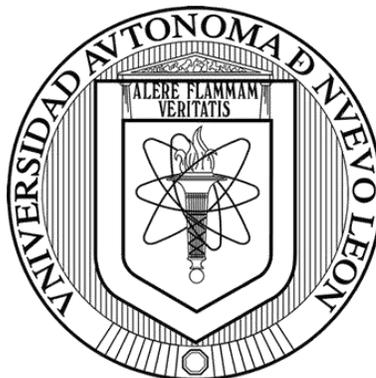


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
VENENO DE LA ORUGA *Megalopyge opercularis* Y LA RELACIÓN DEL
MICROBIOTA DE LA ESPECIE EN ESTADIO DE ORUGA Y POLILLA.

Por

M. C. LUZ MARÍA CASTELLANOS LÓPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES

2022

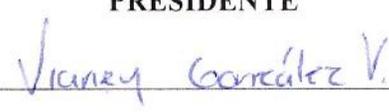
**CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
VENENO DE LA ORUGA *Megalopyge opercularis* Y LA RELACIÓN DEL
MICROBIOTA DE LA ESPECIE EN ESTADIO DE ORUGA Y POLILLA.**

Comité de Tesis



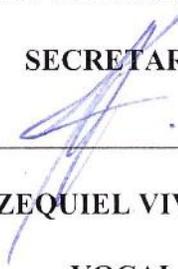
DR. RAMON GERARDO RODRIGUEZ GARZA

PRESIDENTE



DRA. VIANEY GONZALEZ VILLASANA

SECRETARIO



DR. JOSÉ EZEQUIEL VIVEROS VALDEZ

VOCAL



DR. HUMBERTO QUIROZ MARTINEZ

VOCAL



DRA. MARIA JULIA VERDE STAR

VOCAL



DRA. KATIUSHKA ARÉVALO NIÑO

SUBDIRECTORA DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
VENENO DE LA ORUGA *Megalopyge opercularis* Y LA RELACIÓN DEL
MICROBIOTA DE LA ESPECIE EN ESTADIO DE ORUGA Y POLILLA.**

Dirección de Tesis



DR. RAMON GERARDO RODRIGUEZ GARZA

DIRECTOR INTERNO



DRA. MARIA DEL REFUGIO ROCHA PIZANA

DIRECTOR EXTERNO (ITESM)



DR. IRAM PABLO RODRIGUEZ SANCHEZ

ASESOR EXTERNO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Agradecimientos

Al Dr. Ramon Gerardo Rodríguez Garza por su asesoría, confianza, tiempo, paciencia y dedicación en este proyecto.

Al Dr. José Ezequiel Viveros Valdez, por sus consejos y constante motivación.

A la Dra. María Eufemia Morales Rubio, por aceptarme en su laboratorio, por la confianza y su cariño.

A la Dra. Ruth Amelia Garza Padrón, por aceptarme en su equipo de trabajo, confianza y consejos.

A mi director externo Dra. María del Refugio Rocha Pizaña por su apoyo en la elaboración de la tesis y redacción del artículo.

A la Dra. Laura Margarita López Castillo, por su asesoría en la parte experimental de la tesis.

A mi comité de tesis, por su tiempo y asesoría para realizar este trabajo.

A todos los maestros del posgrado por compartir sus conocimientos.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dedicatoria

A Ma. de la Luz López† por ser el principal motivo en cualquier proyecto de mi vida, por su fuerza y fe que siempre me inculcó.

A mis tíos Consuelo López y Ascensión López†, por su apoyo y por ser un ejemplo de responsabilidad y bondad, los amo y siempre estaré agradecida por educarme.

A Ángel Saucedo por su compañía, por su apoyo y por ser una persona muy especial en mi vida.

A mi hermana Ma. Luisa Castellanos por su apoyo e inspirarme con su fortaleza y dedicación para continuar con mis estudios.

A mis sobrinos Nadia, Azael, Katia y Ronaldo, por su compañía y cariño, los amo.

A Dulce y Verito, por siempre ayudarme a mantener una sonrisa durante mi paso por la FCB.

A mis compañeras y amigas de posgrado, Dra. Diana Aceves y Dra. Deniss Perales gracias por su apoyo y consejos.

A mis amigos y familia, por su enorme apoyo y por soportar mis momentos de estrés, los adoro.

Índice

1. Resumen	1
Abstract.....	2
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	1
Importancia farmacéutica de los venenos.....	1
Composición química de venenos	3
Composición química de los venenos de lepidópteros	5
<i>Megalopyge opercularis</i>	8
Ciclo de vida	9
Distribución	12
Importancia sanitaria.....	14
Estudios de caracterización química de venenos de especies relacionadas filogenéticamente con <i>M. opercularis</i>	14
Estudios de microbiota en especies relacionadas filogenéticamente	15
4. Justificación.....	17
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivos	19
7. Objetivos Específicos.....	20
8. Material y Métodos.....	21
Obtención de muestras.....	21
Preservación de la muestra.....	21
Obtención de las espinas de <i>M. opercularis</i>	21
Extracción con agua destilada estéril.....	21
Extracción del veneno con amortiguador RIPA	21
Cuantificación de proteínas	22
Precipitación de proteínas con metanol- cloroformo.....	22
Visualización en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	22
Determinación de la actividad proteolítica sobre el gel	23
Test de hipersensibilidad cutánea/evaluación del veneno	23
Digestión de proteínas en gel SDS-PAGE	23
Nanoflow LC-MS/MS.....	24

Actividad citotóxica	25
Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC).....	26
Extracción de ADN para análisis de Microbiota	26
9. Resultados.....	29
Obtención de muestras.....	29
Preservación de la muestra.....	34
Obtención del veneno de <i>M. opercularis</i>	40
Prueba confirmatoria de extracción de veneno	42
Actividad citotóxica del extracto crudo de <i>M. opercularis</i>	45
Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC).....	46
Actividad citotóxica de las fracciones de <i>M. opercularis</i>	47
Identificación de composición del veneno de <i>M. opercularis</i>	48
10. Discusión	56
11. Conclusiones	62
12. Perspectivas	63
13. Bibliografía	64

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes de venenos de himenópteros	4
Tabla 2. Principales familias de polillas urticantes	7
Tabla 3. Municipios del área metropolitana con presencia de <i>M. opercularis</i>	31
Tabla 4 Extracción de veneno de <i>M. opercularis</i>	41
Tabla 5. Actividad citotóxica de <i>M. opercularis</i>	45
Tabla 6. Actividad citotóxica de las fracciones del veneno de <i>M. opercularis</i>	47
Tabla 7 Filum presentes en oruga de <i>M. opercularis</i>	50
Tabla 8 Filum presentes en polilla de <i>M. opercularis</i>	50
Tabla 9 Clases presentes en oruga de <i>M. opercularis</i>	51
Tabla 10 Clases presentes en polilla de <i>M. opercularis</i>	51
Tabla 11 Ordenes presentes en oruga de <i>M. opercularis</i>	51
Tabla 12 Ordenes presentes en polilla de <i>M. opercularis</i>	52
Tabla 13 Familias presentes en oruga de <i>M. opercularis</i>	52
Tabla 14 Familias presentes en polilla de <i>M. opercularis</i>	53

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de lepidópteros	6
Figura 2. Espina característica de <i>M. opercularis</i>	9
Figura 3. Huevecillos de <i>M. opercularis</i>	10
Figura 4. Etapa temprana de la oruga de <i>M. opercularis</i>	10
Figura 5. Etapa final de la oruga de <i>M. opercularis</i>	10
Figura 6. Oruga de <i>M. opercularis</i>	11
Figura 7. Capullo de <i>M. opercularis</i>	11
Figura 8. Polilla de <i>M. opercularis</i>	12
Figura 9. Distribución de <i>M. opercularis</i>	13
Figura 10. Orugas de <i>M. opercularis</i> en ramas de encino (<i>Quercus</i>)	29
Figura 11. Oruga de <i>M. opercularis</i> en su hábitat (hoja de encino <i>Quercus</i>)	30
Figura 12. Diferentes mudas de oruga <i>M. opercularis</i>	30
Figura 21. Distribución de <i>M. opercularis</i> en la zona metropolitana de Nuevo León, México.....	33
Figura 13. Capullo de <i>M. opercularis</i> desarrollado en condiciones de laboratorio	34
Figura 14. Polilla Macho de <i>M. opercularis</i>	35
Figura 15. Polilla macho de <i>M. opercularis</i>	36
Figura 16. Polillas de <i>M. opercularis</i>	36
Figura 17. Polilla hembra de <i>M. opercularis</i> (ovipositando).....	37
Figura 18. Polilla hembra de <i>M. opercularis</i> (ovipositando).....	38
Figura 19. Huevos de <i>M. opercularis</i>	38
Figura 20. Oruga de <i>M. opercularis</i> eclosionada en laboratorio.....	39
Figura 22. Espinas de <i>M. opercularis</i> (Observado en estereoscopio).....	40
Figura 23. Curva de calibración "Cuantificación de proteínas"	41
Figura 24. Gel 15% acrilamida. MPM Marcador de Peso Molecular (10-250 kD), MA: Muestra extraída con Agua, MR: Muestra extraída con RIPA	42
Figura 25. Aplicación del veneno de <i>M. opercularis</i>	43
Figura 26. Reacción al veneno de <i>M. opercularis</i> en rata egipcia (12 horas).....	44

Figura 27. Necrosis del tejido de rata en respuesta al veneno de <i>M. opercularis</i> en rata egipcia (24 horas).....	44
Figura 28. Actividad citotóxica de <i>M. opercularis</i>	46
Figura 29. Separación cromatográfica del veneno de <i>M. opercularis</i>	46
Figura 30. Porcentaje de viabilidad presentado por las células CACo vs fracciones de veneno de <i>M. opercularis</i>	47

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

ACN	Acetonitrilo
anti-VHB	Anticuerpo de virus de la hepatitis B
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BEH-C18	Puentes de etileno- Octadecilsilano
C18	Octadecilsilano
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Caco2	células de adenocarcinoma de colon
CID	Dispositivo de inyección de carga
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
IG	Insulina glargina
IT	Analgesia intratecal
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodaltones
LA	Anticoagulante lúpico
LC-MS / MS	Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas/Masas
Lopap	Proteasa Activadora de Protrombina De la obliqua de <i>L. obliqua</i>
Losac	Activador factor X de <i>Lonomia obliqua</i>
MS	Espectrometría De Masas
MTS	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NVSCC	Canales de Calcio Neuronales Sensibles al Voltaje de Tipo N
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLA 2	Fosfolipasas 2

RIPA	Amortiguador ensayo de Radio- Inmunoprecipitación
RPM	Revoluciones por minuto
RVV	Veneno de víbora Russell
SEC	Cromatografía de Exclusión Molecular
SDS-PAGE	Dodecil-Sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida
TACE	Quimioembolización transarterial
TDAH	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
Tris.HCl	Trisaminometano-acido clorhidrico
UPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución
ZnCl ₂	Cloruro de zinc

1. RESUMEN

La especie de *Megalopyge opercularis* (JE Smith 1797), pertenece a la familia *Megalopygidae*, llamadas polillas de franela. Todos los estadios de la polilla se caracterizan por presentar una apariencia con gran pelaje, pero la oruga es la fase con importancia sanitaria, porque dentro del pelaje que cubre la parte posterior del cuerpo de la oruga de *M. opercularis* se encuentran unas espinas huecas, que contienen en la parte apical sustancias urticantes, la naturaleza química de los componentes encontrados en el veneno fueron estudiados en el presente trabajo, analizando desde la distribución del modelo de estudio, así como el aislamiento, separación y análisis citotóxico del veneno. Con el desarrollo de adultos en el laboratorio, se logró analizar la microbiota de oruga y polilla. Los resultados mostraron que la especie *M. opercularis* se encuentra distribuida en gran parte del área metropolitana de N. L., México, localizando 50 puntos geográficos con la presencia de la oruga. El veneno aislado de las espinas de la oruga *M. opercularis*, nos permitió obtener el extracto acuoso del veneno que mantuvo activo el veneno corroborado en las pruebas de funcionalidad. La actividad citotóxica mostrada con la línea Caco2, obtuvo un IC50 de 3.98 µg/mL, dentro de un rango establecido con venenos que han resultado con diferentes actividades biológicas y candidatos al desarrollo de fármacos. Uno de los componentes del veneno es un factor de activación de la profenoloxidasa, importante en la inmunidad de algunos insectos. En cuanto, a la microbiota, se encontró una mayor diversidad de bacterias en la microbiota de la oruga en comparación con la polilla de *M. opercularis*, las bacterias encontradas tienen nichos importantes, por lo que es interesante dilucidar su función con investigaciones complementarias con otras especies relacionadas filogenéticamente.

ABSTRACT

Megalopyge opercularis species belongs to the *Megalopygidae* family, called flannel moths. All the stages of the moth are characterized by presenting an appearance with great fur, but the caterpillar is the phase with sanitary importance, because inside the fur that covers the back of the body of the *M. opercularis* caterpillar there are hollow spines, containing stinging substances in the apical part, the chemical nature of the components found in the venom were studied in the present work, analyzing from the distribution of the study model, as well as the isolation, separation and cytotoxic analysis of the venom. With the development of adults in the laboratory, it was possible to analyze the caterpillar and moth microbiota. The results showed that the species of *M. opercularis* is distributed in a large part of the metropolitan area of N. L., Mexico, locating 50 geographical points with the presence of the caterpillar. The venom isolated from the spines of the caterpillar *M. opercularis*, allowed us to obtain aqueous extract of the venom that kept the venom active, corroborated in the functionality tests. The cytotoxic activity shown with the Caco2 line, obtained an IC50 of 3.98 $\mu\text{g} / \text{mL}$, within an established range with poisons that have resulted with different biological activities and candidates for drug development. One of the components of the venom is an activating factor of prophenoloxidase, important in the immunity of some insects. Regarding the microbiota, a greater diversity of bacteria was found in the caterpillar's microbiota compared to the *M. opercularis* moth, the bacteria found have important niches, so it is interesting to elucidate their function with complementary investigations with other species phylogenetically related.

2. INTRODUCCIÓN

Las polillas y mariposas forman parte del grupo de lepidópteros que se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta, se estiman 125,000 a 150,000, especies descritas (Villas et al. 2016). Dentro de los cuales existen especies que se distinguen de los demás, debido a que secretan sustancias venenosas como mecanismos de defensa (Herzig 2019). Dichas sustancias no han sido estudiadas en su totalidad, tal investigación sería de gran importancia, porque permitirá conocer su naturaleza química, marcando la pauta para un posible uso en el área de farmacéutica o para la creación de antídotos eficaces para contrarrestar su efecto nocivo (Müller 2010; Costa y Simonka 2006).

En efecto, algunos lepidópteros presentan en sus estados larvarios estructuras que contienen sustancias urticantes, que de forma intuitiva la usan como mecanismo de defensa para ahuyentar a sus depredadores. Hasta ahora se conocen 12 familias que presentan esta característica de las cuales *Saturniidae*, *Limacodidae*, *Megalopygidae*, *Lasiocampidae*, *Arctiidae*, *Notodontidae* y *Lymantriidae*, son las de importancia médica porque accidentalmente entran en contacto con los humanos y algunos animales (Hossler 2010; Villas et al. 2016).

Megalopyge opercularis es una especie de polilla nocturna perteneciente a la familia *Megalopyridae* (Hossler 2010; Avilán et al. 2010), conocidas como orugas de las polillas franela por su aspecto lanoso, el estado larvario tiene diferentes nombres comunes “tree asp” “woolly worm,” “woolly slug,” “opossum bug,” “asp italiano”, “insecto zarigüeya”, “gatito” “perrito” “bicho peludo”, “chivilla”, “oruga peluche”(Pinson y Morgan 1991; Eagleman 2008; Hossler 2010; Arqueta y Martínez 2014). El estado larvario de *M. opercularis*, en el continente Americano es considerada de las más tóxicas (Eagleman 2008), por su aspecto llamativo lanoso, en su cubierta de pelos, se encuentran las espinas camuflajeadas que contienen veneno (Avilán et al. 2010).

Cabe destacar, que entre las especies de la familia *Zygaenoidea (Megalopygidae)*, *M. opercularis* es la mayormente distribuida, se encuentra en la región tropical del continente Americano (Díaz 2005, Hossler 2010), principalmente en Estados Unidos, se han reportado casos clínicos en Texas y en otros estados sureños en menor cantidad, como es el caso de Louisiana y Florida (Eagleman 2008, MacKinnon et al. 2015).

Del mismo modo, en Suramérica recientemente en Guayana francesa se ha estudiado la presencia de *M. opercularis* (Torrents et al. 2015), en Argentina en el Noroeste, Noreste y Centro, se encuentran varias especies de *Megalopyge* de importancia sanitaria (De Roodt et al. 2000). También, se encuentra distribuida en Brasil (Spadacci-Morena et al. 2016), Venezuela (Avilán et al. 2010), Costa Rica, Ecuador, Guatemala y México (Lepesqueur 2012). En particular en México se ha reportado, en varios estados la presencia de la oruga de *M. opercularis* en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Nayarit, Tabasco, Mérida, Quintana Roo, Oaxaca, Puebla, Michoacán, Morelos, Hidalgo, Nuevo León, Jalisco (Hossler 2010, Bousquets et al. 2014, Arquieta y Martínez 2014).

Los síntomas que se han observado en pacientes, que tienen contacto con *M. opercularis* se encuentran, erupciones provocadas por pelos y espinas, estas últimas contienen toxinas que al tocar la piel, causan diferentes manifestaciones clínicas tales como ardor y dolor local en la lesión, eritema, linfadenopatía regional, dolor de cabeza y dermatitis (Haddad y Latoria 2014); además en algunos casos causa necrosis localizada, formación de pequeñas vesículas y reacción linfocítica. El primer síntoma es el dolor palpitante, el cual se desarrolla inmediatamente o en cinco minutos después del contacto con la oruga (Eagleman 2008, Arquieta y Martínez 2014). Algunas personas pueden tener mareos, vómitos, dificultad abdominal intensa, linfadenitis y a veces choque o estrés respiratorio. Los síntomas dependerán de la cantidad de veneno al que estuvieron expuestos y pueden persistir por varios días si la dosis fue mayor (Eagleman 2008, Hossler 2010, Haddad et al. 2015, Torrents et al. 2015).

El veneno irritante producido por las orugas de *M. opercularis* es producido en el interior de la espina hueca por células glandulares. La única forma que tienen las espinas para entrar por la piel es a través de la fractura de éstas (Avilán et al. 2010, Petrucco et al. 2014).

