

6
rej.



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL VENENO DE AVISPAS
Polistes dorsalis (Fabricius) y Polybia occidentalis
nigritella du Bysson.

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

JOSE AMEZCUA LOPEZ



Asesor de tesis:
Dr. Alejandro Alagón Cano

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
A. RESUMEN	
B. INTRODUCCION	
I. Biología y morfología de las avispas	1
II. Ubicación taxonómica de las avispas estudiadas .	37
III. Distribución geográfica en México de las avispas estudiadas	40
IV. Mecanismos de una alergia inmediata	42
V. Propiedades bioquímicas del veneno de avispas...	61
VI. Propiedades inmunológicas del veneno de avispas.	79
C. MATERIALES Y METODOS	
VII. Fuente del veneno	88
VIII. Materiales	92
IX. Medición de proteínas	92
X. Ensayos enzimáticos	94
XI. Técnicas de purificación	95
XII. Inmunodifusión	98
D. RESULTADOS	
XIII. Extracción del veneno.....	100
XIV. Caracterización del veneno crudo	100
XV. Purificación de la fosfolipasa del veneno de las avispas estudiadas	113
E. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	123
F. BIBLIOGRAFIA	127

Índice de figuras

Figura	Página
1a	4
1b	6
2	7
3	9
4a	11
4b	12
4c	14
4d	15
5a	18
5b	19
5c	20
6	21
7	24
8	26
9	27
10	31
11	41
12	43
13	47
14	49
15	51
16	66
17	84

Figura		Página
18	89
19	97
20	101
21	105
22	106
23	107
24	108
25a	115
25b	116
26	117
27a	118
27b	119
28a	121
28b	122

Indice de Tablas

Tabla	Página
I	52
II	63
III	64
IV	71
V	75
VI	81
VII	82
VIII	93
IX	103
X	110
X*	111
XI	113

PROLOGO.

En esta sección quisiera expresar los objetivos que me propuse alcanzar en el desarrollo de este trabajo. Básicamente estos objetivos son dos:

a) Objetivo experimental. Caracterizar el veneno de - avispas Polistes dorsalis y Polybia occidentalis nigritella y purificar una de las proteínas más importantes desde el punto de vista médico. Esta proteína es una enzima cuya función es la de hidrolizar fosfolípidos.

b) Objetivo informativo. Presentar al lector un breve resumen introductorio sobre aspectos de la biología general - de las avispas, así como sobre la inmunología y bioquímica -- del veneno de estos insectos.

A. RESUMEN

Este trabajo tiene por objeto caracterizar comparativamente el veneno de dos especies mexicanas entre sí (Polistes dorsalis (F) y Polybia occidentalis nigritella du Bysson) y su relación a especies norteamericanas de los géneros Vespula, Dolichovespula y Polistes. Al mismo tiempo se ha emprendido un estudio sobre el efecto de inhibidores de proteasas que puedan ser usados para impedir la degradación de las proteínas que nos interesan. Los estudios comparativos fueron realizados a través de distintos sistemas electroforéticos, cuantificación de enzimas e inmunodifusión.

La acción de inhibidores proteolíticos fue valorada utilizando un substrato insoluble de piel pulverizada con un cromóforo (hidepowder azure). También se estudiaron las posibles acciones deletéreas de los inhibidores efectivos sobre las otras actividades enzimáticas.

La fosfolipasa del veneno de ambas avispas fue purificada a homogeneidad con rendimientos mayores al 80% utilizando 1-(8-carboxietil)-2-hexadecilglicerol- fosforilcolina acoplado a AH-Sefarosa 4B (Rock and Snyder, 1975). La enzima purificada del veneno de avispas Polistes dorsalis (F) es estable en 0.5% de tritón X-100 a pH 8.0, mientras que la fosfolipasa purificada del veneno de avispas Polybia occidentalis nigritella du Bysson no necesita tritón X-100 para conservar su actividad.

B. INTRODUCCION.

i. Biología y morfología de las avispas.

En el orden Hymenoptera se incluye a las avispas, abejas y hormigas. Este orden se divide en dos subordenes, cada uno de los cuales está a su vez dividido en superfamilias. En el suborden Apócrita, (al cual pertenecen las avispas, abejas y hormigas) el segmento basal del abdomen está fusionando con el tórax y separado del resto del abdomen por una constricción; el segmento abdominal que está fusionado con el tórax es llamado propodeum.

En el suborden Sínphyta, el abdómen está ampliamente unido al tórax y casi todos ellos son fitófagos. (Borrer et al., 1971).

En general las avispas varían de tamaño desde microscópicas (especies parásitas) hasta dos pulgadas de largo. Estos insectos son económicamente importantes como parásitos o predadores de plagas dañinas y han sido útiles en el control biológico de estas plagas (Metcalf C.L. y Flint W.P., 1962).

Algunas especies de avispas muestran una organización social compleja como la de las hormigas y abejas y así pueden considerarse como organismos eusociales ya que existe en sus colonias una división de trabajo, hay un traslapamiento de ge-

neraciones, es decir la prole cuida a la progenitora (en el caso de las avispas es la reina), y finalmente todas las castas cooperan en el cuidado de las generaciones más jóvenes (Wilson 1971). Sin embargo entre las avispas hay una gran variedad de comportamientos sociales que van desde las avispas solitarias hasta las eusociales.

A las avispas se les ha dedicado atención desde la antigüedad, Aristóteles hizo uno de los priemros estudios más completos de la biología de estos insectos (Spradvery J.P., 1973). Sin embargo, en cuanto a cantidad de artículos y publicaciones científicas modernas sobre la biología de las avispas, éstas - están dentro del grupo de los himenópteros que menos artícu--los se les ha dedicado (Spradvery J.P., 1973).

Recientemente ha renacido el interés por el estudio de las avispas, debido a su distribución cosmopolita y, a que, -- representan organismos ideales tanto para la investigación, como para la enseñanza de conceptos de taxonomía, anatomía, com--portamiento y organización social.

Dentro de los campos de investigación que se han desa--rollado recientemente con las avispas están la Genética Evolutiva, los aspectos de la Fisiología y Bioquímica de la Comunicación de las avispas, el Control Biológico de Plagas, así como el estudio del veneno de estos organismos, éste último cam--

po tiene importancia en medicina porque el veneno de las avispas (al igual que el de otros himenópteros como abejas y hormi gas) es alérgico, i.e., tiene sustancias que en individuos -- susceptibles desencadenan los procesos de una alergia, de esto último se hablará con más detalle en las siguientes secciones.

La siguiente descripción de la anatomía y fisiología de las avispas está basada en el trabajo de Spradbery (1973).

Morfología Externa.

Cabeza: Las avispas al igual que todos los insectos tie nen el cuerpo dividido en tres partes que son la cabeza, tórax y abdomen. La cabeza está formada de una cápsula muy esclero sada y de escleritos fusionados; en esta estructura se encuen tran los ojos, ocelos, antenas y partes bucales (Fig.1a.) los grandes ojos compuestos de las avispas tienen forma arriñonada y son los responsables de la aguda visión característica de -- las avispas.

Las antenas están compuestas de 12 artejos en las hem-- bras y 13 artejos en los machos. La función principal de las antenas es la recepción de estímulos olfatorios, táctiles, cam bios de temperatura y humedad.

Partes bucales. Los apéndices que forman las estructu--

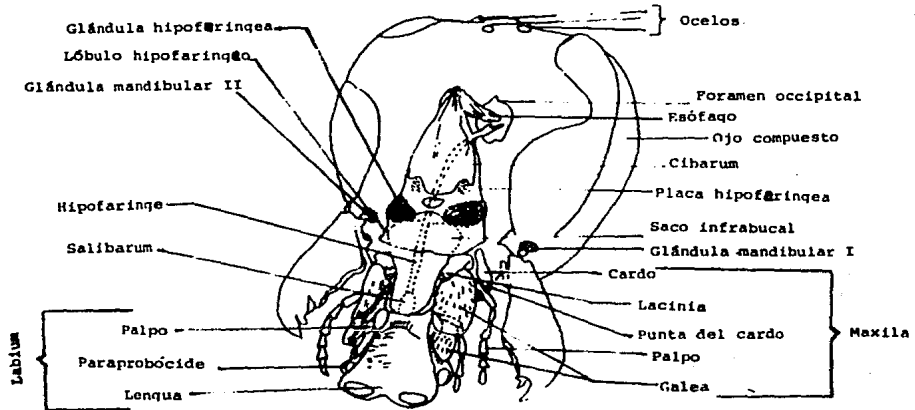


Fig. 1a. Cabeza de una avispa obrera Paravespula germanica. Se indican las partes bucales y glándulas principales.

ras bucales son las siguientes: El labrum, la hipofaringe, maxilas laterales y un sólo labio formando la lengua (Fig.1a), - las partes bucales de una avispa están adaptadas para lamer, - masticar, cortar y sorber, esta condición se considera primitiva dentro del grupo de los himenópteros; si comparamos con las partes bucales de una abeja, sus estructuras están especializadas y altamente modificadas para desempeñar actividades de forrajeo de néctar de las flores (Fig. 1.b), así tenemos que las abejas tienen una proboscide, que les sirve para extraer el -- néctar de las flores. De hecho, la diferencia entre las partes bucales de una abeja y una avispa, nos permite fácilmente reconocer a estos organismos.

Tórax. El tórax está formado de 2 segmentos que son: El protórax anterior, el mesotórax central y el metatórax posterior, con un par de patas unidas a cada segmento. Las alas están unidas a los segmentos meso y metatorácico.(Fig. 2), esta -- parte constituye el principal centro locomotor de una avispa adulta.

Abdomen. Está formado de ocho segmentos de los cuales - el primero está fusionado al tórax. Al resto de segmentos que forman el abdomen se le llama gaster tiene 6 segmentos visibles, mientras que en los machos tienen 7 segmentos visibles - (Fig. 3). Los últimos segmentos (VII y VIII) se han modificado para integrar el mecanismo de picadura en las hembras o los

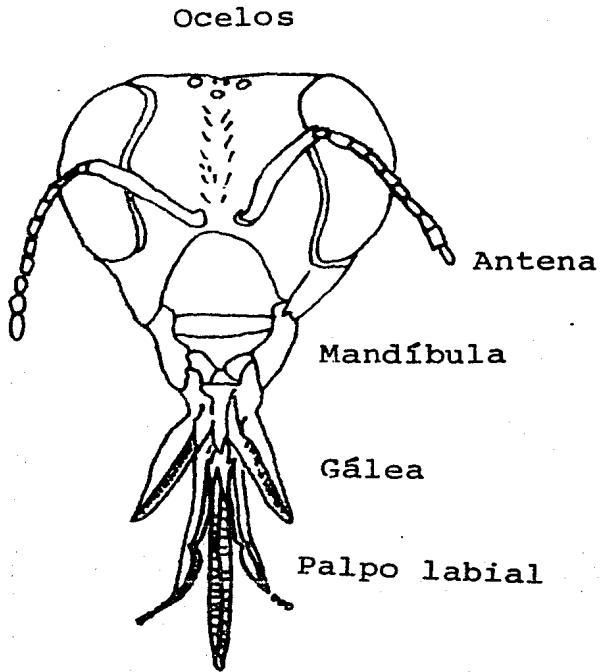


Fig. 1b. Cabeza de una abeja obrera. La proboscide tiene forma tubular especial para succionar néctar.

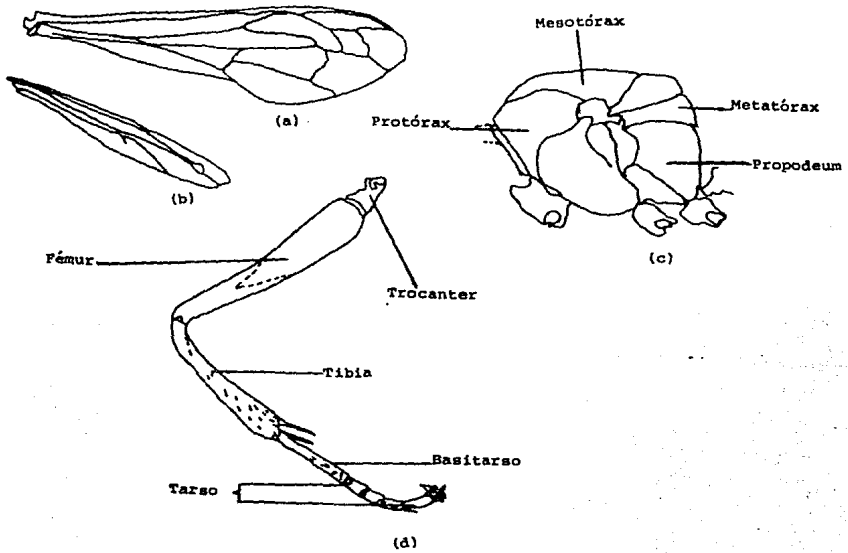


Fig. 2. Tórax y apéndices de locomoción.

- a) Ala anterior.
- b) Ala posterior.
- c) Tórax con sus partes principales.
- d) Pata con sus principales artejos.

genitales en los machos.

Los componentes básicos de cada segmento son los terguitos en la parte dorsal y los esternitos en la parte ventral (Fig. 3).

Aguijón o aparato picador: Esta estructura la veremos con más detalle, debido a la importancia que tienen para el trabajo que hemos realizado. Esta estructura es derivada de los segmentos ocho, nueve y diez del gaster. Cuando está contraído el aguijón queda colocado en una cavidad entre los segmentos 7 y 8. Los grandes escleritos laterales del segmento nueve levantan la parte principal del aguijón los terguitos y esternitos están conectados por una membrana a un lóbulo derivado del décimo segmento.

La parte activa del aguijón consiste de una lanceta lisa derivada de la primera valva la cual está unida a la primera valvífera¹ del octavo segmento.

La lanceta, la cual en alguna especie de avispas es barbada (pero no tanto como en las abejas), está protegida por una vaina, la segunda valva fusionada. Los dos pares de val-

¹ Valvífera: Es una de las placas basales del ovopositor en los himenópteros.

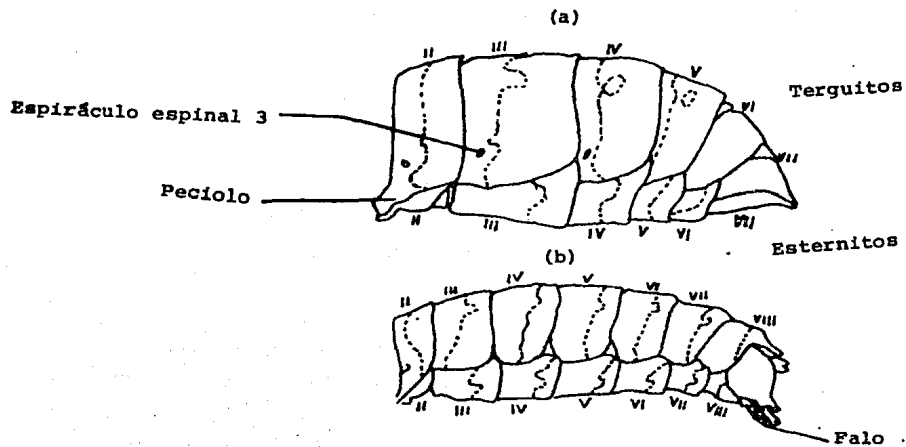


Fig. 3. Vista lateral del abdomen: a) Hembra de Paravespula vulgaris

b) Macho de P. vulgaris

vas, son colectivamente llamado terebra y es ésto lo que penetra en la víctima (Fig. 4a). La tercera valva que se origina de la parte posterior de la segunda región valvífica, forma -- un par de prominentes palpos cibiertos de pelo. La ponzoña -- es utilizada por las avispas como un medio de defensa y no para poner huevos, la ovoposición de las avispas se realiza por medio de una apertura genital anterior a la primera región valvífica. (Fig.5a).

Morfología Interna.

Mecanismos de acción de la picadura. Cuando una avispa pica, ésta entierra la primera y segunda valva (lanceta y vaina respectivamente) en la piel o integumento de la víctima e -- inyecta el veneno por medio de un canal en la lanceta que se -- abre en la punta de ésta. Los detalles de la picadura se han estudiado principalmente en abejas, sin embargo, los mecanis-- mos básicos son aplicables a las avispas. Cuando una avispa está a punto de picar, la placa oblonga y los palpos del aguijón son dirigidos, de tal manera que quedan expuestas las puntas de las lancetas y la vaina (Fig.4b); estas estructuras son empujadas al interior de la víctima doblando el abdomen. Después del contacto inicial con la epidermis de la víctima la penetración es llevada a cabo por movimientos alternados de la -- lanceta. Los músculos que van desde la placa oblonga a la placa cuadrada se mueven hacia adelante y hacia atrás. Este movil

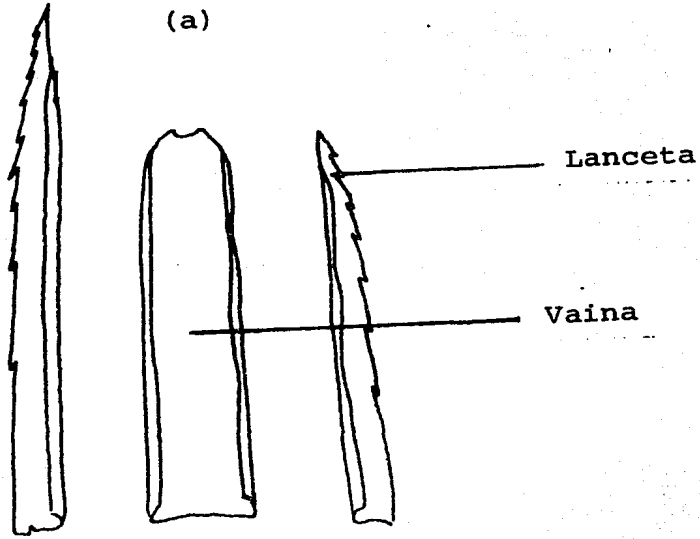


Fig. 4a. Componentes del agujón.

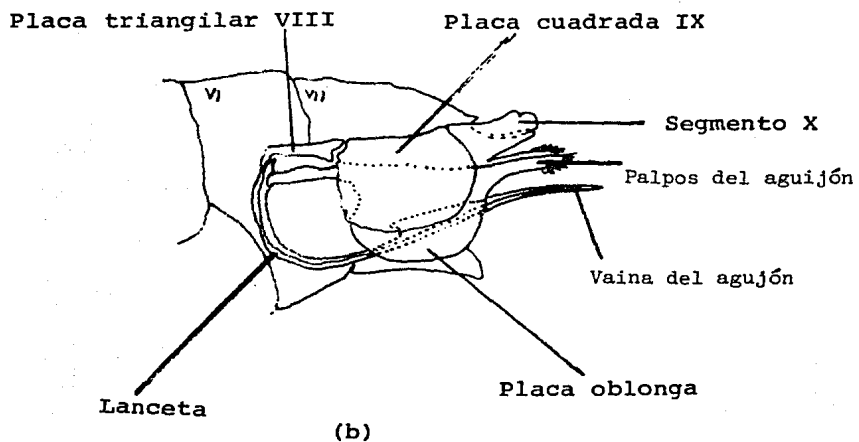


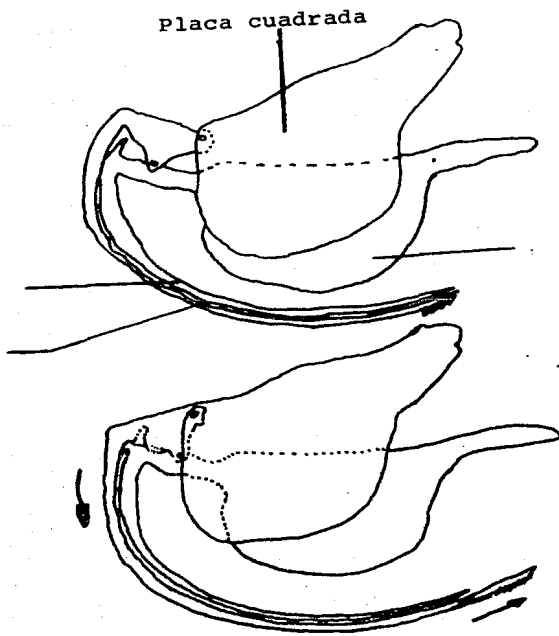
Fig. 4b. Parte terminal del abdomen de una hembra Paravespula germanica que ilustra el aparato picador en su posición de picar. Vista lateral.

miento hace mecer a la placa triangular sobre su articulación con la base de la placa oblonga (Fig. 4c) y así empuja a la lanceta a lo largo de la vaina.

