



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

MINIATURIZACIÓN EN AVISPAS PARASITOIDES DE LAS FAMILIAS
TRICHOGRAMMATIDAE Y PLATYGASTRIDAE EN PANAMÁ: RECONSTRUCCIÓN
ANATÓMICA Y ANÁLISIS ALOMÉTRICO UTILIZANDO MARCADORES DE
INMUNOFLUORESCENCIA

POR:

CAROLINA ELIZABETH ALVARADO RAMOS

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO A
LA ESCUELA DE BIOLOGÍA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CIUDAD DE PANAMÁ, PANAMÁ

2024



TRIBUNAL EXAMINADOR

TÍTULO:

MINIATURIZACIÓN EN AVISPAS PARASITOIDES DE LAS FAMILIAS
TRICHOGRAMMATIDAE Y PLATYGASTRIDAE EN PANAMÁ: RECONSTRUCCIÓN
ANATÓMICA Y ANÁLISIS ALOMÉTRICO UTILIZANDO MARCADORES DE
INMUNOFLUORESCENCIA

PRESENTADO POR:

CAROLINA ELIZABETH ALVARADO RAMOS

8-923-827

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO A CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA DE
BIOLOGÍA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

PROFA. AIDAMALIA VARGAS

ASESOR PRINCIPAL

PROF. ARMANDO CASTILLO

CO-ASESOR

PROF. DUMAS GÁLVEZ

CO-ASESOR

*En la evolución, la trama se entrelaza,
cada ser, un eslabón que el misterio abraza.
Diminutas, las avispas en su danza,
forjan en la sombra, con gracia, su balanza.*

*En la vastedad de su ser, aunque pequeñas, se enaltecen,
sus mentes, un cúmulo de sabiduría ofrecen.
Su vuelo, ligero y efímero, un destello fugaz,
en el misterio de la evolución, su risa resuena, audaz.*

*Así, en el reino de lo ínfimo, con ternura se relata
cada vida, en un poema que el universo enlaza.
La fantasía se funde con la ciencia, en armonía,
y en las avispas, hallamos la más dulce poesía.*

- *Elían Shielle Ravel*

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación es resultado del apoyo y la confianza de tres personas fundamentales en mi vida, y está dedicado a ellas:

A mi mamá, Nathalie, gracias por estar siempre ahí, con tu apoyo constante y tus consejos sabios. Tu presencia ha sido la luz en mi camino, guiándome en cada decisión. Eres y serás siempre mi mayor ejemplo a seguir. Este es un logro alcanzado con el amor incondicional y la confianza que me has dado.

A mi hermana, Katherine, cómplice y confidente en incontables historias. Me has acompañado en cada aventura de la vida. Eres mi compañera en el mundo de la ciencia. Gracias por los invaluable momentos compartidos y por ser una fuente de inspiración sin fin. Tu ejemplo de determinación y tu respaldo han sido muy importantes en mi camino hacia este logro.

A uno de los amores más grandes de mi vida, mi tío bisabuelo Alfonso, Q.E.P.D., porque tu amor me permitió seguir adelante siempre. Sigues siendo el recuerdo más precioso de mi vida y la fuerza detrás de mi determinación para estudiar y superarme. Este triunfo también es tuyo, un eco de tu legado y del amor que me diste.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, gracias por todo su apoyo incondicional, especialmente a mi mamá Nathalie Ramos, a mi abuelo, Armando Ramos, mis hermanos, Carlos y Katherine, y a mis tíos, Armando Ramos e Iveth Palma, quienes creyeron en mí y me ayudaron con la oportunidad de entrar a esta carrera con una beca y la seguridad de que siempre contaría con ellos para cualquier cosa. Gracias también a mis tíos, Rafael Araúz y Yaribeth Ramos, quienes me han dado su apoyo siempre para lograr mis sueños y metas desde niña. Por esto y mucho, mucho más, gracias eternas a todos por sus enseñanzas y por ser una inspiración de vida. Los amo muchísimo.

A Pradiip, mi pareja, encontrarte ha sido uno de los mayores regalos de la vida y compartir mi camino contigo es un verdadero honor. Gracias por tu apoyo incondicional, tus incontables bromas y palabras de aliento; por siempre creer en mí, por soñar conmigo sobre el futuro de este trabajo. Gracias por todas las veces que lo leíste detalladamente, por tus correcciones y tu amor durante mis ensayos; por tu orgullo cuando hablas sobre mí y este estudio. Gracias por acompañarme siempre cuando se me dificultaba alguna parte, por darme lo mejor de ti y ser uno de los pilares más fuertes y hermosos de mi vida. Gracias por cuidar de nuestra bella familia, hasta ahora con dieciséis patitas de amor, mientras le dedicaba horas y horas a este trabajo. Te amo inmensamente.

A mis asesores de tesis, Dra. Aidamalia Vargas, Dr. Dumas Gálvez, y el Dr. Armando Castillo por su invaluable asesoría. Su dedicación ha sido fundamental para la culminación exitosa de este proyecto; sus consejos han llevado a este trabajo a estar a la altura de los estándares académicos y a representar el espíritu de la investigación científica. También, agradezco especialmente al Dr. Armando Castillo, quien no solo me brindó su guía para el desarrollo de la tesis, sino quien también me ha escuchado

atentamente durante estos años de estudio, siendo un amigo, un maestro y una persona en quien confío ampliamente para la ciencia y para la vida misma.

A mis amigos, quienes durante todos estos años de carrera y trabajo de graduación me han brindado su apoyo sincero. Quienes siempre han estado ahí para darme fuerzas y palabras de aliento. A Alex, porque mi experiencia en la licenciatura fue inolvidable junto a ti. Gracias por las noches eternas de estudio, los días con risas en las clases, los proyectos que hicimos juntos y la increíble amistad que nació en nosotros. Gracias por ser mi apoyo siempre y por hacer de la experiencia universitaria la mejor que pude imaginar. A Ramsés Villarreal, gracias por siempre ser paciente y animarme a dar lo mejor de mí, por todas las ocasiones en las que te quedaste estudiando conmigo, inventando canciones con las que pudiese aprender mejor la información. A Jhair Quezada, porque sé que puedo contar contigo siempre. A Tanisha Pérez, a quien considero una hermana, gracias por acompañarme en este camino; la experiencia en INDICASAT - AIP jamás habría sido la misma sin ti. A Paola Visuete, quien siempre me ha dado palabras hermosas de guía y ánimo, gracias por siempre darme una amistad tan hermosa. Los amo incondicionalmente y les agradezco su amistad durante todos estos años.

Al Prof. Néstor Méndez, Q.E.P.D., quien abrió mi mente y corazón a la biología. Gracias por ser mi maestro, por despertar en mí la curiosidad, por enseñarme a ver la ciencia con infinitas posibilidades. Llevo conmigo sus enseñanzas y lecciones de vida siempre.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo General.....	8
2.2 Objetivos Específicos	8
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	9
1.1 Historia de los estudios del proceso de miniaturización en animales	9
1.2 ¿Qué es la alometría? y Regla de Haller	19
1.2.1 Alometría.....	19
1.2.2 Regla de Haller y su excepción en <i>Trichogramma evanescens</i>	21
1.3 <i>Trichogramma</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y su sistema nervioso	24
1.3.1 El límite de la miniaturización: gasto energético y posibles soluciones.....	26
1.4 <i>Telenomus podisi</i> (Hymenoptera: Platygasteridae)	30
1.5 <i>Trissolcus spp.</i> (Hymenoptera: Platygasteridae)	32
1.6 Inmunofluorescencia y microscopía confocal	34
1.7 Importancia ecológica y económica de las avispas	39
CAPÍTULO II. MÉTODOS Y MATERIALES	41
3.1 Cultivo de avispas	41
3.2 Procesamiento de cerebros e inmunomarcaje.....	41
3.3 Microscopía confocal	43
3.4 Análisis de datos y procesamiento de imágenes.....	44
3.4.1 Reconstrucción tridimensional	44
3.4.2 Mediciones	44
3.4.3 Análisis estadísticos.....	45

CAPÍTULO III. RESULTADOS	46
4.1 Protocolo para imágenes con microscopía confocal y reconstrucciones tridimensionales de un organismo completo	46
4.2 Relaciones alométricas de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Trissolcus spp.</i> y <i>Telenomus podisi</i>	52
4.2.1 Volumen promedio del cerebro y la cabeza en hembras y machos de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	53
4.2.2 Proporción del volumen del cerebro en el volumen total de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	56
4.2.2.1 Correlación entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza <i>Trichogramma pretiosum</i>	57
4.2.2.2 Correlación entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza de <i>Trissolcus spp.</i>	58
4.2.2.3 Correlación entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza de <i>Telenomus podisi</i>	59
4.2.3 Volumen promedio de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	60
4.2.4 Volumen promedio del cerebro de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	61
4.2.5 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Trissolcus spp.</i> y <i>Telenomus podisi</i>	62
4.2.5.1 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i>	62
4.2.5.2 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de <i>Trissolcus spp.</i>	63
4.2.5.3 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de <i>Telenomus podisi</i>	64
4.2.6 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Trissolcus spp.</i> y <i>Telenomus podisi</i>	65
4.2.6.1 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i>	65
4.2.6.2 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de <i>Trissolcus spp.</i>	66
4.2.6.3 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de <i>Telenomus podisi</i>	67

4.2.7 Correlación entre el volumen de la cabeza y el largo del fémur de <i>Trichogramma pretiosum</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	68
4.2.7.1 <i>Trichogramma pretiosum</i>	68
4.2.7.2 <i>Trissolcus spp.</i>	69
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	70
5.1 Protocolo para imágenes con microscopía confocal y reconstrucciones tridimensionales de un organismo completo	70
5.2 Relaciones alométricas de <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i>, <i>Trissolcus spp.</i>	73
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	81
CAPÍTULO VI. LIMITACIONES	82
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	83
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS	84
CAPÍTULO X. ANEXOS	95

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura 1. Tamaño del insecto más pequeño y escala de variación en el tamaño y número de células en cerebros de animales.....	10
Figura 2. Evolución de la miniaturización en el clado rasborino.....	15
Figura 3. Filogenia de lagartos con miniaturización.....	16
Figura 4. Isometría, hipoalometría e hiperlometría.....	20
Figura 5. Relaciones entre la masa cerebral y la masa corporal en cuatro clases de vertebrados	21
Figura 6. Relación entre el volumen de cuerpo y cerebro de las avispas <i>T. evanescens</i>	23
Figura 7. Variación fenotípica y diversidad de tamaño en avispas <i>Trichogramma</i>	24
Figura 8. <i>Telenomus podisi</i> hembra.....	30
Figura 9. <i>Trissolcus basalís</i> hembra	32
Figura 10. Ejemplo de aplicación de la inmunofluorescencia con microscopía confocal	35
Figura 11. Comparación de técnicas de imagen 3D con inmunofluorescencia.	38
Figura 12. Avispas <i>Telenomus podisi</i> al nacer de los huevos de <i>Oebalus insularis</i>	42
Figura 13. Proceso de aclarado de cutícula y tejidos internos en <i>Telenomus podisi</i>	42
Figura 14. Proceso de aclarado en tejidos internos en <i>Tr. pretiosum</i>	43
Figura 15. Resultados obtenidos a través del protocolo de inmunofluorescencia para el estudio de avispas parasitoides, utilizando microscopía confocal para examinar el cuerpo entero y visualizar estructuras internas.....	47
Figura 16. Reconstrucción tridimensional de las cabezas de <i>Tr. pretiosum</i> , <i>Te. podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	48
Figura 17. Reconstrucción tridimensional de <i>Te. podisi</i>	49
Figura 18. Vistas detalladas de la transparencia obtenida para mandíbulas y omatidios en avispas parasitoides.	51
Figura 19. Proporción del volumen del cerebro en el volumen total de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	56
Figura 20. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en <i>Tr. pretiosum</i>	57
Figura 21. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en <i>Trissolcus spp.</i>	58

Figura 22. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en <i>Te. podisi</i>	59
Figura 23. Volumen promedio de la cabeza de <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	60
Figura 24. Volumen promedio del cerebro de <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>	61
Figura 25. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en <i>Tr. pretiosum</i>	62
Figura 26. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en <i>Trissolcus spp.</i>	62
Figura 27. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en <i>Te. podisi</i>	64
Figura 28. Relación de volumen del cerebro y ancho de la cabeza en <i>Tr. pretiosum</i>	65
Figura 29. Relación de volumen del cerebro y ancho de la cabeza en <i>Trissolcus spp.</i>	66
Figura 30. Relación de volumen del cerebro y ancho de la cabeza en <i>Te. podisi</i>	67
Figura 31. Relación del volumen de la cabeza con el largo del fémur en <i>Tr. pretiosum</i>	68
Figura 32. Relación del volumen de la cabeza con el largo del fémur en <i>Trissolcus spp.</i>	69
Figura 33. Figura 33. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en las tres especies de este estudio en comparación con los resultados obtenido para <i>Tr. evanescens</i> por van der Woude, 2011.....	96
Figura 34. Diferencias en el tamaño de los lóbulos olfativos entre especies (comparación visual no cuantitativa).....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación de protocolos de inmunofluorescencia en artrópodos: un análisis comparativo del estudio realizado por Smolla et al. (2014) y este estudio	50
Tabla 2. Volumen promedio del cerebro para muestras de las tres especies estudiadas <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i> , con segregación entre hembras (H) y machos (M).....	54
Tabla 3. Volumen promedio de la cabeza para muestras de las tres especies estudiadas <i>Trichogramma pretiosum</i> , <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i> , con segregación entre hembras (H) y machos (M).....	55
Tabla 4. Descripción de características morfológicas y volumétricas del cerebro y cabeza entre especies de avispas parasitoides de Panamá: <i>Tr. pretiosum</i> , <i>Te. podisi</i> , <i>Trissolcus spp.</i> en comparación con <i>T. evanescens</i> (todos los datos tomados de van der Woude, 2011)	95