En cuanto al desarrollo de la espina, este consiste en el cambio de una seta ordinaria, que se convierte en tóxica por el desarrollo de una célula de la glándula de veneno, que se extiende en el lumen de la seta. Las espinas son rígidas y se caracterizan por tener la sustancia irritante en la parte terminal, por eso los accidentes en humanos, que causa malestares al simple roce con la oruga (Battisti et al. 2011). Lo anterior descrito, nos señala los síntomas muy similares a otros organismos, cuyos venenos han sido estudiados y han sido utilizados para el desarrollo de fármacos, por lo tanto, el organismo (*M. opercularis*), que es objeto de estudio en el presente trabajo de tesis, es importante identificar la composición del veneno, que aún no ha sido caracterizado, por lo cual no se han logrado identificar las propiedades y posibles aplicaciones farmacéuticas.

De la misma manera, *M. opercularis*, representa un reto de estudio analizar sus cambios en distribución, actividad biológica y relación con las bacterias que forman parte de su microbiota, por ser un organismo poco estudiado, a pesar de sus características evolutivas sorprendentes. El microbiota de los insectos es esencial para el crecimiento y desarrollo de las especies (de O Gaio et al. 2011). La simbiosis entre insectos y microorganismos ha contribuido, sin duda a su éxito de supervivencia, brindándoles la capacidad de degradar los alimentos recalcitrantes, complementar las dietas deficientes en nutrientes, protegerse de sus enemigos naturales y modular la expresión de su comportamiento social (Bouchon et al. 2016; Douglas, 2015). Relacionar la composición del microbiota, en diferentes estadios del ciclo de vida de un insecto, puede representar una correlación con varias características evolutivas, por lo cual el siguiente trabajo de tesis, cuenta con un aporte al conocimiento de la microbiota en estado de oruga y polilla de *M. opercularis*.

3. ANTECEDENTES

Importancia farmacéutica de los venenos

En las últimas décadas, los venenos de animales han presentado gran importancia en la industria farmacéutica, a partir de estos se han desarrollado potentes analgésicos, antihipertensivos, anticoagulantes, anestésicos y se han descubierto actividades biológicas con posibles aplicaciones farmacológicas como son antibacteriana, anti protozoaria y antiviral (Bailey y Wilce 2001, Okoro et al. 2015). Los venenos químicamente son una mezcla de péptidos y proteínas, los cuales son de utilidad en la naturaleza para la alimentación y sobrevivencia de los organismos que los secretan para combatir a sus depredadores, estas desafiantes funciones, se han aprovechado para combatir diferentes padecimientos en el área médica (Koh et al. 2006, Calvete et al. 2009).

Cabe resaltar, que uno de los fármacos más representativo para el tratamiento de la hipertensión arterial, es el captopril, el cual se desarrolló a partir de veneno de serpientes, fue la primera droga oral que funciona como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), específicamente actúa en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, provocando una disminución en la presión arterial, evitando accidentes cerebrovasculares e infartos al miocardio. Esta droga proviene del veneno de *Bothrops jararacá*, una serpiente originaria de Brasil, su compuesto activo es un péptido llamado BPP5a, péptido potenciador de la bradiquinina (Bailey and Wilce 2001).

Del mismo género de serpiente la *Bothrops moojeni*, aporta en su veneno una proteína “Batroxobin”, del fármaco comercial Defibrase, el cual se emplea para el tratamiento de angina de pecho, infarto cerebral, y en accidente cerebrovascular isquémico, la proteína actúa como un inhibidor de protrombina y trombina. Además del veneno de especies de *Bothrops*, se ha aislado la reptilasa es una proteína de 43 kDa, la cual ayuda para el diagnóstico de desórdenes en la coagulación sanguínea (Koh et al. 2006; Calvete et al. 2009; Carone et al. 2018).

También se cuenta con la Exenatida que es un agonista del receptor de GLP-1, empleado como tratamiento adyuvante en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que ha demostrado ser

tan eficaz como insulina glargina (IG) reduciendo la concentración de hemoglobina glucosilada, cuando se administra en combinación con metformina o/y sulfonilureas (Gordon et al. 2011). Es importante mencionar, que la proteína Exenatida se encuentra en la saliva del monstruo de Gila que imita la acción del péptido 1 similar al glucagón, una incretina importante en la homeostasis de la glucosa (Triplitt y Chiquette 2006), se asocia además a una reducción de peso y a una mayor incidencia de acontecimientos adversos de tipo gastrointestinal (Gordon et al. 2011). Otro péptido en su veneno, llamado gilatida, probablemente mejora la memoria, se cree que ayuda a evitar a los depredadores del Monstruo, ya que un depredador mordido puede recordar la experiencia insoportable, esta propiedad podría ser empleada para los padecimientos de Alzheimer, la esquizofrenia y el TDAH (Guardians y Bec 2010).

El cáncer es una de las principales causas de muertes en todo el mundo, la ciencia ha realizado grandes esfuerzos y numerosas investigaciones para buscar la cura de esta enfermedad. Los venenos han jugado un papel importante en la producción de medicamentos para minimizar los síntomas de esta enfermedad y brindar un tratamiento capaz de controlar la enfermedad como el Huachansu es un medicamento inyectado que se obtiene de la extracción de la piel y las glándulas párotidas del sapo (*Bufo gargarizans*), se usa en pacientes con cáncer de hígado, colon o páncreas, presenta actividades biológicas de antitumoral, anti-VHB y de inmunomodulación. En ensayos clínicos demuestra mejora de la respuesta tumoral objetiva y reducción de los efectos secundarios relacionados con la quimioterapia; combinado con quimioembolización transarterial TACE podría aumentar significativamente la tasa de respuesta objetiva y la tasa de supervivencia a 2 años, reduce la cantidad de derrame pericárdico y mejora de la calidad de vida del paciente (Wang et al. 2018).

Otro tratamiento para el cáncer es Ziconotide, un analgésico no opioide, indicado para el tratamiento del dolor crónico en pacientes, que requieren una terapia de analgesia intratecal (IT), pero son intolerantes o refractarios a otros tratamientos analgésicos. Ziconotide es un análogo sintético de la ω -conotoxina MVIIA, un 25 – amino péptido ácido que se encuentra en el veneno de *Conus magus*. El mecanismo de acción que subyace al perfil terapéutico de la ziconotida se deriva de su bloqueo potente y selectivo

de los canales de calcio neuronales sensibles al voltaje de tipo N (NVSCC). El bloqueo directo de N-VSCC inhibe la actividad de un subconjunto de neuronas, incluidos los nociceptores primarios sensibles al dolor. Este mecanismo de acción distingue a la ziconotida de todos los otros analgésicos, incluidos los analgésicos opioides (Miljanich 2004).

Composición química de venenos

El veneno de las serpientes contiene activadores de protrombinas, las cuales se han aislado, producido y comercializado, para su empleo en el estudio de disprotrombinemias, en particular, la especie de *Daboia russelli*, contiene una toxina (RVV), la cual se emplea para la detección del anticoagulante lúpico (LA), importante en diagnóstico de la enfermedad del Lupus, el examen de laboratorio se basa en que la enzima aislada del veneno actúe sobre el factor de coagulación X, haciendo la conversión de protrombina a trombina (Koh et al. 2006).

En efecto, gran parte de la composición de los venenos de serpientes se encuentran la familia de las α -neurotoxinas, las cuales pueden bloquear reversiblemente la transmisión nerviosa por competencia al unirse a los receptores nicotínico de acetilcolina (nAChRs), que se encuentra en las membranas postsinápticas de los músculos esqueléticos y neuronas, impidiendo la transmisión neuronal, esta acción es empleada para ocasionar asfixia en sus presas (Verheij et al. 1980).

Una vez aisladas del veneno de la mamba africana, las dendrotoxinas son componentes que actúan bloqueando los canales de potasio, ocasiona la liberación de acetilcolina y la subsiguiente transmisión sináptica en la unión neuromuscular, lo que lleva a una actividad muscular excesiva, temblores y fasciculación de la presa. En el laboratorio, se ha investigado con los análogos de las dendrotoxinas, este efecto en la actividad muscular, para elucidar las propiedades de reconocimiento molecular de diferentes tipos de los canales de potasio, y las dendrotoxinas radiomarcadas han sido utilizado para identificar otras toxinas que se unen a los canales de potasio (Schweitz et al. 1990).

Del mismo modo, en los venenos de serpientes se encuentran enzimas dependientes de Ca^{2+} , llamadas fosfolipasas 2 (PLA 2), las cuales catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos,

en el organismo cuando se inyecta el veneno desencadena una serie de procesos inflamatorios, que se caracterizan por una mayor permeabilidad microvascular, formación de edemas, reclutamiento de leucocitos en los tejidos, la nocicepción y la liberación de mediadores inflamatorios que imitan una serie de trastornos inflamatorios sistémicos y locales en los seres humanos (Verheij et al. 1980).

Es necesario resaltar, que los insectos del orden de los himenópteros comprenden algunas especies cuyo veneno puede desencadenar reacciones alérgicas en los seres humanos, que pueden abarcar desde reacciones relativamente leves hasta anafilaxias fatales (Bilò et al. 2019). Generalmente, las sustancias que producen los himenópteros están compuestas de aminos biogénicas y otras sustancias de bajo peso molecular, de péptidos básicos y de proteínas (Müller et al. 2010). Las principales especies de himenópteros, que han sido sujetas de estudio por las reacciones que ocasionan sus picaduras en humanos pertenecen a la familia de *Apidae*, *Vespidae* y *Formicidae* (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de venenos de himenópteros

Especie	Componente	Referencia
Abeja <i>Apis mellifera</i>	Fosfolipasa A2 (Api m1), 16 kDa	(Müller et al. 1997; Hoffman 2003)
	Hialuronidasa (Api m2), 43 kDa	(Müller et al. 1997)
	Fosfatasa ácida (Api m3), 45 kDa	(Grunwald et al. 2006)
	Péptido melittin (Api m4), 2.9 kDa	(Hoffman 2003)
	Proteína alérgica C (Api m5), 102 kDa	(Blank et al. 2010; De Graaf 2009)
	Proteína (Api m6), 7.9 kDa	(Kettner et al. 2001)
	Proteasa de serina (Api m7), 39 kD	(Hoffman 2003)
	Dipeptidilpeptidasa, 102 kDa	(Blank et al. 2010; De Graaf 2009)

Avispa <i>Vespa vulgaris</i>	Fosfolipasa A1 (Ves v1), 33.5 kDa	(Blank et al. 2010; De Graaf 2009)
	Antígeno 5 (Ves v5), 23 kDa	
	Dipeptidilpeptidasa (Ves v3) 100 kDa	
	Hialuronidasa (Ves v2), 45 kDa	(Hemmer et al. 2004; Jappe et al. 2006)
Hormiga <i>Solenopsis invicta</i>	Fosfolipasa A1 (Sol i1), 37 kDa	(Hoffman 2003)
	Sol i2, 14 kDa	
	Antígeno 5 (Sol i3), 24 kDa	
	Sol i4, 13.4 kDa	

En especial el veneno de abeja (*A. mellifera*), ha sido mayormente estudiado por sus propiedades terapéuticas, desde hace aproximadamente 3000 años en la medicina oriental, se ha usado como terapia alternativa (Kwon et al. 2001, Silva et al. 2015, Zhang et al. 2018), está compuesto por una gran variedad de péptidos, enzimas, aminas con actividad biológica y otros componentes no peptídicos, los efectos terapéuticos principales que presentan son del tipo anti-inflamatorio, la ant-apoptotico, anti-fibrosis y anti-arterosclerosis (Zhang et al. 2018).

Composición química de los venenos de lepidópteros

Los lepidópteros son insectos holometábolos típicos, las mariposas y polillas perteneciente a este orden cuenta con 150.000 especies descritas (Villas et al. 2016) se logran distribuir en todas partes del globo terráqueo, que atraviesan las fases de huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 1). Presentan en su ciclo vital dos fases móviles, larva (oruga) y adulto, con nichos característicos. Por lo común las larvas son fitófagas; pueden ser especializadas en una especie de planta concreta (monofagia) o en unas pocas relacionadas (oligofagia) y raramente se alimentan de un número elevado de diferentes hospedadores potenciales (polifagia) (Costa y Simonka 2006).

En su estado larvario, causan daños en cultivos de plantas por su alimentación, cuando se encuentran en estado adulto se alimentan en cambio de fluidos (néctar, agua, jugos procedentes de frutas, o en ocasiones otros materiales líquidos), lo que les ayuda a cumplir con la función de polinizador y perpetuación de su especie, produciendo gran cantidad de huevecillos que son colocados en las plantas hospederas. En fase de larva puede durar entre semanas y años, según los casos. La fase de pupa se da con frecuencia en un refugio, que puede ser un capullo total o parcialmente construido con seda por la oruga (García-Barros et al. 2015).

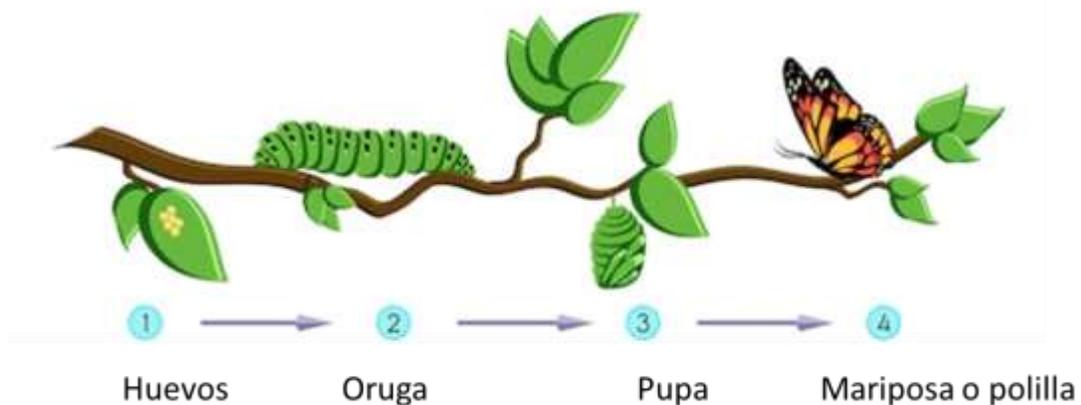


Figura 1. Ciclo de vida de lepidópteros

Las investigaciones acerca de los lepidópteros se enfocan al estudio de plagas de importancia económica, sin embargo, varias especies de polillas pueden causar problemas de salud importantes en los humanos y animales. Son aproximadamente 80 familias de lepidópteros que causan envenenamiento (Tabla 2) (Díaz 2005, Gullan y Castro 2005). Los accidentes que ocasionan los lepidópteros son por la presencia de pelos o setas en la etapa de larva u oruga, estos pelos o setas actúan como un mecanismo de defensa biológica contra los depredadores naturales.

Tabla 2. Principales familias de polillas que producen reacciones urticantes

Familia	Especies
Arctiidae	<i>Arctia</i> sp., <i>Arctia caja</i> , <i>Estigmene acrea</i> , <i>Euchaetes egle</i> , <i>Eutane terminalis</i> , <i>Hyphantria cunea</i> , <i>Lophocampa caryae</i> , <i>Manuela replana</i> , <i>Premolis semirufa</i> , <i>Pyrrharctia isabella</i> , <i>Spilosoma glatignyi</i> , <i>Spilosoma lutea</i> , <i>Spilosoma virginica</i> .
Lasiocampidae	<i>Dendrolimus</i> sp. (also cocoons), <i>Eriogaster lanestris</i> , <i>Malacosoma</i> spp., <i>Lasiocampa quercus</i>
Limacodidae	<i>Acharia stimulea</i> , <i>Adoneta spinuloides</i> <i>Darna pallivitta</i> <i>Doratifera</i> sp. <i>Euclia delphinii</i> <i>Isa textula</i> <i>Latoia lepida</i> <i>Natada nasoni</i> <i>Parasa chloris</i> <i>Parasa Indetermina</i> <i>Thosea penthima</i> <i>Phobetrion pithecium</i> <i>Sibine stimulea</i>
Lymantriidae	<i>Acyphas leucomelas</i> <i>Dasychira</i> sp. <i>Euproctis</i> sp. <i>Leptocneria reducta</i> <i>Lymantria dispar</i> <i>Orgyia</i> sp.
Megalopygidae	<i>Megalopyge opercularis</i> , <i>Norape ovina</i> , <i>Podalia</i> sp
Morphoidea	<i>Morpho</i> sp.
Notodontidae	<i>Anaphe venata</i> , <i>Epicoma</i> sp., <i>Ochrogaster lunifer</i> , <i>Thaumetopoea pityocampa</i> , <i>T. processionea</i> , <i>T. wilkinson</i>
Nymphalidae	<i>Hypolimnna misippus</i> , <i>Nymphalis antiopia</i>
Saturniidae	<i>Automeris io</i> , <i>Dirphia</i> sp., <i>Hemileuca oliviae</i> , <i>Hemileuca oliviae</i> <i>H. maia</i> <i>Hylesia metabus</i> (adult) <i>Lonomia Achelous</i> <i>Lonomia obliqua</i>

Megalopyge opercularis

La especie de *M. opercularis*, pertenece a la familia *Megalopygidae*, llamadas polillas de franela, porque sus fases de larvas y adultos son densamente peludos, se encuentra establecida en la siguiente ubicación taxonómica:

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Zygaenoidea (Megalopygidae)

Megalopyge opercularis

Carama creolata

Lagoa crispata

Megalopyge lanata

Megalopyge albicollis

Megalopyge radiata

La asignación del nombre a la familia y género, de la especie *Megalopyge*, proviene de las raíces griegas Megalo (grande) y pygidium (grupa), por el tamaño y forma de las orugas de esta especie, la especie de *M. opercularis*, se deriva de la palabra latina operculum, puerto o tapa, referida a la salida del capullo (Lepesqueur 2012). La oruga de tiene una apariencia característica, por lo tanto, en las diferentes regiones donde habita se le da nombres comunes característicos, es conocida como "oruga de gato" "oruga de puss", "asp italiana", "zarigüeya", "perrito", y "babosa lanuda" (Diaz 2005; Avilan et al. 2010; Arquieta y Martínez 2014).

Dentro del pelaje que cubre la parte posterior del cuerpo de la oruga de *M. opercularis* se encuentran unas espinas huecas (Fig. 2), que contienen en la parte apical el veneno que produce, las espinas son producidas por la extensión del tegumento, con una glándula de células especializadas, que produce las sustancias urticantes, que responden a estímulos

sensoriales, las espinas son rígidas pero pueden ser rotas para inyectar el veneno, como parte de un estímulo mecánico, el número y tamaño de las espinas van incrementando conforme aumenta el tamaño de las orugas, este tipo de espinas es característico de *Megalopygidae*, *Limacodidae*, y *Saturniidae*, cuya principal función es defensa contra depredadores (Battisti et al. 2011).