Las lancetas de ambos lados son empujadas a lo largo de la vaina en forma alternada (Fig. 4d), y así resulta la penetración de la punta barbada de la lanceta, ésta tiende a quedarse enterrada por medio de las barbas. Sin embargo las barbas de la lanceta de la avispa son mucho más pequeñas, comparadas con las de la abeja.

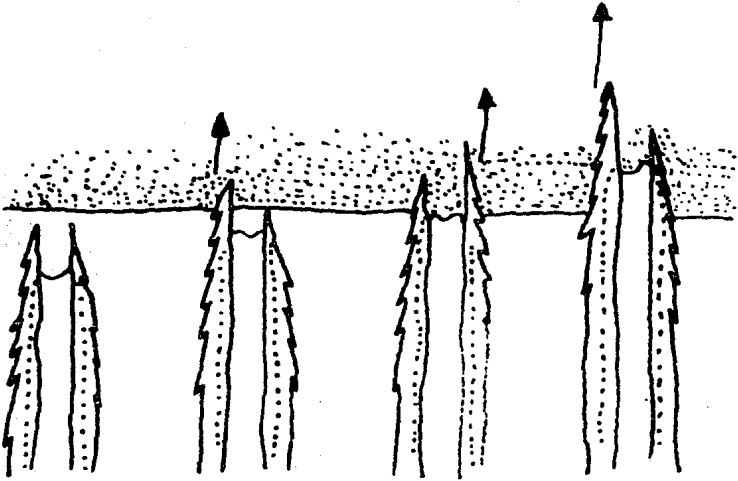
Para hacer más eficiente la penetración de la lanceta, la avispa agarra fuertemente a la víctima con las patas y a veces con las mandíbulas también. Después de que la lanceta entra a la víctima y queda fija al tejido de ésta por medio de las barbas, la segunda lanceta penetra después, enseguida una serie alternada de movimientos que empujan las lancetas, hacen que éstas penetren cada vez más y más profundamente en el cuerpo de la víctima. Los movimientos de las lancetas ayudan a sacar el veneno del saco venenoso o reservorio de veneno. La contracción de los músculos que rodean el reservorio de veneno también ayudan a la emisión del veneno. Cuando finalmente, el veneno es inyectado el aguijón es retirado, moviendo el abdomen hacia arriba y ayudándose por los movimientos de las lancetas que se acabaron de describir. Normalmente no hay autotomía ² del aguijón en los vespinae, ya que las ---

2 Autotomía: Es un proceso por el cual ocurre la auto-amputación de ciertas estructuras bajo condiciones de stress.



(c)

Fig. 4c. Mecánica de la acción de picar.



(d)

Fig. 4d. Modo probable de la penetración del aguijón en la víctima.

barbas no son lo suficientemente largas para que las lancetas se queden enterradas en el tejido de la víctima con el resultado de la auto-amputación del aparato venenoso.

El veneno de las glándulas venenosas es almacenado en - un gran reservorio (fig. 5a) el cual descarga en el interior - de un bulbo formado por la segunda valva fusionada (Fig.4b) y de aquí el veneno es pasado a lo largo de un conducto formado por la segunda valva (vainas) y la primera valva (lanceta). El veneno es producido por las glándulas ácidas mientras que una glándula accesoria, la glándula alcalina probablemente produce un lubricante para hacer más eficiente la picadura (Fig. 5a).

Sistema Reprodutor. En general tanto en hembras como en machos, nos encontramos con un par de conductos, ámbos desembocan a un conducto medio que finalmente llega a los genitales externos (Fig. 5a, 5b y 5c).

Aparato reproductor femenino (Fig. 5a): Está formado por un par de ovarios los cuales constan cada uno de 3 a 5 pares de ovarios; cada ovario desarrolla un oocito u óvulo junto con células nutritivas. El número total de oocitos en la etapa madura puede alcanzar un número tan grande como 3600 oocitos en ámbos ovarios. Los ovarios se comunican a un par de oviductos los cuales se fusionan para formar la vagina. El órgano almacenador de espermatozoides, la espermateca, se comuni

ca dorsalmente con la vagina. La espermateca está formada de una cápsula semitransparente que tiene un ducto espermático el cual se comunica con la vagina (Fig. 5a).

Aparato reproductor masculino (Fig. 5b y 5c). Los testículos están formados de folículos finamente empacados, cubiertos por membrana peritoneal que forma el escroto.

En esta región se realiza la espermatogénesis; las vías deferentes finalizan en una gran vesícula seminal de color amarillo que almacena a los espermatozoides. De esta vesícula -- parte un par de ductos eyaculatorios que finalmente llegan a la base del falo, y entonces se fusionan en un sólo ducto medio que pasa a través del pene.

Sistema digestivo. El aparato digestivo de las avispas consta de un tubo el cual tiene 3 partes que pueden diferenciarse por su anatomía y su función, estas 3 partes son: intestino anterior o estomodeo, el intestino medio y el intestino posterior o proctodeo (Fig. 6).

El intestino anterior consta de boca, faringe, esófago y molleja o buche. El buche es un ensanchamiento del esófago, es un órgano reservorio de fluidos utilizado principalmente - por avispas forrajeras para almacenar carbohidratos o agua y es equivalente al estógeno de miel de la abeja.

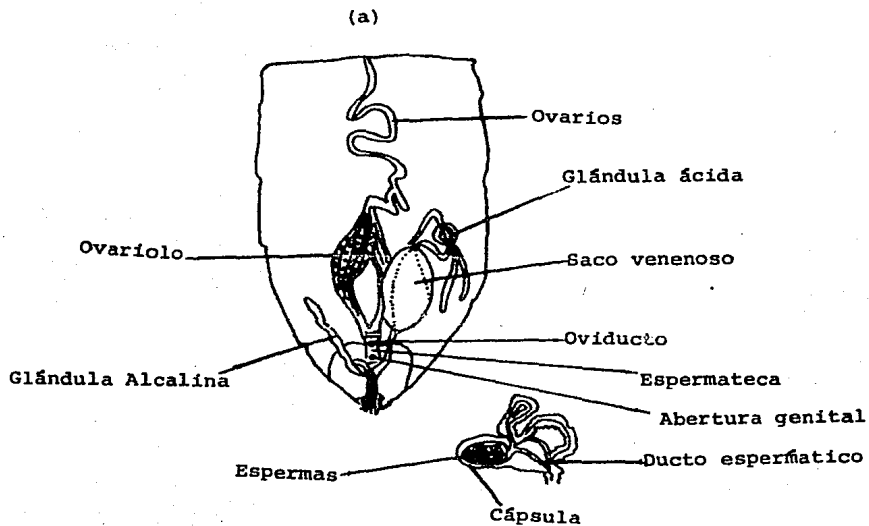
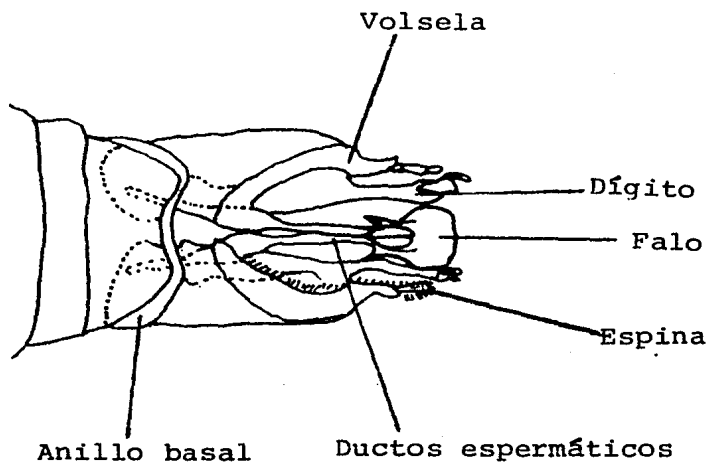


Fig. 5a. Sistema reproductor de una reina de Paravespula germanica..
Anexo: detalle de la espermateca.



(b)

Fig. 5b. Parte terminal del abdomen de un macho de Paravespula vulgaris para ilustrar el aparato reproductor. Vista lateral.

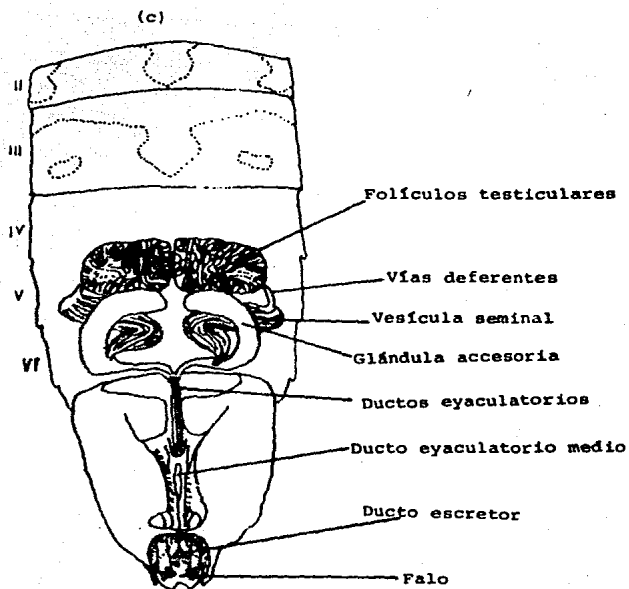


Fig. 5c. Sistema reproductor masculino de Paravospula germanica.

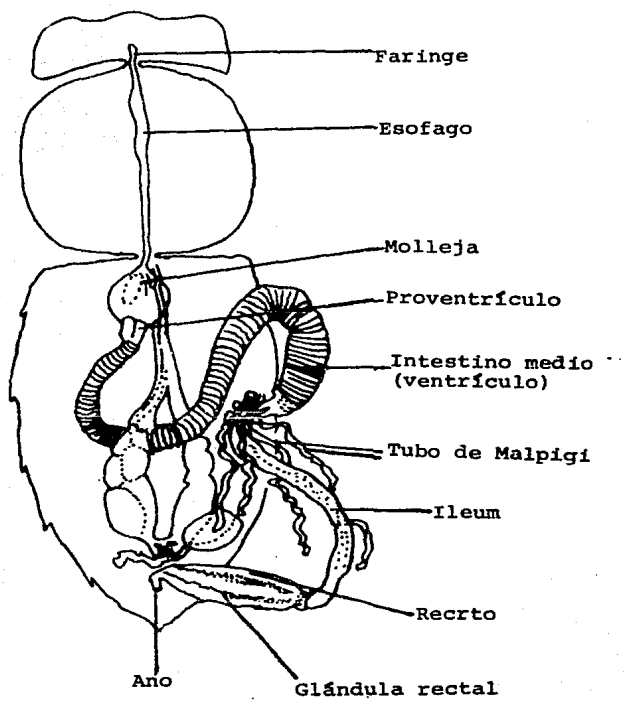


Fig. 6. Sistema digestivo de Paravespula germanica (reina).

El intestino medio es un tubo que tiene músculos que forman anillos. En esta parte se lleva a cabo la digestión, por lo que aquí se producen las enzimas y ácidos digestivos, también es el área de absorción de alimentos. Las delicadas paredes del intestino medio están protegidas de una capa de quitina (la membrana peritrófica) que evita que haya daños por las partes duras e indigestibles de las presas.

El intestino posterior conduce los alimentos no digeridos hasta el exterior a través del intestino grueso o ileum en esta parte del sistema digestivo se originan los tubulos de -- Malphigio, los cuales son de diámetro pequeño y muy largos y numerosos. Su función principal es la de excretar nitrógeno - en forma de ácido úrico insoluble y además absorber agua y sales minerales.

Sistema endócrino. Las glándulas endócrinas y exócrinas en las avispas están involucradas en funciones tales como las de alimentación y comunicación. Muchas de las glándulas de las avispas pueden ser homologadas con las de abeja melífera. Las glándulas relacionadas con la alimentación son iguales para machos y hembras y están localizadas en la cabeza y en el tórax, estas glándulas son : Glándulas mandibulares, --- glándulas hipofaríngea y glándula torácica.

La glándula mandibular funciona principalmente como una glándula salival, produciendo lubricantes para mantener en ---

buen estado a las mandíbulas. (Fig. 1a).

La glándula hipofaríngea, ésta es una de las más grandes y está localizada en la cabeza (Fig. 1a). La función de esta glándula en las avispas no se conoce, sin embargo una glándula comparable en la abeja de miel tiene la función de producir el componente proteico del alimento de larvas, y las enzimas involucradas en la producción de miel tales como la invertasa y la glucosa oxidasa.

La glándula torácica (fig. 7). Esta glándula ocupa una amplia región de tórax y tiene dos grandes ramas en forma de acinos. Las secreciones de la glándula se acumulan en el lumen de la glándula, del cual parte numerosas ramas que llegan a la cabeza, a través del cuello y, finalmente, desembocan en una cámara, el salibarum, en la parte distal de la hipofaríngea. La secreción de esta glándula es principalmente agua pura que sirve en la fabricación del material con el que se hacen los nidos.

Dentro del abdomen las hembras tienen ciertas glándulas que los machos no tienen. La glándula que produce el veneno de las hembras mide entre 1.5-2.5 cm y se le llama glándula ácida (Fig. 5a) la cual está a la altura del VI esternito gastral. Otra glándula importante encontrada en el abdomen (sobre el esternito VI) es la glándula Van der Vech, la cual está

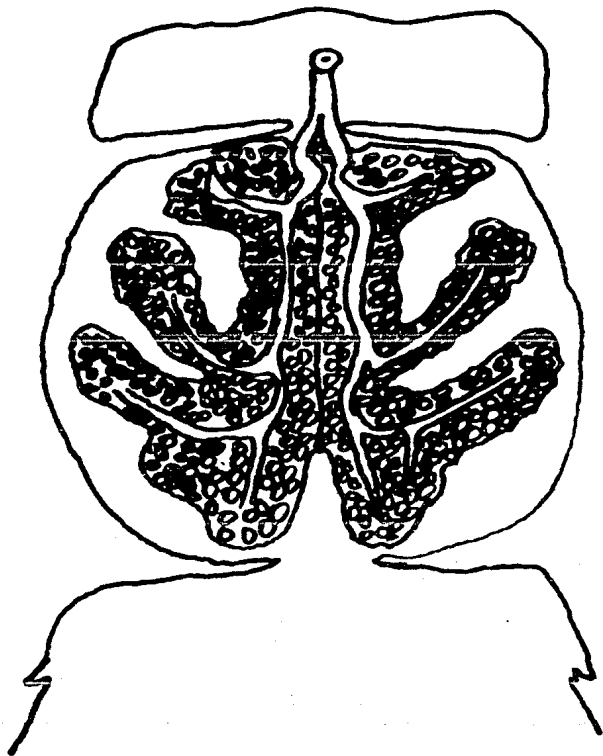


Fig. 7. Glándula torásica de Paravespula germanica (obrero).

más desarrollada en la reina que en las obreras.

La función de esta glándula posiblemente sea la de secretar una feromona volátil que impregna a la avispa obrera de una misma colonia y que sirve como señal de reconocimiento.

Sistema nervioso. El sistema nervioso central de una avispa está constituido por una cadena ganglionar, que está a lo largo del cuerpo y finaliza en el cerebro. De cada ganglio parte una serie de fibras nerviosas, que comunican a los apéndices (Fig. 8). El cerebro está formado por 4 partes principales, el protocerebro formado por el corpus pedunculatum -- (cuerpo pedunculado) y el cuerpo central; los lóbulos ópticos, deutocerebro con los lóbulos antenales, y el tritocerebro (Fig. 9).

Las funciones de las diferentes partes del cerebro no se conocen todavía y las analogías con el cerebro de los vertebrados no es útil. Sin embargo no se ha observado que los cuerpos pedunculados están más desarrollados en las hembras obreras que en la reina o en los machos, y su función principal es la de memorizar y desarrollar patrones de comportamiento social complejos.

Ciclo biológico de las avispas sociales. La vida de una colonia de avispas, se puede dividir en dos grandes etapas

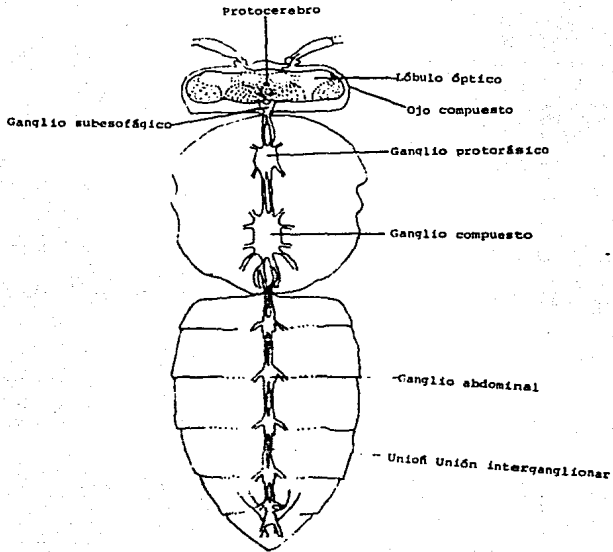


Fig. 8. Sistema nervioso central de Paravespula germanica (reina)

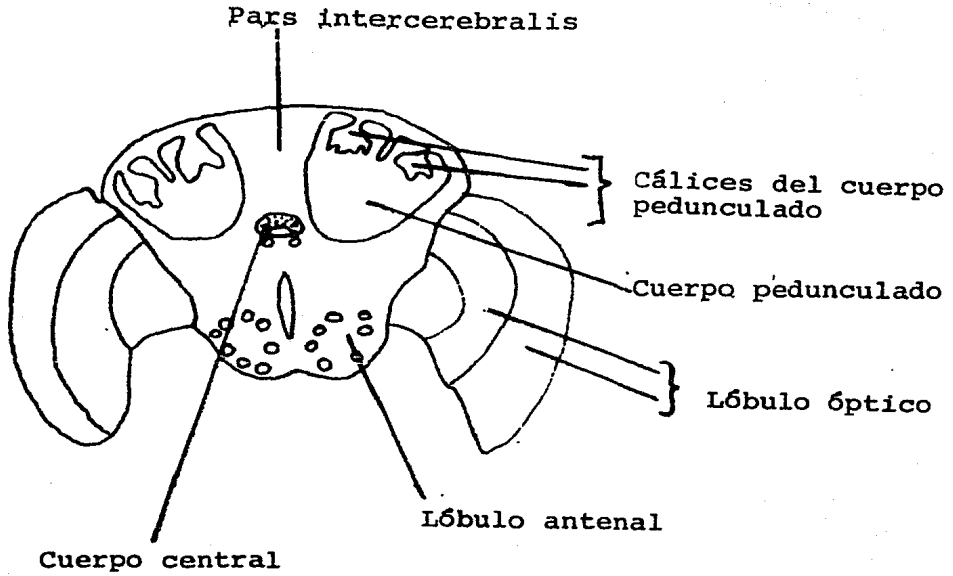


Fig. 9. Sección transversal del cerebro de una avispa obrera Vespula sp.

que son: etapa de hibernación y la etapa de post-hibernación. Estas dos etapas son muy distintas debido a la actividad que se desarrolla en ellas. En la etapa de hibernación no hay actividad social y la única que puede sobrevivir es la reina, - es decir, es la única avispa de una colonia que sobrevive al invierno, en la etapa de post-hibernación se desarrolla la actividad social principal debido a que en esta etapa nacen las avispas obreras originadas por la reina. La etapa de hibernación comienza poco antes de que el invierno llegue y se cree que es la disminución de las horas luz, lo que hace que la -- reina empiese a tener el comportamiento de hibernación, el -- cual comienza con la búsqueda de un lugar para hibernar, este lugar puede ser desde el propio nido hasta agujeros bajo la - tierra, una vez seleccionado este lugar, la avispa se mete en este sitio y disminuye su metabolismo al máximo. Las avispas reina tienen cuerpos grasos, los cuales son tejidos especiali- zados en el almacenamiento de grasas y azúcares que llegan al canzar hasta el 20% del peso fresco de la avispa, mientras -- que en las obreras este tejido sólo alcanza el 4% del peso -- fresco. Esto es una característica que permite a la reina so- brevivir durante el invierno. El período de hibernación dura hasta 6 meses.