RESUMEN

El reino animal exhibe una asombrosa diversidad de tamaños, desde especies gigantes como la ballena azul de 31 metros de largo, hasta diminutos insectos de apenas micrómetros, ilustrando la complejidad de las estrategias adaptativas que se han desarrollado a lo largo de la evolución, como es el caso de la miniaturización. La miniaturización evolutiva revela adaptaciones fascinantes, como en las avispas de los géneros *Trichogramma*, *Telenomus* y *Trissolcus*, destacadas por su crucial papel en el control biológico de plagas como chinches y polillas, y por poseer un pequeño tamaño. Algunas avispas *Trichogramma*, pertenecientes a los insectos más pequeños del mundo, constituyen una excepción a la regla de Haller, que indica que los organismos más pequeños poseen cerebros proporcionalmente mayores. Estas diminutas avispas exhiben una notable plasticidad y complejidad neuronal, permitiéndoles desarrollar habilidades cognitivas complejas a pesar de su reducido tamaño. Sin embargo, poco se conoce sobre el funcionamiento y características de su cerebro. En este trabajo buscamos analizar los cerebros y cuerpos completos de estas especies por medio de la inmunofluorescencia indirecta sin necesidad de realizar disecciones, conservando los tejidos y analizando los datos para estudios de alometría. Las muestras se fueron fijadas, aclaradas y procesadas con los anticuerpos Anti-Synapsin y Alexa Fluor 555. Luego se examinaron mediante microscopía confocal, permitiendo análisis detallados y reconstrucciones 3D. Se encontró que *Tr. pretiosum* tiene el menor volumen de cabeza ($1.04 \times 10^7 \mu\text{m}^3$) y cerebral ($494\ 645 \mu\text{m}^3$) entre las especies comparadas, mientras que *Te. podisi* exhibe el mayor volumen de cabeza ($1.5073 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) y *Trissolcus spp.* presenta el mayor volumen cerebral ($1.19 \times 10^6 \mu\text{m}^3$). Se revelaron diferencias fundamentales en la morfología cerebral y cabeza entre las tres especies de avispas parasitoides, subrayando distintas estrategias evolutivas y adaptativas. Los resultados obtenidos para *Trichogramma pretiosum* indican una tendencia hacia la isometría, siendo una excepción a la regla de Haller. Por otro lado, tanto *Trissolcus spp.* como *Telenomus podisi* sí parecen cumplir con dicha regla. Para *Trichogramma pretiosum* no se observó una relación entre el volumen de cerebro y el largo del fémur, contrario a *Trissolcus spp.* Nuestro estudio ha contribuido al avance de las técnicas de microscopía, enriqueciendo el conocimiento sobre la estructura cerebral y estableciendo bases para futuras investigaciones.

Además, hemos profundizado en las relaciones alométricas y la biología de avispas parasitoides, resaltando la necesidad de generar nuevos conocimientos sobre la neuroanatomía en avispas de la familia Trichogrammatidae y Platygasteridae de Panamá.

Conceptos clave: *miniaturización, avispas parasitoides, alometría, inmunofluorescencia, microscopía confocal*

ABSTRACT

The animal kingdom exhibits a remarkable diversity in size, ranging from the colossal 31-meter blue whale to minuscule insects' mere micrometers in length. This diversity exemplifies the intricate adaptive strategies that have evolved over time, including phenomena such as miniaturization. Evolutionary miniaturization unveils intriguing adaptations, particularly evident in wasps from the genera *Trichogramma*, *Telenomus*, and *Trissolcus*. These wasps are pivotal in the biological control of various pests, including bugs and moths, and are notable for their diminutive size. Certain *Trichogramma* wasps, among the smallest insects globally, defy Haller's rule, which posits that smaller organisms have disproportionately larger brains. These minute wasps demonstrate exceptional neural plasticity and complexity, enabling them to exhibit sophisticated cognitive functions despite their limited size. Nonetheless, the operational dynamics and specific characteristics of their brains remain largely unexplored. This study aims to analyze both the brains and entire bodies of these species using indirect immunofluorescence, obviating the need for dissections, thereby preserving the tissues for comprehensive allometric analysis. The samples were fixed, clarified, and treated with Anti-Synapsin and Alexa Fluor 555 antibodies, followed by examination through confocal microscopy, facilitating detailed analyses and three-dimensional reconstructions. It was found that *Trichogramma pretiosum* has the smallest head volume ($1.04 \times 10^7 \mu\text{m}^3$) and brain volume ($494\,645 \mu\text{m}^3$) among the compared species, while *Telenomus podisi* exhibits the largest head volume ($1.51 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) and *Trissolcus spp.* has the largest brain volume ($1.19 \times 10^6 \mu\text{m}^3$). Fundamental differences in brain morphology and head structure were revealed among the three species of parasitoid wasps, highlighting distinct evolutionary and adaptive strategies. The findings for *Trichogramma pretiosum* indicate a tendency towards isometry, making it an exception to Haller's rule. In contrast, both *Trissolcus spp.* and *Telenomus podisi* appear to conform to this rule. For *Trichogramma pretiosum*, no correlation was observed between brain volume and femur length, unlike in *Trissolcus spp.* Our study has advanced microscopy techniques, enriching our understanding of brain structure and laying the groundwork for future research. Additionally, we have delved deeper into the allometric relationships and

biology of parasitoid wasps, underscoring the need to generate new insights into the neuroanatomy of wasps from the Trichogrammatidae and Platygasteridae families in Panama.

Key concepts: *miniaturization, parasitoid wasps, allometry, immunofluorescence, confocal microscopy*

INTRODUCCIÓN

Las relaciones de escala estudiadas en la biología de los organismos explican de manera cuantitativa las características medibles de animales, plantas, hongos y microorganismos que tienen una escala relativa al tamaño del cuerpo (Minelli & Fusco, 2019). Esta teoría en la escala de medición biológica ofrece un buen contexto para examinar la miniaturización desde una perspectiva evolutiva (Minelli & Fusco, 2019). La escala de dimensión generalmente sigue el comportamiento de una ley de potencia sencilla cuya variable es la masa de un organismo (Minelli & Fusco, 2019).

La regla de Haller, por ejemplo, sostiene que los animales más pequeños tendrán proporcionalmente cerebros más grandes (Rensch, 1948). Se tiene poco conocimiento sobre esta relación alométrica para invertebrados de menor tamaño, a pesar de que se ha explorado con mayor amplitud en vertebrados (Seid et al., 2011). Llevar a cabo investigaciones dirigidas a invertebrados de menor tamaño puede resultar muy interesante, debido a que estos “pueden llevar a cabo actividades extraordinarias con una masa de tejido cerebral muy pequeño”, como menciona Charles Darwin al referirse a las hormigas (Seid et al., 2011).

Un ejemplo es la avispa parasitoide, *Trichogramma evanescens* (Orden: Hymenoptera), una avispa parásita diminuta que desova en los huevos de mariposas y polillas. El tamaño de las avispas adultas depende, en gran medida, de los niveles de nutrientes disponibles en los huevos del huésped a través de la plasticidad fenotípica. Las avispas hermanas genéticamente idénticas crecen hasta 0.3 mm de longitud cuando se desarrollan en pequeños huevos hospederos o compiten con muchas larvas en desarrollo (van der Woude et al., 2013).

Esta avispa *Tr. evanescens* ha mostrado una alta plasticidad fenotípica en el tamaño del cerebro y del cuerpo, lo que resultó en una diferencia de cinco veces en el volumen del cerebro entre avispas hermanas genéticamente idénticas. El volumen del cerebro era linealmente proporcional al peso de estas avispas (van der Woude & Smid, 2017).

A pesar de tener un cerebro muy pequeño, las avispas *Trichogramma* pueden caminar, volar, distinguir olores y colores, vivir durante semanas y controlar el tamaño, número y sexo

en las crías (van der Woude & Smid, 2017). Además, aprenden a detectar los huevos del huésped, deteniéndose automáticamente en mariposas que están listas para poner sus huevos al distinguir los aromas y colores con la presencia del huésped adecuado (van der Woude & Smid, 2017). Esto sugiere que un cerebro muy pequeño puede producir un nivel de complejidad y regulación del comportamiento comparable al de los insectos más grandes (van der Woude & Smid, 2017).

Para reducir aún más el tamaño del cerebro evitando afectar la actividad de las neuronas más pequeñas, se cree que puede ser necesario reducir la cantidad de neuronas y sus conexiones. Una disminución en el número de neuronas puede ocurrir por una disminución proporcional en el número de neuronas en todas las vías neurales o por la eliminación completa de algunas vías mientras se preservan otras (van der Woude & Smid, 2017).

Este trabajo se centra en el estudio de las avispas parasitoides *Trichogramma pretiosum* y *Telenomus podisi* mediante el uso de técnicas avanzadas de biología molecular y microscopía confocal. Proponemos como hipótesis nula que ambas especies cumplen con lo propuesto en la regla de Haller, la cual postula que organismos más pequeños tienen cerebros proporcionalmente más grandes. En contraste, nuestra hipótesis alternativa plantea que estas especies se desvían de la regla de Haller, un patrón previamente observado en *Trichogramma evanescens*. Mediante la refinación de técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal, junto con el desarrollo de protocolos óptimos de fijación y permeabilización, nuestro objetivo es proporcionar evidencia concluyente que respalde una de estas hipótesis, y así enriquecer el conocimiento existente sobre la biología y morfología de estas especies, contribuyendo a la comprensión de su compleja naturaleza.

JUSTIFICACIÓN

Este proyecto es motivado por la necesidad de ampliar nuestro conocimiento sobre la neuroanatomía en avispas de la familia Trichogrammatidae y Platygasteridae debido a la escasa información sobre este grupo de avispas, especialmente en Panamá.

En la actualidad, existe un creciente interés por comprender el funcionamiento y la organización del tejido nervioso en animales que poseen cerebros muy pequeños. Específicamente, se busca entender cómo las proporciones y la distribución de ciertas poblaciones neuronales pueden adaptarse y modificarse en respuesta a la extrema miniaturización cerebral, un fenómeno que aún no se comprende completamente (Seid et al., 2011).

Mediante la optimización de la microscopía confocal, aspiramos a un entendimiento más profundo de las relaciones alométricas en estas especies, lo cual abrirá nuevas vías para la investigación en neurobiología de insectos.

La neurobiología en insectos es una rama científica naciente en nuestro país. El estudio y comprensión de los componentes cerebrales de ciertos tipos de animales y su fisiología puede dar ideas de cómo funcionan los cerebros de organismos con pocas neuronas, pero con un comportamiento extremadamente complejo. Esta investigación permitirá responder interrogantes en la fisiología y evolución de un grupo de organismos altamente diversos y cosmopolitas, como también al desarrollo de técnicas especializadas y de alto impacto en nuestro país.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

1. Investigar las relaciones alométricas entre diferentes especies de avispas parasitoides en la República de Panamá, empleando técnicas avanzadas de inmunofluorescencia para un análisis profundo de sus estructuras morfológicas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Optimizar las técnicas de microscopía confocal y los métodos de inmunomarcaje para permitir una visualización detallada y precisa de las estructuras cerebrales en avispas parasitoides, haciendo uso de marcadores moleculares específicos.
2. Establecer protocolos de fijación y permeabilización optimizados para el análisis detallado de estructuras cerebrales en avispas parasitoides, facilitando la penetración de anticuerpos y marcadores.
3. Examinar y cuantificar las relaciones alométricas mediante la evaluación de correlaciones entre el tamaño cerebral y las características morfológicas externas en avispas parasitoides de Panamá, utilizando microscopía confocal e inmunofluorescencia.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Historia de los estudios del proceso de miniaturización en animales

En el reino animal, encontramos una amplia y fascinante variedad de tamaños, con mamíferos tan grandes e imponentes como la ballena azul antártica *Balaenoptera musculus*, con un cuerpo que puede alcanzar los 29 – 31 m de largo (Sears & Perrin, 2009), el elefante africano *Loxodonta africana*, con hasta cuatro metros de altura (Laurson & Bekoff, 1978), y aves de gran tamaño como el avestruz *Struthio camelus*, con dos - tres metros de altura (Ramos et al., 2013). Entre los reptiles, especies como el cocodrilo de agua salada (*Crocydylus porosus*) sobresalen por su longitud que excede los seis metros (Britton et al., 2012), o el dragón de Komodo, que sobrepasa los tres metros (Ciofi, 1999), mientras que, en el grupo de los anfibios, la salamanca gigante china (*Andrias davidianus*) representa un caso notable de gran tamaño, con un tamaño de hasta 1.8 metros de largo (Marcec et al., 2016). También, podemos encontrar insectos tan grandes como el escarabajo hércules *Dynastes hercules*, el cual mide hasta 17 centímetros de longitud (Gruner & Chalumeau, 1977), el escarabajo Goliath *Goliathus spp.* hasta 11 cm (Dendi et al., 2021), la avispa escolopendra *Megarhyssa macrurus* hembra, hasta 13 centímetros (Coyle & Gandhi, 2012), y la avispa gigante asiática *Vespa mandarinia*, con una longitud corporal de casi 6 cm, y 7.5 cm de envergadura (Nuñez-Penichet et al., 2021).