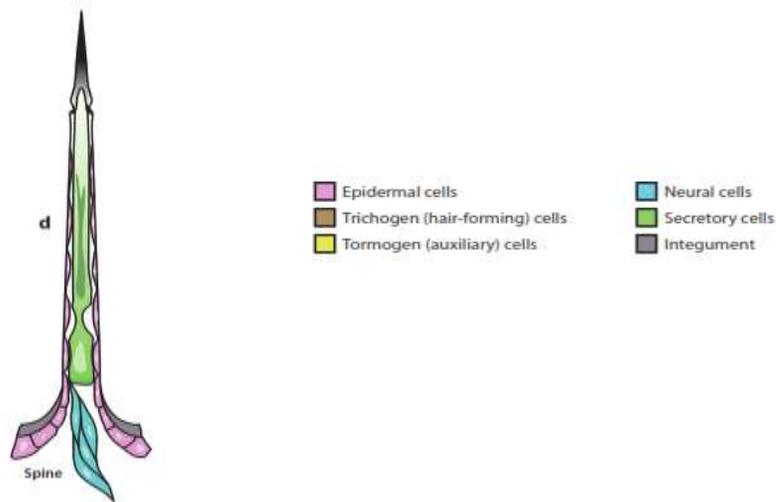


Figura 2. Espina característica de *M. opercularis* (Battisti et al. 2011)

Ciclo de vida

Al igual que otros lepidópteros, *M. opercularis*, presenta las etapas características huevo, larva, pupa, crisalide, adulto; los huevos que produce la hembra de *M. opercularis*, son pequeños de 0.6 mm de ancho por 1.2 mm de largo, ligeramente redondeados en los extremos, color amarillo claro (Fig. 3), colocados generalmente en la planta huésped con ayuda de la seda que secreta de la glándula de la polilla, que les ayuda a fijarse en un sustrato adecuado (Hall 2013).

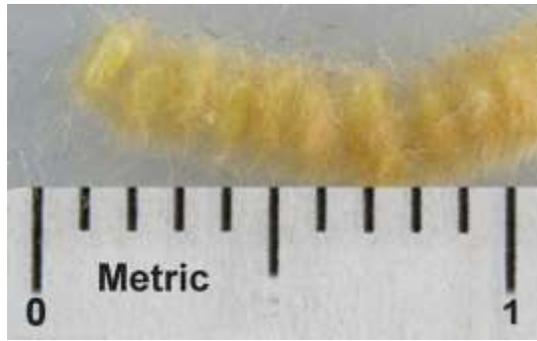


Figura 3. Huevecillos de *M. opercularis*

En el estadio de larva *M. opercularis*, sus instars son inciertas, algunos autores coinciden que son entre 5 y 6, con las siguientes medidas de larva 1er estadio: 1.5 mm, 2do estadio: 2.3 mm, 3er estadio: 3.1 mm, 4to estadio: 3.6 mm, larva madura: 2.54 cm (1 pulgada); sin embargo, otros estudios han identificado entre 8 y 10 estadios (Fig. 4 y 5). La confusión en la identificación de los diferentes estadios de larva, recae por el tamaño que presenta la oruga (Khalaf 1975).



Figura 4. Etapa temprana de la oruga de *M. opercularis*



Figura 5. Etapa final de la oruga de *M. opercularis*

El tamaño más grande reportado hasta ahora es de 4 cm incluyendo la cola que aparenta en los estadios finales, su aspecto algodonoso va incrementando conforme va creciendo, las espinas se ven oscuras entre los pelajes y también su número aumenta conforme el crecimiento de la larva, el tegumento de la oruga inicialmente es de un color amarillento claro posteriormente va oscureciendo a un verde grisáceo, los pelos al igual viran de amarillo, gris, café claro y oscuro (Fig. 6), conforme va mudando (Hall 2013).



Figura 6. Oruga de *M. opercularis*

El capullo que forma tiene un tamaño variado de 1.3 cm a 2.0 cm, presenta una pequeña joroba que es donde se encuentra los pelos que pierden durante el proceso de metamorfosis, al inicio los capullos son débiles por el hilado que lo conforma, posteriormente envejece y se meteoriza, esta parte frontal se colapsa para formar una almohadilla de seda aplanada en el sustrato frente al opérculo (Fig. 7) (Hall 2013).



Figura 7. Capullo de *M. opercularis*

En la etapa adulta las hembras son más grandes que los machos, su color es amarillo las alas delanteras son amarillas con algo de negro a lo largo de los márgenes costales y ondas de pelos blancos (escamas) en la base de 2/3 de las alas, los machos presentan más

marcado el color negro en las alas, para hacerlo más llamativo a las hembras, las alas posteriores de ambos sexos son uniformemente cremosas y amarillas. Miden 2.4 a 3.6 cm de diámetro, en esta etapa no cuenta con espinas con veneno, aunque si presenta pelaje, que son escamas profundamente divididas y que las bases no divididas son típicas de alas de otras polillas (Fig. 8) (Hall 2013).

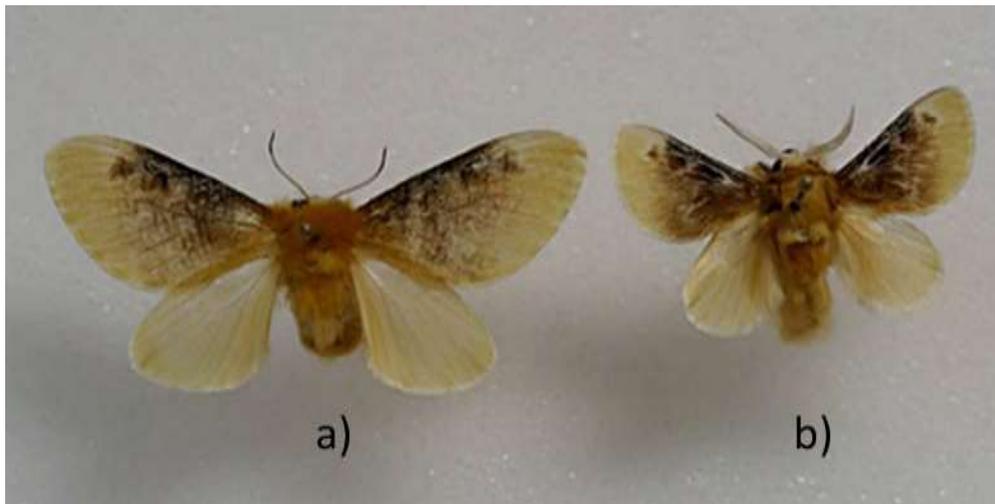


Figura 8. Polilla de *M. opercularis*

a) Hembra b) Macho

Distribución

El primer accidente causado por *Megalopyge* se registró en 1913 en San Antonio, Texas (Pinson y Morgan 1991). El aspecto lanudo característico de la oruga de *M. opercularis* su tamaño, facilidad de acceso en el medio ambiente y la movilidad lenta, incita a los niños por curiosidad hacer contacto con el estado larvario, esto pone en riesgo a los infantes haciéndolos más susceptibles, por lo cual la aparición en escuelas y parques ha causado el cese de actividades, como sucedió en 1923, en escuelas públicas en San Antonio, Texas y en 1951 en Galveston, Texas, originó el cierre de las dependencias educativas (Díaz 2005).

La prevalencia de accidentes con orugas urticantes en Brasil, país en el que se han realizado estudios de esta incidencia, confirman mediante una encuesta no oficial en el

Hospital Vital Brasil (Instituto Butantã), en São Paulo, en 1975-1979, se presentaron 568 casos de accidentes, en 52 accidentes, fue posible identificar el agente causal 14 fueron provocados por *Megalopyge Sp*, 11 por *Megalopyge Albicolis* y 9 por *Megalopyge Lanata* (Cardoso y Junior 2005). En 1996, el hospital de San Pablo, Brazil, registró 100 casos de envenenamiento por *Saturnaiidae* y *Megalopyge* (Lamdin et al. 2000).

En otro país de Suramérica, en Venezuela en el 2010, se describió el primer caso clínico originado por la picadura de *M. opercularis* (gusano-pollo), considerado una nueva entidad patológica que ocasionó al paciente síntomas muy severos, que incluían reacciones sistémicas, así como dolor intenso en la mano, irradiado a la parte alta del brazo, edema restringido, cefalea, mareos, opresión retroesternal y síntomas parecidos al choque anafiláctico, que requirieron su hospitalización (Avilán et al. 2010).

Recientemente en el 2015, se registró 3 casos en Guyana francesa, el agente causal pertenecía al género *Megalopyge* sin embargo no se logró clasificar la especie y la sintomatología fue un poco anormal, los pacientes presentaron movilidad limitada y requirieron aplicar anestesia local para mitigar el dolor (Torrents et al. 2015).

En México se tiene conocimiento de la presencia de *Megalopyge* en 1970, en la zona del centro de Monterrey, Nuevo León, en años recientes en 2015 y 2016 en Noviembre en Jalisco, Nayarit y Tamaulipas y Nuevo León, los medios de comunicación han informado la presencia de oruga en parques y escuelas de educación básica, declaran alerta para evitar accidentes (Fig. 9)



Figura 9. Distribución de *M. opercularis*

Importancia sanitaria

Las orugas de *M. opercularis*, se alimentan de diferentes especies de árboles, otra forma de exposición indirecta en humanos, se presenta cuando caen del follaje y en forma accidental entran en contacto o cuando son oprimidas en el cuerpo, las lesiones generalmente se presentan en cara, cabeza, brazos y cuello (Kuspis et al. 2001).

La importancia sanitaria de la oruga radica en los accidentes que ocurren con humanos, se produce por la incrustación de las espinas en la piel causando urticaria y dolor intenso en los primeros 5 minutos, por sensaciones de ardor y dolor local linfadenopatía regional, cefalea y dermatitis inflamatoria, también puede producir náusea (y vómito), malestar estomacal intenso, y problemas respiratorios. Además, se puede producir necrosis epidérmica localizada y subsecuentes vesículas, así como convulsiones (Avilán et al. 2010; De Roodt et al. 2000; Torrents et al. 2015)

En la actualidad, no existe un tratamiento específico para las lesiones ocasionadas por *Megalopyge*, los médicos sugieren colocar compresas de agua fría y administrar analgésicos orales, como la dipirona y si el dolor es muy intenso tramadol hidrocloreuro se ha empleado o lidocaína (Haddad y Lastoria 2014), el malestar desaparece en unas horas todo depende de la dosis de veneno inyectado y la susceptibilidad del paciente, en algunos casos se crea inmunidad con el contacto constante, sin embargo; en otros la respuesta inmunológica ha sido más agresiva, conforme aumenta la exposición en un individuo. Para reacciones anafilácticas con vasodilatación periférica e hipotensión, la adrenalina subcutánea ha sido un tratamiento con éxito (Díaz 2005).

Estudios de caracterización química de venenos de especies relacionadas filogenéticamente con *M. opercularis*

En el trabajo de investigación de Quintana (2017), en las polillas de las familias *Megalopygidae* (*Podalia ca. fuscescens*) y *Saturniidae* (*Leucanella memusae* y *Lonomia obliqua*), se identificó en el extracto del veneno de su fase larvaria la actividad caseinolítica, fosfolipasa A2 y hialuronidasa. Siendo la especie de *Podalia ca fuscescens* la que tuvo más actividad caseonolitica 15.12 ± 3.39 U/mg proteína y de hialuronidasa con

2.42 ± 1.08 U/mg proteína , *Lonomia obliqua* destacó su actividad de fosfolipasa A2 de 27.81 ± 15.87 U/mg proteína. Así mismo el extracto del veneno de *P. ca. fuscescens* y *l. obliqua* degradaron fibrina humana y disminuyó el tiempo de coagulación provocado por el calcio, y el veneno de *L. memusae* inhibió coagulación plasmática. Se determinó la secuencia de todas las proteínas que presentaron actividad procoaguladora, determinando la presencia de Lopap, activador de protrombina, y Losac en *Lonomia obliqua* y en *Leucanella memusae* también se determinó losac que es un activador del factor X (Quintana et al. 2017).

Es importante resaltar, que la oruga urticante de *Lonomia obliqua* ha sido de mayor interés científico por las reacciones en los procesos de coagulación que desarrolla en los organismos, al contacto con este insecto, puede llegar a causar síndrome hemorrágico (Reis et al. 2001), trabajó con el extracto de los pelos y encontró que presenta actividad procoagulante debido a un Factor X y a una actividad activadora de protrombina. Del extracto del veneno se purificó una serina proteasa 69 kDa Lopap (proteasa activadora de protrombina de la obliqua de *L. obliqua*) que fue capaz de activar la protrombina de una manera dependiente de la dosis, y los iones de calcio aumentaron esta actividad.

Estudios de microbiota en especies relacionadas filogenéticamente

Los insectos tienen importantes endosimbiontes bacterianos, que ayudan a su papel ecológico y adaptación evolutiva (Fromont et al. 2016; Smith et al. 2017), que son bacterias relacionadas con la adquisición de nutrientes, digestión, inmunidad, competencia vectorial, susceptibilidad a patógenos y especiación (Bouchon et al. 2016; Chen et al. 2016; Jehmlich et al. 2016]. Algunos estudios han demostrado que, en la mariposa, fritillaria de Glanville (*Melitaea cinxia*), existe una gran diversidad de microorganismos que influyen significativamente en su tasa de crecimiento (Ruokolainen et al. 2016).

La participación de estos microorganismos ha sido evaluada en orugas y polillas de la espalda de diamante (*Plutella xylostella*). Estos ayudan en la descomposición de las paredes celulares de las plantas, en la desintoxicación de compuestos fenólicos y en la síntesis de aminoácidos. Las especies bacterianas involucradas han sido identificadas

como *Enterobacter cloacae*, *E. asburiae* y *Carnobacterium maltaromaticum* (Xia et al 2017). También hay evidencia de que el microbiota intestinal de estos insectos varía según su dieta, hábitat, estilo de vida en el insecto huésped y etapa de desarrollo (Hossler, 2010; Yun et al. 2014).

El estudio del microbiota de lepidópteros es fundamental para comprender mejor sus interacciones y el papel ecológico que desempeñan en el medio ambiente. Dado que, la microbiota de *M. opercularis* no se ha determinado previamente, el objetivo de este estudio además de elucidar los componentes del veneno de *M. opercularis*, también se centró la investigación en evaluar y comparar la composición de su microbiota en la oruga y la polilla.

4. JUSTIFICACIÓN

Existe en la actualidad una marcada tendencia a la investigación en búsqueda de nuevas drogas de origen natural que permitirán disminuir o eliminar, algunos de los padecimientos o enfermedades, que no cuentan con tratamiento idóneo para ellos, teniendo como antecedentes que fuertes analgésicos, medicamentos contra el cáncer, fármacos para control de diabetes, entre otros, se han obtenido del veneno de organismos marinos y terrestres, y que no existe información completa de la composición del veneno de *Megalopyge opercularis*, en el presente trabajo se plantea realizar caracterización de las componentes de las segregaciones de sustancias urticantes producidas *M. opercularis*, es de gran interés comprobar si en las sustancias venenosas que segregan estos artrópodos existen componentes que pudieran ser usados por la industria farmacéutica como medicamentos para tratamiento del cáncer o estimulante del sistema inmune.

Como fue antes mencionado, existe limitada información de *M. opercularis*, por esto, en este trabajo de investigación se realizó la evaluación del veneno, su actividad biológica y estudio de la microbiota total del organismo, por la importancia de identificar qué factores, han contribuido para el incremento de los efectos causados en el organismo, al ocurrir accidentes con el veneno de la oruga, del estudio panorámico de *M. opercularis*, se espera contribuir al avance de la industria farmacéutica y apoyar con un importante aporte sobre la biología de este organismo y sea un aporte para conocer su papel ecológico.

5. HIPÓTESIS

Los componentes del veneno de la oruga *M. opercularis* presentan diferentes actividades biológicas, caracterizando el veneno permitirá correlacionar los componentes y su actividad específica. El estudio del microbiota total de *M. opercularis* fortalecerá la investigación de este lepidóptero, poco estudiado.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el veneno de la oruga, evaluar la actividad biológica y microbiota de *M. opercularis* en dos estadios.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar áreas de muestreo de *M. opercularis*.
- Colectar las muestras de oruga *M. opercularis*.
- Preservar las muestras mediante su cultivo en laboratorio.
- Aislar el veneno de las espinas de la oruga *M. opercularis*.
- Separar las proteínas mediante Cromatografía de Exclusión Molecular.
- Caracterizar las fracciones mediante diferentes técnicas analíticas (MS, PAGE).
- Evaluar el potencial citotóxico del veneno en células Caco2
- Determinar la microbiota de *M. opercularis* en oruga y polilla.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las zonas de muestreo fueron seleccionadas con base a reportes en zonas residenciales, que se realizaron a la autoridad de salud estatal y búsqueda en redes sociales.

Preservación de la muestra

Para llevar a cabo la colecta se utilizaron recipientes de polipropileno con malla de tela como tapa que permitiera la ventilación. Se colocaron ramas de árbol en donde se encontraron las orugas para crear un hábitat artificial y se rociaban de agua purificada con un atomizador. Las muestras fueron separadas en base a color y tamaño, colocándolas en tubos de 50 ml de polipropileno (Corning, CLS430828) y congeladas a -20°C, para su posterior uso.

Obtención de las espinas de *M. opercularis*

Las orugas fueron lavadas tres veces con agua destilada (CTR, 81273), para liberar las impurezas de polvo y bajar la carga microbiana, después se colocaron en cajas de Petri de plástico (SIGMA, P5481), con ayuda de unas pinzas y tijeras de disección se cortaron los pelos y espinas, la mayor cantidad posible sin traer tejido epitelial, colocándolos en un tubo de polipropileno de 50 ml, se pesaron en una balanza analítica (Sartorius, 124-1s), posteriormente se añadió los solventes para extracción de proteínas.

Extracción con agua destilada estéril

Se colocó un 0.1 gr de la muestra de pelos y espinas obtenidas en un tubo de polipropileno de 15 ml (Corning, 430791), se le agregó 2 ml de agua destilada estéril (CTR, 81273), se agitó 2 min vigorosamente en un vortex (Labnet, X-200) después se sonicó (Branson, 1800), empleando agua con hielo, luego se centrifugó dos veces por 5 min a 8,000 rpm (Labnet, MPW 55) para eliminar los pelos y se pasó el sobrenadante a un tubo de polipropileno de 15 ml (Corning, 430791).

Extracción del veneno con amortiguador RIPA

Se colocó un 0.1 gr de la muestra de pelos y espinas obtenidas en un tubo de polipropileno de 15 ml (Corning, 430791), se le agregó 2 ml de amortiguador RIPA (SIGMA-ALDRICH, R0275), se mezcló vigorosamente en un vortex (Labnet, X-200), se incubó en hielo por 5 min, luego se centrifugó dos veces por 5 min a 8,000 rpm (Labnet, MPW 55) para eliminar los pelos y se pasó el sobrenadante a un tubo de polipropileno de 15 ml (Corning, 430791).

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el empleo del reactivo Bradford (Thermo scientific, 1856210), el rango de la curva de calibración fue de 1-34 µg/ml empleando como estándar Albumina Bovina Sérica y el volumen de muestra analizada fue 100 µl, la lectura fue realizada en un espectrofotómetro (Biotek, Synergy HTX) a 595 nm de longitud de onda.