Etapa de post-hibernación. Esta etapa es la que más - eventos tiene y donde el grado de sociabilidad puede ser reco- nocido. Al iniciarse la primavera las avispas reinas despier- tan de su letargo, y lo primero que hacen es alimentarse, ya-

que durante la hibernación pierden hasta un 30% de su peso to tal, una vez alimentadas, buscan un sitio adecuado para su ni do; generalmente realizan inspecciones de muchos lugares an-- tes de decidir cual lugar es el idóneo para fundar una colo-- nia, las características de los lugares elegidos por las avis pas para construir un nido son muy variadas y van desde luga-- res my ocultos hasta lugares tan expuestos que los nidos pue-- den ser fácilmente molestados por animales domésticos o el -- hombre. A pesar de esto último se ha observado a las avispas reina luchar a muerte por el lugar de anidación. Las avispas reinas a veces antes de fundar una colonia viajan muchos kiló-- metros en grupos formados por miles de avispas reina, estas -- grandes migraciones contribuyen a la dispersión por el plane-- ta de las avispas. Una vez elegido el lugar para fundar una-- colonia la avispa reina recolecta el material con el que cons truye las primeras celdas de su nido, en las cuales deposita-- los óvulos que son diploides ya que la reina fue fecundada an tes de que comenzara a hibernar, cuando estos óvulos se desa-- rrollan en larvas la misma avispa reina se encarga de buscar-- alimento para estas larvas, finalmente pasan al estado de pu-- pa y de éste al adulto. Cuando emergen las primeras obreras-- adultas éstas se encargan de la alimentación, limpieza y cons trucción de las celdas en el nido. Cuando aparecen las obre-- ras se ha alcanzado una etapa de madurez en la colonia. Las-- condiciones físicas dentro del nido, son bastante constantes-- la temperatura se mantiene aproximadamente a 30°C, a pesar de que las avispas son seres poiquilotermos. Para controlar la-- temperatura dentro del nido, el cual es construido con un ma--

terial aislante y además tiene numerosos huecos llenos de aire que sirven de aislantes; otra característica de estructura del nido que ayuda a controlar la temperatura es una envoltura que cubre a todo el nido (Fig. 10), el grosor de esta envoltura depende de si el nido está colocado en una parte aérea o en una parte aislada de la intemperie. El metabolismo de las larvas y adultos genera el suficiente calor para aumentar la temperatura, además los adultos mueven las alas para generar calor, de hecho el movimiento de las alas sirve para disminuir o aumentar la temperatura. Cuando quieren disminuir la temperatura las alas se mueven de tal manera que producen corrientes de aire, mientras que cuando las avispas quieren aumentar la temperatura las alas no producen corrientes de aire al moverse. La actividad de forrajeo es importante para controlar la temperatura, ya que cuando la temperatura es muy alta, las avispas colectan agua la cual es descargada sobre las paredes de la celda de las larvas.

El material con el que está construido el nido es un material quebradizo parecido al papel, que es fabricado con corteza de árboles y madera de bejucos, estos materiales son masticados por las obreras para construir el nido.

La alimentación y el forrajeo de las avispas está afectada por dos principales factores: Factores limitantes y factores estimuladores del forrajeo. Los factores limitantes son -

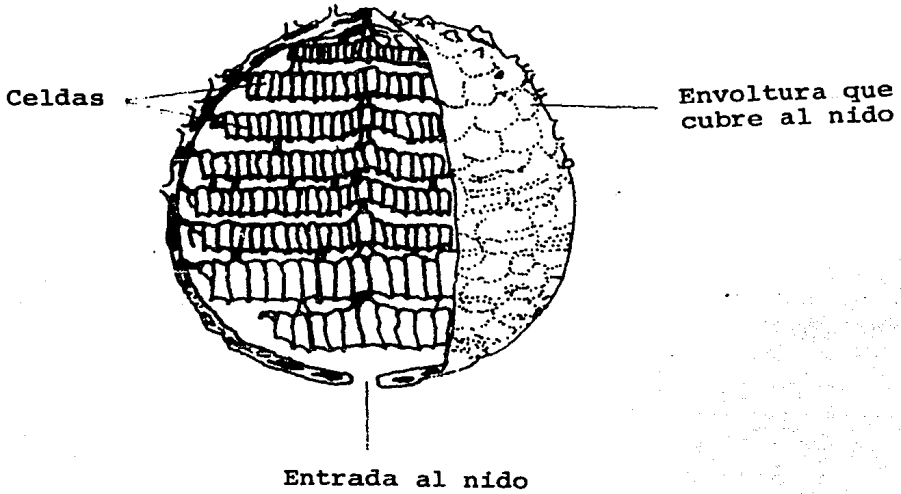


Fig. 10. Nido de avispa Paravespula germanica.

tres: La temperatura, la intensidad luminosa y factores sociales de la colonia, tales como el estado de madurez de ésta, - entre más joven sea la colonia la actividad de forrajeo es mayor, la ausencia de la reina hace que las obreras dejen de colectar alimentos para las larvas y de que no muestren interés por reparar el nido; si artificialmente se aumentan las larvas, colocando un pedazo de nido que tenga celdas con larvas - la obreras hacen más viajes para recolectar alimentos.

Las fuentes alimenticias de las avispas las constituyen flores y artrópodos, por lo que los azúcares son obtenidos de flores y de las excreciones de áfidos y a veces robanmiel de los nidos de abejas. Las flores más visitadas por las avispas pertenecen a la familia Umbelliferae, las cuales tienen nectarios expuestos. La fuente de proteínas principal de las avispas la constituyen otros insectos tales como los que pertenecen a los órdenes Permaptera, Orthoptera, Odonata, Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera (por ejemplo -- Apis mellifera L. inclusive avispas como las del género Vespa) y Diptera. La captura de la presa se lleva a cabo por medio de vuelos rápidos a poca altura del suelo, la avispa se vale principalmente de la vista para localizar a la presa, una vez hecho esto, en pleno vuelo rapta a la presa, y le corta la cabeza con sus mandíbulas para matarla. Las avispas eusociales no utilizan su ponzoña para matar a la presa, sólo en los casos donde la presa es demasiado grande. Las avispas generalmente cortan las alas y las patas de las presas y sólo aprove-

chan el tórax y el abdomen.

Las avispas tienen gran capacidad de aprendizaje, --- ellas aprenden a capturar insectos y a localizar fuentes de - néctar de sus primeros viajes de forrajeo, por lo que una -- avispa adulta es más experimentada que una joven que apenas - comienza a hacer viajes de recolecta de alimentos.

Sin embargo las avispas, no tienen capacidad de comuni- car a otras los lugares donde hay alimentos (como ocurre en - las abejas), por lo que las avispas explotan fuentes muy loca- lizadas y pequeñas de alimento.

La división del trabajo en las avispas es con base al- comportamiento, es decir que no hay especialización morfológi- ca en las obreras para las que realizan actividades tales co- mo forrajeo, defensa del nido, cuidado de las larvas, limpie- za del nido, etc.. Así una sola avispa puede desempeñar todas estas funciones. Sin embargo la única actividad para la cual si hay modificaciones morfológicas es la actividad reproducto- ra, tanto la reina como los machos tienen estructuras en los- últimos segmentos del gaster que sirven para la función repro- ductora (Fig. 5a y 5 b).

Las necesidades alimenticias de las avispas adultas y- las larvas son muy diferentes. Las avispas adultas se alime,,

tan de líquidos principalmente, esto puede deberse a que el esófago en el adulto es muy estrecho. En cambio las larvas se alimentan de sólidos y líquidos, en esta etapa el esófago no es tan estrecho como en el adulto.

Organización Social. Una comunidad social en los insectos está formada por la asociación de una hembra progenitora, y su descendencia. En esta asociación hay una cooperación estrecha para la reproducción y el cuidado de las larvas. La interacción entre la hembra progenitora o reina, las obreras y las larvas determina el nivel de sociabilidad, el grado de interacción y finalmente la eficiencia del grupo como unidad reproductiva. Las jerarquías sociales en las avispas no son muy marcadas, podríamos decir que existen solamente dos castas, la de la hembra reproductora o reina, y la de las obreras, la diferencia entre una obrera y una reina no es muy clara -- morfológicamente.

Existen avispas Polistes cuyas colonias son fundadas por varias hembras fértiles de las cuales sólo una se comportará como reina y las demás como obreras a pesar de que su aparato reproductor sea completamente útil para poner huevos fertilizados. Se ha considerado que uno de los principales factores que puede regular el que una hembra sea o no reina es el grado de actividad y desarrollo de sus ovarios, entre más grandes y desarrollados sean éstos, es muy probable que --

la hembra logra imponer su jerarquía sobre otras hembras fértiles cuyos ovarios se hallan menos desarrollados. Una vez que una hembra logra su dominancia el patrón de su comportamiento se altera, reduce su actividad de forrajeo, la actividad de ovoposición sólo se lleva a cabo por ella y recibe una gran cantidad de alimento regurgitado de las obreras.

Cuando una colonia de avispas Polistes es fundada por una sola hembra, ésta transmite a su descendencia su jerarquía. En una colonia de avispas, las relaciones entre los adultos y las larvas y entre los mismos adultos es a nivel trófico principalmente es decir hay un intercambio de alimento digerido en ambas direcciones, por ejemplo las larvas producen una secreción que es aprovechada por las obreras y parece inducir a éstas últimas a alimentar a las larvas. William Mortimer Wheeler, en 1918, propuso la palabra "Trofolaxis" para describir este intercambio recíproco de alimento en las avispas, en la actualidad el significado del término trofolaxis se ha ampliado para indicar que hay un mutuo intercambio no solo de alimento sino de cualquier substancia o estímulo sensorial.

La función de la reina en una colonia de avispas no es sólo la de poner huevos, sino que su presencia es vital para mantener y promover todas las actividades sociales que permiten a la colonia funcionar como una comunidad. La reina logra esto por medio de feromonas, las cuales producen patrones

de comportamiento en las obreras, tales como forrajeo, construcción y reparación del nido, etc.. Cuando una reina, se re mueve artificialmente, las obreras ya no realizan sus actividades, inclusive pueden abandonar el nido; sin embargo al faj tar la reina es posible que alguna hembra empiece a ovipositar, pero toda su descendencia será de machos ya que sus huevos no estarán fertilizados por esperma. Se ha demostrado -- que las reinas de Paravespula vulgaris producen una substancia inhibidora del desarrollo de ovarios en las hembras obreras, por lo tanto en las avispas la jerarquía depende básicamente de su capacidad para producir feromonas más que de su agresividad.

Desintegración de una colonia de avispas. Como ya se ha mencionado, la única avispa de una colonia que sobrevive - al invierno es la reina, por lo tanto cuando se aproxima esta estación, empiezan a nacer "reinas jóvenes" y machos. Las -- "reinas jóvenes" suelen volar cerca del nido, por el contrario los machos al abandonar el nido nunca regresan a él, pero suelen merodear las entradas de los nidos en espera de la salida de las reinas jóvenes. Una vez que nacen machos y reinas jóvenes, la reina fundadora de la colonia muere, o deja - de funcionar como el pilar que sostiene la organización social de la colonia, por lo que la desintegración social comienza, por el hecho de que muchas obreras abandonan el nido formando agregaciones que sólo duran unas semanas antes de mo rir, se deja de alimentar a las larvas, la actividad de forra

jeo cesa por completo y las obreras que permanecen en el nido, empiezan a destruirlo sacando a las larvas de sus celdas y arrojándolas, finalmente el nido puede ser totalmente destruido por otros organismos.

Comportamiento de apareamiento. Antes de que comience la fase de desintegración social, las hembras reinas y los machos maduran sexualmente y se aparean. El apareamiento -- tiene lugar después de un cortejo realizado tanto por hembras como por los machos, este cortejo consiste en que los machos y las hembras comienzan a volar a poca altura. Los machos -- vuelan constantemente describiendo trayectorias en forma de ocho. La fecundación de las hembras reina ocurre cerca de la entrada de los nidos. Una vez fecundadas las hembras, éstas emprenden un viaje en busca de un buen lugar donde hibernar y en la próxima primavera fundan una nueva colonia.

II. Ubicación taxonómica de las avispas estudiadas.

Las avispas cuyo veneno fué estudiado en el presente -- trabajo fueron determinadas por el Biól. Ricardo Ayala del -- Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, UNAM, y se clasifican del modo siguiente:

Ambas especies pertenecen a los Artropoda, Insecta, -- Hymenoptera, Vespoidea y Vespidae pero Polistes Dorsalis (Fabricius 1770) es de la tribu Polistini y Polibya (Mirapetra)-

occidentalis nigritella duByson, 1905 es de la tribu Polybini.

Esta clasificación es la que propuso Richards en 1978.

A continuación ponemos una breve descripción técnica de las avispas estudiadas, siguiendo el trabajo de Richard O. W. 1978.

Polistes dorsalis (Fabricius 1770)

Vespa dorsalis Fabricius 1775

Polistes fuscatus neotropicus. Begaert 1940

Polistes hunteri neotropicus. Bohart 1949.

Hembra: Típicamente ferruginosa con pleurón y propodeum principalmente negro algunas veces ferruginoso. Comúnmente hay una mancha negra que rodea a los tergitos gastrales 1-3 son más o menos negros. El proepisternum, coxae, bases de los fémora y muchos de los esternitos gastrales son negros, pero en algunas especies del sur de los E.U. estas partes son ferruginosas, y se agrupan en una subespecie llamada californiana, la cual difiere en que la banda amarilla propodeal es más amplia. En general las siguientes estructuras son amarillas: Las mandíbulas, el clypeus (excepto en un área dorsal pequeña), órbitas internas, espacio malar la amplia banda general la quilla pronotal, el margen posterior, la parte media del escutelum y metanotu, valvas y dos amplias bandas sobre -

el propodeo, una mancha escrobal, la mancha apical de los femora, las bandas de los terguitos gastrales 1 a 4 y los esternitos 2,3,4 y 5. tegula amarilla con una mancha testácea --- Alas brillantes grisáceas la región costal amarilla-café. Placa basicostal más o menos amarilla.

Macho: igual que la hembra pero con cara amarilla, marcas en la frente y coxa media amarilla, el tórax tiene una región más negra.

Polybia occidentalis nigritella, du Buysson 1905.

Polybia occidentalis variedad nigritella

Polybia fastidiuseulata variedad nigriceps Zavattori--
1906.

Polubia occidentalis subespecie nausucana Richards --
1951.

Hembra: Mandíbula con mancha basal o completamente café, escapo antenal brillante y de color café oscuro o una pequeña mancha amarilla en la base. Clipeo completamente amarillo, o amarillo con una amplia banda central de color oscuro o con lados y el margen ventral amarillos. o completamente negro. Gena completamente negra. El pronoto con banda moderadamente amplia de color amarillo. Mesoscutum negro, escutelo negro, el propodeo y su cara posterior completamente negros.

Macho: Los machos tienen un clípeo más angosto que -- las hembras con una pubescencia plateada y hay también un -- "polvo" plateado sobre la parte frontal de la frente. La gena es angosta sin margen. El patrón de su coloración es como sigue: Mandíbulas con una mancha amarilla, escapo antenal café, clípeo completamente amarillo, gena completamente negra, pronoto con una banda amarilla y amplia en posición posterior. Mancha en frente del zurco escrobal conspicua. Mesoscutum negro. Escutelo con la mitad anterior amarilla. Metanoto con la mitad anterior amarilla. Propodeo con dos pequeñas manchas amarillas y los terguitos gasterales 1 a 16 -- con bandas apicales amarillas.

III. Distribución geográfica en México de las avispas estudiadas.

Richard O.W. 1979 propone la siguiente distribución geográfica en América de las avispas que en este trabajo se han estudiado.

Polistes dorsalis (F), estas avispas se encuentran en E.U. en los estados de Colorado y Nuevo México. En México -- en los estados de Oaxaca, Puebla y Veracruz. En todo Guatemala y Honduras.

En la Fig. 11 se muestra la distribución de estas -- avispas en México.

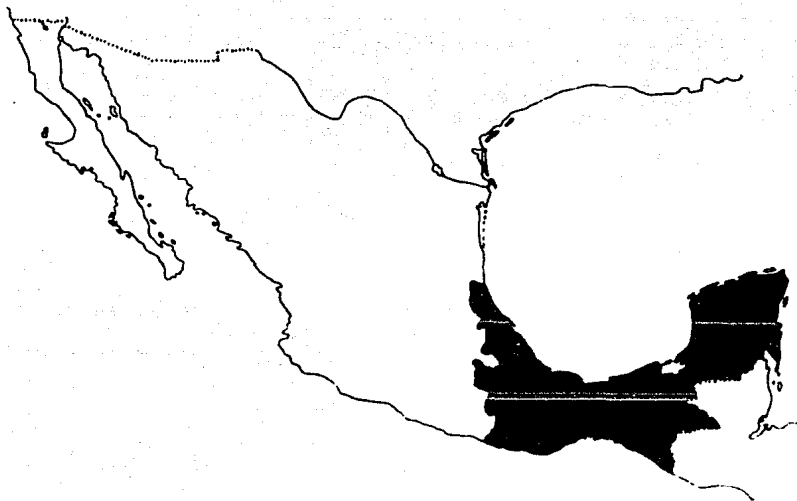


Fig. 11. Distribución geográfica en México de la avispa *Polistes argenteus* (F.).

Polubia occidentalis nigritella du Buysson 1905. Estas avispas se encuentran en E.U. en los estados de Arizona, Nogales y Texas. En México se encuentran en los siguientes estados: Campeche, Chiapas, Colima, D.F. Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán.

También se encuentra en los siguientes países Centro -- americanos: Guatemala, Belice, Honduras, Salvador, Costa Rica y Nicaragua. En la Fig. 12 se muestra la distribución de estas avispas en nuestro país.

IV. Mecanismo de una alergia inmediata.

El veneno de las avispas puede producir alergias en individuos predispuestos genéticamente a presentar esta reac--ción inmunológica ante ciertos antígenos.

A los antígenos que pueden inducir alergia (o hiper--sensibilidad) ya sea inmediata o retardada se les llama alergenos (King T.P. 1976). En este trabajo solo hablaremos de la alergia inmediata, debido a que los componentes del veneno de avispas son antígenos que principalmente producen alergias inmediatas.



Fig. 12. Distribución geográfica en México de la avispa *Polybia occidentalis nigritella* du Buysson.

Una forma de alergia inmediata en el hombre es la anafilaxia la cual incluye manifestaciones tales como la fiebre de heno, asma y urticaria. Esta forma de alergia también se conoce como atopia. Hay muchas fuentes medio ambientales de alergenitos atópicos tales como el polen de herbáceas y ciertos árboles, la caspa de los animales, hongos, insectos, alimentos, medicinas y recientemente algunos detergentes que contienen enzimas bacterianas.

Mecanismos de una alergia inmediata: Este tipo de alergia es provocada principalmente por anticuerpos de la clase - IgE (inmunoglobulinas E). La concentración promedio de IgE - total en el suero sanguíneo de individuos alérgicos es de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ mientras que para individuos normales es de sólo la -- quinta parte de este valor (0.3 $\mu\text{g/ml}$) King T.P. 1976).

Ahora bien se sabe que cuando una sustancia extraña (antígeno) entra a nuestro cuerpo, se producen anticuerpos - contra esta sustancia extraña, como un medio de defensa, - las personas normales producirán principalmente anticuerpos - del tipo IgG, en cambio las personas alérgicas producirán an- ticuerpos IgE; es necesario decir que no todos los antígenos provocan la formación de anticuerpos IgE, en las personas -- alérgicas los antígenos que especialmente provocan la forma- ción de anticuerpos IgE específicos es a lo que se le conoce con el nombre de alergenitos. La mayoría de alergenitos que se-

han caracterizado tienen un peso molecular entre 20,000 y 40,000 sin embargo la formación de anticuerpos IgE contra ciertos antígenos depende principalmente del huésped y no del antígeno. Los anticuerpos de la clase IgE que se producen contra algún antígeno tienen receptores específicos en las células cebadas (Metzger et al., 1982), cuando estos anticuerpos, IgE, se unen a los receptores de las células cebadas por la parte Fc del anticuerpo, una segunda exposición al mismo antígeno hace que este se una a la región variable del anticuerpo IgE (unido a la célula cebada), la unión del antígeno con el anticuerpo IgE provoca la degranulación masiva de estas células, las cuales sueltan al torrente sanguíneo los mediadores de la alergia (Sobotka, K.A. 1982); los mediadores son sustancias químicas que actúan en diferentes tejidos tales como los músculos lisos, glándulas mucosas, vasos sanguíneos, etc..

Estas sustancias provocan broncoespasmos vómitos, inflamación de la piel, nariz y garganta y shock vascular que algunas veces es fatal, también pueden producirse efectos localizados pero esto depende del sitio de exposición al antígeno. En los siguientes párrafos daremos una explicación más detallada de todos los procesos que acabamos de mencionar y que son los que se llevan a cabo en una reacción alérgica de tipo inmediato.

Anafilaxia.