En contraste, existen también animales muy pequeños en diferentes grupos. Podemos encontrar mamíferos como el ciervo ratón *Tragulus javanicus*, uno de los más ciervos más pequeños de América, con una longitud entre 90 – 120 cm (Cabrera-del Sol & Cervantes, 2023), o el tití pigmeo *Cebuella pygmaea*, con un tamaño promedio de 33.9 cm (Garzón, 2016). En los anfibios podemos encontrar a la salamandra *Thorius infernalis*, con un tamaño aproximado de 1.9 cm (Hanken et al., 1999), las ranas que pertenecen al género *Brachycephalus*, como *Paedophryne amanuensis*, con un tamaño de 0.77 cm, y otras del mismo género entre los 0.86 - 1.9 cm (dos Reis et al., 2021; Essner et al., 2022). Entre reptiles, podemos encontrar a los camaleones de los géneros *Sphaerodactylus* y *Brookesia*, con tamaños entre 0.14 – 0.66 cm (Glaw et al., 2021), y las serpientes del género *Leptotyphlops*, con un tamaño por debajo de los 10 mm (Glaw et al., 2021).

En insectos encontramos especies tan diminutas como el escarabajo de ala emplumada (*Scydosella musawasensis*) con un tamaño promedio de 338 μm (Polilov, 2015b), la avispa *Megaphragma mymaripenne*, con 252 μm (Fig. 1) (Polilov, 2015b), la avispa macho *Tinkerbella nana*, 210 μm (Polilov, 2015b), *Megaphragma caribea*, 170 μm (Polilov, 2015b), y la avispa macho *Dicopomorpha echmepterygis*, también conocida como avispa triangulífera, con un tamaño aproximado de 139 μm (Polilov, 2015b), entre otros.

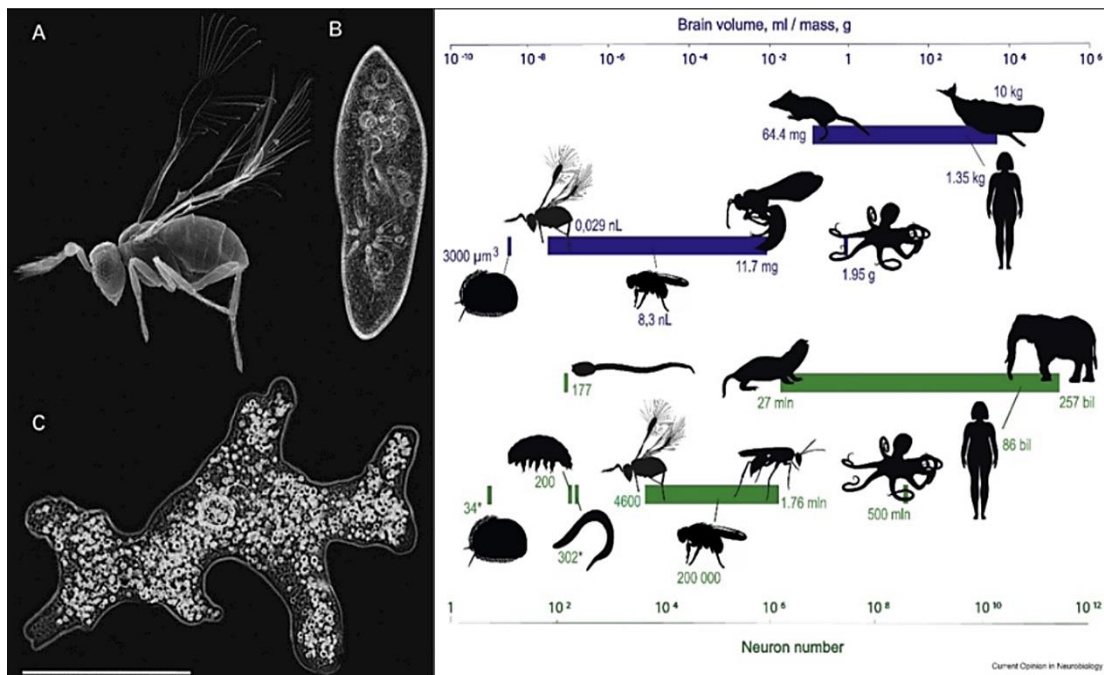


Figura 1. A la izquierda, tamaño de uno de los insectos más pequeños que se conocen y dos protozoos en comparación. (A) *Megaphragma mymaripenne*. (B) *Paramecium caudatum*. (C) *Amoeba proteus*. La barra de escala para A - C es de 200 μm (Polilov, 2012). A la derecha, Escala de variación en el tamaño y número de células en cerebros de animales. Barras y valores azules, tamaño del cerebro (para mamíferos e insectos grandes en gramos, para otros en mililitros); barras y valores verdes, número de células en el cerebro (o, para el nematodo *Caenorhabditis elegans* y el ciclióforo *Symbion pandora*, marcados con asteriscos, en todos los sistemas nerviosos centrales). Para algunos animales, se da el número de neuronas, para otros, para los cuales no hay datos sobre diferenciación de tipos de células, se da el número total de células(*) (imagen y texto tomados de Makarova, Polilov, et al., 2021).

La diversidad en el tamaño corporal observada en el reino animal pone en evidencia tanto la capacidad de adaptación y diversificación como la complejidad de las estrategias adaptativas desarrolladas a lo largo de la evolución (Albert & Johnson, 2012; Etienne et al., 2012).

Este espectro de tamaños no es un accidente biológico, sino el resultado de procesos evolutivos y adaptativos que han moldeado las características de cada especie en respuesta a su entorno, y se identifica como una característica esencial en los animales, impactando significativamente en varios aspectos de su ecología y fisiología, como son las velocidades de deshidratación, los mecanismos de respiración, la regulación térmica y también la actividad influenciada por la temperatura (Kühnel et al., 2017).

Estudios diversos han explorado cómo estas variaciones en el tamaño corporal afectan aspectos fundamentales como el metabolismo, la capacidad reproductiva y las tasas de supervivencia (Owens et al., 1995; Shine & Iverson, 1995).

En 1638, Galileo Galilei publicó su libro *“Discursos y demostraciones matemáticas en torno a dos nuevas ciencias”* en el cual explicaba las razones por las que los objetos no pueden ser de un tamaño arbitrario (Carichner, 2013). En este libro, propone cómo conforme cualquier objeto incrementa su tamaño, su volumen crece más rápidamente que el área superficial del animal (Ley Cuadrático-Cúbica) (Kühnel et al., 2017), la cual es una interfaz crítica para el intercambio de elementos como el agua y el calor con el entorno, así como para la exposición a agentes patógenos (Kühnel et al., 2017). Además, la Ley Cuadrático-Cúbica ofrece una base física para comprender las restricciones y posibilidades que el tamaño impone sobre las funciones biológicas, desde la estructura ósea hasta la eficiencia metabólica (Schmidt-Nielsen, 1984). Los insectos terrestres, por ejemplo, por ser en su mayoría de tamaño reducido, presentan proporciones de área superficial a volumen mayores comparados con animales de mayor tamaño. Históricamente, el cálculo de áreas superficiales se ha basado en leyes de escalado isométrico utilizando la masa corporal como sustituto del volumen, dada la complejidad que estas últimas (Kühnel et al., 2017).

El tamaño corporal también es un rasgo distintivo y fundamental en el espectro evolutivo, desempeñando un papel crucial por su correlación intrínseca con numerosos atributos fisiológicos y de supervivencia (Blanckenhorn, 2000). Este fenómeno ha sido objeto de extensa investigación, revelando tendencias evolutivas generales significativas en este espectro, desde el gigantismo hasta la miniaturización (Palavalli-Nettimi & Narendra, 2018). En todas las circunstancias, ya sea que se aumente o reduzca el tamaño del cuerpo, las especies que atraviesan por estas modificaciones deben alterar no solamente el tamaño de su cuerpo, sino también las proporciones de órganos y estructuras (Rensch, 1948).

Dentro de los cambios evolutivos conocidos, podemos encontrar el gigantismo y enanismo insular, que ocurre cuando las especies de animales se encuentran aisladas en islas y evolucionan hacia tamaños mayores o menores de lo que serían en continentes (Rozzi et al., 2023). El cambio en el tamaño del cuerpo es una adaptación importante para los seres vivos en islas, impactando aspectos importantes como la capacidad de migrar, la interacción con su entorno y los recursos que necesitan para sobrevivir (Lomolino, 2005).

El fenómeno de gigantismo insular puede deberse a las características de las islas como el aislamiento, cambios en la disponibilidad de recursos o nichos ecológicos únicos en los alrededores (van der Geer et al., 2013), y en las especies que se encuentran en ellas como falta de depredadores o de competencia (Lomolino, 2005; van der Geer et al., 2013). Un ejemplo famoso es el dodo, que se volvió bastante grande en comparación con sus ancestros voladores (Livezey, 1993; Shapiro et al., 2002); en el caso del enanismo insular, situación paralela al gigantismo, ocurre una limitación de recursos o hay ausencia de depredadores (van der Geer et al., 2013), como se observa con los elefantes enanos del Pleistoceno de las islas del Egeo (Sen, 2017).

Por otro lado, se conoce sobre la megafauna del Pleistoceno, donde muchos animales (mamíferos, aves, reptiles) en todo el mundo evolucionaron hacia tamaños mucho más grandes de lo que vemos hoy en día (Galetti et al., 2018; Price & Piper, 2009; F. A. Smith et al., 2018). Esto incluye diprotodontes (Price & Piper, 2009) mamuts, gonfoterios, perezosos

terrestres; aves como los pájaros elefantes y moas, y reptiles gigantes como las tortugas gigantes (Galetti et al., 2018).

También pueden ocurrir por situaciones ambientales, como son los cambios relacionados con el clima, con algunas especies haciéndose más grandes o pequeñas en respuesta a los cambios en la temperatura. Para esta situación, la Regla de Bergmann, propuesta en 1847 y modificada por Rensch en 1938, sugiere que las especies de sangre caliente, aves y algunas taxa de invertebrados tienden a ser más grandes en climas más fríos para conservar mejor el calor, como es el caso del gigantismo polar (Cooper, 2022; He et al., 2023; Woods & Moran, 2020), o más pequeñas en climas cálidos para disipar el calor de manera eficiente (Meiri & Dayan, 2003). Meiri y Dayan (2003), también realizaron una revisión exhaustiva sobre esta regla, y concluyeron que existe una tendencia general que apoya la regla, pero que existen variaciones significativas entre algunos grupos taxonómicos. Otros estudios han investigado el tamaño de los insectos a lo largo de gradientes latitudinales o altitudinales, encontrando que los patrones no siempre concuerdan con las predicciones de la regla de Bergmann (Shelomi, 2012).

Igualmente, existen cambios que se han producido como consecuencia de las acciones del ser humano, como el cambio de tamaño debido a la domesticación (Kruska, 2005; Milla et al., 2021; Trut et al., 2009). Los animales domesticados a menudo muestran cambios significativos en el tamaño en comparación con sus antepasados salvajes, debido a la cría selectiva (Kruska, 2007; Tchernov & Horwitz, 1991; Thomas et al., 2013). De acuerdo con Price (1984), en una amplia gama de especies la adaptación en entornos controlados por humanos desencadena cambios genéticos que se manifiestan en variaciones fenotípicas como la coloración del pelaje, la forma del cráneo y tamaño del cerebro, la dentadura, la frecuencia reproductiva, entre otros (Kruska, 2005) debido a un entorno menos desafiante, afectando también su comportamiento, siendo más dóciles (Kruska, 2005; Trut et al., 2009).

Por otro lado, está el caso de la miniaturización. Este cambio evolutivo se debe a que algunas especies han evolucionado para ser significativamente más pequeñas que sus antepasados, a menudo como una adaptación para sobrevivir en nichos ecológicos específicos

con recursos limitados o para evitar la detección por parte de los depredadores (Hanken & Wake, 1993a; Lindsey et al., 2018), modificando su cuerpo para tener un tamaño adulto cada vez más pequeño (Chetverikov, 1915; Hanken & Wake, 1993; Polilov, 2015; Grebennikov, 2008). Esto implica una disminución radical del tamaño corporal, simplificación o modificación de sus estructuras internas y externas y un aumento de variabilidad genética, así como también modificaciones en las células (Shea, 1992).

Hanken y Wake en 1993 plantearon que la miniaturización es un proceso histórico que debe entenderse dentro de un contexto filogenético (Eberhard & Wcislo, 2011). Esto significa que la miniaturización se define como la evolución hacia un tamaño corporal muy pequeño en comparación con otras especies dentro del mismo linaje, enfocándose específicamente en los individuos adultos (Eberhard & Wcislo, 2011). El término "extremo" se considera relativo, ya que no existe una regla fija que permita diferenciar la miniaturización de otras formas menos pronunciadas de reducción del tamaño corporal (Eberhard & Wcislo, 2011). Por ejemplo, lo que se considera un tamaño corporal "extremadamente pequeño" varía significativamente entre escarabajos y salamandras (Eberhard & Wcislo, 2011). Siguiendo esta definición, Hanken y Wake demostraron que la miniaturización en los adultos ha ocurrido de forma independiente en una amplia gama de invertebrados y vertebrados. Observaron que sería difícil encontrar un gran grupo de metazoos que no incluya al menos un ejemplo de miniaturización (Eberhard & Wcislo, 2011).

Esta reducción de tamaño se observa ampliamente en los vertebrados, especialmente en estudios realizados en peces y anfibios (Rüber et al., 2007), permitiendo, por ejemplo, trazar la evolución de la miniaturización de diferentes clados, como el rasborino en peces, con especies miniaturizadas como *Rasbora kalbarensis*, *Horadandia atukorali*, *Boraras maculatus*, entre otros (Fig. 2), o la reducción de tamaño de grandes especies como aves y dinosaurios (Lee et al., 2014; Qin et al., 2021). La miniaturización, como un patrón evolutivo, se ha confirmado a través de estudios comparativos que muestran cambios en el tamaño corporal máximo a lo largo de diferentes linajes. Por ejemplo, se observa en estudios realizados para la filogenia de lagartos (Fig. 3).

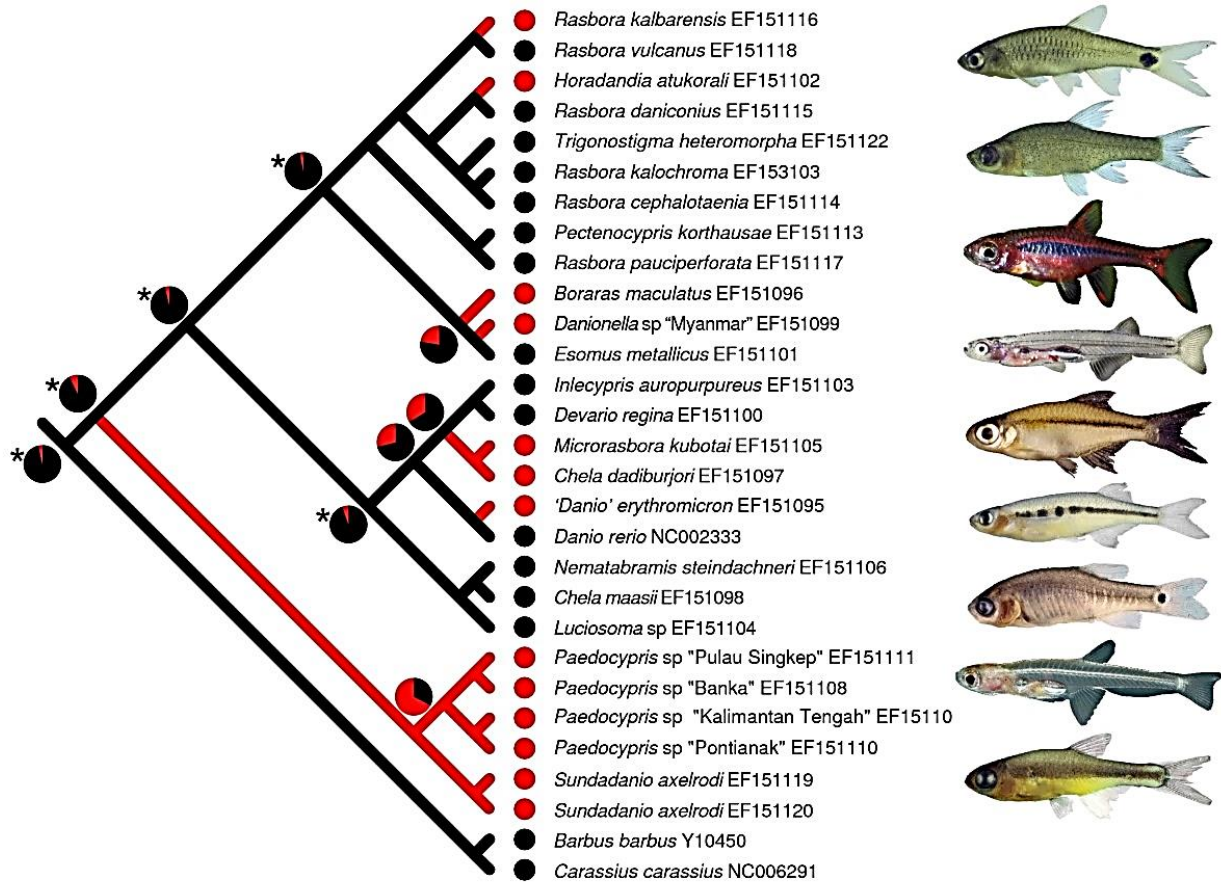


Figura 2. Evolución de la miniaturización en el clado rasborino. El estado "miniatura" se indica en color rojo, mientras que el estado "no miniatura" se muestra en negro (imagen y texto tomados de Rüber et al., 2007).

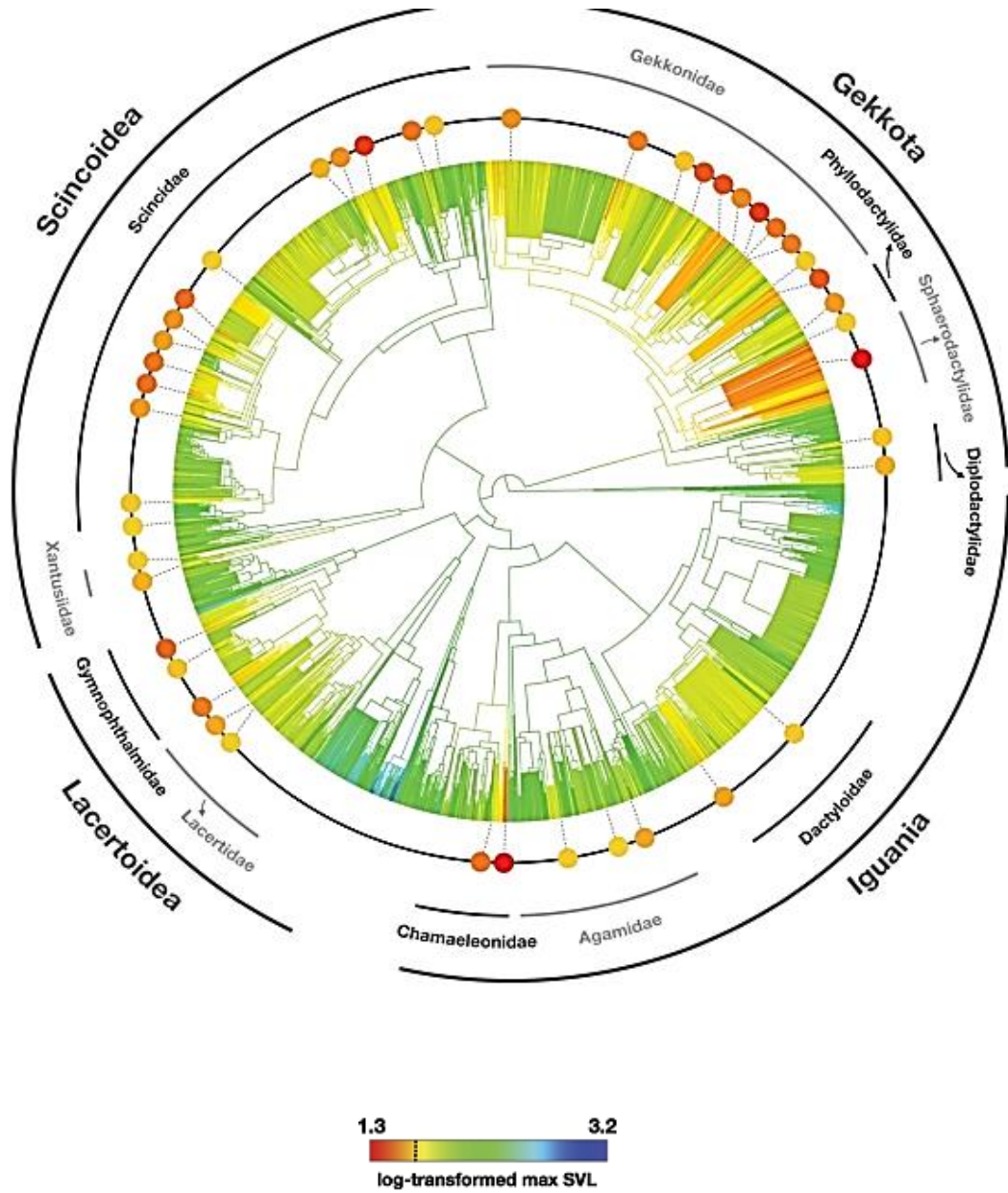


Figura 3. La filogenia de los lagartos muestra la longitud máxima hocico-cloaca transformada logarítmicamente para 6197 especies. Los círculos coloreados señalan las especies miniaturizadas, un total de 44, incluidas en el modelo filogenético (imagen y texto tomados de Perez-Martinez & Leal, 2021).

También, se ha estudiado ampliamente en invertebrados durante las últimas dos décadas, a pesar de que los estudios especializados en el tamaño de las estructuras en insectos se publicaron ya hace más de 70 años (Polilov, 2015b). Estos estudios involucran insectos que se vuelven aún más pequeños (Polilov, 2015a; van der Woude, 2017), pudiendo llegar al tamaño de animales unicelulares, como es el caso de algunas avispas que pertenecen a las familias Mymaridae y Trichogrammatidae, con un tamaño menor a los 300 μm , comparable a los Paramecium (Fig. 1) (Hanken & Wake, 1993b; Polilov & Beutel, 2009; van der Woude, 2017).

Los insectos son reconocidos como uno de los grupos con mayor éxito evolutivo en términos de miniaturización, adaptándose de manera extraordinaria a través de una reorganización considerable de estructuras, afectando casi todos los órganos y tejidos, y siendo crucial en las características morfológicas, fisiológicas y biológicas (Hanken & Wake, 1993b; A. Polilov, 2015b; Polilov & Beutel, 2009), y se cree que esto es posible debido a su gran versatilidad (Angelini & Kaufman, 2005). Atributos como las alas, su tamaño reducido, la cutícula gruesa, y mayor diversidad, permitieron que pudiesen descubrir nuevos nichos no habitados, entrando en nuevos entornos y progresivamente obtuviesen nuevas fuentes de alimento, disminuyeran sus necesidades energéticas al tener un metabolismo más intenso y aumentara su éxito reproductivo (Rensch, 1948). Esta es una de las razones por la que, en comparación con animales de mayor tamaño, los insectos han tenido un gran éxito evolutivo, extendiéndose por múltiples regiones (Hoffmann & Frodsham, 1993; van der Woude, 2017; Grebennikov, 2008).

No obstante, la miniaturización es un fenómeno biológico con limitaciones. En muchos animales pequeños, el tamaño del cerebro puede convertirse en uno de los factores limitantes para la miniaturización del cuerpo, debido a los costos de desarrollo del cerebro (van der Woude et al., 2013). En algunas especies que han alcanzado niveles extremos de miniaturización, se han observado efectos negativos como resultado de las modificaciones morfológicas que experimentan, entre estos las limitaciones en el desarrollo cerebral y órganos sensoriales (Lindsey et al., 2018; van der Woude et al., 2013) o la disminución de la eficiencia reproductiva (Polilov, 2015b; Polilov, 2012, 2016). Estos cambios pueden influir en la fisiología y el comportamiento de estos organismos, lo que, a su vez, puede tener

implicaciones significativas en su longevidad y éxito reproductivo (Polilov & Beutel, 2009; van der Woude, 2017).

La evaluación de estos límites de tamaño en la miniaturización se ha abordado también desde otras perspectivas como el análisis de parámetros relacionados con el tamaño de las células, el tamaño del genoma de un núcleo haploide (valor C) y la relación que existe entre el tamaño corporal y el tamaño de la célula (Grebennikov, 2008). Por esta razón, es de interés conocer cómo la escala y el tamaño relativo se relacionan con estas adaptaciones morfológicas, y cómo estas relaciones se modifican en las generaciones de insectos que experimentan una reducción progresiva en su tamaño corporal, junto con los procesos que generan diversidad morfológica (Hanken, 1984).

A pesar de la complejidad morfológica y de comportamiento que caracteriza a los insectos, así como su notable diversidad y su éxito en el proceso de miniaturización, es relevante señalar que los estudios relacionados con este tema han sido menos frecuentes en comparación con las investigaciones en animales vertebrados. No obstante, algunos insectos han sido objeto de análisis detallados, en particular en lo que respecta a su cerebro (Beutel et al., 2005). Algunos investigadores han planteado la posibilidad de que estos insectos puedan contribuir de manera significativa a nuestra comprensión de la complejidad del cerebro humano. Esto se debe a su tamaño reducido, lo cual facilita la investigación de las conexiones neuronales y su evolución, además de su comportamiento notablemente complejo a pesar de sus cerebros pequeños. Estas características hacen que los insectos sean sujetos de estudios ideales, ya que permiten un análisis profundo y rápido en un laboratorio (Makarova et al., 2021).

Por último, es importante destacar que, si bien existen modelos de otros animales (como los mamíferos), que han sido estudiados y revelado correlaciones importantes, por ejemplo, entre el tamaño del cerebro y la complejidad social, el utilizar modelos de insectos ofrece una perspectiva valiosa, ya que se puede estudiar cómo la plasticidad cerebral, la evolución y el desarrollo del cerebro son influenciados por factores ambientales. Esto es un aspecto crucial en la comprensión de la biología de los organismos (Lihoreau et al., 2012).