Precipitación de proteínas con metanol- cloroformo

Se tomaron 500 µl de muestra del veneno y se colocaron en un microtubo de 2 ml al cual se le agregó 600 µl de metanol (Sigma aldrich, 494437) y 400 µl de cloroformo (Sigma aldrich, 496189), se mezcló y se centrifugó 5 min a 8,000 RPM (Labnet, MPW 55) y se descartó la parte superior cuidando de no arrastrar la interfase donde se encuentran las proteínas luego adicionar 400 µl de metanol mezclar y centrifugar 3 min a 8,000 RPM, posteriormente descartar el sobrenadante y secar usando un sistema de centrifugado a vacío (Thermo Scientific, DNA120), resuspender las muestras en amortiguador de carga y calentar durante 5 min a 100°C en un baño seco de calentamiento (Labnet, D1100).

Visualización en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las muestras se fueron analizadas en gel de SDS-PAGE al 15%, utilizando un gel concentrador de 5%, como amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Biorad, 1610732) en una cámara de electroforesis (Biorad, Mini-PROTEAN II) con una corriente constante de 2mA (Biorad, power pac HC) se tiñó con 1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Biorad, 1610406) en solución de metanol al 45% -ácido acético al 10% (Sigma aldrich, 494437, 695092) durante 4 h y se destiñó con los mismos solventes hasta visualizar el gel, para digitalizar el gel se empleó un escáner.

Determinación de la actividad proteolítica sobre el gel

Se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes y no reductora. El ensayo se llevó a cabo en un gel separador al 12% de acrilamida.

La muestra fue preparada con 10 µg/mL de muestra, 3 µL de buffer de carga nativo y agua destilada hasta obtener un volumen final de 15 µL. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante 2 h, con el uso de un buffer de corrida (Tris-Glicina). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de un rango de 10-250 kDa.

Después el gel obtenido fue lavado con Tritón al 0.1% e incubado a 37°C; toda la noche, en agitación y en buffer de incubación (Tris.HCl 50 mM, ZnCl₂ 1 mM y CaCl₂ 10 mM), para su posterior tinción con negro amido, para la cual, primeramente el gel se sumergió en una solución de teñido (0.1% de negro amido y 7% ácido acético) durante 2 h, posteriormente se elimina el exceso de negro amido mediante 2 a 3 lavados con ácido acético al 7%.

Test de hipersensibilidad cutánea/evaluación del veneno

Se verificó la presencia del veneno activo realizando una prueba de sensibilidad al mismo empleando ratas egipcias a las cuales se les inyectó vía subcutánea 100 µl de extracto crudo obtenido de *M. opercularis* y como control negativo PBS (0,14 M NaCl, 0,04 M Tampón de fosfato, pH 7,2). Se midió el espesor de la zona de la reacción (respuesta inmune), mediante un calibre de baja presión a varios intervalos de tiempo (30 min, 12 y 24 horas). Los resultados se expresaron en términos de milímetros de grosor (Lomonte et al., 1993).

Digestión de proteínas en gel SDS-PAGE

Para digerir las bandas seleccionadas de proteínas de interés se siguió el método de Shevchenko (Shevchenko et al., 1996, 2006) modificado parcialmente (Winkler y García-Lara, 2010). Después de la SDS-PAGE, se escindieron del gel aquellas bandas cuyo peso molecular aparente coincidió con las bandas que mostraron actividad de proteasa en el gel “espejo” (zimograma). Dichas bandas se cortaron posteriormente en cubos con

aproximadamente 1 mm de longitud de borde. Los cubos se transfirieron a viales y se lavaron con una solución 1: 1 (v / v) de bicarbonato de amonio 125 mM y acetonitrilo (ACN) hasta decoloración completa. Los pasos de reducción y alquilación se realizaron mediante incubación con DTT 10 mM y IAA 55 mM. Luego, los trozos de gel se enjuagaron con ACN, luego y se secaron en una centrifuga de vacío. Después de secarse, los trozos de gel se rehidrataron en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM que contenía 10 ng / L de tripsina (PROMEGA, Madison, WI, EUA) y se incubaron durante una noche a 37°C. Después de la digestión triptica, los péptidos se extrajeron agitando durante 15 minutos con una solución 1: 2 (v / v) de ácido fórmico al 5% / ACN a 37 ° C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se secó en una centrifuga de vacío. Antes del análisis mediante LC-MS / MS, los péptidos se disolvieron en 20 µl de ácido fórmico al 0,1% (v / v).

Nanoflow LC-MS/MS

Todos los experimentos se realizaron en un sistema de cromatografía líquida de nanoflujo (LC) nanoAcquity (Waters, Milford, MA, EE. UU.) acoplado a una trampa lineal de iones LTQ Velos Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de nano electroaspiración. El disolvente A consistió en ácido fórmico al 0,1% y disolvente B de ACN al 100% en ácido fórmico al 0,1%. Tres microlitros de proteínas digeridas se unieron a una precolumna (Symmetry® C18, 5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters). Posteriormente se cargaron a una columna capilar de UPLC de 10 cm (100 µm de ID de tamaño de partícula BEH-C18 de 1,7 µm). La temperatura de la columna se controló a 35 ° C. Los péptidos se separaron mediante un gradiente de 60 min a una velocidad de flujo de 400 nL / min. El gradiente se programó de la siguiente manera: 3-50% de disolvente B (más de 30 min), 50-85% de B (más de 1 min), 85% de B (durante 7 min) y 3% de B (más de 22 min). Los péptidos se eluyeron a través de una punta de sílice recubierta estándar (NewObjective, Woburn, MA, EE. UU.). El espectrómetro de masas se operó en modo de adquisición dependiente de los datos para alternar automáticamente entre exploraciones completas (400-2000 m / z) y posteriores exploraciones CID y MS / MS PQD en la trampa de iones lineal. El CID se realizó usando helio como gas de colisión a una energía de colisión normalizada del 40% y 10 ms de

tiempo de activación. La adquisición de datos fue controlada por el software Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

Identificación de proteasa activa de *M. opercularis*

Para determinar la identidad de la proteasa más activa en el extracto soluble de las espinas de *M. opercularis*, se utilizó una estrategia de identificación “target-decoy”, es decir, utilizando una base de datos que contenga tanto secuencias “blanco” como secuencias “falsas” (Elias y Gygi, 2007). Para ello, se generó una base de datos concatenada, incluyendo todas las secuencias de proteasas pertenecientes a lepidópteros encontradas en la base de datos de Uniprot KB. Para generar la base de datos, se utilizó la herramienta disponible en el programa SearchGUI, donde se utilizan como secuencias “falsas” las mismas secuencias de la base de datos, pero invertidas.

Por otra parte, se transformaron los datos adquiridos en el espectrómetro de masas (*.raw) a un formato *.mzml, para poderlos analizar con el programa PeptideShaker v0.38.1 (Vaudel et al., 2015). Para llevar a cabo dicho análisis, primero se realizó una búsqueda utilizando la herramienta SearchGUI (Vaudel et al., 2011), utilizando los motores de búsqueda OMSSA en su versión 2.1.9 para windows de 32 bits (Geer et al., 2004) y X!Tandem, en su versión 13.2.1.1 (Craig y Beavis, 2004). Posteriormente, los datos de esta búsqueda se procesaron utilizando el programa PeptideShaker, en su versión 0.38.1, utilizando tolerancias de 0.5 Da y valores de FDR menores al 1%.

Actividad citotóxica

La prueba de citotoxicidad se realizó empleando células CaCo-2 (ATCC® HTB-37™) y utilizando el método colorimétrico para determinar el número de células viables con el colorante MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt), las pruebas se realizaron partiendo de un paquete celular de 5×10^4 células/ml utilizando medio DMEM/F12 (GIBCO/Thermo Fisher USA) con 5% de suero fetal bovino GIBCO/Thermo Fisher USA. En una placa de 96 pozos (Corning México), se colocaron en cada pozo 100 ul de esta solución y otros con 100 ul de medio sin células. Se incubó durante 24 horas en una cámara humidificada a 37°C y con 5% de CO₂. Se probaron diferentes concentraciones 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 µg/mL de

veneno extraído de *M. opercularis* y se colocó además en testigos positivo 100 µl de medio solo en los pozos con células y negativo 100 µl de medio solo en los pozos sin células de las columnas. Se incubaron por 48 horas en condiciones de humedad controlada con 5% de CO₂ y 37°C. Se agregó 20 µl de la solución CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI) a cada uno de los 96 pozos. Se lee a una absorbancia a 490 nm en el lector de Elisa BioTek® micro plate reader (BioTek, Winooski VT, USA). La citotoxicidad se estimó en términos de porcentaje de inhibición de crecimiento y expresando en IC₅₀.

Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)

Para la separación de las fracciones del extracto crudo se empleó Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC), empleando un Äkta Pure (GE Healthcare, Sistema de cromatografía Uppsala, Suecia) equipado con un Superose™ 12 10/300 columna de alto rendimiento GL (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), empleando las condiciones descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de trabajo en la SEC

Parámetro	Condición
Flujo	0.8 mL/min, Isocrático
Fase móvil	Buffer de fosfatos 20 mM pH 7.2 + 150mM KCl
Software de análisis	UNICORN 7.0
Columna	Superose® 12 10/300 30 cm × 10 mm, 11 µm

Extracción de ADN para análisis de Microbiota

Las muestras congeladas de orugas y polillas fueron homogenizadas en tubos cónicos en forma independiente con agua destilada y centrifugadas a 4500 RPM. Después el ADN fue extraído usando el kit QIAamp DNA Microbiome (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo el protocolo de fabricación. Los ácidos nucleicos de cada muestra fueron

cuantificados utilizando fluorómetro Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) y el reactivo Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher Scientific). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

Amplificación del rRNA y secuenciación por Ion Torrent

La región hipervariable 16S de la subunidad ribosomal fue amplificado de 5 ng de ADN microbiano usando el kit Ion 16S Metagenomics kit (ThermoFisher Scientific) en dos reacciones de PCR con un juego de primer (V1, V2, V4, V8 y V3, V6-V7, V9, V67). Los amplicones fueron purificados usando perlas magnéticas Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Inc, Atlanta, GA, USA) y después se cuantificó con Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) en un analizador Agilent® 2100 Bioanalyzer®. Después se tomaron 15 nanogramos para desarrollar ADN bibliotecas usando el Ion Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific) siguiendo el protocolo sugerido de fabrica. Las bibliotecas de ADN, se purificaron usando perlas magnéticas Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) y cuantificadas con Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies) en un analizador Agilent® 2100 Bioanalyzer®. Posteriormente, cada muestra fue concentrada a 26 pmol y se realizó una PCR con Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 kit (ThermoFisher Scientific) en un equipo OneTouch™2 system (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) con posterior enriquecimiento con el kit Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads en un equipo de Ion OneTouch™ES (Life Technologies). La secuenciación de cada biblioteca genómica fue realizada en un Sistema Ion PGM system utilizando el kit de secuenciación Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) en un chip 314 V2. Base calling se realizó Torrent Suite™ version 4.4.2 (Life Technologies) y el FastQC version 3.4.1.1 (Life Technologies) para obtener archivos fastq files de cada muestra.

Análisis de datos

Las secuencias obtenidas se exportaron a Ion Reporter™ versión 5.2 (Thermo Fisher Scientific). La agrupación y las asignaciones taxonómicas a las unidades taxonómicas operativas (OTU) se determinaron utilizando las bases de datos curadas MicroSEQ® 16S Reference Library v2013.1 y Greengenes v13.5 (Life Technologies). La abundancia

relativa de OTU (%) se calculó y comparó con los mapas de calor entre las etapas de oruga y polilla en diferentes rangos taxonómicos. La asociación se probó (χ^2) y su tamaño del efecto se midió con phi de Cramer (Φ_c) [Cramér, 1946] usando PAST 3.16 [Hammer, 2001]. La mayoría de las comparaciones de datos y cifras se generaron en R (<https://cran.r-project.org/>) utilizando funciones ad-hoc y codificación de colores según la comparación. La riqueza se calculó en el estimador Chao2 de la riqueza de especies [Chao, 1984; Chao, 1987] en EstimateS 9.1.0 [Colwell, 2013], que se recomienda para muestras pequeñas [Colwell y Coddington, 1924; Unterseher y col. 2008]. Estos valores se usaron como referencia de la riqueza esperada de microbiota para estimar la cobertura de la muestra (S_{obs} / S_{Chao2}). Se calculó la diversidad y se compararon los perfiles de orden de diversidad de microbiota para cada etapa de desarrollo (oruga y polilla), obteniendo un continuo de valores de diversidad que otorga el mayor peso al menor peso a las especies raras y que representa mejor la complejidad de este parámetro para una comunidad (p. Ej.) [Tóthmérész, 1995; Rényi, 1961]. Utilizamos el exponencial de la familia de ordenamiento de la diversidad de Rényi [Hill, 1963], también conocida como la diversidad de Hill [Hutcherson, 1970]. Particularmente estimados tres valores (números de Hill) [Hutcherson, 1970], donde $\alpha = 0, 1, 2$, correspondiente a S (número de especies / OTU), e^H (exponencial del índice de Shannon) y $1 / D$ (recíproco de el índice de Simpson), respectivamente. Además, obtuvimos intervalos de confianza del 95% del procedimiento de arranque (2,000 repeticiones). Los valores de diversidad e^H y $1 / D$ se compararon entre etapas con las pruebas t de Hutcherson [Chao, 2014]. Todos los análisis se realizaron en PAST 3.16 [Hammer, 2001]. La similitud se estimó con el índice de similitud basado en la abundancia Jaccard de Chao [Chao, 2005] y sus intervalos de confianza del 95% del procedimiento de arranque (10,000 repeticiones) entre ambas etapas de desarrollo y para cada rango taxonómico (especie a clase). Este índice se eligió ya que se recomienda para muestras con un alto número de especies raras y para condiciones submuestreadas [Chao, 2005]. Todos los análisis se realizaron en EstimateS 9.1.0 [Colwell, 2013].

9. RESULTADOS

Obtención de muestras

La mayoría de las muestras se obtuvieron de la etapa tardía de la oruga *M. opercularis*, (90-95%), con diámetros de 2-3 cm de largo, los colores predominantes fueron el amarillo, también se encontraron en color gris y café, características de las diferentes mudas de la especie de *M. opercularis*. Las orugas pequeñas de 1-1.5 cm, se encontraron en su mayoría en la parte alta del follaje de los árboles y fueron de color amarillo. Las orugas con colores oscuros se encontraron principalmente en las partes bajas de los árboles, en los troncos camuflajeadas (Fig. 10-12).

Se lograron armar tres lotes de cerca de cien orugas por cada uno de los muestreos, uno obtenido de la colonia Valle de Santa María en Pesquería (25°42'32.8" N 100°06'16.4 W y 25°42'24.6" N 100°06'04.1 W), la colonia Puerta de Hierro, Monterrey (25°45'07.9"N 100°25'05.6 W), y centro de Santa Catarina, (25.676797, -100.459623) del estado de Nuevo León, México (Fig. 10).



Figura 10. Orugas de *M. opercularis* en ramas de encino (*Quercus*)



Figura 11. Oruga de *M. opercularis* en su hábitat (hoja de encino *Quercus*)



Figura 12. Diferentes mudas de oruga *M. opercularis*

Durante la búsqueda de los ejemplares en estudio se encontraron 50 lugares en el área metropolitana con presencia de *M. opercularis*, en 11 diferentes municipios pertenecientes a esta zona (Tabla 3), 8 puntos geográficos en Apodaca, 1 en Cadereyta, 3 en Escobedo, 1 en García, 5 en Guadalupe, 6 en Juárez, 12 en Monterrey, 6 en San Nicolas de los Garza, 1 en Santa Catarina y 3 en Santiago, siendo el árbol de encino el principal hábitat (Fig. 13). Los puntos posibles de muestreos no habían sido reportados anteriormente en alguna publicación científica, ni en la paginas de diversidad biológica, por lo cual se integraron en la presente tesis para enriquecer la información descrita sobre la ecología de *M. opercularis*, además cabe destacar que las áreas donde se encontró la oruga, en la mayoría, son zonas residenciales, fraccionamientos nuevos donde se han sembrado arboles de encino como parte del ornamento (Fig. 21).

Tabla 4. Municipios del área metropolitana con presencia de *M. opercularis*

MUNICIPIO	COORDENADAS GEOGRAFICAS
1 Apodaca	25°48'58.6"N 100°14'41.3"W, 25°45'03.0"N 100°13'40.0"W, 25°43'08.7"N 100°09'36.6"W, 25°45'01.4"N 100°12'10.3"W, 25°46'17.0"N 100°14'01.4"W, 25°47'47.9"N 100°12'57.9"W, 25°44'22.0"N 100°11'30.5"W, 25°47'11.9"N 100°14'28.2"W
2 Cadereyta	25°34'55.9"N 100°01'12.2"W
3 General Escobedo	25°47'23.5"N 100°19'55.0"W, 25°47'58.4"N 100°18'22.3"W, 5°47'51.2"N 100°20'34.8"W
4 García	25°46'09.1"N 100°25'42.0"W
5 Guadalupe	25°42'26.6"N 100°13'48.7"W, 25°39'22.4"N 100°12'57.1"W, 25°39'43.1"N 100°15'22.7"W, 25°38'45.2"N, 100°12'25.8"W, 25°38'01.3"N 100°11'38.0"W
6 Juárez	25°38'47.8"N 100°08'11.7"W, 25°37'52.7"N 100°06'20.3"W, 25°40'02.0"N 100°06'41.0"W, 25°39'56.5"N 100°06'39.5"W, 25°38'19.6"N 100°05'38.1"W, 25°38'23.9"N 100°10'38.4"W
7 Monterrey	25°34'38.7"N 100°16'40.8"W, 25°44'50.7"N 100°22'47.8"W, 25°42'12.2"N 100°21'43.9"W, 25°39'06.9"N 100°16'50.6"W, 25°37'35.0"N 100°17'59.9"W, 25°36'49.3"N 100°15'41.7"W, 25°38'58.3"N 100°17'37.3"W, 25°35'25.4"N 100°15'33.4"W, 25°40'38.7"N 100°17'26.6"W, 25°39'34.5"N 100°16'26.9"W, 25°36'03.5"N 100°15'21.8"W, 25°47'08.6"N 100°22'32.0"W

8	San Nicolás de los Garza	25°43'04.8"N 100°13'50.8"W, 25°43'36.1"N 100°18'42.9"W, 25°45'47.4"N 100°15'42.7"W, 25°39'28.4"N 100°22'13.3"W, 25°40'48.4"N 100°24'26.3"W, 25°38'43.8"N 100°20'08.2"W
9	Santa Catarina	25°40'53.5"N 100°29'49.9"W
10	Santiago	25°28'37.9"N 100°10'42.6"W, 25°24'44.3"N 100°08'25.1"W, 25°30'00.0"N 100°12'00.0"W

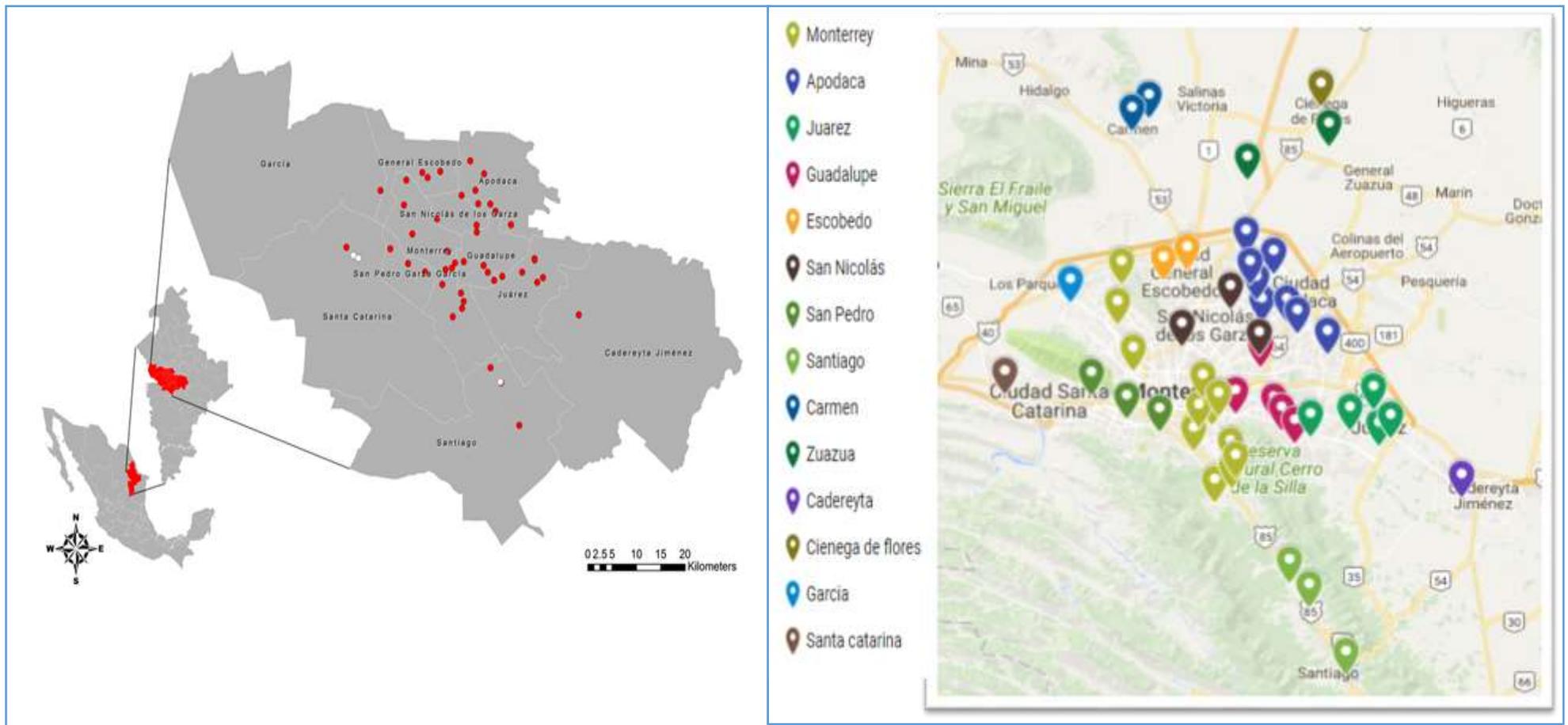


Figura 13. Distribución de *M. opercularis* en la zona metropolitana de Nuevo León, México

Preservación de la muestra

El proceso de congelación de las muestras de oruga permitió la extracción del veneno de *M. opercularis*, se decidió usar los ejemplares de mayor tamaño (2.5-3 cm), para obtener mayor cantidad de muestra, se realizó el corte de las espinas y el pelaje, con las orugas ya congeladas (4°C), porque fue más fácil que a temperatura ambiente, sin congelación el pelaje, se perdía fácilmente y no se podría recuperar la mayor cantidad de las espinas, que se encontraban entre el pelaje, como fue imposible realizar la extracción una por una de las espinas, las cuales contienen el veneno de interés.

Debido a que experimentalmente se dificultó la extracción de veneno y con el antecedente bibliográfico, que indicaban que se requería gran cantidad de especímenes para la extracción de veneno de orugas de especies relacionadas, se planteó como objetivo obtener un cultivo de *M. opercularis*, por lo tanto, se seleccionaron algunas de las orugas en el estadio más desarrollado, en 2-3 días algunas desarrollaron capullo, con una longitud de 3 cm, color amarillo claro (paja), presentando la tipo joroba característica, en la que dejan la muda de las espinas y pelos que pierden al momento de emerger del capullo (Fig. 13).



Figura 14. Capullo de *M. opercularis* desarrollado en condiciones de laboratorio

Después de 7 días empezaron a emerger algunas polillas, el macho con un tamaño menor comparado con la hembra, ambos de color amarillo, con patas en tono negro, en el caso del macho (Fig. 14) se veía un área oscura en las alas más vistoso, en esta etapa no presentan espinas urticantes, las hembras midieron de 2-2.5 cm (Fig. 16) y los machos median cerca de 2 cm. (Fig. 15).

Una de los inconvenientes para mantener un cultivo de *M. opercularis* fue que en limitadas ocasiones, se logró que machos y hembras salieran del capullo sincronizadamente y que se diera la fecundación, aunado que la vida media de los adultos fue de 1-2 días, en tres ocasiones se logró que macho y hembra, copularan y la hembra ovopositará (Fig. 17 y 18).



Figura 15. Polilla Macho de *M. opercularis*



Figura 16. Polilla macho de *M. opercularis*



Figura 17. Polillas de *M. opercularis*

En promedio una hembra ovopositó cerca de 100 huevecillos (Fig. 18), llenos de pelillos amarillos pegados con su saliva en conjuntos de 20 huevecillos (Fig. 19), el aspecto del huevo fue amarillo, el diámetro era de 1 mm de largo y 9.5 de ancho, en esta etapa tampoco se secretan sustancias urticantes, la eclosión de los huevecillos vario de 3-5 días, después de puestos en la paredes de los contenedores de plástico (Fig. 19) y en las mallas que los protegían (Fig. 18).

Después de la eclosión de los huevos se mantuvieron las larvas con varios tratamientos de dieta y bajo condiciones ambientales simuladas en el laboratorio, es decir, con ramas del árbol donde se encontraban y rociando agua, sin embargo, no se logró mantener vivas las orugas.



Figura 18. Polilla hembra de *M. opercularis* (ovipositando)



Figura 19. Polilla hembra de *M. opercularis* (ovipositando)



Figura 20. Huevos de *M. opercularis*



Figura 21. Oruga de *M. opercularis* eclosionada en laboratorio

Obtención del veneno de *M. opercularis*

En el estereoscopio se colocaron las muestras de orugas, entre el pelaje se observaron, pelos con las puntas más oscuras, correspondientes a las espinas huecas características de *M. opercularis*, después de identificadas, se trató de extraer una por una con una pinza, pero no permitía obtener gran cantidad y se tenía que realizar bajo el estereoscopio, por lo tanto se decidió cortar todo el pelaje donde venían espinas y pelos. Como se puede observar en la imagen (Fig. 22), la proporción de pelos en comparación con las espinas puede ser de 30:1, por lo tanto se requirió obtener mucha cantidad de pelos de varias muestras de orugas para asegurar el análisis.

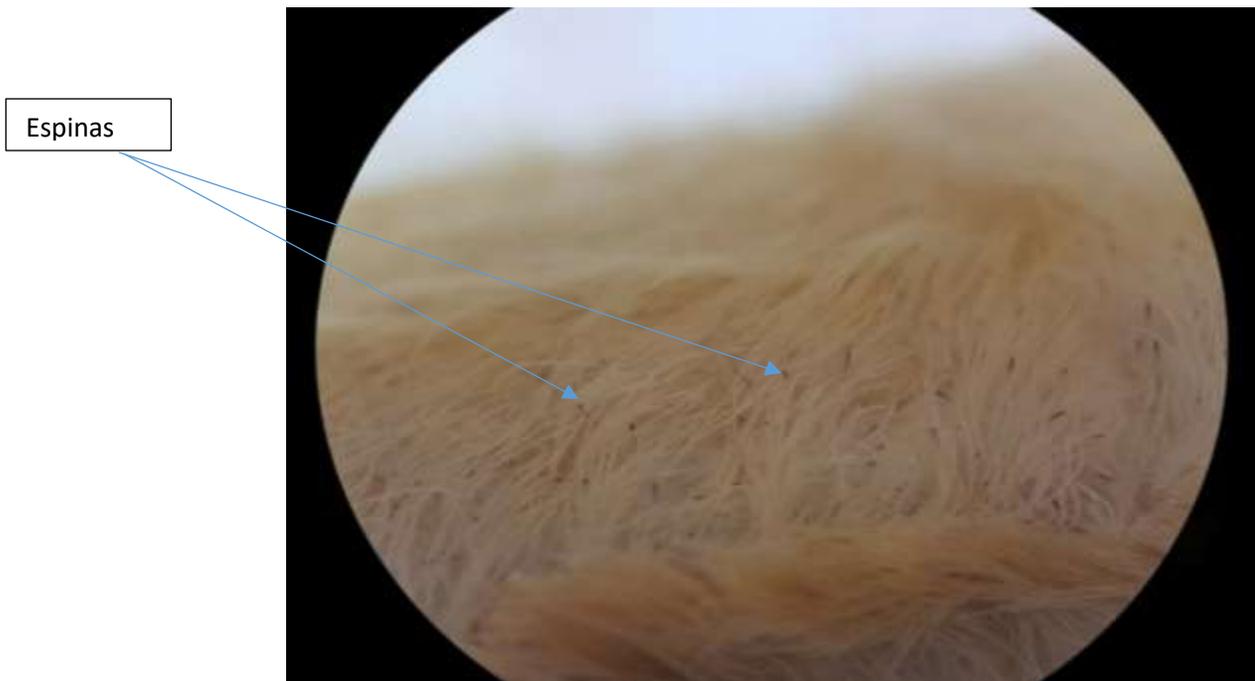


Figura 22. Espinas de *M. opercularis* (Observado en estereoscopio)

En cuanto al empleo de extractos, el medio RIPA que especial para el lisado y la extracción de proteínas en células de mamífero para cultivos in vitro, no resultó el más indicado para el procedimiento de extracción, por el pelaje que contenía la muestra y las burbujas generadas por su uso, no ayudó a recuperar la mayor cantidad de proteínas, por lo cual, se

realizó un extracto acuoso, obteniendo una concentración de 188.27 $\mu\text{g/mL}$, comparado con 67.34 $\mu\text{g/mL}$, obtenidos a partir de la extracción con medio RIPA (Tabla 4, Fig. 23), con parámetros estadísticos de *n=3, r2= 0.9761 (fig. 23), después de la extracción se corrió un gel de bis-acrilamida 15% .

Tabla 5 Extracción de veneno de *M. opercularis*

EXTRACTO	D. O. (495 nm)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)
MUESTRA RIPA	0.168	67.34
MUESTRA ACUOSA	0.185	188.27

*n=3, r2= 0.9761.

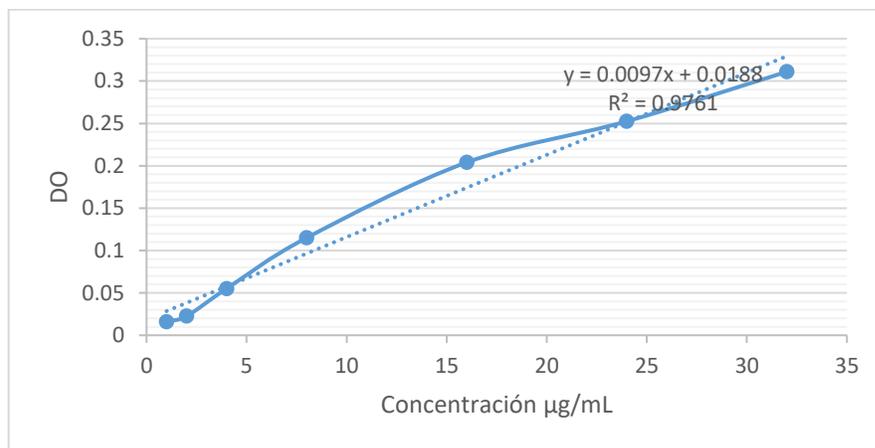


Figura 23. Curva de calibración "Cuantificación de proteínas"

Las muestras obtenidas de la extracción con el amortiguador comercial RIPA y el extracto acuoso, en la corrida electroforética, presentaron migración semejante, solamente en el caso del amortiguador, no se lograban observar las bandas bien definidas, en el extracto acuoso separaron proteínas de un peso 10-125 kD, con bandas con mayor concentración o con menos separación electroforética se presentaron en bandas menores a 37kD,

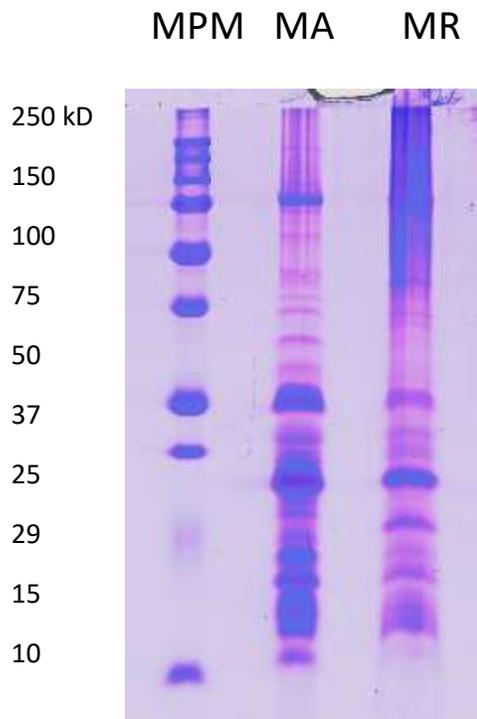


Figura 24. Gel 15% acrilamida. MPM Marcador de Peso Molecular (10-250 kD), MA: Muestra extraída con Agua, MR: Muestra extraída con RIPA

Prueba confirmatoria de extracción de veneno

Después de la extracción acuosa del veneno y su visualización en los geles de poliacrilamida, lo cual, permitió identificar su composición proteica, fue necesario confirmar que el extracto aun tuviera actividad, para verificar que el proceso de extracción no afectó la integridad de nuestro veneno, la colocación del extracto de veneno en la parte dorsal de la espalda de rata egipcia, permitió observar una respuesta inmune, caracterizada por la inflamación, enrojecimiento y necrosado del área de aplicación, la cual, presentan en la fase inicial de la reacción que ocurre cuando se presentan la picadura de la oruga urticante. El control negativo, en esta ocasión se empleó una solución de PBS, en el tejido cutáneo, no presentó reacción inflamatoria. Se consideró positiva para prueba de

inflamación porque pasado el tiempo de 12 y 24 horas después de aplicado, presentó más de un 10% de incremento en el diámetro de la ampula formada inicialmente, por lo cual la prueba se considera positiva, para la prueba de inflamación en rata egipcia (Figuras 25-27).



Figura 25. Aplicación del veneno de *M. opercularis*



Figura 26. Reacción al veneno de *M. opercularis* en rata egipcia (12 horas)



Figura 27. Necrosis del tejido de rata en respuesta al veneno de *M. opercularis* en rata egipcia (24 horas)

Actividad citotóxica del extracto crudo de *M. opercularis*

Con la finalidad de determinar la citotoxicidad del extracto de *M. opercularis*, se realizaron bioensayos con células de cáncer de colon (Caco2), se calculó la concentración inhibidora máxima media IC50, la media de tres ensayos fue 3.98 µg/mL, el porcentaje de inhibición fue directamente proporcional al incremento en la concentración del extracto de veneno en un rango de concentración de 1.2-38.5 µg/mL, como se puede observar en la curva de porcentaje de viabilidad, se presentó un 8.5, 16.4, 27.7, 61.1, 77.5 y 96.5 % de viabilidad a una concentración de 38.5, 19.3, 9.6, 4.8, 2.4 y 1.2 µg/mL, respectivamente. (Fig. 9).

Tabla 6. Actividad citotóxica de *M. opercularis*

Concentración (µg/mL)	Absorbancia	Abs Corregida		% Viabilidad
38.5	0.25425	0.04	0.00	8.578895
19.3	0.2905	0.08	0.02	16.41885
9.6	0.34275	0.13	0.03	27.7192
4.8	0.49725	0.28	0.03	61.13364
2.4	0.573	0.36	0.05	77.51645
1.2	0.66075	0.45	0.05	96.49455

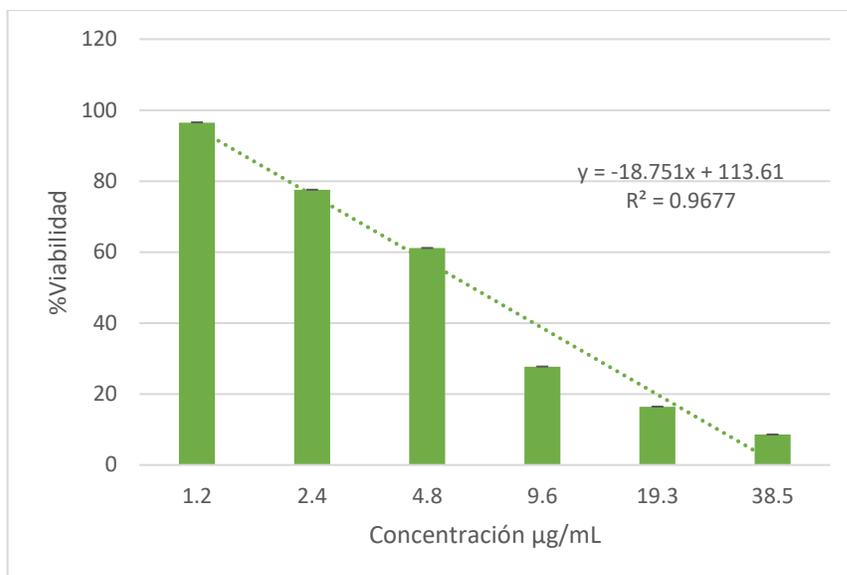


Figura 28. Actividad citotóxica de *M. opercularis*

Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)

El protocolo empleado para la purificación parcial del veneno de *M. opercularis*, incluyó el empleo de la columna Superose® 12 10/300, 30 cm × 10 mm, con amplio rango de fraccionamiento de moléculas con pesos moleculares entre 1000 y 300 000 Da, el cual permitió obtener con el uso de amortiguador fosfatos, tres fracciones, la primera recuperada obtenida a los 7 ml, la segunda de 22-25 ml y la tercera a 26 ml, la primera y la tercera con mejor resolución en los picos cromatográficos obtenidos (Fig. 29).

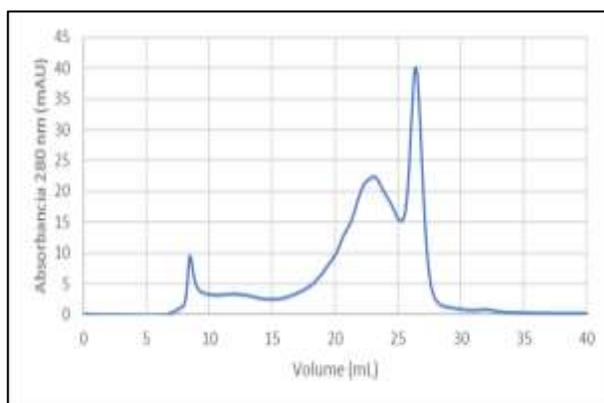


Figura 29. Separación cromatográfica del veneno de *M. opercularis*

Actividad citotóxica de las fracciones de *M. opercularis*

De las tres fracciones obtenidas se tomaron varias muestras de cada una para recuperar la mayor cantidad de proteína, en el caso de la fracción 1, que presento mayor resolución se tomó solamente una muestra, en la fracción 2 se tomaron 5 muestras (B1-B5), por que presentó menor resolución y mayor área bajo el pico y por último en la tercera muestra se tomaron 3 fracciones (C1-C3), posteriormente, los resultados de los ensayos de citotoxicidad, nos arrojaron mayor actividad citotóxica en la fracción B4, seguido de B3, B5 y C1.

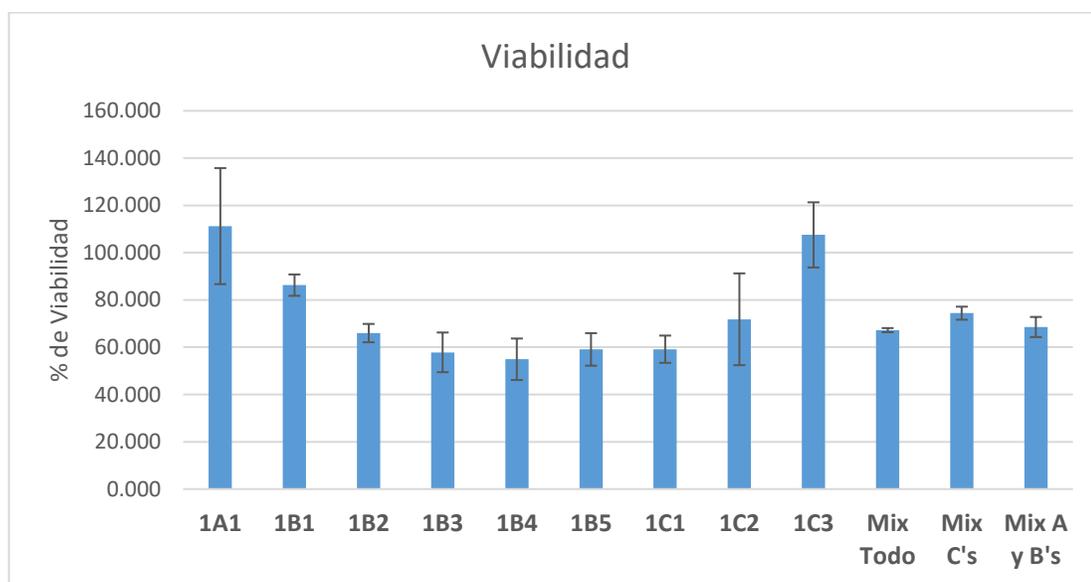


Figura 30. Porcentaje de viabilidad presentado por las células CACo vs fracciones de veneno de *M. opercularis*

Tabla 7. Actividad citotóxica de las fracciones del veneno de *M. opercularis*

Tratamiento	Abs 1	Abs 2	R1	R2	Viabilidad	SD	CV
1A1	0.53	0.726	93.888	128.609	111.249	24.55	22.07
1B1	0.469	0.505	83.082	89.460	86.271	4.51	5.23
1B2	0.357	0.388	63.242	68.733	65.988	3.88	5.88
1B3	0.293	0.36	51.904	63.773	57.839	8.39	14.51
1B4	0.275	0.345	48.716	61.116	54.916	8.77	15.97
1B5	0.306	0.361	54.207	63.950	59.079	6.89	11.66
1C1	0.311	0.357	55.093	63.242	59.167	5.76	9.74
1C2	0.328	0.483	58.105	85.562	71.833	19.42	27.03
1C3	0.552	0.662	97.786	117.272	107.529	13.78	12.81

Mix Todo	0.376	0.383	66.608	67.848	67.228	0.88	1.30
Mix C's	0.409	0.431	72.453	76.351	74.402	2.76	3.70
Mix A y B's	0.404	0.37	71.568	65.545	68.556	4.26	6.21

Identificación de composición del veneno de *M. opercularis*

Como base en la información de la naturaleza del veneno de orugas urticantes, se realizó un zimograma, el cual proporcionó la separación y visualización de la fracción obtenida por SEC, con la identificación de actividad proteolítica, se seleccionaron las bandas para su posterior secuenciación peptídica. La banda que presentó actividad proteolítica en el zimograma realizado, corresponde a un peso cercano a 45 kDa como se observa claramente en la degradación de la gelatina puesta como sustrato en el gel (Fig. 31).

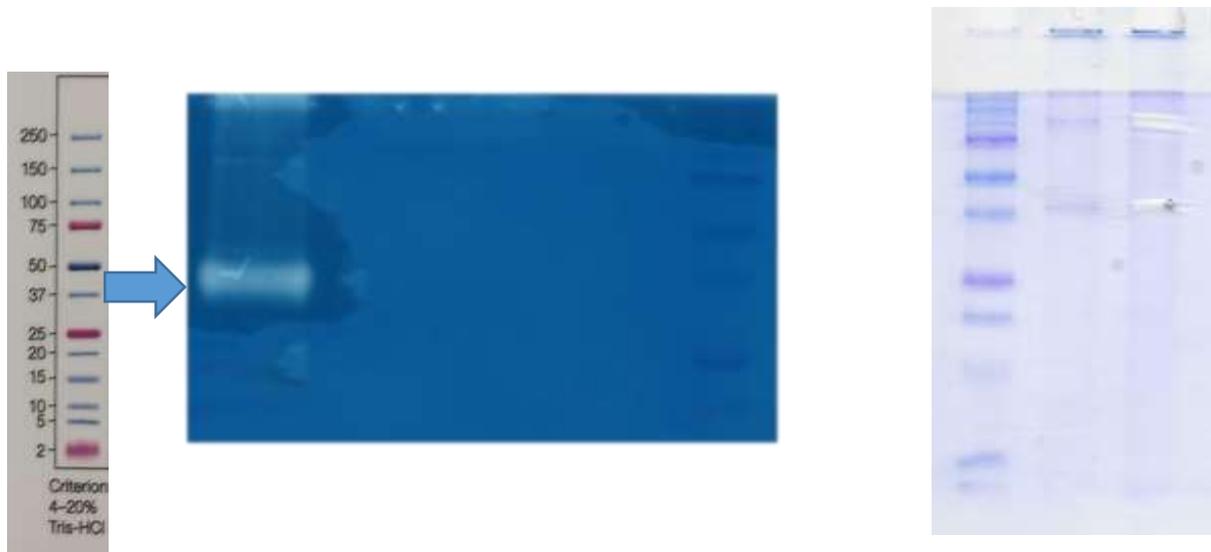


Figura 31 Zimograma

A partir de la identificación mediante LC-MS/MS obtuvimos dos posibles proteínas candidatas: una proteasa proveniente de *Amblyptila sp. AYK-2011* anotada como involucrada en la biosíntesis de pirimidinas (G1ERA8_9NEOP), con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y una proteasa de *Lonomia obliqua*, cuya actividad descrita es la de factor 1 de activación de la profenoloxidasa, con un peso molecular aproximado de 42.86 kDa. Considerando el tamaño de la banda que demostró actividad de proteasa,

nos inclinamos por esta última candidata.

Main Accession	G1ERA8	Q5MGE2
Description Gene Name Chromosome	Pyrimidine biosynthesis (Fragment) (G1ERA8_9NEOP)	Prophenoloxidase activating factor 1 (Fragment) (Q5MGE2_LONON)
MW [kDa]	80.865232	42.867162
Coverage [%]	79.29	42.867162
Spectrum Counting	13974.331	20294.38
Protein Inference, Secondary Accessions	Single Protein	Single Protein
Protein Group	G1ERA8	Q5MGE2
#Peptides	6	6
#Unique	5	6
#PSMs	7	7
Confidence [%]	100	100

Composición de la microbiota de *M. opercularis*

La microbiota de *M. opercularis* en ambos estados (oruga y polilla) está compuesta por 4 filum. La oruga tiene 4 filum, *Actinobacteria* con un 32.26%, seguidos de *Proteobacteria* (31.33%) *Firmicutes* (24.51%) y *Cyanobacteria* (10.66%); en la polilla, los filum dominantes fueron *Proteobacteria* (54.6%), *Cyanobacteria*(24.92%), *Actinobacteria* (12.8%) y *Firmicutes* (7.05%) (Tabla 8 y 9).

Tabla 8 Filum presentes en oruga de *M. opercularis*

Fílum	Porcentaje (%)
<i>Actinobacteria</i>	32.26
<i>Proteobacteria</i>	31.33
<i>Firmicutes</i>	24.51
<i>Cyanobacteria</i>	10.66
<i>Otros <1%</i>	1.24

Tabla 9 Filum presentes en polilla de *M. opercularis*

Fílum	Porcentaje (%)
<i>Proteobacteria</i>	54.6
<i>Cyanobacteria</i>	24.92
<i>Actinobacteria</i>	12.8
<i>Firmicutes</i>	7.05
<i>Otros <1%</i>	0.63

Se identificaron siete clases en el microbiota de ambos estados de *M. opercularis*, las clases fueron *Actinobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Clostridia*, *Bacilli*, *Nostocficidae*, *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. Las más abundantes fueron las *Actinobacterias* con 32.2 % en la oruga y *Alfaproteobacteria* 48.5%, en la fase adulta de *M. opercularis* (Tabla 10 y 11).

Tabla 10 Clases presentes en oruga de *M. opercularis*

Clase	Porcentaje (%)
<i>Actinobacteria</i>	32.2
<i>Alfaproteobacteria</i>	24.3
<i>Clostridia</i>	12.3
<i>Bacilli</i>	12.1
<i>Nostocoficidae</i>	10.5
<i>Gammaproteobacteria</i>	4.3
<i>Betaproteobacteria</i>	2.5
<i>Otros</i>	1.8

Tabla 11 Clases presentes en polilla de *M. opercularis*

Clase	Porcentaje (%)
<i>Alphaproteobacteria</i>	48.5
<i>Nostocophycidae</i>	24.1
<i>Actinobacteria</i>	12.8
<i>Bacilli</i>	4.9
<i>Gammaproteobacteria</i>	4.3
<i>Clostridia</i>	2.1
<i>Betaproteobacteria</i>	1.8
<i>otros <1%</i>	1.5

En cuanto con el orden de *M. opercularis*, se encontraron un total de 12 tanto en la oruga y la polilla, el orden más representativo fue *Actinomicetes* con un 32 % en oruga y en polilla fue *Rhizobiales* con un 30%, los otros ordenes presentes en ambos estadios fueron *Clostridiales*, *Rodobacterales*, *Nostocles*, *Bacillales*, *Rodospirales*, *Lactobacillales*, *Pseudomonales*, *Sfingomonadales*, *Burkholderiales* y *Enterobacteriales*, en menor proporción(Tabla 12 y 13).

Tabla 12 Ordenes presentes en oruga de *M. opercularis*

Orden	Porcentaje (%)
<i>Actinomicetes</i>	32.0
<i>Clostridiales</i>	12.3
<i>Rodobacterales</i>	11.4
<i>Nostocles</i>	10.5
<i>Bacillales</i>	9.5
<i>Rhizobiales</i>	5.7

<i>Rodospirales</i>	4.1
<i>Lactobcillales</i>	2.6
<i>Pseudomonales</i>	2.6
<i>Sfingomonadales</i>	2.5
<i>Burkholderiales</i>	2.3
<i>Enterobacteriales</i>	1.0
<i>Otros</i>	3.4

Tabla 13 Ordenes presentes en polilla de *M. opercularis*

Orden	Porcentaje
<i>Rhizobiales</i>	30
<i>Nostocales</i>	24.09
<i>Actinomycetales</i>	12.5
<i>Rhodobacterales</i>	7.7
<i>Caulobacterales</i>	5.1
<i>Bacillales</i>	3.7
<i>Sphingomonadales</i>	3.1
<i>Pseudomonadales</i>	3.0
<i>Rhodospirillales</i>	2.6
<i>Clostridiales</i>	2.1
<i>Burkholderiales</i>	1.8
<i>Lactobacillales</i>	1.2
<i>otros <1%</i>	3.14

Un análisis detallado mostró que la diversidad en los filos estaba dominada por las familias *Micrococcaceae* (11.86%) y *Rhodobacteraceae* (11.36%) la etapa de oruga, mientras que en la etapa de polilla *Nostocaceae* (24%) y *Methylobacteriaceae* (21%) predominaron. De las 41 familias encontradas en total en ambos estados (oruga y polilla), el 29.26% se compartió entre ambas etapas (12 familias), con el 26.80% (11 familias) solo en la oruga y el 29.26% (12 familias) solo en polilla (Tabla 14 y 15).

Tabla 14 Familias presentes en oruga de *M. opercularis*

Familia	Porcentaje (%)
<i>Micrococcaceae</i>	11.86
<i>Rhodobacteraceae</i>	11.36
<i>Nostocaceae</i>	10.53
<i>Peptostreptococcaceae</i>	7.59

<i>Propionibacteriaceae</i>	5.52
<i>Clostridiaceae</i>	4.29
<i>Geodermatophilaceae</i>	4.02
<i>Xanthobacteraceae</i>	3.9
<i>Staphylococcaceae</i>	3.85
<i>Planococcaceae</i>	3.05
<i>Nocardioideaceae</i>	2.81
<i>Sphingomonadaceae</i>	2.41
<i>Acetobacteraceae</i>	2.29
<i>Intrasporangiaceae</i>	2.16
<i>Bacillaceae</i>	1.92
<i>Rhodospirillaceae</i>	1.8
<i>Pseudomonadaceae</i>	1.54
<i>Streptococcaceae</i>	1.53
<i>Comamonadaceae</i>	1.32
<i>Corynebacteriaceae</i>	1.24
<i>Moraxellaceae</i>	1.07
<i>Streptomycetaceae</i>	1.03
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.97
OTROS < 1%	11.94

Tabla 15. Familias presentes en polilla de *M. opercularis*

Familia	Porcentaje (%)
<i>Nostocaceae</i>	24
<i>Methylobacteriaceae</i>	21
<i>Rhodobacteraceae</i>	8
<i>Geodermatophilaceae</i>	5
<i>Caulobacteraceae</i>	5
<i>Rhizobiaceae</i>	5
<i>Sphingomonadaceae</i>	3
<i>Micrococcaceae</i>	2
<i>Propionibacteriaceae</i>	2
	2
<i>Peptostreptococcaceae</i>	
<i>Xanthobacteraceae</i>	2
<i>Comamonadaceae</i>	2
<i>Pseudomonadaceae</i>	2

<i>Paenibacillaceae</i>	1
<i>Staphylococcaceae</i>	1
<i>Aurantimonadaceae</i>	1
<i>Acetobacteraceae</i>	1
<i>Rhodospirillaceae</i>	1
otros <1%	12

En la oruga y la polilla de *M. opercularis*, la microbiota estaba compuesta de 13 géneros en oruga y 9 en polilla, 8 generos (36.36%) exclusivos el oruga y 4 (18.18%) en la polilla, compartiendo 5 géneros (22.72.1%). Los géneros más dominantes fueron en oruga con 10.6% *Paracoccus* (Fig. 32) y *Methylobacterium* con 20.9 en polilla de *M. opercularis* (Fig. 33).

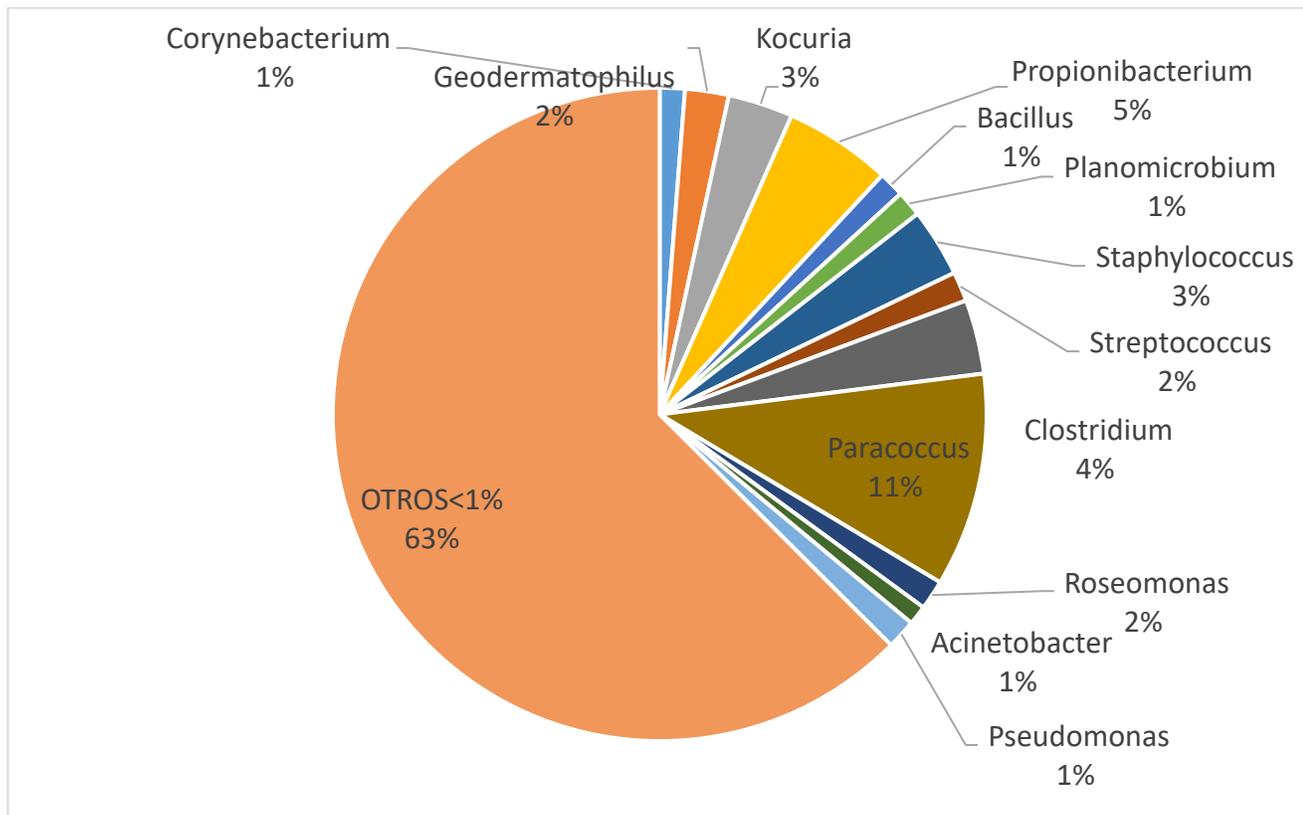


Figura 32 Géneros presentes en el microbiota de la oruga de *M. opercularis*

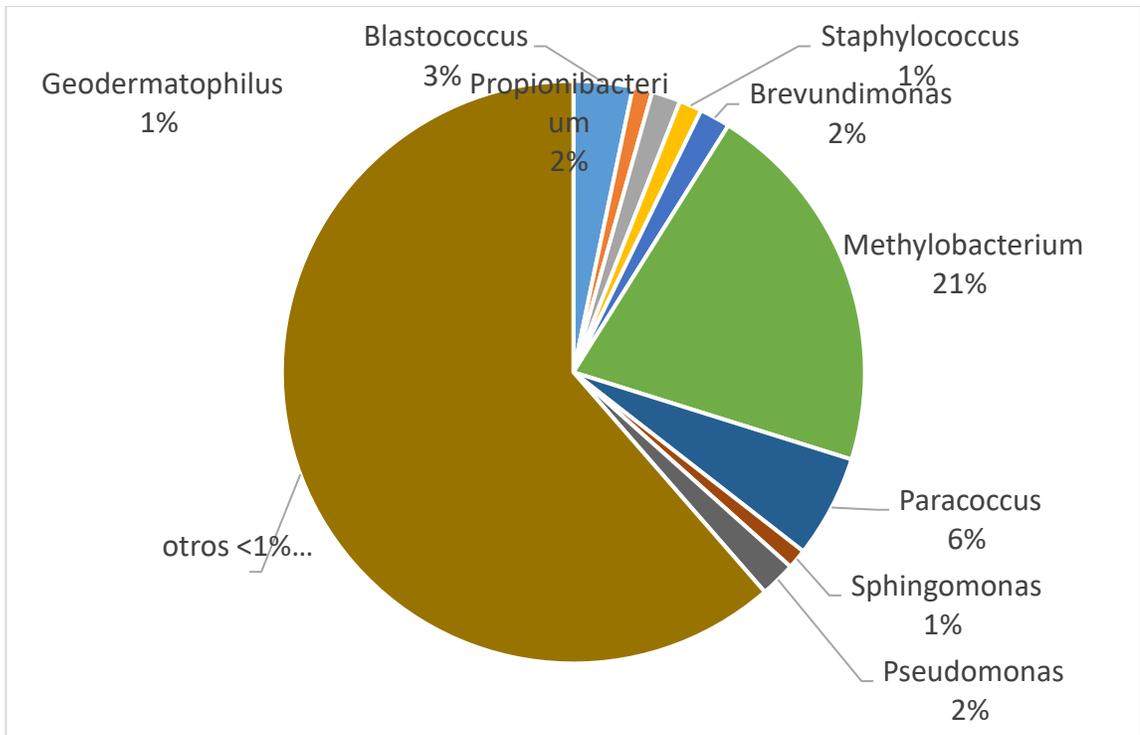


Figura 33 Géneros presentes en el microbiota de la pollia de *M. operularis*

10.DISCUSIÓN

Inicialmente el objeto principal del presente proyecto de investigación, fue elucidar la composición química del veneno de *M. opercularis*, sin embargo; como fue avanzando la investigación hubo un viraje hacia el estudio de *M. opercularis*, desde una perspectiva biológica, conociendo su distribución, gracias al hallazgo de este espécimen en varios puntos de la zona metropolitana y la apertura a preservar la especie de polilla en un ambiente controlado que permitiera obtener mayor cantidad de muestras. Ayudó observar las características anatómicas de *M. opercularis*, realizando una comparación con lo reportado en la literatura, así mismo, logramos identificar la microbiota de la especie *M. opercularis* en oruga y polilla, señalando las principales diferencias en su composición.

Respecto a los 50 sitios de muestreo, localizados en el área metropolitana, donde se reportaron orugas de *M. opercularis*, pertenecen a 11 diferentes municipios Apodaca, Cadereyta, Escobedo, García, Guadalupe, Juárez, Monterrey, San Nicolas de los Garza, Santa Catarina y Santiago, todos del estado de Nuevo León, México, esta información obtenida sobre la distribución de la oruga no ha sido reportada, la única información reciente científica que existe sobre la presencia de *M. opercularis* en México, fue descrito por Arqueta y Martínez, en 2014, que señalaron que *M. opercularis*, se encuentra en estado de Nuevo León desde hace años y muestra evidencia fotográfica de la polilla franela en Monterrey N. L., en mayo del 2009 y la oruga en el Cerro de La Silla, en Cd. Guadalupe, N. L., en octubre de 2013, siendo hasta el 2015, que empezó a reportar con mayor frecuencia en el área metropolitana de Monterrey, por casos de “picadura” de la fase larvaria (Arqueta y Martínez 2014). Cabe destacar que la información sobre la localización de *M. opercularis* en el estado de Nuevo León y otros estados de la república Mexicana, ha aumentado según registro de páginas de diversidad en línea y reportes en noticias locales, es importante considerar los datos obtenidos en este trabajo y complementarlos, para la evaluación de factores ambientales, que influyen en el comportamiento de la distribución de *M. opercularis*.

Otros datos importantes a discutir es la anatomía observada en el cultivo de *M. opercularis* en condiciones de laboratorio, comparada con lo reportado por Lepesqueur en 2012, quien investigo ampliamente la familia *Megalopygidae*, su biología, diversidad y su biogeografía en Brasil, los huevecillos son elipsoides o cilíndricos, están dispuestos en filas individuales (Pereira en el 2003) o también en disposición de línea doble (Scoble 1995), su color es amarillento y cubierto de cerdas desde el extremo del abdomen de la hembra, en los resultados obtenidos en el cultivo al igual que lo reportado, la apariencia amarilla y con pelaje se presentó, pero varió la cantidad de filas fueron de 4-5. La influencia del lugar puede modificar este patrón, debido a que la oviposición fue realizada en cajas de plástico y no en árboles como es natural (Lepesqueur 2012). Del mismo modo, en publicaciones antiguas, se describe la ovoposición, que está formada por una masa compuesta de 30 a 50 huevos cilíndricos amarillos, de 1.2 x 0.6 x 0.6 mm, dispuestos paralelos entre sí (Smith 1797), las medidas están cercanas a lo reportado en este trabajo, solo varia en la cantidad de masa ovopositadas, fueron cerca de 20, dispersos en varios lugares del contenedor del cultivo y en total fueron aproximadamente 100 huevecillos, puestos por una sola hembra.

Las orugas colectadas en el muestreo, formaron capullo, lo hicieron en diferentes tiempos, algunas a las 24, 48 o 72 horas, después de colocarlas en el ambiente de laboratorio; a pesar de colocar ramas del mismo árbol huésped, las orugas no consumieron el alimento, los capullos tenían una longitud de 2.5 cm, color amarillo claro (paja), presentando la tipo joroba característica, en la que dejan la muda de las espinas y pelos que pierden al momento de emerger del capullo, según lo reportado en la literatura, el capullo que forma tiene un tamaño variado de 1.3 cm a 2.0 cm, presenta una pequeña joroba, menciona al inicio los capullos son débiles por el hilado que lo conforma, posteriormente envejece y se meteoriza (Hall 2013), características también observadas en los capullos desarrollados en la fase inicial del cultivo de *M. opercularis* en el laboratorio.

En la etapa adulta de *M. opercularis*, las hembras y los machos fueron de color amarillo, el macho con un tamaño menor comparado con la hembra, con patas en tono negro, en el caso del macho se veía un área oscura en las alas más vistoso, las hembras midieron de 2-2.5 cm y los machos median cerca de 2 cm. Coincide con lo descrito por Hall en el 2013,

describió la polilla de *M. opercularis*, siendo las hembras son más grandes que los machos, su color es amarillo, las alas delanteras son amarillas con algo de negro a lo largo de los márgenes costales y ondas de pelos blancos (escamas) en la base de 2/3 de las alas, los machos presentan más marcado el color negro en las alas, para hacerlo más llamativo a las hembras, las alas posteriores de ambos sexos son uniformemente cremosas y amarillas (Hall 2013). En otro estudio se confirma que las polillas miden de 2.4 a 3.6 cm de diámetro (Covell 2005). Como se puede apreciar el desarrollo de *M. opercularis* no se ve afectado significativamente en condiciones de laboratorio, las magnitudes y características físicas son similares a lo ya reportado por la literatura.

Acerca de la obtención de veneno de *M. opercularis*, se recuperó una concentración de 188.27 µg/mL mediante la extracción acuosa, en trabajos de investigación similares, con organismos relacionados filogenéticamente como es *Lonomia obliqua*, *Premolis semirufa*, *Podalia*, *Leucanella*; también ha logrado obtener concentración óptima que permite el análisis de su extracto de espinas (da CB Gouveia et al. 2005; Boas et al. 2015; Quintana et al. 2017). Las proteínas observadas en el gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, mostraron un rango amplio, respecto a su peso molecular de 10 a 125 kDa. En especies relacionadas filogenéticamente se han encontrado proteínas con variedad de funciones fisiológicas y pesos dentro de este rango mostrado en los resultados, uno de los componentes del extracto obtenidos de las espinas urticantes de *Lonomia obliqua* (2006) que reporto Lopap, un activador de protrombina de 69 kDa, serina proteasa, de 30 kDa, cisteína proteasa de 34.7 kDa, lectinas de 30 y 33.9 kDa, proteína con actividad antibacteriana de 10.2 kDa (Veiga et al 2005), en otro trabajo con la misma especie *Lonomia obliqua*, en la misma especie *L. obliqua* se ha determinado la presencia de una afibrinogenasa (Pinto et al. 2014) y por último en *Lonomia sp.*, se encontró una fosfolipasa (Piñango y Guerrero, 2001),

En relación con el aporte de la prueba de sensibilidad al veneno y la citotoxicidad a este proyecto, en forma general ayudo a identificar la calidad del extracto, para su posterior identificación, el proceso de inflamación presentado en el experimento de la rata egipcia es un signo característico de la “picadura” de *M. opercularis* causando una dermatitis inflamatoria y una necrosis epidérmica localizada (Avilán et al. 2010). Por otro lado, la

actividad citotóxica mostró concentración inhibitoria máxima media IC50 de 3.98 $\mu\text{g/mL}$, en contraste con otros extractos de insectos como el caso de la Abeja (*Apis cerana indica*), organismo muy estudiado por sus múltiples propiedades con potencial farmacéutico, la IC50 en células HeLa fue de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, en WiDr fue de 2.68 $\mu\text{g/mL}$ y en Vero 3.53 $\mu\text{g/mL}$ (Plasay et al. 2016) y otro artrópodo también ampliamente estudiado por sus propiedades curativas es el Escorpión (*Scorpio maurus*) que en pruebas de citotoxicidad con células SNU-1 presentó una IC50 de 39.1 $\mu\text{g/mL}$ (Ahn et al. 1997), como se puede observar la IC50 obtenida en este trabajo con veneno de *M. opercularis* es baja y equiparable con otros artrópodos, que han sido la base para el desarrollo de fármacos.

Por otra parte, el tema medular de este trabajo de investigación fue la elucidación de los componentes del veneno de *M. opercularis*, con la prueba de zimograma, mostro que una de las proteínas que formaba parte del veneno extraído, tenía como mecanismo de acción de proteasa, seguido de la secuenciación peptídica que identificó a un tipo de enzima activadora llamada Profenoloxidasa Activating Protein (ppA), la cual es responsable de la activación del sistema proPO, regulada por la cascada de activación de profenoloxidasa, importante en el sistema inmune de algunos insectos y crustáceos marinos, proporciona inmunidad innata, mediante un proceso llamado melanización, el cual protege a las especies de patógenos como virus, bacterias y hongos, además de ayudar en la cicatrización de tejidos dañados, el proceso de melanización como su nombre lo indica se basa en la producción del pigmento melanina, el cual, es pardo-negro que tiene esas funciones biológicas de protección y reparación (Vera 2017).

En cuanto a la información obtenida de las pruebas de microbiota, mostraron la abundancia del filum *Proteobacteria* (54.6% en la polilla y 31.33% en la oruga), el cual según otros estudios reportados, participa en funciones de digestión, asimilación de nutrientes, el uso de ciertas sustancias fotoquímicas, la síntesis de aminoácidos, vitaminas y la desintoxicación de insecticidas en varias especies de insectos; particularmente en polillas como *Pieris rapae* (blanquita del repollo) (Robinson et al. 2010) y algunos filogenéticamente relacionados con *M. opercularis* como *Lymantria dispar* (Broderick et al. 2004), *Helicoverpa armigera* (Xiang et al. 2006) y *Spodoptera littoralis* (Chen et al 2016). El filum *Firmicutes* también encontrado en la microbiota de *M. opercularis* en un

7.05% en la polilla y 24.51% en la oruga, participa en procesos de digestión de celulosa y hemicelulosa en lepidópteros (Anand et al. 2010). Los resultados son similares a los reportados en los estudios de las polillas nocturnas de *Busseola fusca* (Snyman et al. 2016) y *Helicoverpa armígera* (Priya et al. 2016), lo que sugiere que las poblaciones bacterianas brutas son independientes de la especie.

El análisis de las clases indicó una proporción de *Actinobacterias* con 32.2 % en la oruga, siendo la más abundante, esta clase se produce en muchos hábitats diferentes, incluidos los entornos humanos y animales, y en insectos como hormigas, abejas y avispa, donde pueden desempeñar papeles protectores. En la triatomina, *Rhodnius pallescens*, las actinobacterias son la clase predominante en el intestino medio (Montoya et al. 2017). Los estudios sobre lepidópteros como la chinche de fuego europea (*Pyrrhocoris apterus*) y el colorante de algodón africano (*Dysdercus fasciatus*) revelaron la importancia de la microbiota para la supervivencia del organismo (Salem et al. 2013). Las contribuciones de las actinobacterias como simbiontes factibles suministran nutrientes como las vitaminas B en el huésped (Salem et al. 2013). Relacionado con los ordenes encontrados en *M. opercularis*, *Actinomycetes* estaba en mayor proporción 32 % en oruga y en polilla fue *Rhizobiales* con un 30%, los otros ordenes presentes en ambos estadios fueron *Clostridiales*, *Rodobacterales*, *Nostocles*, *Bacillales*, *Rodospirales*, *Lactobacillales*, *Pseudomonales*, *Sfingomonadales*, *Burkholderiales* y *Enterobacteriales*, en menor proporción. De los cuales el orden Bacillales en un estudio similar, en el microbiota intestinal en larvas y adultos de *Bombus pascuorum*, el orden de Bacillales se encontró exclusivamente en larvas (Parmentier et al. 2016), con este resultado que consiste en diferentes insectos sugirió un papel importante en el desarrollo de la etapa de larva.

El estudio de la microbiota encontró en mayor proporción las familias *Micrococcaceae* (11.86%) y *Rhodobacteraceae* (11.36%) la etapa de oruga, y en la polilla *Nostocaceae* (24%) y *Methylobacteriaceae* (21%), los géneros más dominantes fueron en oruga con 10.6% *Paracoccus* y *Methylobacterium* con 20.9%. En general, algunas de las bacterias que forman parte de las familias y géneros mencionados anteriormente, provienen del suelo y los árboles, lo que sugiere su incorporación al microbiota a través de la dieta y el hábitat en el que se desarrollan; en este caso, las muestras tratadas en esta investigación

de *M. opercularis* en todas sus etapas se encuentran en los árboles de *Quercus* (Green, 2006; Bahrndorff et al. 2016; de O Gaio et al. 2011). La etapa de oruga en comparación con la con la polilla, presentó mayor cantidad de especies de bacterias, es decir mayor diversidad. Se sabe que las orugas requieren más energía para su crecimiento y desarrollo. Nuestros resultados sugieren que la mayoría de las especies de bacterias están involucradas en la asimilación de nutrientes, *M. opercularis*, como su nombre lo indica, es una gran oruga y tiene entre 5-6 mudas (Bishopp, 1923), que requieren un alto consumo y síntesis de proteínas que permitirle producir su piel y seda con las que construyen su capullo y ácidos grasos esenciales para realizar su metamorfosis (Cookman et al. 1984). La polilla, como otros polinizadores, se alimenta de néctar con un alto contenido de carbohidratos necesarios para su corta vida (Wong y Kato, 2017), en la que su función principal es reproducirse.

11.CONCLUSIONES

La especie de *M. opercularis* se encuentra distribuida en gran parte del área metropolitana de N. L., México, localizando 50 puntos geográficos con la presencia de la oruga, este tipo de información se puede utilizar para realizar modelos de distribución con variables geográficas y climáticas para predecir los hábitats de *M. opercularis*.

La metodología de extracción de espinas de la oruga *M. opercularis*, nos permitió obtener extracto acuoso del veneno que mantuvo activo el veneno corroborado en las pruebas de funcionalidad.

El veneno de oruga de *M. opercularis* presentó actividad citotóxica con la línea Caco2, teniendo un IC50 de 3.98 µg/mL, dentro de un rango establecido con venenos que han resultado con diferentes actividades biológicas y candidatos al desarrollo de fármacos.

Uno de los componentes del veneno de *M. opercularis* es un factor de activación de la profenoloxidasa, importante en la inmunidad de algunos insectos.

En este estudio, se encontró una mayor diversidad de bacterias en el microbiota de la oruga en comparación con la polilla de *M. opercularis*, las bacterias encontradas tienen nichos importantes, por lo que es interesante dilucidar su función con investigaciones complementarias con otras especies relacionadas filogenéticamente.

12.PERSPECTIVAS

El trabajo de investigación presentado anteriormente marca la pauta para diversas investigaciones, con base en lo obtenido de los lugares de muestreo, se sugiere realizar algún modelo de distribución con el fin de identificar factores ambientales, los cuales puedan influir con el crecimiento de la población de *M. opercularis* en la zona metropolitana de Nuevo León, además si la presencia de este organismo puede representar un severo problema sanitario en un futuro o si influye negativamente en la población de otros organismos que se encuentran en el mismo hábitat.

En cuanto al aislamiento del veneno y su caracterización, se sugiere continuar con la separación de fracciones para lograr obtener más información sobre la composición química de este. Y lograr correlacionar que componente o mezcla de este produce la actividad citotóxica. Además, será conveniente probar el veneno de *M. opercularis*, sobre otras células de cáncer y analizar su posible efecto anticancerígeno. La actividad antimicrobiana sería de interés analizar del veneno obtenido de la oruga de *M. opercularis*, considerando que este efecto se ha estudiado con especies que producen sustancias urticantes o venenosas.

Con relación al microbiota encontrado en adulto y oruga de *M. opercularis*, se observaron una mayor variedad de especies en la oruga comparada con la polilla, la información obtenida de las especies demuestra que su función se relaciona con la asimilación de nutrientes y protección, se sugiere realizar la determinación de microbiota separando la parte interna y externa de los especímenes, para determinar además una posible correlación con la producción de veneno en las espinas de la oruga.

13.BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, M. Y., Lee, B. M., & Kim, Y. S. (1997). Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of animal venoms. *Archives of pharmacal research*, 20(1), 13-16.
2. Anand, A. A. P. et al. Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut of *Bombyx mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *Journal of Insect Science*, 2010;10, 107
3. Arocha-Piñango, C. L., & Guerrero, B. (2001). *Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 31(3-6), 288-293.
4. Arquieta, S. C., & Martínez, H. Q. (2014), ORUGAS URTICANTES (INSECTA: LEPIDOPTERA) DE IMPORTANCIA MÉDICA EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.
5. Avilán, L., Guerrero, B., Álvarez, E., & Rodríguez-Acosta, A. (2010). Description of envenomation by the “gusano-pollo” caterpillar (*Megalopyge opercularis*) in Venezuela. *Investigación clínica*, 51(1), 127-132.
6. Bahrndorff S., Alemu, T., Alemneh. T. & Lund J. The microbiome of animals: implications for conservation biology. *International journal of genomics*, 2016.
7. Bailey, P., & Wilce, J. (2001). Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emergency Medicine*, 13(1), 28-36.
8. Battisti, A., Holm, G., Fagrell, B., & Larsson, S. (2011). Urticating hairs in arthropods: their nature and medical significance. *Annual review of entomology*, 56, 203-220.
9. Battisti, A., Holm, G., Fagrell, B., & Larsson, S. (2011). Urticating hairs in arthropods: their nature and medical significance. *Annual review of entomology*, 56, 203-220.
10. Bilò, M. B., Pravettoni, V., Bignardi, D., Bonadonna, P., Mauro, M., Novembre, E., ... & Cremonte, L. (2019). Hymenoptera Venom Allergy: Management of children and adults in clinical practice Brief Title: Management of venom allergic children and adults. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 29(3).
11. Bishopp, F. C. The puss caterpillar and the effects of its sting on man. United States Department of Agriculture. Department Circular 1923; 288. 14
12. Blank, S., Seismann, H., Bockisch, B., Braren, I., Cifuentes, L., McIntyre, M., ... & Grunwald, T. (2010). Identification, recombinant expression, and characterization of the 100 kDa high molecular weight Hymenoptera venom allergens Api m 5 and Ves v 3. *The Journal of Immunology*, 184(9), 5403-5413.
13. Boas, I. M. V., Pidde-Queiroz, G., Magnoli, F. C., Goncalves-de-Andrade, R. M., van den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2015). A serine protease isolated from the bristles of the Amazonian caterpillar, *Premolis semirufa*, is a potent Complement system activator. *PloS one*, 10(3), e0118615.

14. Bouchon, D., Zimmer, M. and Dittmer J. 2016. The Terrestrial Isopod Microbiome: An All-in-One Toolbox for Animal-Microbe Interactions of Ecological Relevance. *Front Microbiol.*, 7, 1472
15. Bousquets, J. L., Fernández, I. V., Martínez, A. L., Ortega, M. T., Mejía, C. H., & Warren, A. D. (2014). Biodiversidad de Lepidoptera en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 16.
16. Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., & Handelsman, J. Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004;70, 293–300
17. Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS letters*, 583(11), 1736-1743.
18. Cardoso, A. E. C., & Junior, V. H. (2005). Accidents caused by lepidopterans (moth larvae and adult): study on the epidemiological, clinical and therapeutic aspects Acidentes por Lepidópteros (larvas e adultos de mariposas): estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol*, 80(6), 573-8.
19. Carone, S. E., Menaldo, D. L., Sartim, M. A., Bernardes, C. P., Caetano, R. C., da Silva, R. R., ... & Sampaio, S. V. (2018). BjsP, a novel serine protease from Bothrops jararaca snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. *Toxicology and applied pharmacology*, 357, 50-61.
20. Chen, B., et al. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci Rep*, 2016;6, 29505
21. Chen, B., Teh, B. S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W. and Shao, Y. 2016. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci Rep*, 6, 29505.
22. Cookman, J. E., Angelo, M. J., Slansky, F. & Nation, J. L. Lipid content and fatty acid composition of larvae and adults of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, as affected by larval diet. *Journal of Insect Physiology* 1984;305, 23-527.
23. Costa, C., Ide, S., & Simonka, C. E. (2006). *Insectos inmaduros: metamorfosis e identificación*. Sociedad Entomológica Aragonesa.
24. Covell, C. V. (2005). field guide to the moths of eastern North America.
25. da CB Gouveia, A. I., da Silveira, R. B., Nader, H. B., Dietrich, C. P., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2005). Identification and partial characterisation of hyaluronidases in *Lonomia obliqua* venom. *Toxicon*, 45(4), 403-410.
26. De Graaf, D. C., Aerts, M., Danneels, E., & Devreese, B. (2009). Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *Journal of Proteomics*, 72(2), 145-154.
27. de O Gaio A, et al. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). *Parasites & vectors*, 2011;4, 105.
28. de O Gaio, A., Gusmão, D. S., Santos, A. V., Berbert-Molina, M. A., Pimenta, P. F. and Lemos, F. J. 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and

- egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). *Parasites & vectors*, 4, 105.
29. De Roodt, A. R., Salomón, O. D., & Orduna, T. A. (2000). Accidentes por lepidópteros con especial referencia a *Lonomia* sp.
 30. Diaz, J. H. (2005). The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(3), 347-357.
 31. Donato, J. L., Moreno, R. A., Hyslop, S., Duarte, A., Antunes, E., Le Bonniec, B. F., ... & de Nucci, G. (1998). *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thrombosis and haemostasis*, 79(03), 539-542.
 32. Douglas A. E. 2015. Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. *Annu. Rev. Entomol*, 60, 17-34
 33. Eagleman, D. M. (2008). Envenomation by the asp caterpillar (*Megalopyge opercularis*). *Clinical Toxicology*, 46(3), 201-205.
 34. Fromont, C., Riegler, M. and Cook, J. M. 2017. Relative Abundance and Strain Diversity in the Bacterial Endosymbiont Community of a Sap-Feeding Insect Across Its Native and Introduced Geographic Range. *Microb Ecol*.
 35. García-Barros E., Romo, H., Sarto i Monteys, V., Munguira, M. L., Baixeras, J., Vives, A. 5 & José Luis Yela García. 6 "CLASE INSECTA, Orden Lepidoptera." *Revista IDE@ - SEA*, 65: 1-21.
 36. Goodall, G., Costi, M., Timlin, L., Reviriego, J., Sacristán, J. A., Smith-Palmer, J., & Dilla, T. (2011). Cost-effectiveness of exenatide versus insulin glargine in Spanish patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 58(7), 331-340.
 37. Green, P. N. *Methylobacterium*. In *The prokaryotes* Springer New York. 2006;257-265.
 38. Grunwald, T., Bockisch, B., Spillner, E., Ring, J., Bredehorst, R., & Ollert, M. W. (2006). Molecular cloning and expression in insect cells of honeybee venom allergen acid phosphatase (Api m 3). *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117(4), 848–854.
 39. Guardians, W., & Beck, D. (2010). Petition to list the Utah population of the Gila Monster (*Heloderma suspectum*) under the US Endangered Species Act. Petition submitted to the US Secretary of Interior acting through the US Fish and Wildlife Service. Submitted January, 22, 2010.
 40. Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2014). *The insects: an outline of entomology*. John Wiley & Sons. LIBRO
 41. Haddad Junior, V., Amorim, P. C. H. D., Haddad Junior, W. T., & Cardoso, J. L. C. (2015). Venomous and poisonous arthropods: identification, clinical manifestations of envenomation, and treatments used in human injuries. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(6), 650-657.

42. Haddad, V., & Lastória, J. C. (2014). Envenomation by caterpillars (erucism): proposal for simple pain relief treatment. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20(1), 1-1.
43. Hall, D. W. (2013). Puss caterpillar (larva), southern flannel moth (adult), *Megalopyge opercularis* (JE Smith 1797)(Insecta: Lepidoptera: Zygaenoidea: Megalopygidae). EDIS, 2013(1).
44. Hemmer, W., Focke, M., Kolarich, D., Dalik, I., Götz, M., & Jarisch, R. (2004). Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as cross-reactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(3), 460-469.
45. Herzig, V. (2019). Arthropod assassins: Crawling biochemists with diverse toxin pharmacopeias.
46. Hoffman, D. R. (2003). Hymenoptera venoms: composition, standardization, stability. *Monograph on insect allergy*, 4, 37-53.
47. Hossler, E. W. (2010). Caterpillars and moths: Part II. Dermatologic manifestations of encounters with Lepidoptera. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62(1), 13-28.
48. Hossler, E. W. 2010. Caterpillars and moths: Part II. Dermatologic manifestations of encounters with Lepidoptera. *J Am Acad Dermatol*, 62, 29-30.
49. Jappe, U., Raulf-Heimsoth, M., Hoffmann, M., Burow, G., Hübsch-Müller, C., & Enk, A. (2006). In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy*, 61(10), 1220-1229.
50. Jehmlich, N., Müller, M., Meyer, S., Tischer, A., Potthast, K., Michalzik, B., and von Bergen, M. 2016. Proteome data on the microbial microbiome of grasshopper feces. *Data in Brief*, 9, 1147–1154
51. Kettner, A., Hughes, G. J., Frutiger, S., Astori, M., Roggero, M., Spertini, F., & Corradin, G. (2001). Api m 6: a new bee venom allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 107(5), 914–920.
52. Khalaf, K. T. (1975). *Biology of the Puss Caterpillar and Its Ichneumonid Parasite*. Loyola University Press.
53. Koh, D. C. I., Armugam, A., & Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 3030-3041.
54. Kuspis, D. A., Rawlins, J. E., & Krenzelok, E. P. (2001). Human exposures to stinging caterpillar: *Lophocampa caryae* exposures. *The American journal of emergency medicine*, 19(5), 396-398.
55. Kwon, Y. B., Lee, J. D., Lee, H. J., Han, H. J., Mar, W. C., Kang, S. K., ... & Lee, J. H. (2001). Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*, 90(3), 271-280.
56. Lamdin, J. M., Howell, D. E., Kocan, K. M., Murphey, D. R., Arnold, D. C., Fenton, A. W., ... & Ownby, C. L. (2000). The venomous hair structure, venom

- and life cycle of *Lagoa crispata*, a puss caterpillar of Oklahoma. *Toxicon*, 38(9), 1163-1189.
57. Lapesqueur, C. (2012). *Megalopygidae* (Lepidoptera, Zygaenoidea): biologia, diversidade e biogeografia. *Doutorado.*) *Universidade de Brasília, Brasília.*
TESIS
 58. MacKinnon, J. A., Waterman, G., Piastro, K., Oakes, J., & Pauze, D. (2015). Oropharyngeal Edema in an 8-Month-Old Girl after Woolly Bear Caterpillar Exposure. *The Journal of emergency medicine*, 49(5), e147-e149.
 59. Miljanich, G. P. (2004). Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Current medicinal chemistry*, 11(23), 3029-3040.
 60. Montoya, L. M, Triana, O. J., Alzate, F., Moreno, X. C. & Cadavido, G. E. 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia, *Acta Tropica*, 2017;178, 327-332
 61. Müller, U. R. (2010). Insect venoms. In *Anaphylaxis* (Vol. 95, pp. 141-156). Karger Publishers.
 62. Müller, U. R. (2010). Insect venoms. In *Anaphylaxis* (Vol. 95, pp. 141-156). Karger Publishers.
 63. Müller, U., Fricker, M., Wymann, D., Blaser, K., & Cramer, R. (1997). Increased specificity of diagnostic tests with recombinant major bee venom allergen phospholipase A2. *Clinical & Experimental Allergy*, 27(8), 915-920.
 64. Okoro, O., Obi, E., Abia, E. A., Fomboh, R., & Abia, W. (2016). Snake Venoms: Composition And Cancer Therapeutic Potentials. *Journal Of Disease And Global Health*, 1-6.
 65. Parmentier A. et al. A different gut microbial community between caterpillar and adults of a wild bumblebee nest (*Bombus pascuorum*). *Insect science*. 2016.
 66. PEREIRA, P. D. S. (2003). *Norape* sp.(Lepidoptera: Limntriidae): lagarta desfolhadora em plantios comerciais de *Acacia mangium*. Embrapa Roraima.
 67. Petrucco Toffolo, E., Zovi, D., Perin, C., Paolucci, P., Roques, A., Battisti, A., & Horvath, H. (2014). Size and dispersion of urticating setae in three species of processionary moths. *Integrative Zoology*, 9(3), 320-327.
 68. Pinson, R. T., & Morgan, J. A. (1991). Envenomation by the puss caterpillar (*Megalopyge opercularis*). *Annals of emergency medicine*, 20(5), 562-564.
 69. Pinson, R. T., & Morgan, J. A. (1991). Envenomation by the puss caterpillar (*Megalopyge opercularis*). *Annals of emergency medicine*, 20(5), 562-564.
 70. Pinto, A. F. M., Dobrovolski, R., Veiga, A. B. G., & Guimarães, J. A. (2004). Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis research*, 113(2), 147-154.
 71. Plasay, M., Wahid, S., Natzir, R., & Miskad, U. A. (2016). Selective cytotoxicity Assay in anticancer drug of Melittin Isolated from Bee Venom (*Apis cerana indica*) to several human cell lines: HeLa, WiDr and Vero. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 2674-2676.

72. Priya, N. G., Ojha, A., Kajla, M. K., Raj, A., & Rajagopal, R. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS One*, 7, 2012.
73. Quintana, M. A., Sciani, J. M., Auada, A. V. V., Martínez, M. M., Sánchez, M. N., Santoro, M. L., ... & Peichoto, M. E. (2017). Stinging caterpillars from the genera *Podalia*, *Leucanella* and *Lonomia* in Misiones, Argentina: a preliminary comparative approach to understand their toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 202, 55-62.
74. Reis, C. V., Portaro, F. C., Andrade, S. A., Fritzen, M., Fernandes, B. L., Sampaio, C. A., ... & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2001). A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap): biochemical characterization. *Thrombosis research*, 102(5), 427-436.
75. Robinson, C. J. , Schloss, P., Ramos, Y., Raffa, K., & Handelsman, J. Robustness of the Bacterial Community in the Cabbage White Butterfly Caterpillarl Midgut Microb Ecol, 2010;59, 199–211
76. Ruokolainen, L., Ikonen, S., Makkonen, H. and Hanski, I. 2016. Caterpillar growth rate is associated with the composition of the gut microbiota in the Glanville fritillary butterfl. *Oecologia*. 181, 895-903.
77. Salem, H., Kreutzer, E., Sudakaran, S., & Kaltenpoth, M., Actinobacteria as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environ Microbiol*, 2013;15, 1956–1968
78. Schweitz, H., Bidard, J. N., & Lazdunski, M. (1990). Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon*, 28(7), 847-856.
79. Scoble, M. J. (1995). *The Lepidoptera. Form, Function and Diversity*: Oxford University Press. London, United Kingdom.
80. Silva, J., Monge-Fuentes, V., Gomes, F., Lopes, K., Anjos, L. D., Campos, G., ... & Campos, L. (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.
81. Smith, C. C., Srygley, R. B., Healy, F., Swaminath, K. and Mueller, U. G. 2017. Spatial Structure of the Mormon Cricket Gut Microbiome and its Predicted Contribution to Nutrition and Immune Function. *Front Microbiol*, 8, 801.
82. Smith, J. E. (1797). *The Natural History of the Rarer Lepidopterous Insects of Georgia Collected from Observations by John Abbot*.
83. Snyman, M., Gupta, A. K., Bezuidenhout, C. C., Claassens, S., & van den Berg, J. Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). *World J Microbiol Biotechnol*, 2016; 32, 115
84. Spadacci-Morena, D. D., Soares, M. A. M., Moraes, R. H. P., Sano-Martins, I. S., & Sciani, J. M. (2016). The urticating apparatus in the caterpillar of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Toxicon*, 119, 218-224.
85. Torrents, R., Simon, N., Schmitt, C., De Haro, L., & Agha, M. (2015). Envenomation by caterpillars of the genus *Megalopyge* in French Guiana with an

- atypical clinical presentation, based on three observations. *Clinical Toxicology*, 53(8), 844-845.
86. Triplitt, C., & Chiquette, E. (2006). Exenatide: from the Gila monster to the pharmacy. *Journal of the American Pharmacists Association*, 46(1), 44-55.
 87. Veiga, A. B., Ribeiro, J. M., Guimarães, J. A., & Francischetti, I. M. (2005). A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene*, 355, 11-27.
 88. Vera Bizama, F. O. (2017). Identificación y evaluación de genes asociados al sistema profenoloxidasa de *Caligus rogercresseyi* y su respuesta transcriptómica frente a los antiparasitarios deltametrina, cipermetrina y azametifos (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas).
 89. Verheij, H. M., Boffa, M. C., Rothen, C., Bryckaert, M. C., Verger, R., & De Haas, G. H. (1980). Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2. *European journal of biochemistry*, 112(1), 25-32.
 90. Villas-Boas, I. M., Alvarez-Flores, M. P., Chudzinski-Tavassi, A. M., & Tambourgi, D. V. (2018). Envenomation by caterpillars. *Gopalakrishnakone P et al. Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas. Toxinology. Springer Science+ Business Media BV*, 429-449.
 91. Wang, Z., Qi, F., Cui, Y., Zhao, L., Sun, X., Tang, W., & Cai, P. (2018). An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics. *BioScience Trends*, 12(3), 220-239.
 92. Wong, A. A., & Kato, M. Pollination system of *Corylopsis gotoana* (Hamamelidaceae) and its stonefly (Plecoptera) co-pollinator. *Plant Species Biology*, 2017; 32, 440-447.
 93. Xia, X., Gurr, G. M., Vasseur, L., Zheng, D., Zhong, H., Qin, B., Lin, H., Wang Y., Song F., Li Y., Lin H. and You M. 2017. Metagenomic Sequencing of Diamondback Moth Gut Microbiome Unveils Key Holobiont Adaptations for Herbivory. *Frontiers in Microbiology* 8, 663.
 94. Xiang, H. et al. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can J Microbiol*, 2006;52, 1085-1092
 95. Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, D. S., Yoon, C. Nam, Y. D., Kim, Y. J. Choi, J. H. Kim, J. Y, Shin, N. R. Kim, S. H., Lee, W. J. and Bae J. W. 2014. Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 17, 5254–5264
 96. Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X. R., Lin, L. T., Xiao, L. Y., ... & Liu, C. Z. (2018). Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, 148, 64-73.