En 1902 Portier y Richet, estudiaron los efectos de los extractos de la anemona de mar en perros. Estos autores encontraron que una segunda inyección de una dosis no tóxica "causaba una violenta e inmediata reacción que terminaba muchas veces con la muerte del animal". Estos investigadores propusieron el término "anafilaxis" para nombrar el fenómeno que observaron. Después similares reacciones fueron producidas en varios animales de laboratorio y en la actualidad este fenómeno está bien entendido. La anafilaxia es producida en los animales de laboratorio por los siguientes métodos: Un antígeno el cual no es tóxico, es inyectado a un animal por una o varias rutas (intravenosa intraperitoneal, subcutánea, etc.) (Fig. 13). Esta primera inyección del antígeno es llamada dosis de sensibilización. Los anticuerpos producidos contra este antígeno (o alérgeno) son del tipo de las inmunoglobulinas E (IgE), estos anticuerpos se unen en las células cebadas y basófilos, por medio de las partes Fc del anticuerpo IgE, como ya hemos dicho las células cebadas y basófilos tienen receptores especiales para este tipo de anticuerpos. (Fig. 14 y la referencia de Metzger H. et al., 1982).

Los anticuepros IgE contra el alérgeno se forman en un período de 2 a 21 días (período latente) en este período también ocurre la fijación de los anticuerpos a la células -

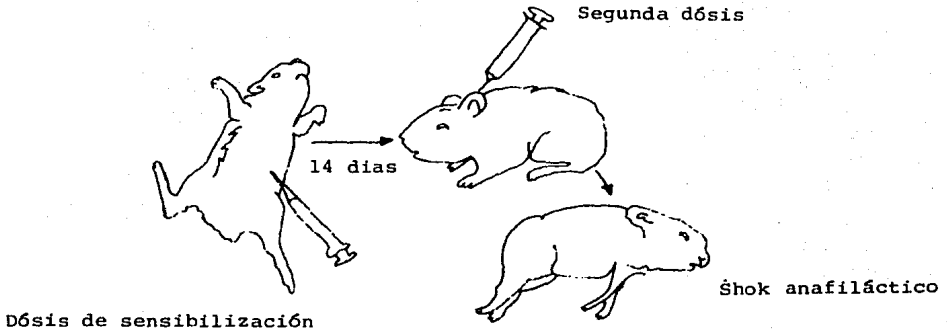


Fig. 13. Anafilaxia producida en un cuyo. Dos semanas después de la sensibilización activa, el desafío con el mismo antígeno (o alérgeno) resulta en una reacción anafiláctica que puede finalizar en la muerte.

cebadas y basófilos. El período latente varía dependiendo de la cantidad, tipo de alérgeno utilizado, ruta de sensibilización y la especie animal. Cuando termina el período latente, una segunda inyección del mismo antígeno (llamada dosis de desafío) es dada intravenosamente o en forma de aerosol. Esta segunda dosis es 5 ó 10 veces más grande que la primera dosis de sensibilización. Después de la segunda dosis hay una reacción antígeno-anticuerpo, pero en este caso los anticuerpos están fijados a las células cebadas y basófilos. El complejo antígeno-anticuerpo actúa sobre las células sobre las que está fijado el anticuerpo IgE, haciendo que las células cebadas y basófilos liberen los mediadores químicos que causan los síntomas patofisiológicos y clínicos característicos de una anafilaxia (Ver Fig. 14 y la referencia de Sobotka K.A., 1982).

La liberación de los mediadores químicos por las células cebadas y basófilos ocurre cuando dos moléculas de IgE son unidas por el alérgeno, el sitio de unión del alérgeno al IgE es por medio de la región Fab del anticuerpo IgE esto se muestra en la Fig. 14. La unión entre los anticuerpos IgE-vecinos anclados a la membrana de células cebadas y basófilos) puede ser llevado a cabo artificialmente también por anticuerpos IgG, dirigidos contra los IgE, produciéndose la liberación de los mediadores químicos de la anafilaxia. Cuando de alguna manera se evita que el alérgeno pueda efectuar-

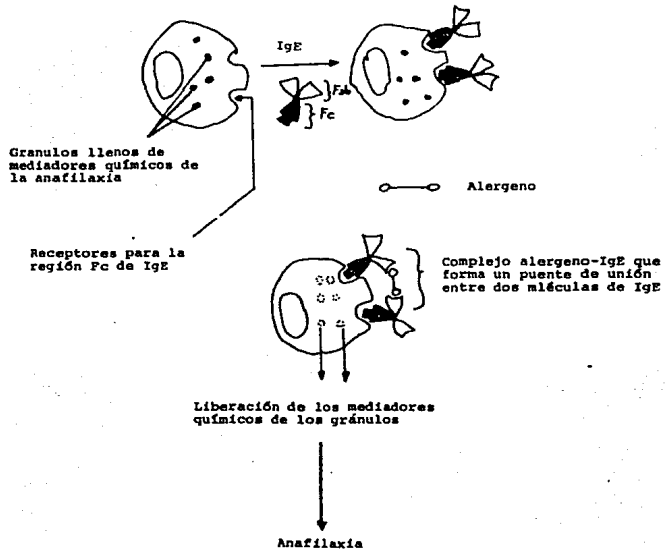


Fig. 14. Mecanismo de la liberación de mediadores químicos de las células cebadas y basófilos por complejos alérgeno- IgE.

uniones entre los IgE vecinos unidos a su vez a las células cebadas y basófilos, no ocurre la liberación de mediadores químicos. Por lo tanto para que ocurra la liberación de mediadores químicos de la anafilaxia es necesario que se formen enlaces - que unan a varias moléculas vecinas de IgE que estén en la superficie celular de basófilos y células cebadas.

Los principales mediadores químicos liberados inicialmente por basófilos y células cebadas son histamina, factor -- quimiotáctico eosinofílico (EcF), substancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A), factor activador de plaquetas (PAF) y heparina. Después que se liberan estos mediadores químicos, - éstos provocan reacciones celulares cuya consecuencia es la liberación de otros mediadores químicos tales como prostaglandinas, 5-hidroxitriptamina (serotonina y quininas). (ver Fig.15).

Entre las muchas propiedades farmacológicas de estas -- substancias están la inducción de la contracción de la musculatura lisa, incremento de la permeabilidad vascular, hipersecreción glandular e hipocoagulación sanguínea (es decir, baja capacidad para detener hemorragias). Los cambios fisiológicos - resultantes de los efectos que hemos mencionado son: Hipoxia, shock, necrosis tisular y hemorragias. La Tabla I enlista las principales manifestaciones de la anafilaxia, órganos afectados en varias especies animales (ver la Fig. 15 y la referencia de Noel, R.R. et al., 1973).

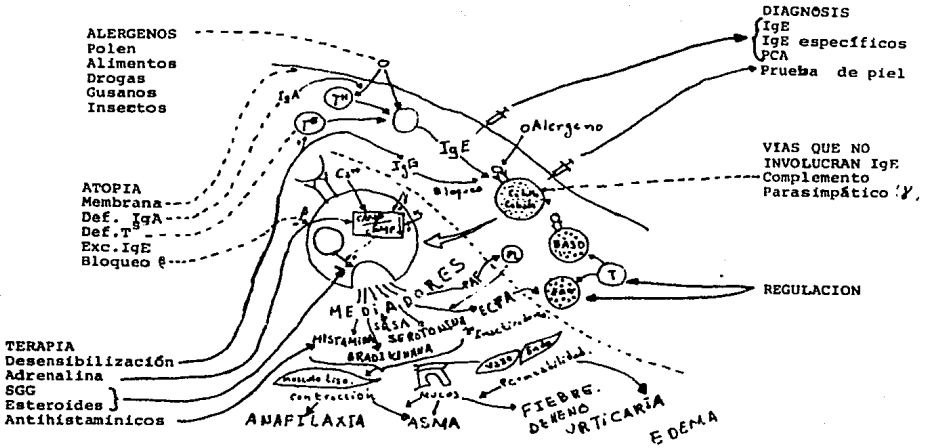


Fig. 15. Principales eventos que ocurren en una reacción alérgica de tipo inmediato.

Tabla I.-En esta tabla se muestran los principales mediadores químicos de la anafilaxia, los órganos blanco de estos mediadores y los síntomas - clínicos de varias especies de laboratorio.

Especies	Organos principalmente afectados.	Síntomas	Mediadores principales
Cuyo	Bronquios	Broncoconstricción	Histamina, SRS-A Serotonina,quinina
Rata	Intestino	Colapso circulatorio, actividad peristáltica	Histamina, SRS-A Serotonina
Ratón	Intestino y pulmón	Dificultad para respirar. Postración.	Histamina Serotonina
Conejo	Venas de los pulmones	Fallas del corazón Paro cardiaco	Histamina, SRS-A Serotonina
Perro	Venas hepáticas	Emesis Diarrea	Histamina

Control genético de la producción de IgE. Diferentes líneas de ratones difieren en su capacidad para producir anticuerpos de la clase IgE, esto indica que la susceptibilidad a la anafilaxia o atopia es heredable. Estas líneas no solo difieren en la producción de IgE sino también en la respuesta inmune en general; así por ejemplo a bajas dosis de antígenos -- (0.1 a 1.0 μ g/ratón) algunas líneas no producen anticuerpos de ningún tipo, mientras que otras líneas producen tanto IgE como otras clases de anticuerpos. Las personas alérgicas similarmente, parecen diferir de personas no alérgicas, principalmente en la capacidad para producir anticuerpos ya sea IgE o de cualquier otra clase en respuesta a la exposición natural a -- cantidades traza de antígenos medio ambientales. Las líneas de ratones que no responden a bajas dosis de antígenos pueden producir IgE y otros anticuerpos en respuesta a altas dosis de antígeno (100 μ g/ratón). Similarmente con una suficiente inmunización todas las personas podrán ser activamente sensibilizadas y presentar síntomas de alergias. Sin embargo hay ciertos antígenos como los extractos de Ascaris sp (un nemátodo parásito del intestino) que aún en dosis bajas es capaz de sensibilizar a un 90% de individuos de una población de ratones para -- que den respuesta alérgica a estos antígenos.

En los ratones el control genético de IgE es así: Una línea de ratón (SjL) parece ser incapaz de formar IgE mientras que es capaz de formar anticuerpos de otras clases. Por lo --

tanto a diferencia de los genes llamados Ir, los cuales controlan la capacidad de producir anticuerpos de cualquier clase, los "genes reagínicos" (llamados así porque a los IgE también se les conoce con el nombre de "reaginas") parecen regular la capacidad para sintetizar únicamente anticuerpos de la clase particular IgE. En cruza de líneas con producción baja de IgE (SJL) con líneas que producen altas concentraciones de IgE producen progenies con la característica de ser altamente productoras de IgE mostrándose así que la producción de IgE es dominante. Sin embargo la progenie de retro-cruzas entre los híbridos segregan en productores buenos, intermedios, y pobres de IgE, esto sugiere que más de un gene controla la producción de IgE.

El significado de las reacciones alérgicas. Las enfermedades mico-bacterianas regularmente producen alergias de tipo retardado a las proteínas bacterianas. Ya que es probable que las reacciones alérgicas ocurran regularmente en sitios infectados por parásitos, esto puede explicar las reacciones de inflamación y necrosis tisular que muchas veces se observa. Las consecuencias de estas reacciones severas depende de su localización. Si la reacción ocurre en la piel y causa ulceración entonces ésto puede dar origen al drenaje de microbios virulentos del cuerpo, pero si se lleva a cabo en la superficie del cerebro o en los bronquios la misma respuesta puede dar origen a una meningitis fatal o a una inflamación de todo

el pulmón.

A pesar de ésto las reacciones alérgicas a antígenos - microbianos (y de otros parásitos tales como *Ascaris sp*), generalmente favorecen a la defensa del huésped por las siguientes razones:

1) Un microbio dado tiene muchos antígenos de los cuales solamente unos están directamente relacionados con la virulencia. Así, de la gran cantidad de reacción antígeno-anticuerpo que ocurre durante una enfermedad infecciosa muy poca resulta en la neutralización específica de substancias que -- causan toxicidad o virulencia. Sin embargo existen muchas otras reacciones que pueden también contribuir indirectamente a la resistencia del huésped; tales como las respuestas alérgicas localizadas (como lo es una alergia de tipo inmediato) al rededor de agentes microbianos o cualquier otro parásito, provocando la acumulación de granulocitos, linfocitos, macrófagos y proteínas del suero sanguíneo que incluyen anticuerpos y proteínas del sistema del complemento, todo esto favorece la destrucción del parásito.

2) Las respuestas alérgicas de tipo retardado están asociadas con la activación de macrófagos, los cuales pueden destruir aquellas bacterias (tales como *M.tuberculosis*) que normalmente proliferan dentro de células fagocíticas. Este -

tipo de reacción alérgica también parece ser más efectiva que el sistema anticuerpo-complemento en la destrucción de células blanco; por ejemplo reacciones con células infectadas que tienen viriones emergiendo de su superficie celular, pueden ser fácilmente eliminadas por macrófagos activados y así eliminan centros infecciosos de enfermedades virales. Por lo tanto al analizar las reacciones alérgicas y pensando en agentes dañinos tales como M. tuberculosis y Ascaris sp., podemos decir que general el proceso alérgico es benéfico para la defensa del hospedero y quizás, por esto la reactividad alérgica ha persistido a través de la evolución del sistema inmune. (Eisen H. N., 1974)

El sistema nervioso autónomo y las alergias. El músculo liso de los bronquios, intestino y vasos sanguíneos está bajo control del sistema nervioso autónomo. De acuerdo con esto, el efecto de los mediadores en las reacciones alérgicas dependen del balance real entre las interacciones del sistema nervioso simpático y parasimpático y además de las condiciones generales de los mensajeros intracelulares (como el AMP y GMP cíclicos). Los receptores del sistema nervioso autónomo no han podido ser aislados, pero ellos son clasificados funcionalmente como α y β de acuerdo a las respuestas obtenidas por varios agentes farmacológicos. Los receptores están involucrados en la contracción de la musculatura lisa, tal como la de los bronquios, además aumentan la permeabili-

dad celular. El receptor β está considerado como parte de la adenilatocíclicasa de la membrana.

Dentro de las células los nucleótidos cíclicos actúan como mensajeros secundarios y sus niveles están controlados - por fosfodiesterasas. Los agentes que modifican este balance pueden estimular, aumentar o inhibir la respuesta alérgica. - La estimulación parasimpática actúa sinérgicamente reproduciendo las manifestaciones de un shock anafilático, por el -- contrario la estimulación simpática tiene un efecto antagonis-- ta inhibiendo la reacción alérgica (Lazar, M. & Schwartz, M. - J. 1980). Teniendo ésto en cuenta puede uno tratar de expli-- car el por-qué factores emocionales pueden aumentar o inhibir una reacción alérgica, se han reportado algunos casos tanto de huma-- nos, como animales alérgicos, a los cuales al ponerlos frente a un alergen falso (es decir una imitación artificial del -- alergen) puede provocar una reacción alérgica. Así, tenemos por ejemplo un caso reportado en la Revista Americana de Cien-- cias Médicas, Am J. Sci 1886, donde se menciona a un pa-- ciente asmático, el cual tuvo un ataque de asma, como resulta-- do de una reacción alérgica, cuando se le mostró una rosa ar-- tificial (Robert, M. 1984).

Inmunoterapia y anticuerpos bloqueadores.

La inmunoterapia, también impropriamente llamada desen-

sibilización o hiposensibilización es un método de tratamiento de pacientes alérgicos por inyección de extractos de alérgenos a los cuales ellos son sensibles. Este método es ampliamente utilizado, especialmente en el tratamiento de fiebre de heno, asma y alergias producidas por el veneno de insectos. Los pacientes atópicos pueden ser clasificados como poco reactivos o muy reactivos, y las dosis de alérgeno inyectado se modifica de acuerdo con éstos. Las reacciones que siguen después de este tratamiento son:

- 1.- Formación de una roncha, hay dolor y ardor en el sitio de la inyección, esto desaparece en pocas horas.
- 2.- Eritema local, comezón e hinchazón en tejido subcutáneo. Esto puede durar hasta 24 horas.
- 3.- Síntomas sistémicos con ronchas y urticaria. Algunas veces esto es más severo en personas con angioedema; si ocurre esto último la reevaluación del tratamiento es necesario.

El mecanismo de desensibilización aún no se conoce. Algunos pacientes no responden; otros responden por producir "anticuerpos bloqueadores". En estos pacientes, las inyecciones de Alérgeno inducen la formación de diferentes anticuer-

pos, los cuales pertenecen a la clase IgC principalmente. - Estos neutralizan al alérgeno en exposiciones accidentales y previenen que este se una a los IgE unidos a la superficie celular de los basófilos y células cebadas. Algunos autores han observado que in vitro los leucocitos de pacientes desensibilizados muestran una disminución en la liberación de histamina y otros mediadores, a pesar de la exposición directa del alérgeno. No hay ninguna explicación hasta ahora para el decremento en la sensibilidad de los leucocitos. (Lazar M. & Schawarts, M.D. 1980).

En la Fig. 15 se muestra un resumen gráfico de los mecanismos que involucra una reacción alérgica.

IgA. Este anticuerpo normalmente protege la piel y la superficie de la mucosa, se cree que la deficiencia en la producción de estos anticuerpos facilita la entrada de anticuerpos y estimula la formación de IgE.

IgC. Anticuerpos que normalmente se producen para remover antígenos. Pueden evitar que haya degranulación de las células cebadas y leucocitos (ver la sección de Inmunoterapia y anticuerpos bloqueadores en este mismo capítulo). Sin embargo, algunas subclases de IgC (en el humano subclase IgG4) pueden producir la degranulación.

T^H . Célula auxiliar T. La producción de IgE por células B depende mucho de estas células T auxiliares.

PL. Plaquetas, contienen muchos de los mismos mediadores que las células cebadas, pero las IgE no son directamente responsables de su liberación.

EOS. Eosinófilos, estas células son atraídas por las sustancias ECF-A (Factor quimiotáctico eosinofílico A) producido por las células cebadas. Los eosinófilos producen sustancias que neutralizan los mediadores de la inflamación. Estas células juegan un importante papel en la homeostasis.

T. Células T. atraen, estimulan y controlan a basófilos y eosinófilos en las reacciones mediadas por células.

Ca^{+2} . Se cree que la entrada de calcio es el primer evento que ocurre cuando el alérgeno hace una unión entre dos anticuerpos IgE vecinos, unidos a la membrana de una célula cebada.

AMPC GMPC. Adenosin monofosfato cíclico y guanosin cíclico, los niveles relativos de estos mononucleótidos regulan la actividad celular. Una caída en la razón cAMP/cGMP es favorecida por la entrada de calcio (Ca^{+2}) y por activación de los receptores α y γ , lo cual trae como consecuencia la de-

granulación. La activación de los receptores β (por ejemplo con adrenalina), tiene el efecto opuesto; algunos pacientes alérgicos pueden tener un defecto parcial de los receptores β que hace que se libere en gran cantidad a los mediadores.

PAF. Factor de agregación de plaquetas, promueve la liberación de histamina por las plaquetas.

SCG. Cromoglicato de sodio y esteroides (como la metasona). Se cree que las sustancias inhiben la liberación de los mediadores por estabilizar la membrana de los lisosomas. Otra drogas utilizadas en las alergias incluyen antihistamínicos (los cuales no pueden evitar la liberación de otros mediadores que no sea histamina) adrenalina, isoprenalina etc., -- los cuales estimulan los receptores β . Anticolinérgicos -- (por ejemplo atropina) los cuales bloquean los receptores γ , y la teofilina, la cual sube los niveles de cAMP. Ha sido -- muy gratificante para los médicos clínicos ver que la nueva farmacología molecular de la regulación celular confirma muchas de sus observaciones empíricas sobre el control de enfermedades alérgicas.

V. Propiedades bioquímicas del veneno de avispas.

El veneno de avispas está compuesto principalmente de 3 proteínas de alto peso molecular que son: Fosfolipasa ----

(PLA) Hialuronidasa (HYA) y antígeno 5 (Ag5) sus pesos moleculares son: 35000, 45000 y 25000 respectivamente (King. T.P. et al 1978). Además de estas proteínas encontramos que tienen componentes peptídicos, tales como aminos biogénicas, y un análogo a la bradiquimina. (Habermann E., 1972). En la tabla II se muestra la composición química del veneno de avispas y además muestran los componentes del veneno de otros animales tales como el de abeja, serpientes y avispones.

El veneno de avispas norteamericanas del género Vespa la es el que más se ha estudiado y ha sido caracterizado por King T.P., et al., 1983. En la tabla III se hace un resumen de la composición bioquímica y de las actividades enzimáticas encontradas por el autor antes mencionado. Además en esta misma tabla se hace una comparación entre el veneno de la misma especie de avispa pero extraído por dos métodos distintos:

a) Por un método se hace un extracto del saco venenoso, a este extracto se le llama veneno crudo. (para una explicación de este método ver la sección "Extracción del veneno" capítulo VII).

b) El segundo método, utiliza estimulación eléctrica para extraer el contenido del saco venenoso, al veneno así obtenido se le llama veneno puro.

Tabla II.-Componentes activos tanto farmacológicamente como bioquímicamente de varios venenos de animales.

Abejas	Avispas	Avispón	Serpientes		
			Elapidae	Crotalidae	Viperidae
Aminas Biogénicas					
Histamina	Histamina	Histamina			
Dopamina	Serotonina	Serotonina			
Noradrenalina	Dopamina	Acetilcolina			
	Noradrenalina				
Toxinas protéicas y péptidos (no enzimáticos)					
Melitina	Quinina de avispas	Quinina de avispón	Neurotoxinas	Crotamina	Viperotoxina
Apamina			Cardiotoxinas		
Péptido MCD					
Mínimina					
Enzimas					
Fosfolipasa A	Fosfolipasa A	Fosfolipasa A	Fosfolipasa A	Fosfolipasa A	Fosfolipasa A
Fosfolipasa B	Fosfolipasa B	Fosfolipasa B	Colinesterasa	Hialuronidasa	Hialuronidasa
Hialuronidasa	Hialuronidasa		Hialuronidasa	Muchas otras enzimas	Muchas otras enzimas
	Peptidasa				

Tabla III. Propiedades bioquímicas de los venenos de avispas del género Vespa.

	V. germanica ^a		V. maculifrons ^a		V. vulgaris ^a	Mezcla
	V.C.	V.P.	V.C.	V.P.	V.C.	
Hialuronidasa U/mg de veneno	190±28	193±17	174±28	171±6	464±65	470
Fosfolipasa U/mg de veneno	940±110	810±90	360±90	780±90	170±40	210
Peptidasa mU/mg de veneno	154±9	11.2±0.5	34.9±1.3	25.9±1.0	86.1	-
Proteinasa	0.48±0.20	0.07±0.20	6.32±0.99	0.34±0.08	2.5	-
% de veneno como proteína	34.4±0.2		43.3±2.6		38.8±2.3	30±3
% de veneno como:						
Hialuronidasa	0.62		0.5		1.5	1.5
Fosfolipasa	6.9		6.9		3.3	0.69
Antígeno 5	1.4		8.7		8.1	4.5

a: V.C. Veneno Crudo.

V.P. Veneno Puro.

Como podemos ver en la tabla III, para las especies de V. germánica y V. maculifrons, la diferencia básica en el veneno extraído por los dos métodos antes mencionados es la actividad de proteinasa, mientras que el veneno obtenido de un extracto de saco venenos tiene esta actividad aumentada -- más de 20 veces. Esto sugiere fuertemente, que la actividad de proteinasa proviene de restos de tejido que se destruye -- cuando se homogeniza (King. T.P., et al. 1978), sin embargo -- al estudiar los venenos por electroforesis en geles de poli--acrilamida con SDS y electroforesis en disco en acetato-u--rea, los patrones electroforéticos del veneno de una misma -- especie extraído por los dos métodos antes mencionados son in--distinguibles con esto se prueba que el extracto de saco vene--noso (ó veneno crudo) no está exageradamente contaminado con proteínas de origen tisular y que se parece mucho al veneno -- extraído por estimulación eléctrica (veneno puro), que es en realidad el veneno que inyecta una avispa a su presa. (King. T.P. et al 1978).

La distribución de las actividades enzimáticas del -- veneno de las avispas Vespula de acuerdo a su peso molecular se muestran en la fig. 16. Esta figura muestra el patrón de--sarrollado por el veneno de Vespula masculifrom en una cromatografía de filtración en gel Sefadex G-100; de acuerdo a este patrón cromatográfico vemos que todos las enzimas del vene--no eluyen juntas; de acuerdo a esta cromatografía, las enzi--

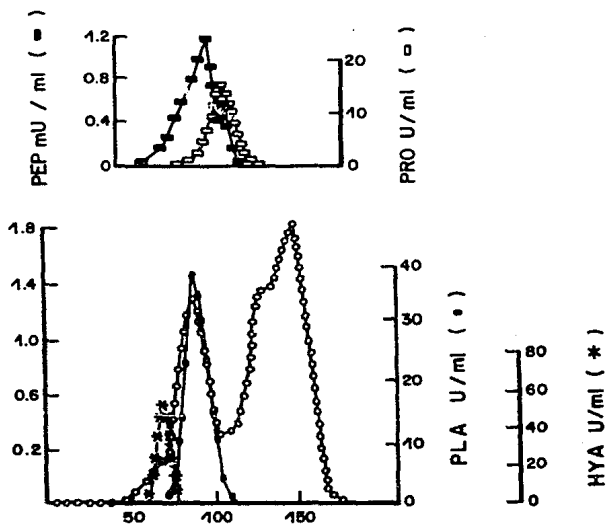


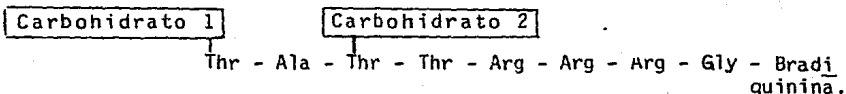
Fig. 16. Cromatografía de filtración en gel sefadex G-100 en una columna 200 X 0.9 cm. de extractos de saco venenoso de V. maculifrons. Aproximadamente 7.9 mg. de veneno se cromatografiaron, se eluyó con buffer de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. A cada una de las fracciones se les analizó su actividad enzimática: hialuronidasa (HYA), fosfolipasa (PLA), peptidasa (PEP) y proteinasa (PRO).

mas tienen pesos moleculares muy parecidos. También podemos observar que al final de la cromatografía se obtiene un pico muy ancho de bajo peso molecular (pico en la región de los - 125 ml) posiblemente este pico esté formado de péptidos de - bajo peso molecular. La caracterización bioquímica detallada de estos péptidos todavía no se lleva a cabo. Yoshida - H., et al., (1976) encontraron en el veneno de avispas Ves-
pula un péptido análogo a la bradiquinina. Este autor y -- sus colaboradores lograron aislar dos péptidos análogos a la bradiquinina de extractos de sacos venenosos de la avispa -- Vespula maculifrons. Estos compuestos fueron bautizados con los nombres de vespuloquinina 1 y vespuloquinina 2. Las actividades biológicas de estos dos péptidos son las siguientes: contraen el útero de rata y el ileo de cuyo, relajan el duodeno de rata y disminuyen la presión sanguínea de la misma especie. Estos efectos son producidos característicamente -- por las bradiquininas de los mamíferos (Lys-bradiquinina y -- Met-Lys-bradiquinina). La vespuloquinina 1 es dos veces más potente (en base a su peso) que la bradiquinina de mamífero, en su acción de disminuir la presión sanguínea de la rata. - De manera semejante que las quininas conocidas y las vespuloquininas 1 y 2 fueron inactivadas por quimotripsina y carboxi peptidasa B, pero no por tripsina y carboxipeptidasa A ó leucín-aminopeptidasa.

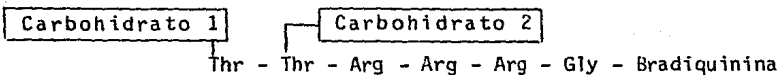
Un aspecto muy interesante de estos péptidos es que --

contienen azúcares (por lo que son glicopéptidos), hasta antes de este trabajo no se conocían glicopéptidos derivados de la bradiquinina. Las estructuras primarias para las vespuloquininas 1 y 2 propuestas por Yoshida y sus colaboradores son:

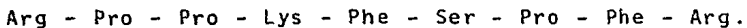
Vespuloquinina 1:



Vespuloquinina 2:



La estructura primaria de la bradiquinina es:



La diferencia entre la vespuloquinina 1 y 2 es que esta última carece de un par de aminoácidos del aminoterminal, es decir Thr-Ala. Los carbohidratos están unidos a las treoninas 5 y 6 por medio de un enlace O-glucosídico.

Pisano J.J. y Bronzert T.L. (1969) también lograron aislar análogos de braquinina de extractos de sacos venenosos

de avispas del género Polistes. (P. anularis, P. fuscatus y P. exclamans), por lo que la llamaron polistequinina. Esta tiene acciones características que la hacen diferente de -- las quininas de mamíferos la diferencia principal es que la polistequinina no es inactivada al pasar por el sistema vascular del pulmón. También tiene un efecto hipotensivo muy grande y además es la substancia liberadora de histamina de las células cebadas de ratón más potente que se conoce.

Las vespuloquininas son similares a la polistequinina, en ambas la bradiquinina está en la región del carboxilo terminal de los péptidos, sus porciones aminoterminal son -- muy básicas, y todos estos péptidos son aproximadamente del mismo tamaño. Las diferencias entre estos péptidos son: Las vespuloquininas contienen 3 residuos de arginina y un grupo amino libre en el amino terminal, en cambio la polistequinina contiene en el amino terminal ácido piroglutámico, y entre los aminoácidos unidos a la bradiquinina tres lisinas y una arginina.

La estructura primaria de la polistequinina es la siguiente:

piro - Glu - Thr - Asa - Lys - Lys - Lys - Leu - Arg - Gly - bradiquinina.

La diferencia principal entre la polistequinina y ves-puloquinina, es que estas últimas contienen carbohidratos, -- mientras que las polistequininas no contienen azúcares.

Antígeno 5 (Ag5). Esta proteína que se encuentra en - los extractos de saco venenoso de avispas Vespula y Polistes es muy importante desde el punto de vista médico, ya que ésta proteína es un potente alergeno (ver el capítulo siguiente).

Esta proteína no tiene ninguna actividad enzimática co-nocida, sin embargo en avispas Vespa mandarinia, se ha identi-ficado una proteína llamada mandarotoxina (MDTX) sin activi-dad enzimática muy parecida en composición de aminoácidos y punto isoeléctrico del antígeno 5 de avispas Vespula. La pro-teína MDTX purificada del veneno del V. mandarinia tiene acti-vidad neurotóxica en langosta (Abe, T. Kawai, N. and Niwa.,, 1982). En la tabla IV se muestra la composición de aminoáci-dos del antígeno 5 y de MDTX. La mandarotoxina tiene aproxi-madamente un peso molecular de 20,000 daltons, y un $pI=9.1$; - la naturaleza básica de MDTX es una consecuencia de su alto - contenido de lisina. Esta toxina es la primera que se ha pu-rificado del veneno de una avispa y esta tiene una acción pre-sináptica. La MDTX a diferencia de otras toxinas que también actúan presinápticamente (como la β -bungarotoxina, crotóxina, y notóxina) no tiene actividad enzimática. Las otras toxinas generalmente tienen actividades de fosfolipasa A.

Tabla IV. Composición de aminoácidos de mandarotoxina y antígeno 5.

Aminoácidos	Antígeno 5 de <u>Vespula germanica</u>	Mandarotoxina de <u>Vespa mandarinia</u>
Lis	24	17
His	6	5
Arg	5	5
Asp	26	17
Tre	9	9
Ser	8	9
Glu	26	19
Pro	7	9
Gli	16	16
Ala	13	12
Cis	7	5
Val	13	10
Met	2	3
Ile	7	10
Leu	12	9
Tir	11	8
Fen	5	4
Trp ^a	n.d.	4
	PM= 25,000 pI=Básico	PM= 19,000 pI= 9.1

Nota: (a) n.d.= No determinado.

La toxicidad de la fosfolipasa A. se caracteriza por la disminución de liberación de transmisor seguida por la de presión que resulta en un bloqueo irreversible de transmi--- sión sináptica. Como ya lo hemos dicho el veneno de avispas en general tiene actividad de fosfolipasa A; por lo tanto -- uno podría pensar que la MDTX afecta la membrana nerviosa por la actividad de fosfolipasa, sin embargo ésto no es así, ya que tanto el veneno crudo de V. mandarinia como la toxina pu ra carecen de la actividad de fosfolipasa, y además los estu dios electrofisiológicos muestran que no hay fase de facili tación de liberación de neurotransmisor en el proceso de acci ón de la MDTX (cuando actua una fosfolipasa A, esta fase - de facilitación de liberación de neurotransmisor si existe).

La MDTX es lábil al calor y se desnaturaliza irrever siblemente. Su concentración efectiva es de 10^{-6} (muy pare cida a la de tetrodotoxina). La MDTX puede actuar como una proteína que se enlaza específicamente a una estructura de - la membrana nerviosa (Takashi et al 1982).

Las avispas solitarias tienen un veneno muy interesan te, desde el punto de vista de la neurobiología, ya que su - veneno produce una parálisis enarañas y otros artrópodos. El veneno de una avispa solitaria llamada Philantus triangulum F. ha sido estudiado por Spanger W., et al (1982) y Pieck T. (1982). Este veneno causa una parálisis reversible en los -

insectos (como la cucaracha Periplaneta americana) lo cual puede ser el resultado de una acción complicada de varios componentes activos sobre el control neural de la contracción muscular; también, posiblemente, estén involucrados efectos sobre el sistema nervioso central, así como efectos pre- y posinápticos en la unión neuromuscular. El peso molecular aparente de los 4 componentes paralizantes que contiene este veneno es de 700. A los componentes se les ha llamado $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -Phlantoxinas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -PTX). La naturaleza química de estas toxinas es peptídica. Se ha logrado asilar a homogenidad la $\beta\gamma\delta$ -PTX. Pero sólo cuando se inyecta una mezcla de las 4 toxinas en el ganglio torácico de abejas se logra producir una parálisis total del insecto. La abeja queda paralizada pero continúa viviendo todavía por algún tiempo.

En condiciones naturales, la avispa puede inyectar certeramente su aguijón en el gánglio torácico de la abeja produciéndole parálisis, sin que ésta pierda la vida y pueda servir de alimento durante varios días ya sea a la misma avispa o a sus larvas.

Las 4 toxinas de este veneno pueden causar un bloqueo de la apertura de los canales iónicos en la membrana posináptica de fibras musculares de insectos (Spanger E., et al, -- 1982).

Fosfolipasa (PLA). Esta es una de las enzimas más importantes desde el punto de vista fisiológico y médico del veneno de avispas, ya que ésta al igual que el Ag5, es uno de los principales alérgenos del veneno (ver el capítulo siguiente). La purificación de esta enzima a homogeneidad del veneno de avispas Vespula ha sido llevada a cabo por King.-T.P., et al., (1983), utilizando una cromatografía de afinidad con un ligando análogo a la fosfatidil colina llamado -- Rac-1- (-9-carboxi)-nonil-2-hexadecilglicero 3-fosforilcolina (ver el capítulo X, de material y métodos). La composición de aminoácidos de esta enzima se muestra en la tabla V. En electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, esta enzima muestra una banda principal que corresponde a un peso molecular de 37,000, pero también pueden observarse bandas -- ténues que corresponden a pesos moleculares de 74,000 y --- 20,000. La banda de 74,000 es un dímero de esta enzima (es decir que dos moléculas de PLA se unen y migran como si fuera una sola molécula en el gel durante la electroforesis) ya que esta banda desaparece cuando la enzima se trata con 1% - de 2-mercaptoetanol (esta substancia produce una reducción - de los enlaces di-sulfuro, haciendo que se rompan y se disocien las moléculas). La banda de 20,000 parece ser un produc to de degradación ya que la intensidad de la banda aumenta con el tiempo. Entre más vieja es la muestra más intensa es esta banda.

La PLA de avispas Vespula es una glucoproteína. Es-

Tabla V. Composición de aminoácidos de la fosfolipasa del veneno de Vespula germanica.

Aminoácidos	Residuos
Lis	24
His	9
Arg	12
Asp	27
Tre	24
Ser	26
Glu	32
Pro	13
Gli	23
Ala	21
Cis	12
Val	18
Met	4
Ile	22
Leu	22
Tir	13
Fen	14
Trp ^a	n.d.

Nota: (a) n.d.= No determinado.

ta enzima es más estable a temperatura de 4°C y en un buffer de acetato de amonio 20 mM PH 4.7; bajo estas condiciones tiene una vida media de 16 días, mientras que a pH 8 y -4°C, la vida media es de 10 días, esta es una de las razones por las cuales el veneno al ser extraído es almacenado a 4°C y en un buffer de acetato de amonio a pH 4.7 20 mM.

Hialuronidasa (HYA). Esta es otra de las enzimas importantes del veneno de avispa Vespula; esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar el ácido hialurónico, el cual es un heterosacárido que está formado de un disacárido de ácido D-glucorónico y la N-acetil D-Glucosamina, unidos por un enlace β (1 \rightarrow 3). Puesto que cada unidad de disacárido se halla unida a la siguiente por enlaces β (1 \rightarrow 4), el ácido hialurónico contiene alternativamente enlaces β (1 \rightarrow 3) y β (1 \rightarrow 4). Como sus grupos carboxilo están completamente ionizados y poseen cargas negativas a pH 4.7, el ácido hialurónico es soluble en agua, por lo que forma soluciones muy viscosas. La enzima hialuronidasa cataliza la hidrólisis de los enlaces β (1 \rightarrow 4), cuando el ácido hialurónico está en solución la hidrólisis es acompañada de una disminución de viscosidad, y precisamente en este se basa el ensayo para medir la actividad de esta enzima (ver el capítulo de material y métodos).

El ácido hialurónico forma una red que sirve para dar firmeza al tejido conjuntivo en los mamíferos. La hia-

luronidasa actúa como un factor de dispersión de los demás componentes del veneno ya que al romper la estructura que forma el ácido hialurónico los componentes del veneno pueden difundirse fácilmente en un área más grande. Esta enzima ha sido purificada del veneno de avispas Vespula por King T.P. et al. (1983), utilizando cromatografía de afinidad, en la cual está unida como ligando concanavalina-A a una fase sólida formada de sefarosa 4B. Esta cromatografía funciona porque el ligando es capaz de retener a las glucoproteínas del veneno. De hecho la PLA queda retenida en esta columna pero la fuerza con que es retenida es menor que la fuerza que une a la hialuronidasa, por lo que pueden ser separadas ambas enzimas. La hialuronidasa tiene dos formas, una con un peso molecular 45,000 y otra con un peso molecular de 42,000, estas dos formas pueden separarse por una cromatografía de intercambio iónico, utilizando carboximetil-celulosa 32 (CM-32); la diferencia entre estas dos formas de hialuronidasa es el contenido de azúcares. Esta enzima tiene también capacidad de producir alergia en individuos susceptibles.

En resumen, sobre la composición bioquímica del veneno de avispas y otros himenópteros podemos decir lo siguiente: Los venenos de abejas, avispas y otros himenópteros, contienen gran variedad de sustancias farmacológicamente activas. Tales sustancias incluyen, aquellas que actúan -

directamente como las aminas biogénicas bien conocidas; acetil colina, serotonina, catecolaminas, histamina, y los polipéptidos, melitina, apamina, el péptido degranulador de células cebadas (péptido-MCD) y quininas. También existen sustancias que actúan indirectamente tal como la fosfolipasa A que produce sustancias activas a partir de substratos que están presentes en el tejido de la víctima. Interesantes diferencias entre las especies distintas se encuentran en la distribución de aminas y péptidos, (ver tabla II). -- Por ejemplo el veneno de abeja es notable por su contenido de melitina, apamina, y el péptido degranulador de células cebadas, pero este veneno contiene quininas, las cuales se encuentran en el veneno de avispas; en cambio los venenos de avispas no contienen melitina, apamina, o péptido-MCD. Sin embargo la variedad de agentes farmacológicos presentes en el veneno de cualquiera, de las especies es suficiente para producir, dolor, inflamación, y tumefacción y síntomas que comúnmente aparecen después de una picadura.

El veneno de extracto de sacos venenosos de Vespula maculifrons además de las vespuloquininas 1 y 2 contienen dopamina, noradrenalina, e histamina descarboxilasa. La acetil colina y la 5-hidroxytriptamina que comúnmente se encuentran en el veneno de otras avispas no están presentes en el veneno de Vespula maculifrons. Es interesante hacer notar que el péptido MCD del veneno de abeja tiene una ines

perada e importante acción antiinflamatoria. La acción del péptido-MCD, puede arrojar algo de luz al controvertido problema de si el veneno de abeja es benéfico en el tratamiento de la artritis humana. Al veneno de avispa también se le ha atribuido un valor terapéutico semejante.

VI. Propiedades inmunológicas del veneno de avispas.

En las avispas del género Vespula se han estudiado principalmente las proteínas de peso molecular alto que están presentes en el veneno, estas proteínas son: La fosfolipasa (PLA) (PM=37,000), la hialuronidasa (HYA) (PM=42,000), y el antígeno 5(Ag5) (PM=23,000).

Las técnicas principales que se han utilizado para estudiar las propiedades inmunológicas de estos componentes son: la inmunodifusión, la inmunoelectroforesis, y la liberación de histamina de leucocitos humanos sensibles a los componentes del veneno.

Esta última técnica ha sido ampliamente estudiada por Lichtenstein M. y Osler A.G. (1964). Básicamente esta técnica consiste en aislar leucocitos de seres humanos alérgicos al veneno de avispas. Estas células son cultivadas en un medio libre de suero sanguíneo y en condiciones que permiten la máxima liberación de histamina. Cuando en el medio de --

cultivo se agrega veneno crudo o alguno de los componentes-purificados se produce la liberación al medio de histamina de parte de los leucocitos, debido a que hay un enlace del antígeno (alergeno) a los anticuerpos IgE específicos, unidos a la superficie celular del leucocito, (para una explicación más detallada del proceso de liberación de histamina ver el capítulo IV), la histamina puede ser entonces cuantificada en el medio de cultivo.

Las especies de avispas que se han estudiado se muestran en la tabla VI. T.P. King et al., (1978), estudiaron los venenos de Vespula maculata y Vespula arenaria por separado y una mezcla de veneno de las especies Vespula germánica, Vespula maculifrons y Vespula vulgaris, estas tres especies son agrupadas bajo el nombre común de Yellowjacket (YJ) (Tabla VI). Las reacciones cruzadas entre los diferentes componentes del veneno, estudiadas por inmunoelectroforesis e inmunodifusión se muestran en la tabla VII, en esta tabla el signo + significa que hay reacción cruzada y el signo - significa que no hay reacción cruzada. La hialuronidasa de estas especies de avispas es la proteína que da más reacciones cruzadas, lo que significa que inmunológicamente son muy parecidas estas enzimas. La proteína que menos reacciones cruzadas tiene es la fosfolipasa. Es importante señalar que --ninguna de las fracciones estudiadas del veneno de estas --avispas dió reacción cruzada con antisuero dirigido contra -

Tabla VI. Avispas cuyo veneno ha sido más estudiado.

Nombre específico	Nombre Vulgar dado en los E. U.
<u>Vespula maculata</u>	White-facednornet (WFH).
<u>Vespula arenaria</u>	Yellowhornet (YH)
<u>Vespula germánica</u>	Yellowjacket (YJ)
<u>Vespula maculifrons</u>	Yellowjacket (YJ)
<u>Vespula vulgaris</u>	Yellowjacket (YJ)

Tabla VII. Resumen de las reacciones cruzadas antigénicas del veneno de distintas especies del género Vespula.

Antígeno	Antisuero específico contra el veneno de:		
	WFH ^a	YH ^a	YJ ^a
Hialuronidasa			
WFH	+	+	+
YH	+	+	-
YJ	+	+	+
Fosfolipasa			
WFH	+	+	-
YH	-	+	-
YH	-	-	+
Antígeno 5			
WFH	+	+	+
YH	-	+	+
YJ	-	-	+

Nota: (a) Para saber que significan estas iniciales ver la tabla VI.

el veneno de abeja. Las abejas pertenecen a la familia Apidae, mientras que las avispas Vespula pertenecen a la familia Vespidae, por lo que no es muy extraño que no existan reacciones inmunológicas cruzadas entre el veneno de abejas y avispas. T.P. King et. al., (1983) estudiaron por separado el veneno de las avispas agrupadas bajo el nombre común de Yellowjacket (YJ) Tabla VI., la fosfolipasa y el antígeno 5 de estas 3 especies resultaron inmunológicamente indistinguibles.

En la figura 17 podemos ver las gráficas que se obtienen en los estudios de la actividad alergénica de los componentes del veneno por medio de la liberación de histamina de leucocitos humanos. En las ordenadas tenemos el porcentaje de histamina liberada, y en las abscisas tenemos la cantidad de alérgeno. La interpretación de esta gráfica es así:

Si ponemos atención en una de las curvas, por ejemplo la de Ag5, observamos, que esta tiene forma sigmoidal, a medida que aumenta la cantidad de alérgeno en el medio de los leucocitos, estos liberan histamina hasta llegar a un máximo. Pues bien, el valor que se toma para caracterizar la actividad alergénica de un antígeno es la cantidad necesaria para obtener el 50% de la liberación total de histamina, entre más pequeña sea esta cantidad se dice que el alérgeno es

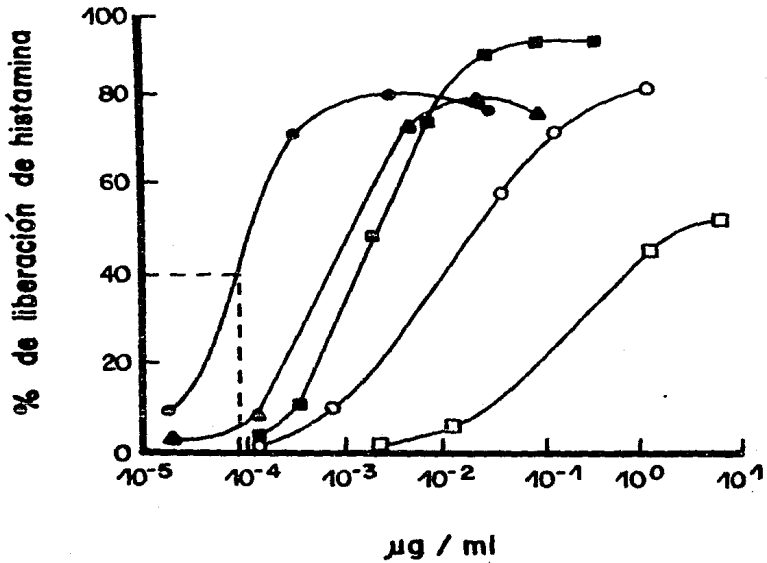


Fig. 17 Curvas de liberación de histamina de leucocitos de un paciente alérgico al veneno de avispas Yellowjaket (ver Tabla VI).

●-●-● Antígeno 5 de Yj.

▲-▲-▲ Fosfolipasa de Yj.

■-■-■ Proteínas del veneno de Yj. con un peso molecular mayor de 10000

○-○-○ Proteínas del veneno de Yj. con un peso molecular menor de 10000.

más activo, en nuestro ejemplo, la cantidad de Ag5 necesaria para obtener el 50% de liberación de histamina es del orden de 1×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$, para las demás proteínas esta cantidad es mayor por lo tanto en el veneno de avispas del género Vespula podemos concluir que el alergeno más activo es el antígeno 5.

En este tipo de ensayo el valor de la cantidad de -- alergeno necesaria para obtener el 50% de histamina total liberada depende mucho de la sensibilidad de los leucocitos a el alergeno que se está probando, esta sensibilidad de -- las células depende a su vez de la cantidad, afinidad, y especificidad de los anticuerpos IgE unidos a la membrana de la célula. En la Fig. 17 también podemos ver que a otro -- alergeno importante es la fosfolipasa; como ya lo hemos mencionado King T.P. et. al; 1983, estudiaron por separado los venenos de avispas (YJ) (tabla VI), en este trabajo se buscaron determinantes antigénicos semejantes entre la PLA y - el Ag5, sin embargo, el concluyó que no existen determinantes antigénicos comunes entre estas dos proteínas (un reporte anterior, Alagón A.C. et, al., 1982, indicaba la posibilidad de que estas dos proteínas tubieran determinantes antigénicos comunes). Las evidencias de esta conclusión son:

- a) Hay una pobre inhibición del enlace de fosfolipasa y su anticuerpo específico por Ag5 e inversamente, la PLA no-

puede inhibir el enlace de Ag5 y sus anticuerpos específicos.

b) Los anticuerpos producidos contra el Ag5 y fosfolipasa no producen reacciones cruzadas.

El suero de pacientes alérgicos al veneno de avispa contiene tanto anticuerpos IgE e IgG específicos contra la PLA y el AG5. La razón de concentraciones de anticuerpos IgG contra Ag5 y PLA varía entre 0.6 y 3.5 en el suero de un solo paciente. La suma de los anticuerpos IgG dirigidos contra Ag5 y PLA del veneno de estas avispas es igual a la totalidad de anticuerpos IgG dirigidos contra el veneno de avispa desde el punto de vista inmunológico, es decir, son las más importantes, ya que su inmunogenicidad es muy alta y además son los alérgenos más potentes con respecto a los demás componentes proteicos del veneno.

Por último, mencionaremos que los principales alérgenos del veneno de abeja son las enzimas fosfolipasa A₂ (PM= 15,800) y la hialuronidasa (PM=50,000) (King et al., 1976), como podemos notar tanto el veneno de abeja como el de avispa tienen fosfolipasa y esta enzima en ambos venenos tiene actividad alérgica alta, sin embargo estas dos enzimas no tienen determinantes antígenicos en común. En el trabajo de King et al., (1976) también se estudió la ca-

pacidad alérgica de la fosfolipasa A en función de modificaciones químicas de la enzima. Estas modificaciones químicas fueron: La succinilación de 8 grupos aminoácidos, lo que dió origen a un derivado que sólo conservaba el 4% de la actividad enzimática con respecto a la enzima no modificada. También la enzima fue reducida y carboximetilada para romper sus 4 enlaces disulfuro lo que da origen a un derivado completamente inactivo, finalmente también se rompieron 3 de sus enlaces peptídicos de metionina con bromuro de cianógeno (lo que origina un derivado inactivo). Estos derivados muestran un decremento en la actividad alérgica con respecto a la enzima no modificada, estos resultados indican que los determinantes antigénicos de la fosolipasa dependen de la carga, la secuencia de aminoácidos y la conformación de la molécula.

C. MATERIAL Y METODOS

VII.- Fuente del veneno.

Las avispas cuyo veneno fué estudiado en el presente-trabajo, fueron recolectadas en el norte del Estado de Puebla en un rancho llamado "Ojo de Agua" situado en el Municipio de Venustiano Carranza.

Este lugar tiene una altitud de 200 m s.n.m. el clima es de tipo Amw (e), según Koppen modificado por E. García, -cálido-húmedo con lluvias en verano, la lluvia invernal es -menor del 5% de la anual, con una oscilación anual de temperatura media mensual entre 7°C y 14°C. El tipo de vegetación de este lugar es el Bosque Tropical Perenifolio según Rzedowski J. (1978).

Técnica para coleccionar las avispas. Como las avispas-estudiadas son sociales; éstas forman nidos, por lo tanto para capturarlas se atrapan con todo y nido, ya que las avispas obreras siempre están en gran número dentro del nido o agrupadas cerca de su superficie. En la figura 13 se muestra como atrapar un nido de avispas con una red entomológica; para hacer esto el colector debe estar protegido con el mismo equipo que se utiliza para coleccionar miel de abejas. Cuando se localiza un nido (generalmente estos aparecen en lugares altos, -

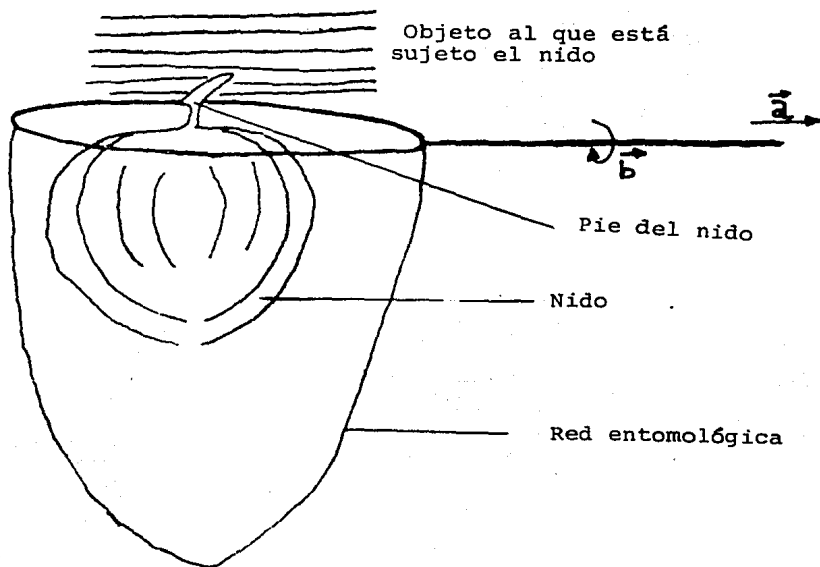


Fig. 18. Método para atrapar un nido de avispas con una red entomológica (ver el texto).

techos, ramas de árboles, etc.), se trata de despejar una zona amplia alrededor del nido, teniendo mucho cuidado de no molestar al nido, de tal manera que no haya obstáculos que se interpongan entre el colector y el nido, una vez hecho esto, el colector debe hacer que el nido quede dentro de la red entomológica (esto también debe hacerse sin molestar al nido, ya que de lo contrario las avispas se alborotan y escapan muchas de ellas, y muchas otras atacaran al colector o personas que se encuentren muy cerca) una vez que el nido ha quedado dentro de la red entomológica (Fig. 18) hay que hacer dos movimientos, casi simultáneamente, el primer movimiento \vec{a} (Fig. 18) es para tirar el nido, al jalar la red entomológica en la dirección de \vec{a} , debemos golpear el pié del nido, éste se rompe y el nido cae al fondo de la red entomológica, inmediatamente se debe efectuar el movimiento \vec{b} , el cual es un giro del mango de la red, con lo que la red queda cerrada y las avispas no pueden escapar. Una vez lograda la captura de un nido, se mete en una caja con hielo seco, las avispas mueren después de algunos minutos y el nido y sus avispas se pasan a una bolsa de plástico con una etiqueta donde se anotan los datos de la recolecta; las avispas son guardadas en hielo seco hasta arribar al laboratorio en donde son transferidas a un congelador a -25°C . Así se mantienen hasta que se realiza la extracción del veneno.

Extracción del veneno. Existen dos métodos para extraer el veneno como ya lo habíamos mencionado en el capítu-

lo V, explicaremos con detalle el método que hemos utilizado en el presente trabajo.

El método consiste en hacer un extracto de sacos venenosos. Para lograr esto se extrae el aparato venenoso -- (formado por el aguijón, saco venenoso y glándula ácida) -- (Figs. 4b y 5a) jalándolo del aguijón con unas pinzas de disección bajo el microscopio estereoscópico. Una vez que se tiene el aparato venenoso fuera del abdomen del animal, se recupera únicamente el saco venenoso, librándolo de todos los demás órganos y tejidos, esta estructura se almacena en un tubo de ensayo que contiene 1 ml, de buffer de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Cuando se han juntado 500 sacos venenosos aproximadamente, se homogenizan con un pistón flojo, por dos minutos a baja velocidad y se centrifugan a 570 x g, se recupera el sobrenadante al que se le determina la cantidad de proteína por absorción a 280 nm y se guarda a -4°C. El veneno así obtenido lo llamamos veneno crudo. Este veneno, al igual que los sacos venenosos sin homogenizar, siempre deben estar a 4°C durante su manipulación, ya que como hemos visto (capítulo V) la actividad de proteinasa del propio veneno puede destruir proteínas importantes como la fosfolipasa, hialuronidasa o antígeno 5. Este método tiene como defecto, que la solución del veneno que una avispa inyecta a una presa, se contamina con sustancias provenientes de tejidos que se rompen al homogenizar, sin embargo como también ya hemos visto, esta contaminación no es muy grande y es princi

palmente con proteinasas, (capítulo V). Una ventaja que tiene este método es que nos permite obtener cantidades suficientes de veneno en relativamente poco tiempo. En la tabla-VIII se muestran los resultados que obtuvimos de este proceso.

VIII.- Materiales.

Los reactivos utilizados fueron de pureza analítica y fueron manufacturados por los siguientes fabricantes:

El Sefadex G-100 y el ácido hialurónico grado III fueron obtenidos de Sigma. El azul brillante de coomasie G-250, la acrelamida, la bisacrilamida, la agarosa, el persulfato de amonio y el TEMED fueron de Bio-Rad. La AH-Sefarosa 4-B y el azul de dextrán fueron obtenidos de Pharmacia. El ligando 1-11-carboxi-undecil-rac-2-hexadecilglicero-3-fosforilcolina y el "hidepowder azure" fueron obtenidos de CalBiochem. Los venenos de avispas norteamericanos que se utilizaron con fines comparativos fueron una donación del Dr. T.P.-King de la Universidad Rockefeller, N.Y.

IX.- Medición de Proteína.

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente, asumiendo que $1.0 \text{ A}_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1 \text{ mg/ml}$ de proteína soluble.

Tabla VIII.- Resumen de los resultados del proceso de extracción del veneno de avispas.

Especie	mg de protefna por saco venenoso	mg de protefna total abtenidos	No. total de avispas
<u>Polistes dorsalis</u>	0.170+8	435	2700
<u>Polybia occidentalis</u> <u>nigritella</u>	0.125+10	770	6200

X.- Ensayos enzimáticos.

a) Determinación de la actividad de proteasa. Esta actividad fué determinada de acuerdo a Rinderknecht et al., (1968); básicamente se determinó utilizando un substrato coloreado insoluble llamado "hide powder azure" como sigue: En tubos de ensayo de 5 ml se añadió la enzima $100\mu\text{g}$ en $100\mu\text{l}$ y el substrato (5mg) en 0.75 ml de buffer de fosfatos 0.1 M pH 8.0 junto con una bolita de vidrio de 3 mm de diámetro para ayudar a la agitación de la suspensión. Los tubos son girados en un agitador inclinado 45° por 20 h, después de la liberación del colorante, este se mide en un espectrofotómetro a 595 nm. Se realizó una curva patrón que relaciona la absorbancia a 595 nm y la cantidad de substrato digerido, haciendo que cantidades conocidas de substrato se disolvieran completamente por digestión con tripsina. Una unidad de actividad está definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 mg de sustrato en 20 h a temperatura ambiente.

b) Determinación de la actividad de hialuronidasa. -- Esta actividad fué determinada turbidimétricamente de acuerdo al método descrito por Tolksdorf et al., (1949). Una unidad de actividad está definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar $1\mu\text{g}$ de ácido hialurónico por minuto a 25°C en $200\mu\text{l}$ de solución de ácido hialurónico ($200\mu\text{g}/\text{ml}$) a pH 5.3.

c) Determinación de la actividad de fosfolipasa. Este ensayo se realizó de acuerdo a lo reportado por Shiloah, (1973) así esta actividad se determinó titulométricamente, utilizando como sustrato una solución de yema de huevo al 10% v/v con 0.1 N de NaCl y 0.5% v/v de tritón X-100. Una unidad actividad de fosfolipasa está definida como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de una 1 μ mol de ácido graso por minuto a pH 8.0 y a 25°C en 3 ml de solución de sustrato.

XI.- Técnicas de purificación.

a) Centrifugación. El homogenado de sacos venosos se centrifugó a 570 x g en un rotor ss40 de ángulo fijo de -- 20° durante 10 min. a 4 °C. Se recupera el sobrenadante, se le determina proteína por absorción a 280 nm y se congela, a esta fracción se le llama veneno crudo, como ya lo hemos visto en el capítulo VI sección "Extracción del veneno".

b) Diálisis y ultrafiltración. La diálisis se llevó a cabo con el veneno crudo, en una membrana tubular visking-8/32; esta membrana deja pasar moléculas cuyo peso molecular es menor de 10,000 y retiene a las moléculas más grandes; La diálisis se realizó contra buffer de acetato de amonio pH -- 4.7 20 mM a una temperatura de 4°C. Por lo general siempre se dializaban 20 mg de veneno crudo, disueltos en 5 ml. de

buffer de acetato de amonio pH 4.7 20 mM. La ultrafiltración se realizó sólo con las fracciones que contenían actividad de fosfolipasa y que eran recuperadas después de la cromatografía de afinidad. Este proceso se llevó a cabo con una membrana de Amicon UM-2 que permite el paso de moléculas cuyo peso molecular es menor de 2000, con la finalidad de concentrar estas fracciones.

c) Cromatografía de filtración en gel. Esta cromatografía se realizó en una columna de 200 x 0.9 cm de Sefadex G100. Se aplicaban 20 mg de veneno crudo previamente dializado; la elución de la columna se hizo con buffer de acetato de amonio pH 4.7 20 mM. A cada una de las fracciones se les midió las siguientes actividades enzimáticas: fosfolipasa (PLA), hialuronidasa (HYA) y proteasa (PRO).

d) Cromatografía de afinidad. La fase inmóvil de esta cromatografía fue preparada de acuerdo al método propuesto -- por Rock y Snyder, (1975), así el ligando 1-11-carboxi-undecil-rac-2-hexadecil-glicero-3-fosforilcolina fue acomplado a AH-sefarosa 4-B por medio de carbodiimida. La figura - - - 19 muestra la fórmula del ligando. La columna midió --- 0.9x10.0 cm. La muestra (20mg de veneno crudo) se corría a una velocidad de 60 ml/h en un buffer Tris-HCL pH 7.95 50 mM+ 20 mM de CaCL₂. Para eluir a la proteína pegada a el soporte sólido se utilizó como eluyente una solución de ácido acético a 0.1. M y entonces la velocidad de elución se cambiaba a 90

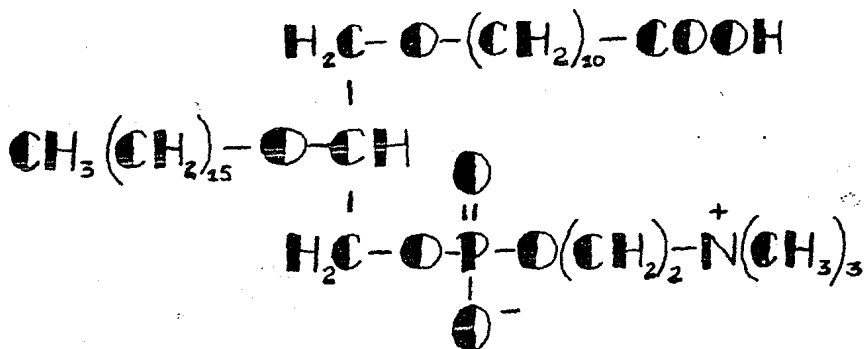


Fig. 19. Fórmula semi-desarrollada del ligando utilizado en la cromatografía de afinidad, para aislar la fosfolipasa. Notese que esta molécula a diferencia de los lípidos verdaderos, tiene enlaces tipo éter en lugar de enlaces éster, que unen a los ácidos grasos con el glicerol.

ml/hr, el eluido de esta fracción se colectaba en tubos que contenían 1 ml de buffer de Tris-HCL 1M pH 7.95 + tritón X-100 suficiente para dar una concentración final de 0.5%, para evitar que la enzima se desnaturalize por el pH ácido producido por el acético. El tritón X-100 fué necesario sólo cuando se procesaba veneno de avispas Polistes dorsalis ya que la fosfolipasa de este veneno pierde su actividad si no hay tritón X-100.

En cambio cuando se procesaba veneno de Polybia occidentalis nigritella el tritón X-100 no fué necesario ya que la fosfolipasa de este veneno no pierde su actividad por -- ser más estable.

e) Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Se realizaron electroforesis en placas de poliacrilamida en presencia de SDS de acuerdo al método descrito por Laemli, - (1970), sólo que en nuestro caso el gel separador tenía una concentración final de poliacrilamida del 15%. Los geles -- fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G-250 de -- acuerdo al método de Reisner et al., (1975). Estas electroforesis tuvieron como finalidad evaluar la pureza de nuestra proteína en cada paso de purificación, así como también calcular su peso molecular. De acuerdo al trabajo de Weber y - Osborn, (1969), la determinación del peso molecular por este método es muy preciso, y se obtiene una precisión de hasta - ±10%.

XII.- Inmunodifusión.

Las inmunodifusiones se llevaron a cabo en geles de agarosa - (26.0 X 76.0 X 1.0 mm) al 1% que contenían un buffer de Tris HCL 0.1 M pH 7.95. Se hicieron pozos con un diámetro de 3 - mm separados 10 mm entre sí. Los geles fueron secados, lavados y teñidos 20 h después de que se aplicó la muestra. Todo esto se realizó de acuerdo a la técnica de Weeke, (1973).

RESULTADOS

Todos los resultados que se presentaron en las secciones anteriores fueron obtenidos de la literatura. A partir de esta sección todos los resultados son los que se obtuvieron de nuestros experimentos.

XIII.- Extracción del veneno.

En la tabla VIII se muestran los resultados que se obtuvieron del proceso de extracción del veneno (capítulo VI). Las avispas Polistes dorsalis son más grandes (aproximadamente el doble) que las avispas Polybia occidentalis, esta es la razón por la que se obtiene más veneno por saco venenoso con las avispas Polistes dorsalis que con las Polybia occidentalis nigritella. La cantidad de veneno crudo total expresado como mg de proteínas que se obtuvo al final del proceso de extracción se muestra en la segunda columna de la Tabla VIII. El número total de avispas procesadas se presenta en la tercera columna de la tabla VIII.

XIV.- Caracterización del veneno crudo.

a) Patrones electroforéticos. En la fig. 20 se muestran los patrones electroforéticos de los venenos crudos de avispas norteamericanas y mexicanas. Los carriles 1 y 5 corresponden a estándares de peso molecular; los carriles 2,3,

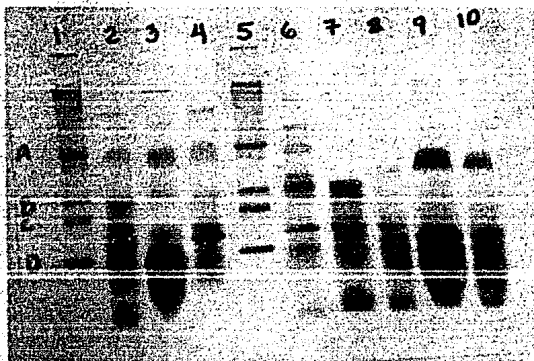


Fig. 20. Electroforesis en placa de gel de poliacrilamida (12%) con SDS (de acuerdo a Laemli U.K. 1970) de veneno crudo de distintas especies de avispas. La cantidad que se corrió en cada carril se indica a continuación junto con el nombre de la especie de la avispa de que proviene el veneno:

1 y 5 Estandares de peso molecular, A = 65000, B = 43000, C = 34700
 D = 14400.

2 Polistes apachus 100 μ g.

3 Vespula arenaria 100 μ g.

4 Polistes exclamans 100 μ g.

6 Polistes canadensis 100 μ g.

7 y 8 Polistes dorsalis 100 μ g y 50 μ g respectivamente.

9 y 10 Polibya occidentalis 125 μ g y 62 μ g respectivamente.

4 y 6 corresponden a avispas norteamericanas y los carriles - 7, 8, 9 y 10 a el de las avispas mexicanas estudiadas en el presente trabajo. El patrón cualitativo general es semejante entre todas las especies de Polistes; Polybia se diferencia fácilmente de las anteriores, ya que la mayoría de sus componentes tienen pesos moleculares bajos. Vespula también presenta abundantes proteínas de bajo peso molecular, si -- bien las de alto peso molecular tienen cierto parecido con -- el patrón Polistes. La proteína principal de alto peso mole -- cular de Polybia no tiene equivalencia en ninguno de los -- otros géneros.

b) Actividades enzimáticas del veneno crudo de las -- avispas estudiadas. Al veneno crudo de cada una de las avis -- pas se les midió las actividades enzimáticas más importantes -- que se conoce que tienen este tipo de venenos. (Cap. V); es -- tas actividades son la de fosfolipasa, proteasa y hialuroni -- dasa. Los métodos para medir estas 3 actividades se descri -- ben en el capítulo IX. En la tabla IX se muestran los resul -- tados obtenidos, estos se expresan en unidades de actividades por mg de proteína (U/mg), es decir se expresa la actividad -- específica.

c) Distribución de las actividades enzimáticas del ve -- neno crudo de acuerdo a su peso molecular. A los venenos cru -- dos de las dos especies de avispas estudiadas, se les estudió la distribución de las enzimas de acuerdo a su peso molecu --

Tabla IX.- Actividades enzimáticas del veneno crudo de avispas Polistes
y Polybia.

Actividades enzimáticas del veneno crudo de avispas
Polistes y Polybia.

Actividad Enzimática	<u>Polistes</u>	<u>Polybia</u>
Fosfolipasa (U/mg)	139.60	376.00
Hialuronidasa (U/mg)	56.86	50.51
Proteasa (U/mg)	4.18	5.69

lar, para esto se realizaron cromatografías de filtración en gel (sefadex G-100). A cada una de las fracciones obtenidas se les cuantificó la actividad de hialuronidasa (HAsa) fosfolipasa (PLsa) y proteasa (Ptsa).

Los venenos crudos de las dos especies de avispas estudiadas se cromatografiaron bajo las mismas condiciones. En la fig. 21 se muestra el patrón cromatográfico obtenido por el veneno crudo de Polistes dorsalis y en la Fig. 22, se muestra el patrón cromatográfico del veneno crudo de Polybia occidentalis nigritella.

d) Inmunodifusión. Con la finalidad de comparar el veneno crudo de las avispas desde el punto de vista inmunológico se realizaron inmunodifusiones; se compararon los venenos crudos tanto de las avispas Polybia occidentalis y Polistes dorsalis como el de avispas norteamericanas. Las inmunodifusiones se realizaron en placas de agorosa al 1% en un buffer Tris-HCL 0.1 M pH7.95 (Ver el Cap. XI). En las figs. 23 y 24 se muestran los resultados de estos experimentos. En el pie de figura se indica lo que se puso en cada pocito.

En la inmunodifusión que se muestra en la Fig. 23 podemos observar que el suero que contiene anticuerpos dirigidos contra fosfolipasa pura del Polistes apachus es capaz de reconocer a proteínas del veneno crudo, que seguramente corresponden a las fosfolipasas, de las otras especies de avis

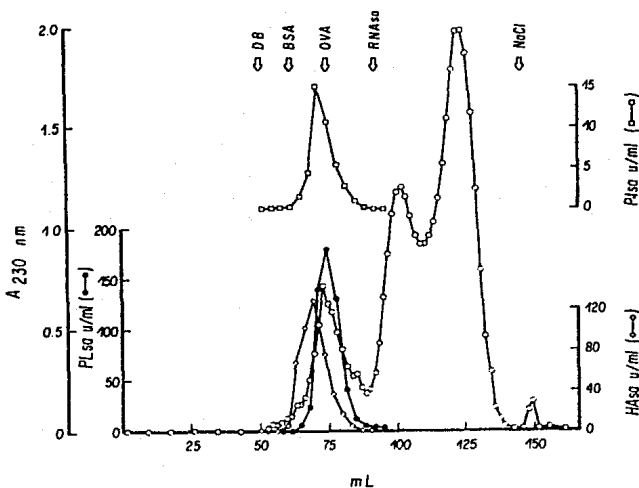
CROMATOGRAFIA EN SEFADEX G-100 DE VENENO DE Polistes dorsalis

Fig. 21 Patrón cromatográfico de 20 mg de veneno en una columna de 0.9 X 200 cm eluida con buffer de acetato de amonio, pH=4.7, 20 mM, a una velocidad de flujo de 15 ml/h. Los marcadores corresponden respectivamente a el volumen de exclusión y a los siguientes pesos moleculares: 65000, 43000, 13500, y 58. En la gráfica se indica también la posición de las actividades enzimáticas medidas, estas corresponden a fosfolipasa (PLAsa), hialuronidasa (HASa) y proteasa (Plasa).

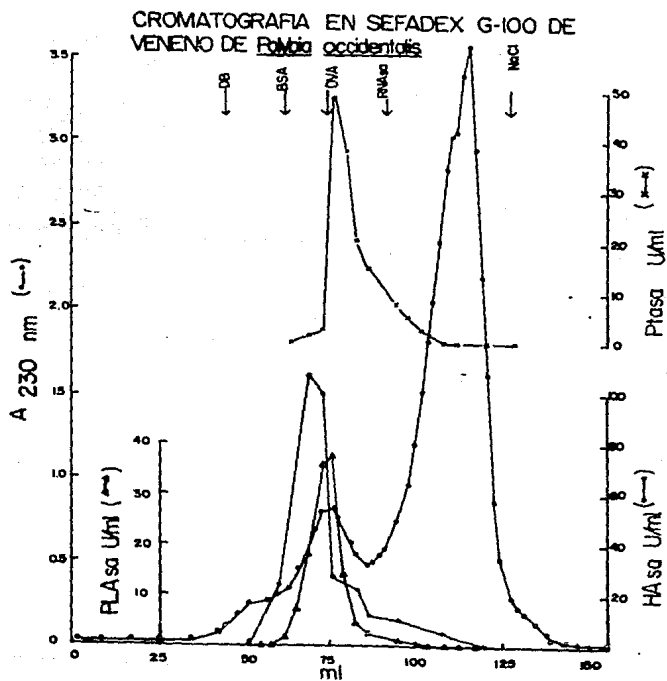


Fig. 22. Las condiciones e indicaciones son las mismas que para la Fig. 21.

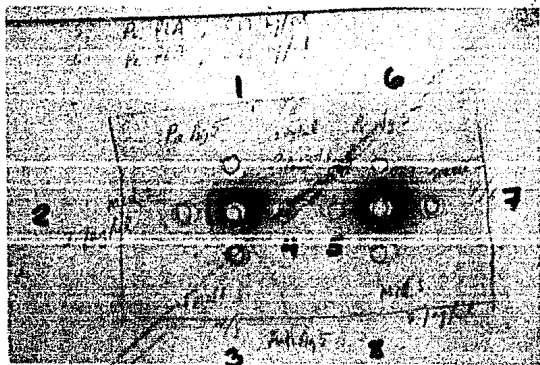


Fig. 24. Inmunodifusión de los venenos. Suero anti-Ag5 de Polistes apachus en los pocillos centrales. Los demás pocillos tienen lo siguiente:

- 1 Ag 5 de Polistes apachus.
- 2 Veneno crudo de Polistes dorsalis.
- 3 Veneno crudo de Polybia occidentalis.
- 4 Veneno crudo de Polistes inestabilis.
- 5 Veneno crudo de Polistes inestabilis.
- 6 Ag 5 de Polistes exclamans.
- 7 Veneno crudo de Polybia occidentalis.
- 8 Veneno crudo de Polistes dorsalis.

pas que corresponden a los géneros Polistes y Polybia. Esto es evidenciado por la forma de las bandas de inmunoprecipitación que se observan en el gel, estas bandas son el producto de reacciones cruzadas.

En la inmunodifusión de la Fig. 24, vemos que el suero que contiene anticuerpos dirigidos contra antígeno 5 (Ag5) puro de Polistes apachus es capaz de reconocer proteínas -- del veneno crudo, que seguramente es Ag5 de la especie del género Polistes, esto es evidente de la forma de las bandas de inmuno precipitación. También podemos observar que los anticuerpos dirigidos contra Ag5 de Polistes apachus no reconocen Ag5 del veneno crudo de la avispa Polybia occidentalis nigritella, ya que no existe banda de inmunoprecipitación -- frente a los pocitos donde se colocó el veneno de esta avispa.

e) Efecto de distintos inhibidores en las actividades enzimáticas del veneno crudo de avispas. Se probaron distintos inhibidores de proteasas con el objeto de encontrar, alguno que inhibiera la actividad de proteasa, ya que esta actividad como se ha visto en el capítulo V, proviene de restos de tejidos del saco venenoso con el que se prepara el veneno crudo; esta actividad destruye enzimas propias del veneno como son la hialuronidasa y la fosfolipasa. En la tabla X se muestran los resultados que se obtuvieron al probar distintos inhibidores sobre la actividad proteolítica del vene-

Tabla X. Efecto de distintos inhibidores sobre la actividad proteolítica de veneno de avispas.

Inhibidor	(mM)	<u>Polistes*</u>	<u>Polybia*</u>
PMSF ¹	2.0	10.0	61.4
	4.0	33.2	57.6
DFP ¹	2.0	94.0	96.2
	4.0	90.0	96.4
EDTA ¹	2.0	0.0	4.5
	4.0	0.0	5.2
O-FT ¹	2.0	16.2	29.0
	4.0	19.0	29.0
IAA ¹	2.0	0.0	0.0
	4.0	0.0	0.0

* Los resultados se expresan como por ciento de inhibición de la actividad.

¹ Ver tabla X*

Tabla X* Nombre de los inhibidores que se utilizaron para estudiar la actividad proteolítica del veneno de avispas.

INHIBIDORES	NOMBRE
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro.
DFP	Diisopropilfluorofosfato.
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
O-FT	o-Fenantrolina.
IIA	Acido iodoacético.

no de las avispas estudiadas. En este caso los ensayos se realizaron de la misma forma en que se mide la actividad proteolítica (ver capítulo IX). Se tenían como controles enzima sin inhibidor y sustrato sólo con inhibidor. El veneno crudo se incubaba 15 minutos a temperatura ambiente con el inhibidor a la concentración deseada (para que el inhibidor y la enzima puedan reaccionar fácilmente y no exista interferencia por parte del sustrato) y después se pone a reaccionar con el sustrato en presencia del inhibidor a la misma concentración de la incubación. Cada experimento se realizó por triplicado.

En la tabla XI se muestra el efecto que tienen los inhibidores PMSF y DFP sobre la actividad de fosfolipasa y hialuronidasa del veneno crudo de las avispas estudiadas. El PMSF y DFP son los inhibidores más eficaces de la actividad proteolítica del veneno crudo (ver tabla X). Los ensayos se realizaron de la misma manera que en la indicada en material y métodos (Ver Cap. IX) para cada una de las actividades. Los controles son: enzima sin inhibidor y sustrato sólo con inhibidor. El veneno crudo se preincubaba 15 minutos con el inhibidor a la concentración deseada, la reacción con el sustrato se lleva a cabo con una concentración de inhibidor igual a la de preincubación para cada caso. Los resultados son el promedio de 3 experimentos.

Tabla XI.- Efecto de los inhibidores PMSF y DFP sobre las actividades enzimáticas hialuronidasa y fosfolipasa del veneno de avispas.

Efecto de los inhibidores PMSF y DFP sobre la actividad de fosfolipasa de veneno de avispas.

Inhibidor	(mM)	Polistes*	Polybia*
PMSF	2.0	22.0	16.0
	4.0	33.0	16.0
DFP	1.0	0.0	100.0
	0.5	0.0	100.0

Efecto de los inhibidores PMSF y DFP sobre la actividad de hialuronidasa de veneno de avispas.

Inhibidor	(mM)	Polistes*	Polybia*
PMSF	2.0	0.0	0.0
	4.0	2.4	1.7
DFP	0.5	0.0	9.8
	1.0	11.2	73.3

* Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad.

f) Efecto del pH sobre la actividad proteolítica. Se estudió la actividad proteolítica del veneno crudo de ambas avispas en función del pH. Los resultados se muestran en la figura 25a y 25b para cada una de las avispas estudiadas. La actividad se midió de acuerdo al método descrito en el capítulo IX; sólo que en este caso el buffer de la solución donde se lleva a cabo la reacción tiene el pH indicado en la figura. Cada experimento se realizó por duplicado. Las barras en negro indican experimentos en donde la reacción se midió a 1 h de incubación con la enzima al pH indicado. -- Las barras blancas representan experimentos donde la reacción se midió después de 20 hrs. de incubación. En cada experimento se utilizaron 100 *Mg* de veneno crudo.

Al observar con cuidado las Figs. 25a y 25b uno puede ver fácilmente el perfil de una curva de actividad enzimática en función del pH. La curva de actividad proteolítica del veneno de Polistes dorsalis es de forma gaussiana (del tipo de la tripsina) con un pH óptimo de 9 (Fig. 25a). La curva de actividad proteolítica del veneno de Polybia occidentalis nigritella no se puede diferenciar si esta es de forma gaussiana o de forma sigmoideal (del tipo de la Colinesterasa) -- sin embargo el pH donde se obtuvo la máxima actividad enzimática es de 10.

XV.- Purificación de la fosfolipasa del veneno de las avispas estudiadas.

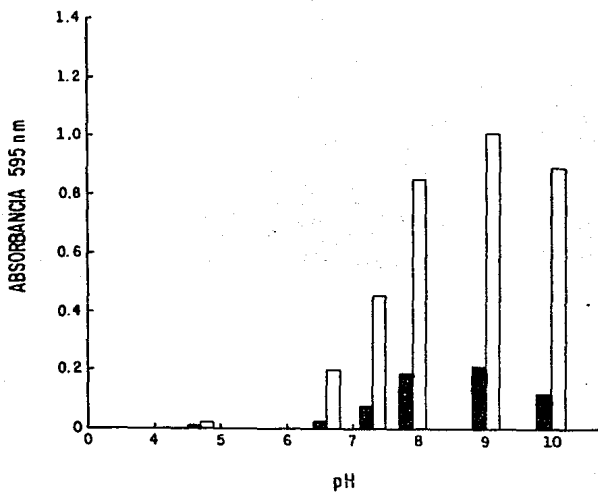
ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL V.T. EN AVISPAS Polistes dorsalis.

Fig. 25a. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del veneno crudo de avispas Polistes dorsalis.

a) Estrategia de purificación. La enzima fosfolipasa del veneno de avispas Polistes dorsalis y Polybia occidentalis nigritella, fué purificada a homogenidad, los pasos seguidos para la purificación se muestran en la Fig. 26.

b) Cromatografía de afinidad. Por medio de este tipo de cromatografía se logró obtener pura la fosfolipasa del veneno de avispas. Los resultados de la cromatografía del veneno dializado de las avispas Polistes dorsalis se muestra en la figura 25a. La cromatografía se realizó como se indica en el capítulo X. Es importante hacer notar que en los tubos colectores de la fracción C hay 1 ml de buffer tris-HCL pH7.95 1.0M con suficiente tritón X-100 para que quede a una concentración final de 0.5%, el tritón X-100 evita que se pierda la actividad de fosfolipasa, y además ayuda a estabilizar la enzima (Denis A.E. 1973). La Fig. 27b muestra una electroforesis en placa de gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS donde se rastrea el grado de purificación de la enzima. El contenido de los carriles se indica en el pie de figura. Las flechas a la derecha del gel indican los marcadores de peso molecular. El peso molecular de la fosfolipasa de acuerdo a esta electroforesis es de 25000. En la Fig. 28a se muestran los resultados de la cromatografía del veneno dializado de las avispas Polybia occidentalis nigritella, prácticamente las condiciones de la cromatografía fueron las mismas que para el veneno de Polistes dorsalis, sólo que como lo digimos en el capítulo X, los tubos colectores de la -

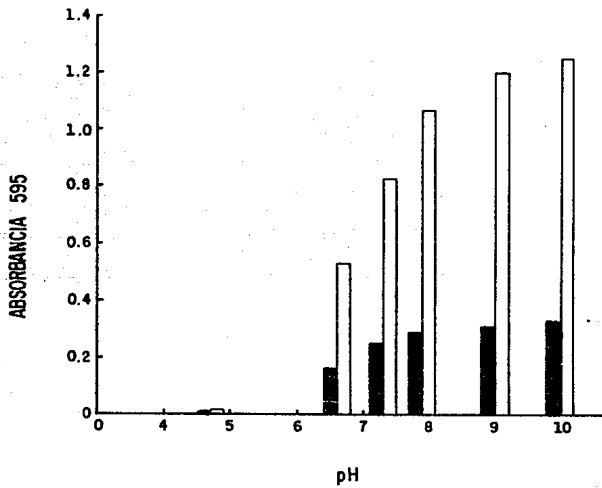
ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL V.T. EN AVISPAS Polybia occidentalis

Fig. 25b. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del veneno crudo de avispas Polybia occidentalis.

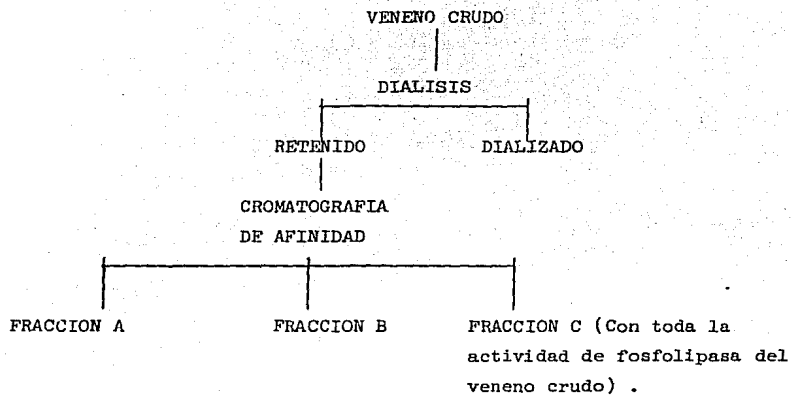


Fig. 26. Estrategia seguida para la purificación de la fosfolipasa del veneno crudo de las avispas estudiadas.

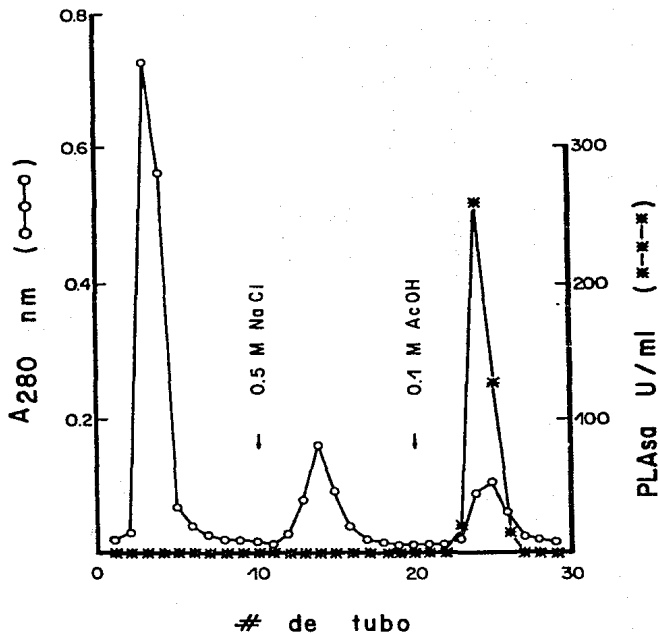


Fig. 27a. Cromatografía de 5.83 mg de veneno dializado (36.0 mg de veneno crudo) de Avispas *Polistes dorsalis* en una columna de 0.9 X 11.0 cm de PC-Sefarosa 4-B. El cargado se hizo en un buffer de Tris-HCl 50mM pH 7.95 con 10mM de CaCl_2 . Se hizo un lavado con el mismo buffer pero conteniendo 0.5 M de NaCl. La elución de fosfolipasa se realizó con 0.1 M de ácido acético.

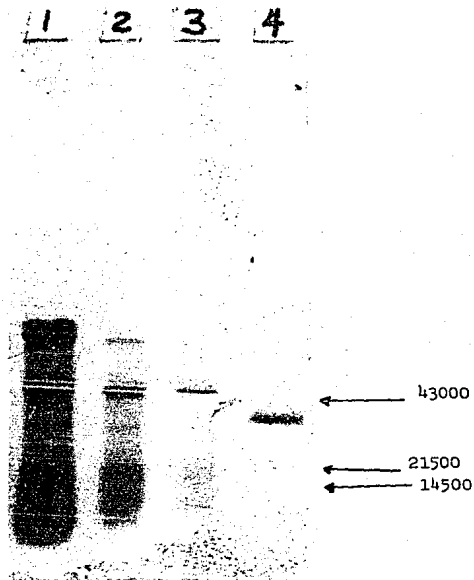


Fig. 27b. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5%) con SDS en placa de diferentes fracciones de la purificación de la fosfolipasa de veneno de avispa Polistes dorsalis, el contenido de los carriles es:

- 1 Veneno crudo sin dializar 14 μ g.
- 2 Veneno dializado 14.3 μ g.
- 3 Proteína no pegada 4.2 μ g.
- 4 Fosfolipasa eluida con ácido acético 5.0 μ g.

fracción C^{*} del veneno de avispas Polybia occidentalis nigritella contienen 1 ml de buffer tris-HCL pH 7.95 1.0M no tienen tritón X-100, ya que la fosfolipasa de Polybia occidentalis nigritella no pierde su actividad en ausencia de este detergente, por lo que es más estable que la enzima de Polistes dorsalis. En la Fig. 28b se muestra una electroforesis en placa de gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS donde se rastrea el grado de purificación de la enzima. El contenido de los carriles se indica en el pie de figura. El peso molecular de la fosfolipasa calculado en esta electroforesis es de 40272.

* Esta fracción es la que contiene la actividad de fosfolipasa, como puede observarse en las Figs. 27a y 28a.

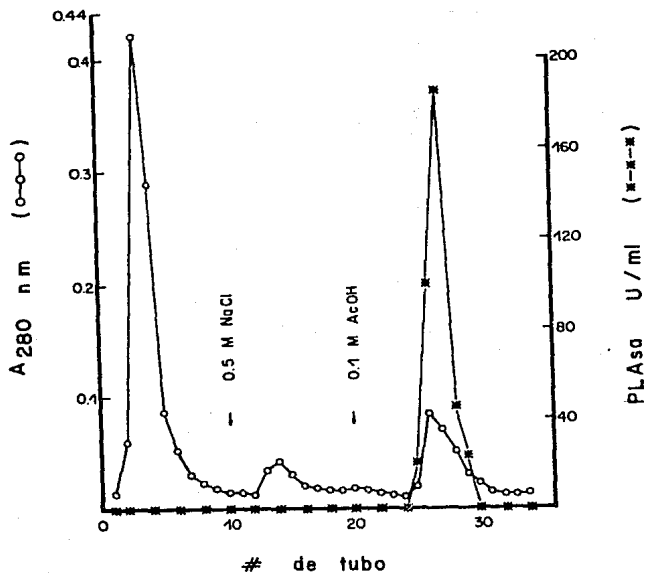


Fig. 28a. Cromatografía de 5.0 mg de veneno dializado (40.48 mg de veneno crudo) de avispas Polybia occidentalis en una columna de 0.9 X 11 cm de PC-Sefarosa 4B. El cargado se hizo en un buffer de Tris-HCl pH 7.95 50 mM con 10mM de CaCl_2 . Se hizo un lavado con el mismo buffer pero conteniendo 0.5 M de NaCl. La elución de la fosfolipasa se realizó con 0.1M de ácido acético.



Fig. 28b. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5%) con SDS en placa de distintas fracciones de la purificación de fosfolipasa del veneno de avispa Polybia occidentalis, el contenido de cada carril junto con la cantidad de proteína (en μg) aplicada se indica en seguida:

- 1 Veneno crudo 160 μg .
- 2 Fracción de proteínas que pasan a través de la membrana de diálisis (tienen un peso molecular menor de 10 000) 11.96 μg .
- 3 Veneno dializado 28.58 μg .
- 4 Proteína no pegada 10.4 μg .
- 5 Proteína pegada inespecíficamente 1.34 μg .
- 6 Fosfolipasa eluída con acético 6.48 μg .
- 7 " " " " 4.8 μg .
- 8 " " " " 3.38 μg .
- 9 Marcadores de peso molecular: 60,000 45,000 24,000 18,400 14,300.

E. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los venenos crudos de las dos avispas estudiadas tienen las tres actividades enzimáticas medidas: hialuronidasa, fosfolipasa y proteasa.

En ambos venenos el 75% de la proteína total lo constituyen moléculas con peso molecular bajo mientras que el componente proteico de alto peso molecular esta entre un 20% y 30% de la proteína total. Los pesos moleculares aparentes de enzimas estudiadas en el veneno crudo son: Para Polistes dorsalis 52000, 43000 y 50000 de la hialuronidasa, fosfolipasa y proteasa respectivamente. Para Polybia occidentalis nigritella son de 48000, 31000 y 31000 para hialuronidasa, fosfolipasa y proteasa respectivamente.

De acuerdo a las inmunodifusiones realizadas no pudo detectarse antígeno 5 (Ag 5) en el veneno crudo de Polybia occidentalis nigritella.

El pH óptimo para la actividad proteolítica del veneno de Polistes dorsalis es de 9, mientras que el pH óptimo para la actividad proteolítica del veneno de Polybia occidentalis nigritella es de 10 ó posiblemente mayor.

El inhibidor más eficiente de la actividad proteolítica

tica del veneno de ambas avispas es el DFP a 1.0 mM. Sin embargo su efecto en las otras enzimas es bastante diferente, ya que en el veneno de Polistes dorsalis no afecta la actividad de fosfolipasa y hialuronidasa a una concentración de 1.0 mM; por el contrario en el veneno de Polybia occidentalis nigritella inhibe totalmente la actividad de fosfolipasa e inhibe un 73% la actividad de hialuronidasa a una concentración de 1.0 mM.

El procedimiento de purificación de la fosfolipasa del veneno crudo de ambas avispas por medio de cromatografía de afinidad permite un rendimiento cuantitativo y un factor de purificación de 20. Las fosfolipasas de estas dos avispas son distintas; así tenemos que la fosfolipasa del veneno de las avispas Polistes dorsalis no es afectada por DFP a 1.0 mM y es dependiente para su estabilidad de tritón X-100, ya que sólo en un buffer de Tris-HCl pH 7.95-X-100 al 0.5% es capaz de mantener su actividad. En cambio la fosfolipasa del veneno de avispas Polybia occidentalis nigritella es inhibida totalmente por DFP a 1.0 mM y esta enzima no es dependiente del tritón X-100 para mantenerse estable, por lo que esta enzima no pierde su actividad si se mantiene en un buffer de Tris-HCl pH 7.95 sin tritón X-100.

Los pesos moleculares calculados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS en placa son de -

25000 para la fosfolipasa del veneno de avispas Polistes dorsalis y de 40000 para la fosfolipasa del veneno de las avispas Polybia occidentalis nigritella. La diferencia que existe entre los pesos moleculares de la fosfolipasa de Polistes dorsalis calculados por filtración en gel (43000)- y por electroforesis (25000), posiblemente se deba, a que esta enzima forma dímeros que en la filtración en gel viajan como una sola molécula, en cambio en la electroforesis, este dímero se disocia por la presencia del SDS. La fosfolipasa del veneno de avispas Polybia occidentalis nigritella parece no formar dímeros y por eso uno obtiene pesos moleculares parecidos tanto por filtración en gel como en electroforesis el peso molecular es de 40000. Esto podría considerarse como otra posible diferencia entre las fosfolipasas del veneno de las avispas estudiadas, así tendríamos que la fosfolipasa de Polistes dorsalis posiblemente forme dímeros, mientras que la fosfolipasa de Polybia occidentalis nigritella no forma dímeros.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo y los citados en la introducción se puede afirmar lo siguiente. Los patrones electroforéticos y cromatográficos del veneno de avispas Polistes dorsalis son muy parecidos a los obtenidos para la avispa Vespula, compare las figuras 16, 20 y 21. El veneno de la avispa Polybia occidentalis nigritella presenta un perfil cromatográfico muy parecido al de las avispas Polistes y Vespula en cuanto a la pre---

sencia de componentes de bajo peso molecular, sin embargo - el veneno de Polybia occidentalis nigrivittata posee más componentes de bajo peso molecular que los venenos de Vespula y Polistes, compárense las figuras 16, 20 y 22. La distribución de las actividades enzimáticas en los patrones cromatográficos de los venenos de las avispas Polistes, Polybia y Vespula es la misma, en todos estos venenos las actividades enzimáticas corresponden a las proteínas de alto peso molecular. Las inmunodifusiones del veneno de Polybia occidentalis nigrivittata (Fig. 24) sugieren que el veneno de esta avispa no contiene una de las proteínas que poseen los venenos de Polistes y Vespula, esta proteína es el antígeno 5.

F. BIBLIOGRAFIA

Abe, T., Kaway, No., Niwa, A., 1982. Purification and properties of a presynaptically acting neurotoxin, mandarotoxin, from hornet (Vespa mandarinia). Biochemistry, 21: -- 1693-1697.

Alagón, A.C. Kuan, J. & King, T.P., 1982. Venom allergens of Vespa germanica, V. maculifrons and V. vulgaris. J. Allergy Clin. Immun. 69; 114

Benich & Johansson, 1971. Structure and function of human Immunoglobulin E. Adv. Immunol., 13: 1-35.

Borror, D.J., & DeLong, M.D. 1971. An Introduction to the Study of Insects. 3rd edition Holt, Renahart and Wiston -- INC. USA. p. 537-615.

De Bach, P., 1974. Biological Control by Natural Enemies. - Academic Press London pp 300.

Dennis, E.A., 1973. Kinetic dependence of phospholipase A₂ activity on the detergent triton X-100. J. Lipid Res., 14: - 152-159.

Eisen, H.N., 1974. Immunology and Introduction to Molecular and Cellular Principles of Immune Responses. Harper and Row -- Publisher. INC. New York pp. 581-595.

Haberman, E., 1972. Bee and wasp venoms. Science, 117: 314--322.

King, T.P., 1976. Chemical and biological properties of some atopic allergens. Adv. Immunol., 23: 77-105.

King, T.P., Sobotka, A.K., Kochoumain, L., & Lichtenstein, - M.L., 1976. Allergens of honey bee venom. Arch. Biochem. - Biochem. Biophys. 172: 661-671.

King, T.P., Sobotka, A.K., Alagón, A.C. Kochoumian & Lich--- tenstein, 1978. Protein allergens of white-face hornet, -- yellow hornet, and yellow jacket venoms. Biochemistry, 17: - 5165-5174.

King, T.P., Alagón, A.C. Kuan, J., Sobotka, A.K. & Lichtens- tein, L.M., 1983 Immunochemical studies of yellowjacket venom protein. Molecular Immunology 20: 297-308.

Laemmli, U.K., 1970 Clevege of structural proteins during -- the assembly of the head of bacteriophage T. 4. Nature Lond., 227: 680-685.

Lazar, M. & Schuwartz, M.D., 1980. Compendium of Immunology - Vol. I. Ven Nostrand Reinold company. New York pp. 515.

Lichtenstein, L.M. & Osler, A.G., 1964. Studies on mechanisms of hipersensitivity phenomena. J. exp. Med., 120: 507-530.

Metcalf C.L. & Flint W.P., 1962. Insectos Destructivos e Insectos Utiles. Traducción de la 4o. edición en inglés. CECSA -- México, D.F. pp. 900

Metzger, H. Goetze, A., Kamellooulos, J. Holowka O. & Fewtrell, C., 1982. Structure of the high-affinity mast cell -- receptor for IgE. Federation Proc., 41: 8-11.

Noel, R.R., Milgrom F. & Van Oss, C.J., 1973. Principles of Immunology 2nd, edition. Macmillan publishing Co. INC. New York USA. pp. 301-318.

Pisano, J.J. & Bronzert J.T., 1969. Analysis of amineacid - phenylthiohydantoin by gas chromatography. J. Biol Chem., - 244: 5597-5607.

Pieck, T., 1982. Effect of venom of diger wasp Philanthus triangulum F. on the sixth abdominal ganglion of the cockroach. Comp. Biochem. Physiol. 71 C: 159-164.

Radbard, D. & Chrambach, 1970. Unified theory for gel electro-
phoresis and gel filtration. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 65:
970-977.

Rawn J.D., 1983. Biochemistry. Harper and Row publishers INC.
USA. pp. 163-192.

Reisner, A.H., Nemes. P. Bocholtz, C., 1975. The use of coo-
massie brilliant blue G-250 percloric acid solution for stain-
ing in electrophoresis and isoelectric focusing on poly --
acrilamide gels. Analyt. Biochem., 64: 509-516.

Richard O.W., 1978. The Social Wasps of the Americas. British
Museum Natural history (Eds.) London. pp. 400.

Rinder Knecht, H., Geokas, M.C. Silveram P. & Haverback B.J.,
1968. A New ultrasensitive method for the determination of --
Proteolytic activity. Clinica Chim. Acta, 21: 197-203.

Robert M. 1984. Alergias aprendidas. Naturaleza, 15: 254.

Rock, O.C. & Snyder F., 1975. Rapid purification of phospholi-
pase A₂ from Crotalus adamanteus venom by affinity cromato-
graphy. J. Biol. Chem. 250: 6564-6566.

Rezedowski, J. 1978 Vegetación de México. Editorial Limusa --
S.A. México, D.F. p. 154-178.

Shiloah, J. Klibansky, C., De Vries, A., & Berger, A., 1973. Phospholipase B activity of purified phospholipase from Viper a palestinae venom. J. Lip. Res. 14: 267-278.

Spanjer W., May, T.E., Pieck, T. & De Haan, N., 1982. Partial Purification of components from the paralyzing venom of digger wasp Philanthus triangulum F. (Hym. sphec) and their action on neuromuscular transmission in the locust. Comp. Biochem. Physiol. 71 C: 149-157.

Spradbery, J.P., 1973. Wasps and Account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasp. University of Washington Press. pp. 408.

Sobotka, K.A., 1982. Role of receptor aggregation in triggering IgE-mediated reactions. Federation Proc., 14: 12-16.

Swan, L.A., 1964. Beneficials Insects. Macmillan Publishing-Co. Inc. New York USA, pp. 300.

Terrace G. Cooper., 1977. The Tools of Biochemistry. John -- Willey and Sons New York pp. 423.

Tolksdorf S. McCreedy, H.H., Mc Coullagh, D.R. Schewenk. E., 1949. The turbidimetric assay of hyaluronidase. J. Lab. clin. Med. 34: 74-89.

Takashi, A., Kawai, N. & Niwa, A., 1982. Purification and properties of a presynaptically acting neurotoxin, mandarin toxin, from hornet (Vespa mandarinia). Biochemistry, 21: - 1693-1697.

Weber, K. & Osborn M., 1969. The Reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate polyacrilamide gel-electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412.

Week, B., 1973. Scand. J. Immunol. Suppl. 1, 2, 15.

Wilson E. O., 1980. Sociobiologia. Ed. Omega. Barcelona España pp. 701.

Yoshida, J., Geller G.R. & Pisano, J.J., 1976. Vespulokinis: New Carbohydrate containing bradykinin dervatives. Biochemistry, 15 No. 1: 61-64.