1.2 ¿Qué es la alometría? y Regla de Haller

1.2.1 Alometría

Cuando nos referimos a las relaciones proporcionales de diferentes partes del cuerpo de un organismo y sus variaciones con los cambios en el tamaño total del cuerpo, hablamos de *alometría* (Gayon, 2000; Pélabon et al., 2014). Frédéric Cuvier incursionó en este campo, con sus estudios asociados a la relación entre el tamaño de los mamíferos y su cerebro, concluyendo que, en aquellos mamíferos relacionados, un mayor tamaño corporal generalmente significará un cerebro relativamente más pequeño (Gayon, 2000). Posteriormente, más estudios fueron realizados por científicos como Dubois (1858 – 1940), Laticque (1866 – 1952), Pézard (1875 – 1927), Huxley (1887 – 1975), Morgan (1866 – 1945), Teissier (1900 – 1972), Champy, Gould y otros (Gayon, 2000).

La alometría nos permite comprender cómo la variedad de rasgos morfológicos, fisiológicos y evolutivos se relacionan entre sí (Pélabon et al., 2014). Sin embargo, más allá de solo estudiar cómo el tamaño corporal está relacionado con otras partes de cuerpo, también pueden estudiarse sus variaciones con la edad y sus etapas de desarrollo, dando lugar a diferentes tipos de alometría (Pélabon et al., 2014).

De acuerdo con Gould (1966), podemos observar dos categorías, las dinámicas y las estáticas. Dentro de las alometrías dinámicas, las cuales están relacionadas con el tiempo, encontramos la alometría ontogenética, relacionada con el crecimiento de un organismo a lo largo de su vida, y la alometría filogenética, que examina cómo evolucionan las proporciones corporales a través de diferentes linajes (Gayon, 2000; Pélabon et al., 2014).

Por otro lado, están las llamadas alometrías “estáticas”, las cuales son constantes en el tiempo. Dentro de esta categoría podemos encontrar la alometría intraespecífica, que está enfocada en las variaciones de crecimiento dentro de los miembros adultos de una misma especie o población, y la alometría interespecífica, que compara las variaciones entre especies cercanas (Gayon, 2000; Pélabon et al., 2014).

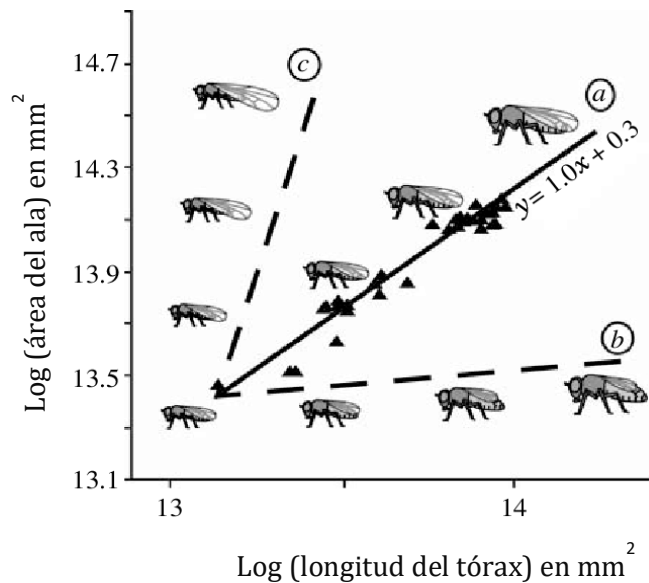


Figura 4. Isometría, hipoalometría e hiperlometría. (a) La relación entre el área del ala y el área corporal (longitud del tórax al cuadrado) en *Drosophila melanogaster* de tipo salvaje es lineal e *isométrica* ($a \approx 1.0$). **(b)** Ejemplo de una relación hipoalométrica **(c)** e hiperlométrica (hipotéticas) entre el tamaño del ala y el tamaño corporal. Las ilustraciones muestran ejemplos de moscas para cada relación alométrica (imagen y texto tomados y modificados de Shingleton et al., 2008).

El ajuste de tamaño corporal puede resultar en cambios isométricos, es decir, patrones que mantienen una constancia en la forma, o en cambios alométricos, que se apartan de la similitud geométrica (Kühnel et al., 2017). Al analizar los cambios alométricos, si el rasgo que se estudia cambia en proporción al tamaño corporal del organismo, obtenemos una isometría, donde $b = 1$. En alometría, " b " representa el coeficiente de alometría, el cual es un parámetro que cuantifica cómo varía el tamaño de un rasgo específico en relación con el tamaño corporal general del organismo. En cambio, cuando $b \neq 1$, el tamaño del rasgo y el tamaño corporal varían en diferentes proporciones (Pélabon et al., 2014).

De acuerdo con J. Huxley (1932), se utiliza el término de *crecimiento alométrico positivo* o *hiperalometría* ($b > 1$) para referirse a un órgano que experimenta un aumento de tamaño a un ritmo superior al del cuerpo, mientras que el concepto de *crecimiento alométrico negativo* o *hipoalometría* ($b < 1$) ocurre cuando el órgano crece a un ritmo más lento en comparación con el cuerpo completo (Fig. 4) (Rensch, 1948).

1.2.2 Regla de Haller y su excepción en *Trichogramma evanescens*

Durante los cambios evolutivos, ya sea que los organismos aumenten o reduzcan el tamaño de su cuerpo, aquellos que atraviesan estas modificaciones deben alterar no solamente el tamaño de su cuerpo, sino también las proporciones de órganos y estructuras (Rensch, 1948).

Galilei (1618), Robinson (1748) y A. von Haller (1762) fueron algunos de los científicos que explicaron cómo los cambios evolutivos de las especies están constituidos también por variaciones en el tamaño de los órganos (van der Woude et al., 2013). Este último, quien estudió la alometría en relación con el tamaño relativo del cerebro y los ojos, dio lugar a la Regla de Haller, la cual indica que, a medida que un organismo disminuya su tamaño, su cerebro será proporcionalmente cada vez más grande; es decir, los organismos más pequeños tendrán cerebros más grandes en relación con su cuerpo, si los comparamos con organismos de mayor tamaño (Rensch, 1948; van der Woude et al., 2013). La relación entre el tamaño del cerebro y el tamaño del cuerpo es un elemento fundamental en la biología evolutiva. Numerosos estudios en vertebrados han demostrado esta correlación potencial entre el tamaño del cerebro y la masa corporal, tanto para vertebrados (Fig. 5) como invertebrados (Groothuis & Smid, 2017; van der Woude et al., 2013; van der Woude & Smid, 2016).

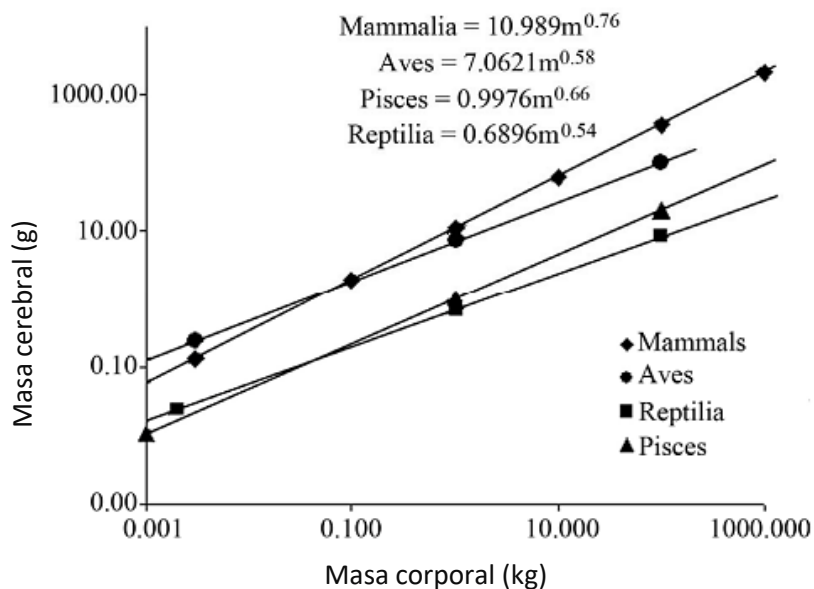


Figura 5. Relaciones entre la masa cerebral y la masa corporal en cuatro clases de vertebrados (Gavrillov, 2013).

Además, se ha encontrado que, dentro de un mismo grupo taxonómico, las especies con cerebros más pequeños tienden a tener un número menor de neuronas, las cuales son también más pequeñas (Eberhard & Wcislo, 2011).

Sin embargo, no todos los animales cumplen con la Regla de Haller. En organismos de menor tamaño, como la avispa *Trichogramma evanescens*, se han documentado excepciones, debido a que muestran una relación isométrica entre el tamaño del cerebro y el cuerpo (Fig. 6) (Groothuis & Smid, 2017). Esto puede interpretarse como un crecimiento del cerebro que es proporcional con su tamaño corporal (Groothuis & Smid, 2017).

Se cree que una de las razones por las que esto se presenta es para mantener un equilibrio entre el tamaño del cerebro y el cuerpo, debido a los altos costos metabólicos que conllevaría un cerebro de mayor tamaño en un cuerpo tan pequeño (Groothuis & Smid, 2017). Esto puede verse como una estrategia adaptativa que minimiza los costos mientras mantiene la funcionalidad cognitiva necesaria para sus actividades (Groothuis & Smid, 2017; van der Woude et al., 2013; van der Woude & Smid, 2016).

También, se ha sugerido que esto se debe a la necesidad de mantener habilidades cognitivas comparables a las de animales más grandes, a pesar de tener cada vez un menor tamaño (Groothuis & Smid, 2017). La regla de Haller se describe mediante una ley de potencias en la que el coeficiente de escala determina la tasa de aumento relativo del tamaño del cerebro en animales más pequeños. Cuanto menor sea este coeficiente, más marcado será el aumento relativo del tamaño del cerebro en los animales más pequeños (Groothuis & Smid, 2017; van der Woude et al., 2013; van der Woude & Smid, 2016 (Eberhard & Wcislo, 2012).

Este patrón se encuentra no solo al contrastar distintas especies, sino también al examinar individuos pertenecientes a la misma especie. Los de menor tamaño suelen presentar una proporción cerebro-cuerpo mayor en comparación con los más grandes, y esta asociación ha sido corroborada por investigaciones que abarcan varios grupos de animales (Rensch, 1948).

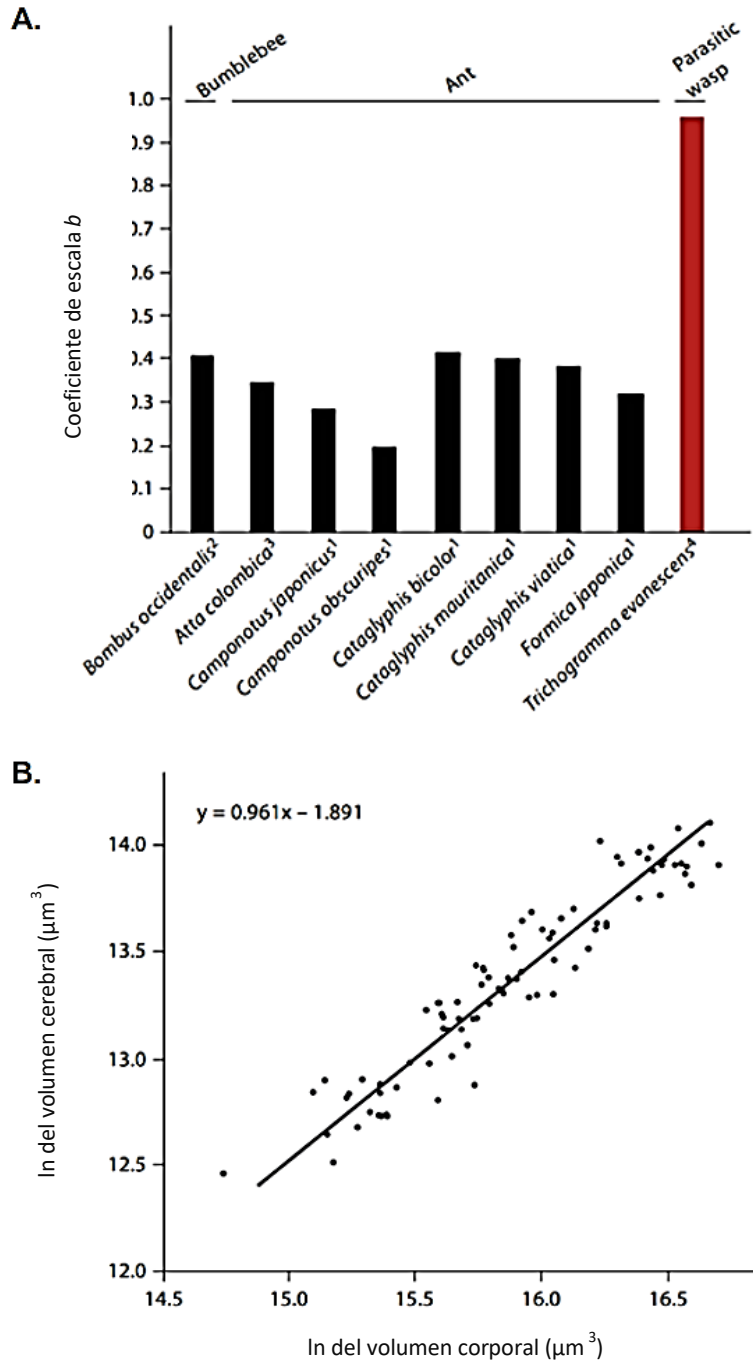


Figura 6. Relación entre el volumen de cuerpo y cerebro de las avispas *T. evanescens*. A. coeficientes de escala cerebral alométricos. B. Gráfica logarítmica doble de volumen cerebral versus volumen corporal. La pendiente de la línea recta que representa el coeficiente isométrico $b = 0,96$ ($n = 87$, $r^2 = 0,900$) (imágenes y texto tomados de van der Woude et. al, 2014).

1.3 Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y su sistema nervioso

El género *Trichogramma* pertenece a la familia Trichogrammatidae. Este género fue descrito por primera vez por Westwood en 1833, designando a *T. evanescens* como la especie tipo (Özder & Kara, 2010). Actualmente, se conocen alrededor de 180 especies de *Trichogramma* distribuidas en todo el mundo. Muchas de estas especies son morfológicamente similares entre sí y presentan complejas interacciones de compatibilidad reproductiva (Lindsey et al., 2018).

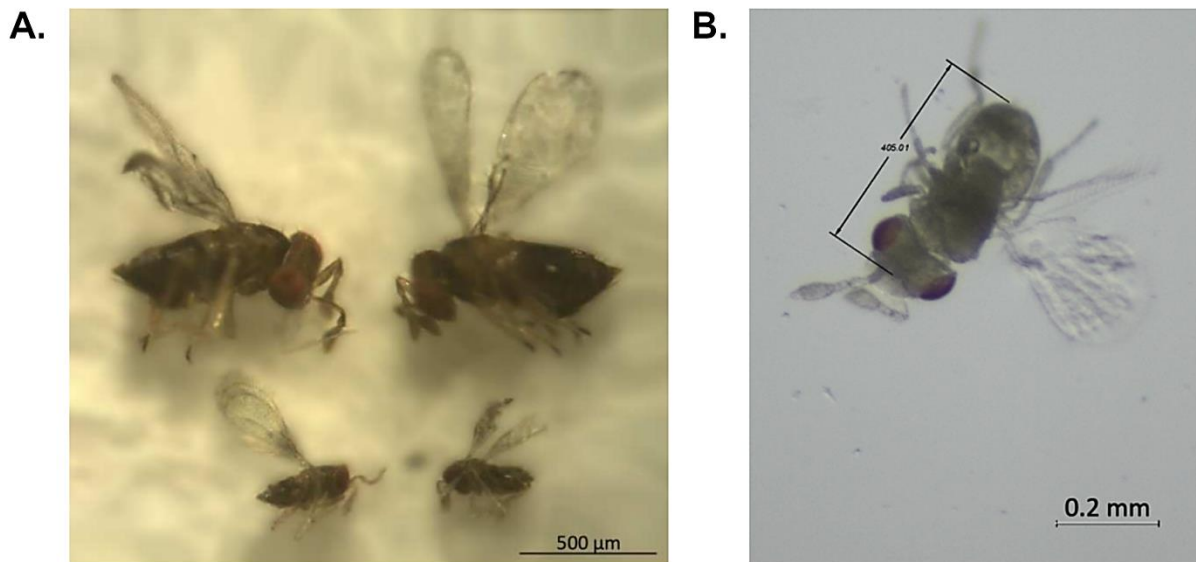


Figura 7. Variación fenotípica y diversidad de tamaño en avispas *Trichogramma*. **A)** Ejemplo de variación fenotípica del tamaño corporal en avispas *Trichogramma evanescens*. Las avispas mostradas en esta imagen son hembras de la misma edad y pertenecen a la misma cepa iso-femenina, sin embargo, muestran una diferencia extrema en tamaño corporal (tomado de van der Woude et al., 2011) **B)** Muestra de *Trichogramma pretiosum*.

Este género está compuesto por avispas parasitoides de huevos, las cuales son extremadamente pequeñas (Lindsey et al., 2018). De hecho, pertenecen a algunos de los insectos más diminutos que existen, incluso más pequeños que los protozoos más grandes, con adultos que apenas alcanzan décimas de milímetros de longitud (Lindsey et al., 2018).

Esta diferencia de tamaño varía según la cantidad de nutrientes que se encuentren disponibles en el huevo parasitado, además de la cantidad de huevos que se depositen en él, puesto que existe competencia entre las larvas (Fig. 7) (van der Woude & Smid, 2017a).

Por ejemplo, en huevos donde existe poca competencia, pueden alcanzar un tamaño de 0.9 mm, y en huevos donde hay mucha competencia por los nutrientes, el tamaño puede ser tan pequeño como 0.3 mm (van der Woude, 2017). También se han encontrado avispas con un tamaño menor a 0.2 mm (van der Woude & Smid, 2017).

Estas avispas desempeñan un papel esencial en la agricultura y la silvicultura, ya que son enemigos naturales de chinches y muchas plagas lepidópteras. Son especialmente eficaces cuando se llevan a cabo liberaciones masivas para controlar estas plagas (Özder & Kara, 2010). Además, se utilizan ampliamente en la protección biológica de las plantas y son una parte crucial de las biocenosis naturales (Reznik, 2011).

Las *Trichogramma* tienen una variada gama de hospedadores, parasitando principalmente huevos de insectos lepidópteros (mariposas y polillas) (Makarova, Veko, et al., 2021). El proceso de desarrollo de estas avispas, desde el huevo hasta la pupa, ocurre dentro del huevo del insecto hospedador (Makarova et al., 2021). Las habilidades olfativas y cognitivas son esenciales para que las avispas localicen y utilicen de manera efectiva los huevos de sus huéspedes, lo cual es crucial para su reproducción y supervivencia, según la teoría de Darwin (van der Woude & Smid, 2016). Estas avispas femeninas tienen la capacidad de encontrar el cuerpo de mariposas hembras ya apareadas y viajar sobre ellas hasta el lugar donde depositarán sus huevos. Este comportamiento permite a las avispas formar recuerdos a corto y largo plazo al asociar las feromonas de las mariposas, experimentadas durante estos viajes, con la oportunidad de depositar sus propios huevos en los huevos de las mariposas (van der Woude & Smid, 2016).

Además, las avispas *Trichogramma* demuestran una gama de comportamientos avanzados que necesitan habilidades sensoriales y cognitivas significativas, como la visión, el vuelo y la capacidad de responder a las feromonas sexuales de otros individuos de su especie

y a señales de las plantas generadas por la puesta de huevos de las mariposas (van der Woude et al., 2013; van der Woude & Smid, 2016).

1.3.1 El límite de la miniaturización: gasto energético y posibles soluciones

Dentro de este género se observa una notable plasticidad y adaptabilidad, la cual se manifiesta tanto a nivel del organismo completo como en sus células individuales (Lindsey et al., 2018). La tendencia a disminuir su tamaño corporal es guiada especialmente por las necesidades del sistema nervioso central. No solo se han modificado órganos como los omatidios, los cuales componen los ojos y son extremadamente pequeños si los comparamos con otros insectos (Lindsey et al., 2018). Además, se conoce que, en algunos grupos, el proceso de miniaturización ha llevado a que pierdan órganos respiratorios y circulatorios en estadios larvales (Lindsey et al., 2018).

En general, los animales de tamaño reducido se enfrentan a desafíos únicos al desarrollar sus sistemas nerviosos debido a múltiples factores. Uno de los problemas radica en el tamaño mínimo que los axones pueden tener para transmitir señales eléctricas de forma efectiva (Eberhard & Wcislo, 2011), el cual puede fallar al tener un diámetro menor a $1 \mu\text{m}$ (van der Woude & Smid, 2016).

Además, en las células nerviosas particularmente pequeñas, el núcleo ocupa una proporción mayor del espacio en comparación con el citoplasma, lo que podría limitar cuán pequeñas pueden ser estas células. Es decir, si la plasticidad es efectuada por medio del tamaño de las neuronas, podemos encontrar límites necesarios para que las mismas sean funcionales (van der Woude & Smid, 2016), como el espacio disponible para las mitocondrias al producir energía, el tamaño de los organelos, entre otros (van der Woude & Smid, 2016). Todo esto está determinado por el tamaño mínimo de la célula, el cual está determinado por el tamaño de sus orgánulos, y donde la mayor parte de su volumen está determinado por el tamaño del núcleo (van der Woude & Smid, 2016). Un ejemplo de esto se ha registrado en algunas neuronas anucleadas en la avispa *Megaphragma mymaripenne*, siendo estas de

aproximadamente el 95 % del total de sus neuronas, luego de un proceso de lisis durante la etapa de pupa (van der Woude & Smid, 2016).

También, es importante considerar la regla de Haller, según la cual los animales más pequeños tienden a tener cerebros relativamente más grandes, lo que implica que estos organismos puedan necesitar destinar una mayor proporción de sus recursos a su tejido nervioso (Eberhard & Wcislo, 2011). Esto conlleva a desafíos metabólicos significativos, ya que construir, mantener y operar un volumen grande de tejido nervioso y redes neuronales demanda una gran cantidad de energía (Eberhard & Wcislo, 2011). Por último, en cerebros más pequeños, se observa que las dendritas tienden a ser menos complejas y de menor tamaño, lo que podría influir en la capacidad de procesamiento del cerebro (Eberhard & Wcislo, 2011). Todos estos aspectos juntos presentan un panorama complejo que los pequeños animales deben superar para desarrollar sistemas nerviosos funcionales y eficientes (Eberhard & Wcislo, 2011).

Se han identificado tres enfoques principales que los animales podrían emplear para hacer frente a los desafíos asociados con el aumento del tamaño de su cerebro y las limitaciones conductuales debido a su pequeño tamaño corporal (Eberhard & Wcislo, 2011). Estas estrategias no son excluyentes, lo que significa que un mismo animal podría aplicar diferentes ajustes para sortear las restricciones de su tamaño reducido (Eberhard & Wcislo, 2011).

La primera estrategia es la limitación de tamaño. Esta estrategia implica el desarrollo de estilos de vida que requieran menos habilidades de comportamiento, lo que podría reducir los gastos metabólicos al disminuir la necesidad de un tejido cerebral más energéticamente costoso. En entornos donde los costos de mantener ciertas capacidades superan a los beneficios que ofrecen, la selección natural tiende a favorecer la simplificación de estas capacidades. La teoría de la limitación de tamaño sugiere que los individuos más pequeños podrían estar limitados en su comportamiento debido a los altos costos de mantener un sistema nervioso central que iguale las capacidades comportamentales de organismos más

grandes, lo que hace más ventajoso para estos pequeños animales tener habilidades comportamentales menos complejas (Eberhard & Wcislo, 2011).

La segunda estrategia, conocida como el “cerebro de gran tamaño”, sugiere que es posible priorizar la retención de esas habilidades específicas, a pesar del alto costo metabólico asociado con el tejido nervioso necesario para mantenerlas, siendo el beneficio mayor al costo (Eberhard & Wcislo, 2011). En consecuencia, estos animales pueden evolucionar hacia tener cerebros relativamente grandes, como un compromiso entre mantener capacidades comportamentales cruciales y los desafíos metabólicos de soportar un sistema nervioso más desarrollado (Eberhard & Wcislo, 2011). Esta teoría concuerda, al menos de forma general, con las tendencias alométricas bien documentadas que muestran que los animales más pequeños suelen tener cerebros proporcionalmente más grandes (Eberhard & Wcislo, 2011).

La tercera estrategia, “economía del diseño” está basada en la cantidad de información que los animales recopilan de su entorno, y contrasta las capacidades de recopilación de datos de su sistema nervioso central para procesar y almacenar esa información de manera significativa (Eberhard & Wcislo, 2011). Plantea la posibilidad de ajustar la cantidad de información que llega al eliminar la redundancia recolectada por diferentes receptores antes de enviarse a los procesadores centrales, “economizando” el procesamiento de la información (Eberhard & Wcislo, 2011).

Estas modificaciones del cerebro para economizar los gastos pueden ocurrir por medio de la reducción del número y tamaño de neuronas, donde la complejidad neuronal se mantiene, así como también por una reducción de las redes neuronales y sus proyecciones, donde se reducen el número de neuronas y sus arborizaciones, con lo cual se puede mantener un la complejidad cognitiva y conductual que se requiere para llevar a cabo las funciones básicas sin que esto afecte su rendimiento (van der Woude & Smid, 2016).

Para *Trichogramma* esta última opción de reducción de las redes neuronales ha sido relevante (van der Woude & Smid, 2016). Se piensa que estos cambios pueden deberse a modificaciones en los genes de plasticidad que permiten variaciones en el número de neuronas, la composición del neuropilo y la complejidad de las arborizaciones neuronales.

Estos cambios dependerían del entorno en el que se desarrollan las crías, considerando factores como el espacio y la disponibilidad de nutrientes en el huevo del huésped (Lanet & Maurange, 2014; van der Woude & Smid, 2016).

Un ejemplo de esta plasticidad encontrada en el cerebro de las avispas *Trichogramma* fue descrita para *Trichogramma evanescens*, que posee neuronas aminérgicas que pueden variar ampliamente de tamaño, a pesar de que sean avispas genéticamente idénticas, en un rango de 1.7 μm a 4.4 μm , por ejemplo (Lindsey et al., 2018). La plasticidad en esta avispa es mucho mayor a la descrita en otras especies hasta la actualidad, pues se ha descubierto que en adultas hembras el volumen del cerebro puede variar hasta 5 veces (van der Woude et al., 2013).

Mantener tejido nervioso implica costos metabólicos muy altos, resultando en que los animales más pequeños enfrenten costos metabólicos relativamente mayores (Eberhard & Wcislo, 2011). Si estos cerebros más pequeños poseen capacidades de procesamiento de información comparables a las de cerebros más grandes, es probable que su actividad metabólica sea más intensa, y se ha observado que sus neuronas transmiten información a velocidades más lentas (Eberhard & Wcislo, 2011).

Las adaptaciones en sus hábitos y características biológicas, especialmente en respuesta a la miniaturización, pueden generar cambios notables en el desarrollo del sistema nervioso central, afectando significativamente la estructura y función de los parasitoides (Makarova, Veko, et al., 2021). Sin embargo, diferentes estudios han descrito cómo sus habilidades son similares a las de insectos que poseen un mayor tamaño, lo cual demuestra que su cerebro es capaz de procesar funciones complejas, como el desplazarse caminando o volando, el identificar colores, olores, y asociar esta información con animales que están por colocar huevos que pueden parasitar; controlar el tamaño, número y sexo de sus huevos y vivir extensamente (van der Woude, 2017).

En el campo de la investigación, se pone especial énfasis en especies pertenecientes a la familia Trichogrammatidae, como los géneros *Megaphragma* y *Trichogramma*, para entender mejor estos fenómenos (Makarova, Veko, et al., 2021).

1.4 *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae)

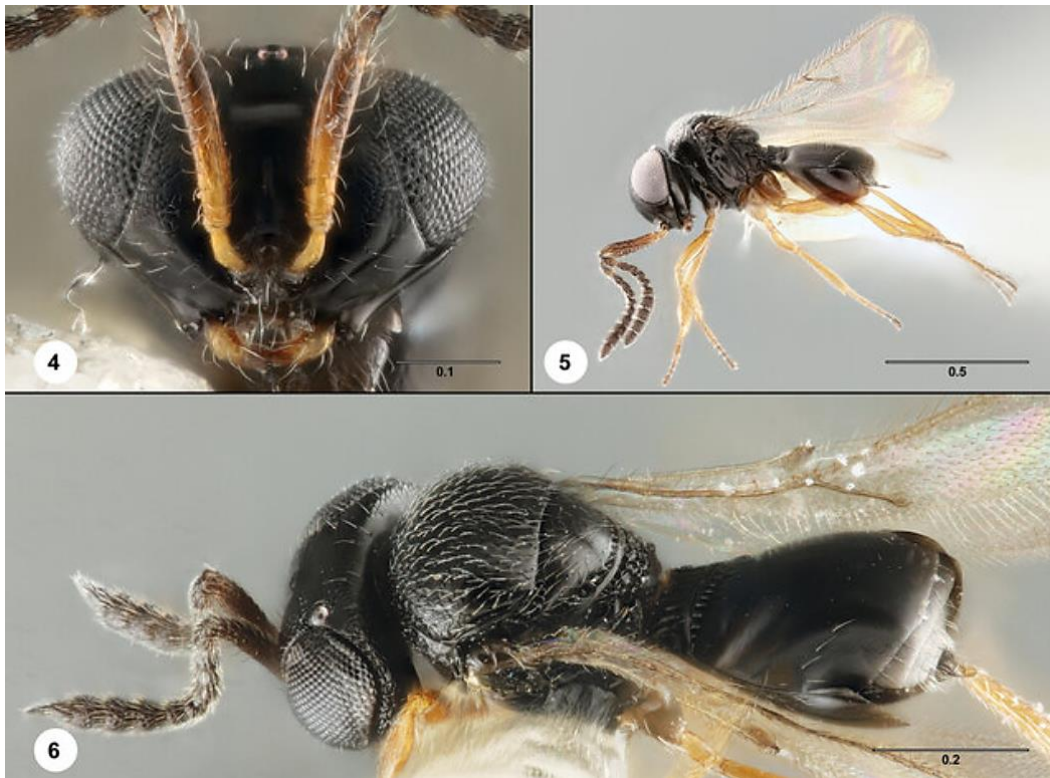


Figura 8. *Telenomus podisi* hembra (tomado de Felipe-Victoriano et al., 2019)

El género *Telenomus* pertenece a la familia Platygasteridae. Históricamente, este género se clasificaba dentro de la familia Scelionidae (Felipe-Victoriano et al., 2019; Yeargan, 1980), pero revisiones taxonómicas más recientes han llevado a una reorganización de estos grupos, situando a este y otros géneros dentro de Platygasteridae (Murphy et al., 2007).

Esta familia se caracteriza por incluir numerosas avispas, las cuales suelen tener un tamaño pequeño a muy pequeñas. Son conocidas también por tener una conducta endoparasítica, y afectan los huevos de otros insectos y arañas (Murphy et al., 2007).

Dentro del género de *Telenomus* encontramos a *Telenomus podisi* (Fig. 8) (Ashmead, 1893). Esta avispa parasitoide es conocida ampliamente por su uso como control biológico en varias especies, especialmente de las chinches (Pentatomidae) (Battisti et al., 2020; Lahiri

et al., 2017; Tognon et al., 2013, 2014; Zachrisson et al., 2016), incluyendo, por ejemplo, a *Euschistus heros* y *Tribaca limbativentris* (Tognon et al., 2014), siendo en Brasil el enemigo natural más abundante para *Euschistus heros* en los cultivos de soya (Tognon et al., 2014), y reportado con una tasa de parasitismo mayor a 85 % para el control y regulación de la población en la especie *Oebalus insularis* en cultivos de arroz en Panamá (Zachrisson et al., 2016).

1.5 *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Platygastridae)

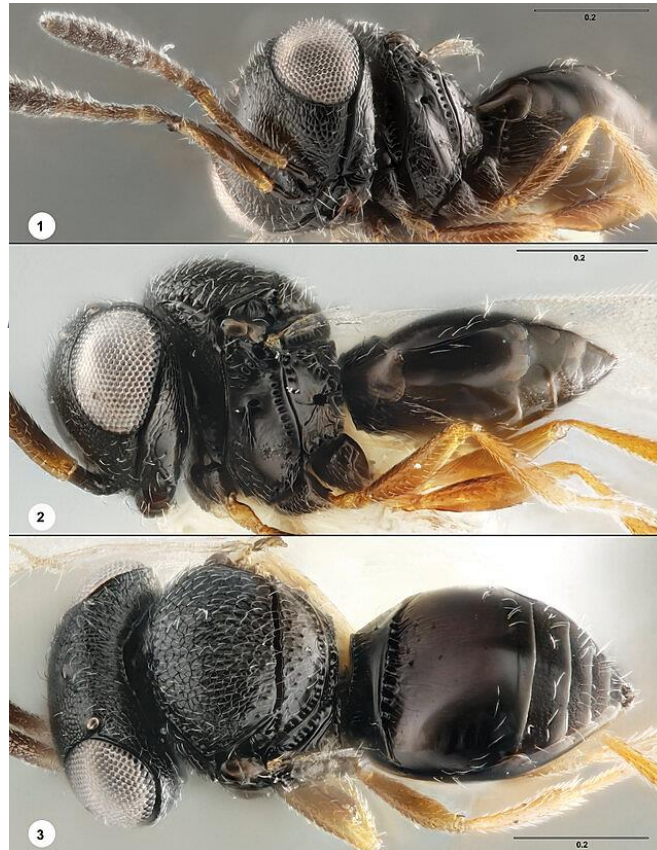


Figura 9. *Trissolcus basalis* hembra (tomado de Felipe-Victoriano et al., 2019)

La clasificación del género *Trissolcus* ha sido objeto de estudio dentro de la superfamilia Platygastroidea, que comprende dos familias principales: Scelionidae y Platygastridae (Austin et al., 2005). Esta familia incluye insectos parasitoides, siendo el tercer grupo de superfamilias con más especies descritas a nivel mundial (Austin et al., 2005). Históricamente, este género se clasificaba dentro de la familia Scelionidae (Felipe-Victoriano et al., 2019; Yeargan, 1980).

Los estudios sobre Platygastroidea han confirmado la monofilia de la superfamilia y la familia Platygastridae (Murphy et al., 2007), es decir, poseen un solo ancestro común, pero han encontrado que Scelionidae es probablemente polifilética (no incluye el ancestro común más reciente de todos sus miembros) (Murphy et al., 2007). Los estudios realizados indican

que la clasificación dentro de esta superfamilia sigue en revisión (Austin et al., 2005; Murphy et al., 2007).

Estas avispas, además, son conocidas por su parasitismo en variedades de cultivo, incluyendo el cultivo de arroz (Zachrisson & Martinez, 2011). En Panamá, se ha reportado que las tasas de parasitismo de *Trissolcus basal* (Fig. 9) han variado entre el 84 y 89 % en programas de control para *Oebalus insularis* (Zachrisson & Martinez, 2011).

Considerando que las avispas parasitoides de estas familias son controladoras naturales de plagas, y que se han utilizado ampliamente para investigaciones entomológicas en las últimas décadas, es importante poder conocer más sobre su evolución y biología (Austin et al., 2005).

1.6 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Basado en los principios físicos que describen las propiedades de la materia, la fluorescencia se caracteriza por la habilidad de un material para emitir luz de manera inmediata tras exponerse a radiación. De acuerdo con la ley de Stokes, esta luz emitida presenta una longitud de onda superior a la de la luz absorbida, lo que implica que los fotones emitidos poseen menor energía (Auzel, 2004; Storch, 2000; Xiao et al., 2019). De acuerdo con Storch (2000), los estudios realizados por Coons (1941) y otros autores consiguieron integrar la alta sensibilidad de la microscopía de fluorescencia con la precisión específica de las técnicas inmunológicas, al marcar anticuerpos con fluorocromos. Con esto, se han introducido los términos "inmunofluorescencia" o "técnica del anticuerpo fluorescente" para denominar este enfoque (Storch, 2000).

La técnica de inmunofluorescencia (IF) posibilita la observación de una amplia gama de componentes en cualquier tipo de célula o tejido utilizando anticuerpos específicos marcados con fluoróforos. Este método es esencial tanto en investigación básica como en aplicaciones clínicas, permitiendo la detección de diversas moléculas biológicas (Im et al., 2019). Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos marcados con fluoróforos para detectar y unirse a sus objetivos dentro de las células (Allaire et al., 2015). Lo cual se aplica comúnmente en el estudio de tejidos y cultivos celulares para analizar la disposición de diversas moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos y glicanos (Allaire et al., 2015).

Para llevarla a cabo, deben desarrollarse dos fases importantes: la primera, que incluye la fijación de la muestra y el procesamiento del tejido, incluyendo los bloqueos de sitios no específicos, incubación del anticuerpo primario, proceso de sistemas de detección que tengan revelado, contrateñido, entre otros, y la segunda, que requiere de interpretar y cuantificar lo que se haya observado expresado en los tejidos examinados (Fig. 10) (De Matos et al., 2010).

Al no existir un fijador universal, la selección del fijador óptimo y el método de fijación se determinan en función del antígeno y tipo de muestra (Im et al., 2019). La fijación es un paso inicial crítico en el procedimiento, diseñado para inhibir la autodestrucción de las células, disminuir la descomposición y mantener intacta la forma celular al tiempo que se preserva la

capacidad de los antígenos para reconocerse (Im et al., 2019). Este proceso tiene como objetivo asegurar los antígenos de interés en su lugar sin modificar la estructura interna de las células, facilitando el acceso completo de los anticuerpos a los componentes celulares específicos que se buscan (Im et al., 2019).

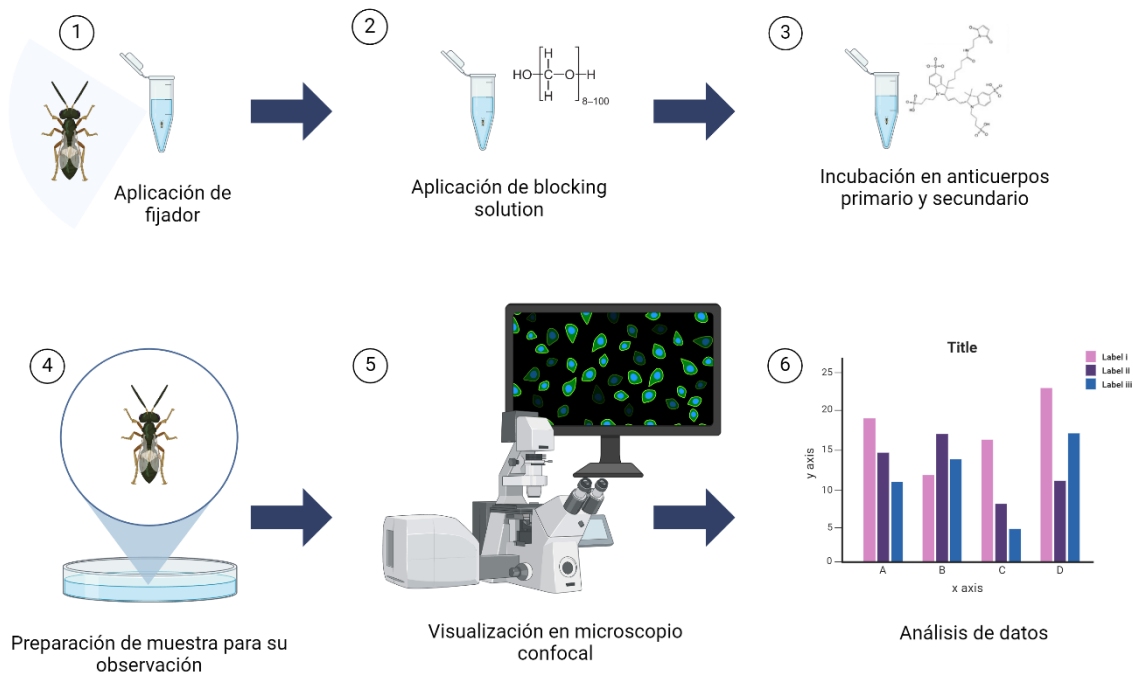


Figura 10. Ejemplo de aplicación de la inmunofluorescencia con microscopía confocal (ilustración creada en Biorender).

Antes de la aplicación de los anticuerpos primarios y secundarios, se realiza un bloqueo con una solución bloqueadora para prevenir la unión a moléculas que no sean parte de nuestro objetivo (Im et al., 2019). La detección de fluorescencia se logra con anticuerpos conjugados a fluoróforos, seleccionados por sus características específicas (Im et al., 2019).

Además, la inmunofluorescencia se utiliza comúnmente en conjunto con otras técnicas de tinción fluorescente, como la aplicación de DAPI, el cual se emplea para marcar el ADN en las muestras biológicas (Allaire et al., 2015). Esta combinación de técnicas permite la

identificación simultánea de diferentes tipos de moléculas en una misma muestra, lo que amplía las posibilidades de análisis (Allaire et al., 2015).

Existen dos enfoques principales para realizar la inmunofluorescencia: la directa y la indirecta (Allaire et al., 2015). En la inmunofluorescencia directa, el anticuerpo primario está marcado directamente con un fluoróforo, lo que simplifica el procedimiento y limita la reactividad cruzada entre anticuerpos (Allaire et al., 2015; Storch, 2000), sin embargo, pueden ser complicados de adquirir comercialmente, reducir la sensibilidad y aumentar los costos (Allaire et al., 2015). En cambio, en la inmunofluorescencia indirecta, se utiliza un anticuerpo secundario marcado que lleva el fluorocromo reconoce entonces al anticuerpo primario y se une a él, lo que proporciona una mayor sensibilidad y una señal amplificada, aunque requiere más pasos y tiempo (Allaire et al., 2015; Storch, 2000). Comercialmente, hay una amplia gama disponible (Allaire et al., 2015).

Distintos tipos de microscopios se pueden utilizar para analizar muestras de inmunofluorescencia. El microscopio de epifluorescencia, por ejemplo, permite la excitación y detección de la fluorescencia a través del mismo sistema óptico, aunque puede presentar una alta relación de ruido debido a la transmisión de la mayoría de la luz de excitación a través de la muestra (Allaire et al., 2015). Debido a que la mayor parte de la luz de excitación se transmite a través de la muestra, solo la luz excitatoria reflejada puede alcanzar el objetivo junto con la luz emitida (Allaire et al., 2015).

Por otro lado, la microscopía confocal ofrece una mayor resolución óptica y contraste al eliminar la luz fuera de foco mediante el uso de un diafragma espacial (Fig. 11). Aunque este enfoque permite la reconstrucción de estructuras tridimensionales a partir de las imágenes obtenidas, como una fracción importante de la luz de la muestra se bloquea en el diafragma a menudo se requieren exposiciones largas (Allaire et al., 2015).

Para emplear la inmunofluorescencia también debemos tomar en consideración que pueden existir algunas limitaciones. Entre ellas se pueden mencionar, por ejemplo, el hecho de que no estamos observando directamente nuestro objetivo, sino una evidencia de su presencia, y en ocasiones, si ocurre una ausencia de tinción, puede deberse a una ausencia de

inmunoreactividad, y no a que la molécula esté ausente. Esto es común y puede deberse a que nuestro tejido y el anticuerpo no tienen suficiente afinidad, a que el procesamiento del tejido no fue correcto, entre otros (Fritschy, 2008).

Existen factores que influyen en la calidad de nuestros experimentos con inmunofluorescencia (Fritschy, 2008). Entre estos, podemos mencionar el seleccionar un buen método de fijación celular o tisular, debido a que la fijación modifica las propiedades químicas de sus componentes, lo cual puede afectar la afinidad del anticuerpo, al dificultar la penetración de estos en el tejido (Fritschy, 2008). También, otra limitante que se debe tomar en consideración durante el procedimiento de tinción es la duración y temperatura de incubación (Fritschy, 2008).

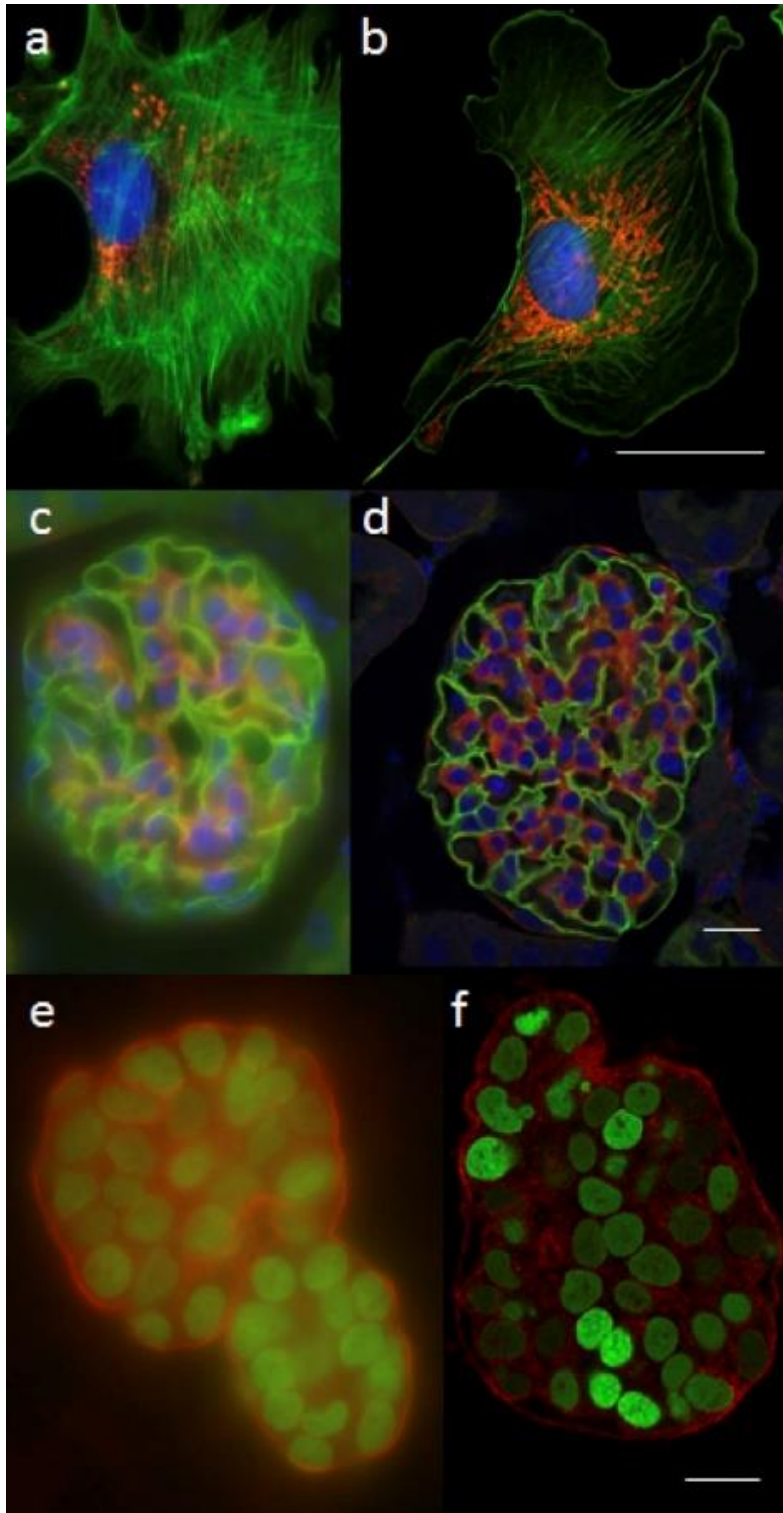


Figura 11. Comparación de técnicas de imagen 3D con inmunofluorescencia. Comparación de imágenes de campo amplio (wide-field) (a, c y e) y CLSM (microscopía confocal de barrido láser) (b, d y f) de muestras de varios grosores. Barras de escala, 20 μm (tomado y modificado de Jonkman & Brown, 2015).

1.7 Importancia ecológica y económica de las avispas

El control biológico está relacionado con el manejo integrado de plagas, en donde se utilizan insectos (parasitoides y depredadores) para controlar las poblaciones de plagas agrícolas por debajo de los niveles de daño económico (Jiménez-Martínez, 2009). Este control desempeña un papel importante en la supresión de diversas poblaciones de insectos plaga en diferentes cultivos y bosques, siendo utilizado con el objetivo de no perjudicar al medio ambiente (por ejemplo, a los insectos de beneficio), y proteger la salud humana (Jiménez-Martínez, 2009).

La búsqueda de alternativas al uso excesivo de pesticidas en la agricultura ha aumentado en los últimos años (Garcerán & Castillo, 2019; Mélo-Filho & Guenther, 2015). Entre las opciones más sostenibles de manejo de plagas se encuentra el control biológico aumentativo (CBA), que implica la liberación inundativa de agentes de control biológico como parasitoides de huevos (van Lenteren et al., 2018). Estos agentes de control biológico se destacan por actuar en la etapa de huevo de la plaga, la cual ocurre antes de la aparición de cualquier daño en el cultivo (Querino et al., 2016; Valente et al., 2017).

Dentro de los enemigos naturales para plagas más eficientes en todo el mundo se encuentran las avispas parasitoides *Trichogramma spp.* Se consideran altamente aptas debido a su facilidad de cría en masa y su capacidad para reducir la población de diversas plagas de insectos, especialmente insectos lepidópteros (Löhr et al., 2018; Parreira et al., 2019; Shower et al., 2021; Zachrisson, 2010). Desde los años 60, ha habido un avance significativo en el uso de técnicas de cría masiva y dietas artificiales para multiplicar las presas de los depredadores o huéspedes de los parasitoides (Zachrisson, 2010b).

Se han reportado muchos casos exitosos de las avispas parasitoides *Trichogramma* (Familia: Trichogrammatidae) y *Telenomus* (Familia: Platygasteridae) como control biológico a nivel mundial, con estudios en Panamá (Zachrisson, 2010b; Zachrisson et al., 2016), España (Gallego et al., 2019), India (Romeis et al., 1999), Canadá (S. M. Smith, 1996), Alemania (Hassan, 1993), México (Hernández-Trejo et al., 2019), entre otros.

Por ejemplo, se conoce que *Te. podisi* es un importante enemigo natural de las chinches (Pentatomidae) (Tognon et al., 2014). En Panamá se han utilizado en las zonas arroceras de la

región oriental para parasitar huevos de insectos como *Rupella albinella* (polilla), *Spodoptera frugiperda* (polilla) y *Oebalus insularis* (chinche), debido a que son capaces de reducir rápidamente la población de plagas en un corto período de tiempo (Zachrisson, 2010).

En la práctica del manejo integrado de plagas, se prefiere el uso de controladores biológicos, destacando las especies del género *Trichogramma*, por su superioridad en el control de poblaciones de plagas en comparación con los métodos químicos (Parreira et al., 2019). Sin embargo, la aplicación de pesticidas puede ser contraproducente para estos agentes naturales, ya que pueden dañarse al entrar en contacto con superficies tratadas, o al consumir agua y polen contaminados (Parreira et al., 2019). Los efectos nocivos de los pesticidas no se limitan a la muerte inmediata, sino que también pueden perturbar significativamente el desarrollo y comportamiento de los parasitoides, afectando su ciclo de vida, incluyendo la tasa de parasitismo, duración de vida, balance de género, emergencia de adultos, comunicación y apareamiento (Parreira et al., 2019). Esto es particularmente crítico para parasitoides inmaduros que se desarrollan dentro de huevos tratados con pesticidas, ya que pueden perecer junto con sus huéspedes (Parreira et al., 2019).

Además de brindar un mejor entendimiento de la fisiología de *Telenomus podisi*, *Trissolcus spp.* y *Trichogramma pretiosum*, este trabajo puede tener implicaciones importantes en el campo del control biológico.

CAPÍTULO II. MÉTODOS Y MATERIALES

3.1 Cultivo de avispas

Los especímenes de *Te. podisi*, *Tr. pretiosum* y *Trissolcus spp.* fueron proporcionados por el IDIAP (Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá) a través del Dr. Bruno Zachrisson y el proyecto de “Control Biológico de *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) y *Oebalus insularis* (Pentatomidae) en arroz, utilizando parasitoides oófagos”, con sede en el Centro de Investigación Agropecuaria Oriental (CIAOr), El Naranjal, Chepo, Panamá. Las mismas son criadas en condiciones abióticas controladas.

3.2 Procesamiento de cerebros e inmunomarcaje

Las muestras de hembras y machos de *Te. podisi*, *Trissolcus spp.* y *Tr. pretiosum* se fijaron enteras en formaldehído al 4 % 0,1 M (pH = 7,4) inmediatamente después de su nacimiento (Fig. 12) a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se enjuagaron cinco veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se dejaron en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 % durante 7 – 10 días (*Te. podisi* y *Trissolcus spp.*) y 4 – 8 días (*Tr. pretiosum*) para aclarar la cutícula. Luego, las avispas se lavaron nuevamente con PBS e incubaron en Triton X-100 (Sigma Solution) al 0,5 % durante 3 horas (3 × 1 h) a temperatura ambiente, para permeabilizar la membrana y permitir una mayor penetración de los anticuerpos y el agente de tinción. Después, fueron pre-incubadas en suero de cabra al 1% en PBS durante <16 horas. Seguidamente, se lavaron con Triton X-100 durante 5 min y se incubaron en anticuerpo primario Anti-Synapsin en una dilución 1:50 (*Te. podisi* y *Trissolcus spp.*) y 1:100 (*Tr. pretiosum*) durante 48 horas a 4 °C. