

# Comparación de perfiles electroforéticos del veneno de especies de Hymenoptera colectados en diferentes localidades de Colombia

David Cáceres Marañón<sup>1</sup>, Dimitri Forero Fuentes<sup>1</sup>, Ricardo Vera Bravo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, <sup>2</sup>Departamento de Química

Pontificia Universidad Javeriana

**Resumen:** Los venenos de Hymenoptera han sido estudiados con el fin de encontrar en sus cocteles proteicos péptidos que puedan tener un uso potencial en humanos. Sin embargo, existen especies ya estudiadas como *Apis mellifera* que podrían llegar a tener complejos proteicos distintos según el lugar donde se encuentre como ya se ha reportado en algunas especies del mismo orden, ampliando las posibilidades de encontrar péptidos benéficos. Asimismo, los venenos de algunas especies de Hymenoptera no han sido estudiados y se desconoce su contenido proteico, como ocurre con *Synoeca septentrionalis* y especies del género *Eulaema*. Por esta razón, utilizando la electroforesis SDS-PAGE obtuvimos y comparamos los perfiles electroforéticos del veneno de individuos de *A. mellifera* colectados en dos ubicaciones distintas, en los que encontramos que a pesar de ser la misma especie existen cambios en las proteínas de sus venenos. Adicionalmente obtuvimos los perfiles del veneno de *S. septentrionalis* y de una especie de *Eulaema*, los comparamos entre sí y con el de *A. mellifera*, donde encontramos proteínas que posiblemente se comparten entre los venenos de las diferentes especies.

Palabras clave: Electroforesis, proteínas, péptidos, *Apis mellifera*, *Synoeca septentrionalis*, *Eulaema* sp.

---

## Introducción

Los venenos son mezclas complejas de proteínas, péptidos, sales y moléculas orgánicas, estos han sido importantes tanto para aquellos linajes que lo poseen y lo usan para cazar o para defenderse (Casewell et al., 2013) como para los seres humanos que los han visto a través de la historia como sustancias relacionadas con dolor, considerando que un posible envenenamiento puede causarnos enfermedades o incluso la muerte (Utkin, 2015). Sin embargo, hemos sabido utilizarlos como herramientas (Piek, 1986), y ha sido tal la importancia que muchas comunidades y culturas alrededor del mundo siguen utilizando los animales venenosos y los venenos en sí (Alonso-Castro, 2014). Desde la segunda mitad del siglo pasado, los venenos han empezado a generar un interés particular por el uso medicinal que se les puede llegar a dar, llevando a que farmacéuticas e investigadores realicen estudios para encontrar un potencial uso. Debido a la gran diversidad de venenos, diferencias en composición y en sus blancos, los venenos pueden ser observados desde distintos puntos según el campo en el que se deseen utilizar, como puede

ser en el desarrollo de antídotos (Casewell et al., 2013) y el desarrollo de medicamentos (King, 2011). En este desarrollo ha tenido mucho que ver el conocimiento tradicional, donde algunas veces se toman las bases para desarrollar los medicamentos o por lo menos empezar a investigar, además el reciente auge de herramientas y disciplinas como las omicas, principalmente la genómica, transcriptómica y proteómica facilitan el estudio de los venenos y sus posibles funcionalidades (von Reumont et al., 2014). Existen algunos linajes donde la composición del veneno puede variar de manera intraespecífica en el que juega un rol importante la ubicación geográfica de los individuos, esto puede suceder en serpientes (Jayanthi & Gowda, 1988), escorpiones (Schaffrath et al., 2018), gastrópodos (Dutertre et al., 2014) e Hymenoptera (Bernardi et al., 2017; Colinet et al., 2013; Dias et al., 2014; Poirié et al., 2014; Touchard et al., 2015), esto genera que se amplíen las posibilidades de encontrar péptidos y proteínas potencialmente útiles en el desarrollo de medicamentos, donde incluso, en la misma especie podemos tener complejos proteicos diferentes.

El uso en medicina del veneno de Hymenoptera, orden al que pertenecen abejas, avispas y hormigas, ha sido desarrollado a nivel mundial desde el siglo pasado, siendo el de *Apis mellifera* el que más investigaciones presenta y uno de los pioneros; una de las primeras moléculas aisladas de su veneno fue el Mastoparan, un péptido presente en el veneno de varias especies de Hymenoptera, este presenta actividades farmacológicas como: desgranulador de mastocitos (Hirai et al., 1979); acción en la permeabilización de plaquetas (Ozaki et al., 1990); actividad antimicrobiana (Silva et al., 2017) y efectos neurológicos positivos y actividad antitumoral (Moreno & Giralt, 2015). Otros péptidos que han sido aislados del veneno de *Apis mellifera* también han presentado actividades farmacológicas, podemos destacar dos; la Melitina, que actúa principalmente en el sistema nervioso central de algunos mamíferos evitando la neuroinflamación y la posterior muerte neuronal, por esto ha sido muy importante en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Silva et al., 2015) y también podría ser una alternativa a drogas neurolépticas, debido a que presenta propiedades antipsicóticas sin evidencia de efectos secundarios como los producidos por medicamentos convencionales (Dantas et al., 2014); por otra parte la Apamina aumenta la plasticidad sináptica y la excitabilidad neuronal (Silva et al., 2015). En el caso de las avispas tenemos a las pompilidotoxinas (PMTX)  $\alpha$  y  $\beta$ , dos péptidos utilizados en tratamientos para la epilepsia (Magloire et al., 2011). Sin embargo, en otros casos se han encontrado propiedades medicinales directamente en el veneno; el de la hormiga *Dinoponera quadriceps* tiene actividad antimicrobiana eficaz contra *Staphylococcus aureus* (Lima et al., 2014) y el veneno de *Vespa orientalis* aumenta la liberación de antihistamínicos, que tiene gran importancia en alergias e inflamaciones (Jalaei et al., 2016). A pesar de ser una especie pionera en este campo y contar con numerosas investigaciones,

aún no se ha demostrado si la composición del veneno de *Apis mellifera* tiene cambios según el lugar donde se encuentre geográficamente. Sin embargo Hymenoptera es un grupo donde ya se ha evidenciado dicha variación, que puede ocurrir por razones de especificidad con las presas o huésped (Poirié et al., 2014), regulación génica (Colinet et al., 2013), dieta (Bernardi et al., 2017), existencia de especies crípticas (Touchard et al., 2015), presencia de depredadores o comportamiento sexual (Dias et al., 2014).

Por esta razón, se comparó el veneno de dos poblaciones de *A. mellifera* que se encuentren en diferentes ubicaciones geográficas, con el fin de evidenciar si existe un cambio en la expresión y composición proteica de su veneno, lo cual se puede lograr utilizando electroforesis SDS-PAGE; adicionalmente, se obtuvieron los perfiles electroforéticos de especies como *Synoecca septentrionalis*, considerada una de las tres especies de Hymenoptera con la picadura más dolorosa, teniendo una puntuación de 4 en la escala de dolor de Schmidt (Schmidt, 2016), así como de la una especie del género *Eulaema*, debido a que el contenido proteico de sus venenos es desconocido, de modo que con esta investigación se quiso realizar un aporte al entendimiento bioquímico de estas especies.

## **Materiales y métodos**

- **Colecta de los individuos**

Los individuos se colectaron de acuerdo con el decreto 1376 de 2013 y según el Permiso Marco de Recolecta, resolución No. 0546 de 2014 y modificado por la resolución No. 0778 de 2017.

**Colecta *Apis mellifera* muestra rural:** Se colectaron 250 individuos de *Apis mellifera* que fueron colectados directamente del apiario, se utilizó una escobilla para “barrer” las abejas a los recipientes donde se guardaron. Esta colecta se realizó en un sitio rural en la finca Lituania, vereda Carolina del municipio de Viotá, Cundinamarca a 936 msnm. (4,480278, -74,478611). La colecta se realizó con la autorización de las personas encargadas.

**Colecta *Apis mellifera* muestra urbana:** Se colectaron 120 individuos de *Apis mellifera* que fueron tomados directamente del apiario de manera manual y utilizando los tubos de salida de cada colmena. Esta colecta se realizó en el apiario de la Pontificia Universidad Javeriana, sitio urbano ubicado en Bogotá D.C a 2672 msnm (4,628333, -74,0625). La colecta se realizó con la autorización de las personas encargadas.

**Colecta *Synoecca septentrionalis*:** Se colectaron 17 individuos hembras de un único panal, este fue perturbado para que los individuos salieran, posteriormente se atraparon con una jama y fueron puestos

en recipientes de plástico. Se colectaron en un sitio rural en la finca La Cuenchar, municipio La Palma, departamento de Cundinamarca a 1379 msnm (5,353048, -74,396335).

**Colecta *Eulaema* sp.:** Se colectó una hembra utilizando una jama y se introdujo en un recipiente de plástico. Se colectó en un sitio rural en la finca La Cuenchar, municipio La Palma, departamento de Cundinamarca a 1480 msnm (5,355837, -74,400282).

- **Extracción de los reservorios de veneno de todas las especies**

Los individuos colectados fueron trasladados a la Pontificia Universidad Javeriana, donde se guardaron en un congelador a -17 °C por 45 minutos para sacrificarlos, posteriormente se realizó la extracción de los reservorios de veneno de manera manual, en la que utilizando unas pinzas de punta fina se halo el agujón desprendiendo el aparato picador del individuo y luego, con una pinza, se separó el reservorio del agujón y se quitaron los residuos con el fin de dejar el reservorio de veneno lo más limpio posible. Luego de este proceso, los reservorios se guardaron en tubos de microcentrífuga (ependorf) de 1,5 ml a -17 °C. El número de reservorios que se extrajeron por especie fue: *Apis mellifera* muestra rural 104 reservorios; *Apis mellifera* muestra urbana 120 reservorios; *Synoeca septentrionalis* 17 reservorios; *Eulaema* sp. 1 reservorio. La extracción manual se realizó con base a lo propuesto por Tom Piek (Piek, 1986). Para una mejor visualización de los individuos durante el proceso de extracción se utilizó un estereoscopio.

- **Identificación del material colectado**

Para la identificación del material colectado se utilizaron las claves taxonómicas y descripciones morfológicas (Fernández & Sharkey, 2006; Menezes et al., 2011; Michener, 2000).

- **Preparación de las soluciones de veneno**

**Preparación solución veneno *Apis mellifera*:** Para la preparación de las soluciones de veneno de las dos muestras de *Apis mellifera* se utilizó el mismo procedimiento. Se agregó a cada uno de los eppendorf, donde se encontraban los reservorios, un volumen aproximado de 0,915 µL de buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) por reservorio, luego los reservorios con PBS se centrifugaron a 10000 gravedades por 15 min., con el fin de extraer el veneno y que los reservorios y otros residuos se precipitaran. Enseguida, se retiraron de la centrifuga y con una micropipeta se recuperó el sobrenadante (veneno con PBS) y se llevó a un eppendorf limpio, que luego se guardó a -17 °C. El volumen que se adiciono de PBS a la muestra de *Apis mellifera* rural fue de 95,16 µL, de los cuales se lograron recuperar 80 µL de muestra; A la muestra de *Apis mellifera* urbana se le adicionaron 109,8 µL de PBS, de los que se recuperaron 82 µL de muestra.

**Preparación solución veneno *Synoecca septentrionalis*:** Al eppendorf con los reservorios se le adicionaron 35  $\mu$ L de PBS, se centrifugo a 12000 gravedades por 20 min., se sonicó por 15 min., se volvió a centrifugar a 12000 gravedades por 30 min. Luego de esto, se recuperaron 20  $\mu$ L de sobrenadante que se pasaron a un eppendorf limpio y que se almaceno a -17 °C

**Preparación solución veneno *Eulaema* sp.:** Se adicionaron 10  $\mu$ L de PBS al eppendorf con el reservorio, se centrifugo a 12000 gravedades por 20 min., se sonicó por 15 min., se volvió a centrifugar a 12000 gravedades por 30 min. Luego de esto se recuperaron 10  $\mu$ L de muestra, que se almacenaron en un eppendorf limpio a -17 °C.

- **Electroforesis SDS-PAGE**

Para la electroforesis se utilizó el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell – BIO-RAD, esta se realizó de acuerdo con el sistema Laemmli, utilizando geles de Poliacrilamida, el de apilamiento al 4% y el de resolución al 13 %, Antes de ser sembradas las muestras, se diluyeron con buffer muestra (1/3). La muestra de *Apis mellifera* urbana formo un precipitado al momento de mezclarse con el buffer muestra, por lo que se centrifugó a 12000 gravedades durante 15 minutos, esto con el fin de que el material solido no interfiriera al momento de correr la electroforesis. Se sembraron volúmenes de 6  $\mu$ L de cada una de las muestras en los diferentes pozos del gel y se utilizó un patrón de peso molecular de 202,915 kDa a 5,968 kDa (BIO-RAD #161-0318), del cual se sembraron 4  $\mu$ L. Al finalizar la electroforesis uno de los geles se tiño con azul de Coomassie durante 1 hora, se aplicó una solución de desteñido de 10% metanol, 20% ácido acético, 20% etanol, 45% agua y 5% glicerol, en la que se dejó el gel durante 1 hora, cambiando la solución cada 15 minutos. Luego de esto los dos geles, el gel teñido bajo el método de azul de Coomassie junto con el que no se tiño, fueron teñidos con el método de tinción de plata propuesto por Mortz y colaboradores (Mortz, Krogh, Vorum, & Görg, 2001). Los dos geles que se corrieron fueron, el gel #1 (Figura 2) que tenía las muestras de los venenos de *A. mellifera* urbana y *A. mellifera* rural, y el gel #2 (Figura 3) que tenía las muestras de los venenos de *S. septentrionalis*, *A. mellifera* rural y *Eulaema* sp. Para la determinación de los pesos moleculares se elaboró una curva de calibración para cada uno de los geles utilizando los patrones de peso molecular y la distancia de las bandas correspondientes, luego las distancias de las bandas de las muestras se remplazaron en la ecuación de la curva para hallar el peso molecular de cada una.

- **Identificación de proteínas**

Luego de determinar los pesos moleculares de las bandas del gel #1 se realizo una aproximación de las bandas observadas utilizando los pesos moleculares con base a las proteínas reportadas del veneno de *A.*

*mellifera* por Van Vaerenbergh y colaboradores (Van Vaerenbergh et al., 2014), y por Zalat y colaboradores (Zalat et al., 2002).

- **Método Bradford para cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el protocolo de Bradford (Bradford, 1976), se realizó una curva de calibración con BSA en concentraciones de 0 a 60  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para leer la absorbancia de la muestra se hizo una dilución de 5  $\mu\text{L}$  de veneno en 295  $\mu\text{L}$  de agua. La absorbancia se leyó a 595 nm.

- **Pruebas antimicrobianas**

Se realizaron pruebas antimicrobianas contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con los venenos de *A. mellifera* urbana, *A. mellifera* rural y *S. septentrionalis*. Se realizaron soluciones de 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada uno de los venenos, haciendo diluciones con dimetilsulfóxido (DMSO) de la solución de veneno en base a las concentraciones obtenidas en la cuantificación de proteínas. Se agregó aproximadamente una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL de cada bacteria a la solución de agar mientras estaba líquida, luego se sirvió en las cajas de Petri; cuando se solidificó el agar se hicieron 6 pozos en este removiendo el medio, para cada veneno se inocularon 30 microlitros por pozo de cada una de las diferentes concentraciones planteadas, como control positivo para *E. coli* se empleó Ciprofloxacina, como control positivo para *S. aureus* se utilizó Novobiocina y como control negativo se usó DMSO una caja de Petri se utilizó por solución de veneno a evaluar y se realizó por duplicado. Se incubaron durante 48 horas a 37 °C

## Resultados

- **Extracción de aparatos picadores**

Tras la extracción de los aparatos picadores para cada individuo se lograron identificar el aguijón y el reservorio de veneno para cada una de las especies (Figura 1).

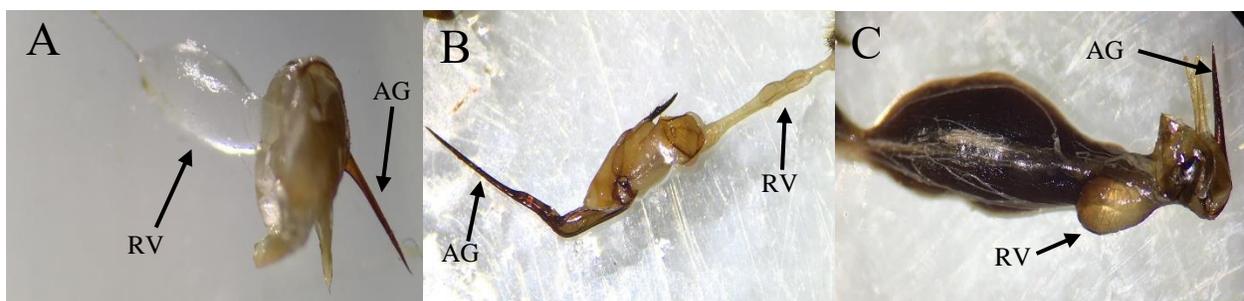


Figura 1: Se muestran el aguijón (AG) y el reservorio de veneno (RV) en los aparatos picadores extraídos de *A. mellifera* (A), *Eulaema* sp. (B) y *S. septentrionalis* (C).

- **Geles de electroforesis**

En el gel #1 (Figura 2 y tabla 1) se tiñeron y observaron 23 bandas diferentes entre las muestras *Apis mellifera* urbana y *Apis mellifera* rural, de las cuales 12 bandas son compartidas entre las dos muestras de veneno, 6 son únicas de la muestra de *A. mellifera* rural y 5 son únicas de la muestra de *A. mellifera* urbana. Se observaron en total 18 bandas en la muestra de *A. mellifera* rural, a las que se estimaron pesos moleculares de 137,642, 127,968, 121,899, 107,957, 88,889, 74,989, 66,413, 57,405, 46,132, 36,183, 29,077, 22,806, 18,778, 16,834, 12,731, 8,221, 6,371 y 3,872 kDa. En la muestra de *A. mellifera* urbana se observó un total de 17 bandas, a las que se estimaron pesos moleculares de 144,494, 127,968, 107,957, 99,157, 88,889, 74,989, 64,819, 46,132, 36,183, 29,077, 22,259, 18,778, 16,834, 14,550, 8,221, 6,371 y 3,872 kDa.

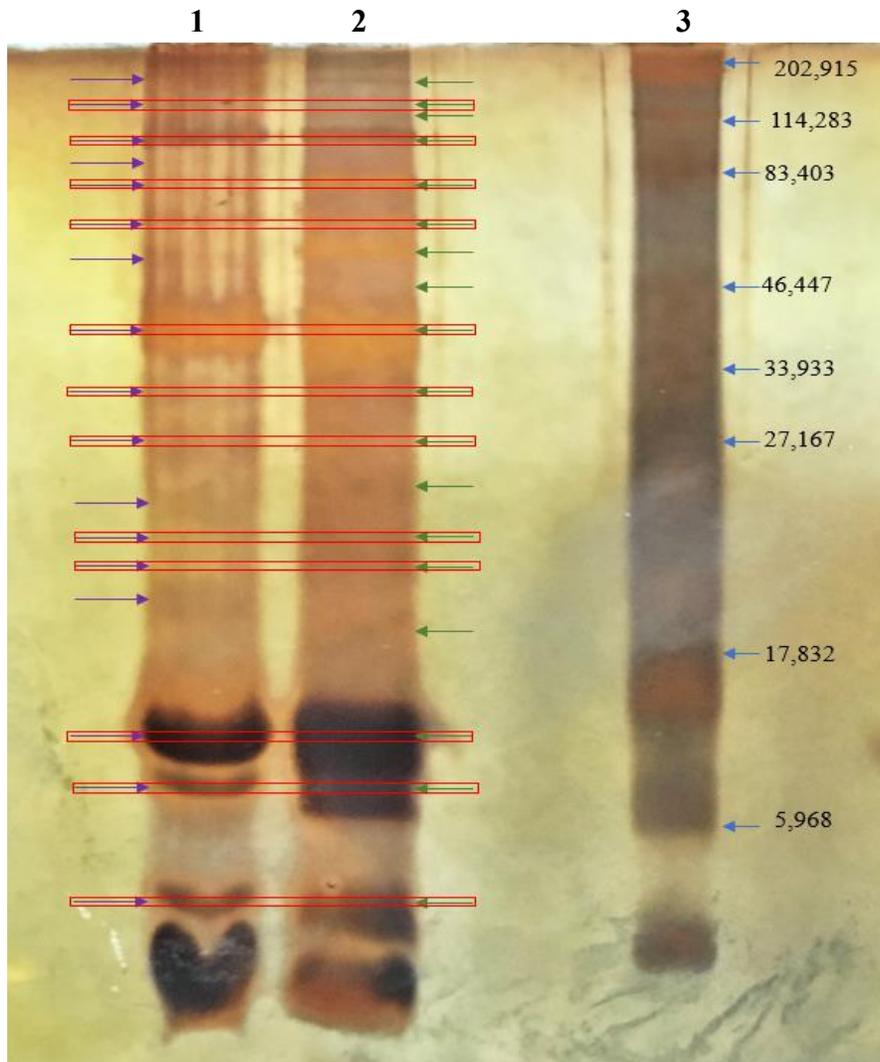


Figura 2: Gel #1 de electroforesis con el contenido proteico de los venenos de *A. mellifera* urbana (1) y *A. mellifera* rural (2); también está presente el patrón de peso molecular (3). Las flechas señalan las bandas identificadas. Las bandas encerradas en rojo son las compartidas entre los dos venenos.

Tabla gel #1					
Banda	Peso molecular (kDa)	<i>A. mellifera</i> urbana (UR)	<i>A. mellifera</i> rural (RU)	Comentario	Descripción*
1	144,494	+		No se expresa en <i>A. mellifera</i> RU	No reportada
2	137,642		+	No se expresa en <i>A. mellifera</i> UR	No reportada
3	127,968	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR > <i>A. mellifera</i> RU	$\alpha$ -manosidasa
4	121,899		+	No se expresa en <i>A. mellifera</i> UR	No reportada
5	107,957	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Hsp70
6	99,157	+		No se expresa en <i>A. mellifera</i> RU	No reportada
7	88,889	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Dipeptidil peptidasa IV
8	74,989	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Serina proteasa
9	66,413		+	No se expresa en <i>A. mellifera</i> UR	5'-nucleotidasa
10	64,819	+		No se expresa en <i>A. mellifera</i> RU	Proteína con función desconocida
11	57,405		+	No se expresa en <i>A. mellifera</i> UR	Profil carboxipeptidasa
12	46,132	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Hialuronidasa
13	36,183	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR = <i>A. mellifera</i> RU	Fosfolipasa A
14	29,077	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR > <i>A. mellifera</i> RU	Tripsina
15	22,806		+	No se expresa en <i>A. mellifera</i> UR	Forma de fosfolipasa A
16	22,259	+		No se expresa en <i>A. mellifera</i> RU	Forma de fosfolipasa A
17	18,778	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR = <i>A. mellifera</i> RU	Peptidil-profil cis-trans isomerasa B
18	16,834	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR = <i>A. mellifera</i> RU	Proteína similar a C1q
19	14,550	+		No se expresa en <i>A. mellifera</i> RU	Fosfolipasa A
20	12,731		+	No se expresa en <i>A. mellifera</i> UR	Fosfolipasa A
21	8,221	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Secapina
22	6,371	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Melitina
23	3,872	+	+	Expresión <i>A. mellifera</i> UR < <i>A. mellifera</i> RU	Apamina

Tabla 1: Pesos determinados en las bandas observadas en el gel #1 donde están presentes las muestras de veneno de *A. mellifera* urbana (UR) y de *A. mellifera* rural (RU). El símbolo (+) representa la expresión de una proteína. \*Se realizó una aproximación de las bandas observadas utilizando los pesos moleculares con base a las proteínas reportadas en el artículo de Van Vaerenbergh et al., 2014 y en el artículo de Zalut et al., 2002.

En el gel #2 que comprendía el contenido proteico de *Apis mellifera* rural, *Eulaema* sp. y *Synoecca septentrionalis* (tabla 2 y Figura 3) se tiñeron y observaron 42 bandas diferentes, de las cuales 3 son compartidas por las 3 especies, 5 compartidas entre *Eulaema* sp. y *S. septentrionalis*, 3 entre *Eulaema* sp. y *A. mellifera*, 2 compartidas entre *S. septentrionalis* y *A. mellifera*, 8 propias de *Eulaema* sp., 11 propias de *S. septentrionalis* y 11 propias de *A. mellifera*. Para la muestra de *Eulaema* sp. se observaron 19 bandas, a las que se estimaron pesos moleculares de 121,568, 116,289, 111,240, 104,073, 101,789, 96,294, 80,627, 77,126, 63,160, 57,156, 48,390, 35,465, 30,361, 25,421, 19,477, 12,357, 10,007, 8,567 y 6,006 kDa. Para la muestra de *S. septentrionalis* se observaron 21 bandas, a las que se estimaron pesos moleculares de 150,107, 143,589, 127,087, 121,568, 116,289, 110,012, 100,665, 94,180, 88,113, 73,777, 65,298, 57,156, 48,390, 35,465, 26,282, 19,477, 14,595, 12,357, 8,857, 6,006 y 4,705 kDa. Para la muestra de *A. mellifera* se observaron 19 bandas, a las que se estimaron pesos moleculares de 150,107, 129,939, 121,568, 110,012, 101,789, 92,113, 86,179, 77,126, 55,284, 46,806, 39,628, 35,465, 25,421, 19,477, 15,774, 10,007, 7,416, 5,199 y 4,305 kDa.

Tabla gel #2					
<i>Eulaema</i> sp.		<i>Apis mellifera</i>		<i>Synoecca septentrionalis</i>	
Banda	Peso molecular (kDa)	Banda	Peso molecular (kDa)	Banda	Peso molecular (kDa)
1	121,568	1	150,107	1	150,107
2	116,289	2	129,939	2	143,589
3	111,240	3	121,568	3	127,087
4	104,073	4	110,012	4	121,568
5	101,789	5	101,789	5	116,289
6	96,294	6	92,113	6	110,012
7	80,627	7	86,179	7	100,665
8	77,126	8	77,126	8	94,180
9	63,160	9	55,284	9	88,113
10	57,156	10	46,806	10	73,777
11	48,390	11	39,628	11	65,298
12	35,465	12	35,465	12	57,156
13	30,361	13	25,421	13	48,390
14	25,421	14	19,477	14	35,465
15	19,477	15	15,774	15	26,282
16	12,357	16	10,007	16	19,477
17	10,007	17	7,416	17	14,595
18	8,567	18	5,199	18	12,357
19	6,006	19	4,305	19	8,857
				20	6,006
				21	4,705

Tabla 2: Pesos determinados en las bandas observadas en el gel #2 donde están presentes las muestras de veneno de *Eulaema* sp., *Apis mellifera* y *Synoecca septentrionalis*. Las celdas color verde representan las bandas compartidas por las 3 especies; las de color naranja son las que comparten por *S. septentrionalis* y *Eulaema* sp.; las de color gris son las que comparten *A. mellifera* y *S. septentrionalis*; las de color azul son las que se comparten entre *Eulaema* sp. y *A. mellifera*.

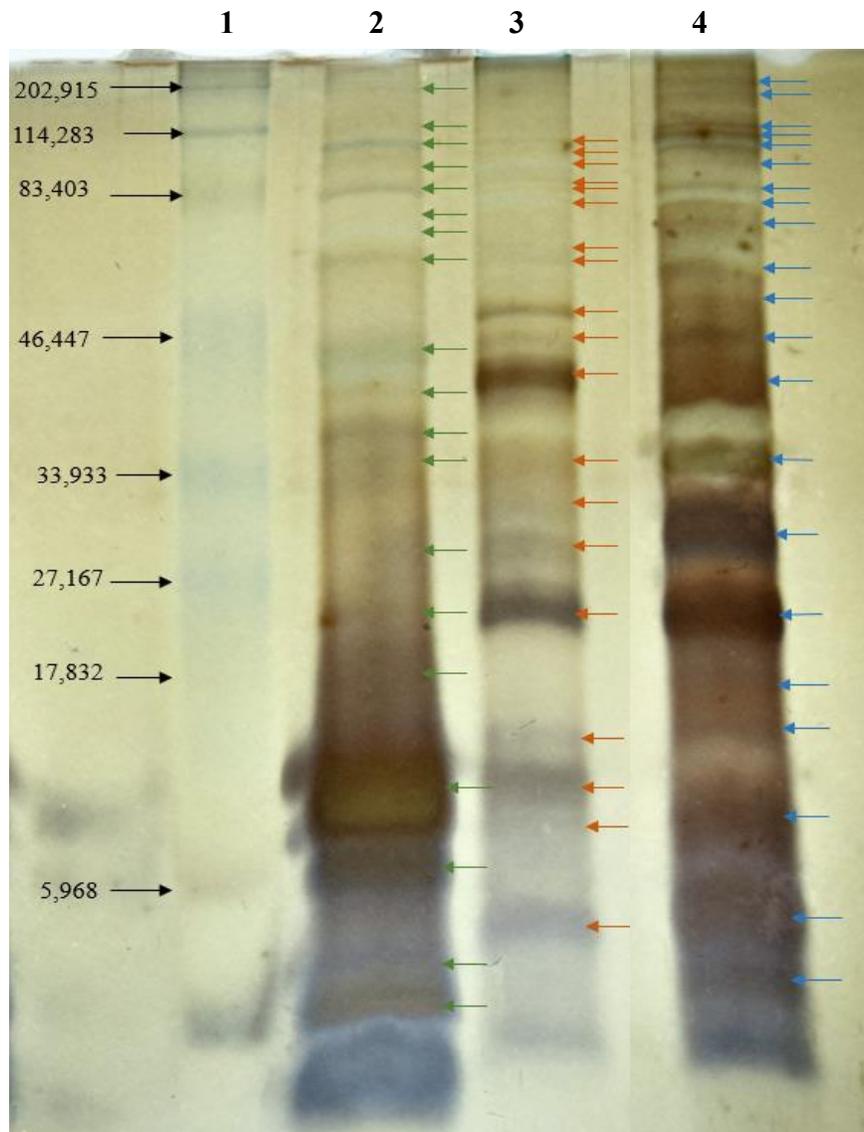


Figura 3: Gel #2 de electroforesis con el contenido proteico de los venenos de *Apis mellifera* (2), *Eulaema* sp. (3) y *Synoeca septentrionalis* (4); también está presente el patrón de peso molecular (1). Las fechas señalan las bandas identificadas.

- **Cuantificación de proteínas**

El contenido proteico todos los venenos fue cuantificado, las concentraciones obtenidas fueron: *A. mellifera* urbana 25487  $\mu\text{g/mL}$ , *A. mellifera* rural 19469  $\mu\text{g/mL}$ , *S. septentrionalis* 12832  $\mu\text{g/mL}$ , *Eulaema* sp. 10442  $\mu\text{g/mL}$ .

- **Actividad antimicrobiana**

Ninguna de las muestras presento actividad antimicrobiana frente a las bacterias utilizadas.

## Discusión

Los venenos de las dos poblaciones de *A. mellifera* (urbana y rural) presentan diferencias entre sí, evidenciadas en la cantidad de bandas que se observaron en el gel de electroforesis, la expresión y la concentración de sus proteínas, siendo la muestra de *A. mellifera* urbana la que tiene una mayor concentración de proteínas (25487 µg/mL) y la muestra de *A. mellifera* rural en la que se observaron más bandas. Las proteínas con pesos moleculares de 144,494, 137,642, 121,899 y 99,157 kDa no han sido reportadas, la proteína de 64,819 kDa tiene una función desconocida (Van Vaerenbergh et al., 2014), las demás proteínas según su peso molecular (kDa) podrían ser: 127,968 α-manosidasa, 107,957 Hsp70, 88,889 Dipeptidil peptidasa IV, 74,989 Serina proteasa, 66,413 5'-nucleotidasa, 57,405 Prolil carboxipeptidasa, (Van Vaerenbergh et al., 2014), 46,132 Hialuronidasa, 36,183 Fosfolipasa A (Zalat et al., 2002), 29,007 Tripsina (Van Vaerenbergh et al., 2014), 22,806 y 22,259 formas de Fosfolipasa A (Zalat et al., 2002), 18,778 Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B, 16,834 proteína similar a C1q (Van Vaerenbergh et al., 2014), 14,550 Y 12,731 Fosfolipasa A (Zalat et al., 2002), 8,221 Secapina, 6,371 Melitina y 3,872 Apamina (Van Vaerenbergh et al., 2014). Existen varias razones por las que posiblemente los venenos de estas dos poblaciones sean diferentes entre sí; una de estas puede ser la diferencia en la tasa de encuentros depredador-presa, teniendo en cuenta que el lugar donde se colectaron ambas muestras es diferente, es muy probable que el número de depredadores en donde se encontraba el apiario en Viotá sea mucho mayor al que puede haber en Bogotá, por esta razón los individuos de la zona de Viotá posiblemente tengan un veneno mucho más complejo y con mayor número de proteínas, a mayor número de depredadores, más complejo y eficaz suele ser el veneno en especies que lo utilizan de manera defensiva (Dias et al., 2014; Jenner & Undheim, 2017), como es el caso de *A. mellifera* (Piek, 1986). Adicionalmente, al no tener un veneno con especificidad hacia los depredadores, por la variedad de estos, es importante aumentar la eficacia del veneno en si (Casewell et al., 2013; Jenner & Undheim, 2017), además el costo metabólico que implica tener un veneno más complejo o darle mayor eficacia hace que algunos organismos que no tienen tantas relaciones predador-presa tiendan a disminuir la eficacia y composición del mismo (Touchard et al., 2015), igualmente la expresión de proteínas como 5'-nucleosidasa y Prolil carboxipeptidasa en el veneno de *A. mellifera* rural, proteínas involucradas directamente en la acción hemotóxica (Dhananjaya & D'Souza, 2010; Van Vaerenbergh et al., 2014), apoyan el argumento que el cambio en la tasa de relaciones depredador-presa haga que el veneno de *A. mellifera* varíe la complejidad y la efectividad. Otra de las razones por las que posiblemente estas dos poblaciones tenga una composición proteica diferente en sus venenos es la alimentación, como se mencionó anteriormente, los lugares donde estas fueron colectadas son distintos en cuanto a altitud

(Bogotá 2672 msnm y Viotá 936 msnm) y ecosistema, esto supondría una diferencia en la dieta de las dos poblaciones, pues las especies de flora pueden variar en estos dos lugares, además, se ha reportado que la alimentación es un factor relevante en la composición del veneno en especies en las que el veneno no tiene una relación directa con la depredación, como ocurre en especies de Hymenoptera, que incluso pueden llegar a cambiar la composición de su veneno cuando se cambia la alimentación durante algunos meses (Bernardi et al., 2017).

Por otra parte, los venenos de *A. mellifera*, *S. septentrionalis* y *Eulaema* sp. presentaron 3 proteínas compartidas, la existencia de las mismas proteínas en especies emparentadas es muy común en el reino animal (Casewell et al., 2013; Fry et al., 2009), normalmente se conservan muchas de estas considerando que el veneno se ha desarrollado a partir de un ancestro en común, además la posibilidad de reclutar nuevas toxinas es limitado, por lo que proteínas con funciones similares tienden a ser conservadas (Jenner & Undheim, 2017). Asimismo, los venenos de especies que lo usan como arma defensiva suelen tener proteínas similares, pues el objetivo es prácticamente el mismo (Fry et al., 2009), por esta razón nosotros proponemos que esto es lo que puede ocurrir en *Eulaema* sp., *S. septentrionalis* y *A. mellifera*, pues sus venenos tienen una función netamente defensiva (Piek, 1986), dando como resultado que varias de sus proteínas sean las mismas. Entre las especies más cercanas, como lo son *A. mellifera* y *Eulaema* sp. se comparten proteínas que no están presentes en el veneno de *S. septentrionalis*, nosotros planteamos que posiblemente esto ocurra debido a que, al ser *A. mellifera* y *Eulaema* sp. parte de la misma familia (Apidae) (Fernández & Sharkey, 2006), tengan en su veneno proteínas conservadas del veneno de un ancestro en común (Casewell et al., 2013), que es más cercano al ancestro que puede existir entre estas especies y *S. septentrionalis* (Fernández & Sharkey, 2006). Sin embargo, entre los venenos de *S. septentrionalis* y *Eulaema* sp. también existen proteínas compartidas que no se comparten con el de *A. mellifera*, proponemos que probablemente el factor que influye en que se compartan estas proteínas es la dieta que pueden llegar a tener estas dos especies, debido a que estas fueron colectadas en un lugar diferente a donde fue colectada *A. mellifera*, por lo que es posible que existan similitudes en la flora de las que estas se pueden alimentar, además este factor ya ha sido descrito como determinante en el cambio de la composición proteica de los venenos en especies de Hymenoptera (Bernardi et al., 2017). Por otro lado, también se comparten proteínas entre los venenos de *A. mellifera* y *S. septentrionalis* que no están presentes en el veneno de *Eulaema* sp., proponemos que esta relación entre los venenos puede ser debido al rol ecológico que cumple el veneno en estas dos especies teniendo en cuenta la organización social que estas presentan, pues estas dos especies son eusociales (Fernández & Sharkey, 2006), mientras que *Eulaema* sp. presentan un comportamiento parasocial (Fernández & Sharkey, 2006), de modo que por la

organización social de las dos especies, estas deben defender su colonia de una gran variedad de depredadores y otros animales que las ataquen, lo que implica que sus venenos deben ser eficaces en un alto número de organismos (Dias et al., 2014), por lo que las proteínas que se comparten en sus venenos pueden estar relacionadas con la eficacia que estos tengan.

A pesar de que ya se ha reportado que el veneno de *A. mellifera* tiene actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *E. coli* (Han et al., 2016; Zolfagharian et al., 2016), nuestras pruebas no dieron resultados de actividad antimicrobiana, teniendo en cuenta que los venenos necesitan de ciertos estímulos para que se activen (Jenner & Undheim, 2017), posiblemente los péptidos y enzimas hayan entrado a su forma activa una vez diluidas en PBS, adicionalmente el tiempo que transcurrió desde la extracción de los venenos hasta que se realizaron las pruebas pudo potenciar la acción de estas enzimas, dando como resultado la degradación de las muestras, las cuales a raíz de esto perdieron cualquier tipo de eficacia contra el crecimiento de las bacterias que fueron utilizadas en las pruebas antimicrobianas.

## **Conclusiones**

En este estudio se presenta por primera vez una comparación del veneno de dos poblaciones de *A. mellifera* colectadas en lugares geográfica y altitudinalmente distintos, adicionalmente, se encontraron cuatro proteínas que no han sido registradas anteriormente. Además, se obtuvieron los perfiles electroforéticos de los venenos de *S. septentrionalis* y de una especie del genero *Eulaema*, de las cuales no se había reportado nada hasta la fecha. Asimismo, comparamos los perfiles electroforéticos del veneno de tres especies de Hymenoptera, donde encontramos que puede existir similitud en algunas de sus proteínas y que posiblemente factores como la biología, filogenia y ecología de las especies juegan un papel importante en la composición proteica de los venenos. Con esto queremos mostrar que es importante explorar el campo de los venenos en las diferentes especies, pues en Colombia tenemos muchas de las cuales no se tiene conocimiento y que además como país megadiverso poseemos un potencial que muy pocos países en el mundo pueden llegar a disfrutar.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la Pontificia Universidad Javeriana por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo, a mi director Ricardo Vera Bravo por el apoyo en la técnica, conceptos químicos y por darme la posibilidad de desarrollar el proyecto en su laboratorio, a mi codirector Dimitri Forero Fuentes por el apoyo en la parte entomológica del proyecto y por permitirme usar las instalaciones de las colecciones biológicas, al Padre Luis Alfonso Castellanos SJ. y a Nadezhda Rojas por permitirme utilizar los apiarios para tomar muestras, a mis padres por el apoyo moral y económico, a mis amigos por el apoyo durante

la realización de este proyecto, a mi hermano Daniel por su ayuda como compañero en campo y a mi novia Andrea Ardila quien me apoyo en la parte experimental, en la parte de campo y en lo personal para que saliera adelante este proyecto.

## Bibliografía

1. Alonso-Castro, A. J. (2014). Use of medicinal fauna in mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(1), 53-70.
2. Bernardi, R. C., Firmino, E. L. B., Mendonça, A., Sguarizi-Antonio, D., Pereira, M. C., da Cunha Andrade, L. H., . . . Lima, S. M. (2017). *Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the ectatomma brunneum smith (formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.jphotobiol.2017.09.004>
3. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
4. Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., & Fry, B. G. (2013). Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(4), 219-229. doi:<http://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>
5. Colinet, D., Deleury, E., Anselme, C., Cazes, D., Poulain, J., Azema-Dossat, C., . . . Poirié, M. (2013). Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: The case of leptopilina parasitoids of drosophila. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(7), 601-611. doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.ibmb.2013.03.010>
6. Dantas, C. G., Nunes, T. L. G. M., Nunes, T. L. G. M., da Paixão, A. O., Reis, F. P., Júnior, W. d. L., . . . Gramacho, K. P. (2014). *Pharmacological evaluation of bee venom and melittin* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1590/0102-695X20142413365>
7. Dhananjaya, B. L., & D'Souza, C. J. M. (2010). The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. *Cell Biochemistry and Function*, 28(3), 171-177. doi:10.1002/cbf.1637
8. Dias, N. B., de Souza, B. M., Gomes, P. C., & Palma, M. S. (2014). *Peptide diversity in the venom of the social wasp polybia paulista (hymenoptera): A comparison of the intra- and inter-colony compositions* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.peptides.2013.10.029>
9. Dutertre, S., Jin, A., Alewood, P. F., & Lewis, R. J. (2014). Intraspecific variations in conus geographus defence-evoked venom and estimation of the human lethal dose. *Toxicon*, 91, 135-144. doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.toxicon.2014.09.011>
10. Fernández, F., & Sharkey, M. (2006). *Introducción a los hymenoptera de la región neotropical* Sociedad Colombiana de Entomología. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=51-2MgAACAAJ>

11. Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., King, G. F., . . . Norton, R. S. (2009). The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*, 483-511.
12. Han, S. M., Kim, J. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Kim, S. G., Jang, H. R., & Pak, S. C. (2016). Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Molecules*, *21*(1), 79.
13. Hirai, Y., YASUHARA, T., YOSHIDA, H., NAKAJIMA, T., FUJINO, M., & KITADA, C. (1979). A new mast cell degranulating peptide" mastoparan" in the venom of vespula lewisii. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(8), 1942-1944.
14. Jalaei, J., Fazeli, M., Rajaian, H., Ghalehsoukhteh, S. L., Dehghani, A., & Winter, D. (2016). In vitro antihistamine-releasing activity of a peptide derived from wasp venom of vespa orientalis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *6*(3), 259-264. doi:<http://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.001>
15. Jayanthi, G. P., & Gowda, T. V. (1988). Geographical variation in india in the composition and lethal potency of russell's viper (vipera russelli) venom. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *26*(3), 257-264.
16. Jenner, R., & Undheim, E. (2017). *Venom: The secrets of nature's deadliest weapon* Smithsonian Books. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=dJ82DwAAQBAJ>
17. King, G. F. (2011). Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *11*(11), 1469-1484.
18. Lima, D., Torres, A., Mello, C., Menezes, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra, Sampaio, T., Canuto, J., . . . Havt, A. (2014). Antimicrobial effect of dinoponera quadriceps (hymenoptera: Formicidae) venom against staphylococcus aureus strains. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(2), 390-396.
19. Magloire, V., Czarnecki, A., Anwander, H., & Streit, J. (2011). B-pompilidotoxin modulates spontaneous activity and persistent sodium currents in spinal networks. *Neuroscience*, *172*, 129-138.
20. Menezes, R. S., Andena, S. R., Carvalho, A. F., & Costa, M. A. (2011). First records of synoeca septentrionalis richards, 1978 (hymenoptera, vespidae, epiponini) in the brazilian atlantic rain forest. *ZooKeys*, (151):75-8. doi(151), 75-78. doi:10.3897/zookeys.151.1882 [doi]
21. Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* JHU press.
22. Moreno, M., & Giralt, E. (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, *7*(4), 1126-1150.
23. Mortz, E., Krogh, T. N., Vorum, H., & Görg, A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, *1*(11), 1359-1363. doi:10.1002/1615-9861(200111)1:113.0.CO;2-Q

24. Ozaki, Y., Matsumoto, Y., Yatomi, Y., Higashihara, M., Kariya, T., & Kume, S. (1990). Mastoparan, a wasp venom, activates platelets via pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170(2), 779-785.
25. Piek, T. (1986). *Venoms of the hymenoptera: Biochemical, pharmacological and behavioural aspects*. London: Academic Press.
26. Poirié, M., Colinet, D., & Gatti, J. (2014). *Insights into function and evolution of parasitoid wasp venoms* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.cois.2014.10.004>
27. Schaffrath, S., Prendini, L., & Predel, R. (2018). *Intraspecific venom variation in southern african scorpion species of the genera parabuthus, uroplectes and opisththalmus (scorpiones: Buthidae, scorpionidae)* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.toxicon.2018.02.004>
28. Schmidt, J. O. (2016). *The sting of the wild*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.
29. Silva, J., Monge-Fuentes, V., Gomes, F., Lopes, K., Anjos, L. d., Campos, G., . . . Galante, P. (2015). Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins*, 7(8), 3179-3209.
30. Silva, J. C., Neto, L. M., Neves, R. C., Gonçalves, J. C., Trentini, M. M., Mucury-Filho, R., . . . Mortari, M. R. (2017). *Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan polybia-MPII isolated from venom of the social wasp pseudopolybia vespiceps testacea (vespidae, hymenoptera)* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.013>
31. Touchard, A., Dejean, A., Escoubas, P., & Orivel, J. (2015). Intraspecific variations in the venom peptidome of the ant odontomachus haematodus (formicidae: Ponerinae) from french guiana. *Journal of Hymenoptera Research*, (47), 87-101. doi:10.3897/JHR.47.6804
32. Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28-33. doi:10.4331/wjbc.v6.i2.28
33. Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B., & de Graaf, D. C. (2014). *Exploring the hidden honeybee (apis mellifera) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS* doi:<https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.jprot.2013.04.039>
34. von Reumont, B. M., Campbell, L. I., & Jenner, R. A. (2014). Quo vadis venomics? A roadmap to neglected venomous invertebrates. *Toxins*, 6(12), 3488-3551.
35. Zalat, S., Abouzeid, A., Ibrahim, A., & Abd El-Aal, A. (2002). Protein pattern of the honeybee venoms of egypt. *Egyptian Journal of Biology*, 4(1)
36. Zolfagharian, H., Mohajeri, M., & Babaie, M. (2016). Bee venom (apis mellifera) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains: Bee venom an effective potential for bacteria. *Journal of Pharmacopuncture*, 19(3), 225.



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Anexo No. 6**

Doctor  
JORGE JÁCOME REYES  
Director Carrera de Biología  
Facultad de Ciencias

Respetado Doctor:

Con la presente comunicación, hacemos constar que el trabajo de grado titulado: Comparación de perfiles electroforéticos del veneno de especies de Hymenoptera colectados en diferentes localidades de Colombia

realizado por los(as) estudiantes Paul Cáceres Marañón y \_\_\_\_\_, ha sido revisado y corregido de acuerdo con las observaciones sugeridas por los jurados en la sustentación.

En constancia se firma, a los 3 días del mes de Diciembre del año 2018.

Cordialmente,

NOMBRE Ricardo Vera Bravo

FIRMA Ricardo Vera Bravo

DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Giovanny Fagua

FIRMA Giovanny Fagua

JURADO TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Jorge Jácome Reyes

FIRMA Jorge Jácome Reyes

DIRECTOR CARRERA DE BIOL. Jorge Jácome Reyes

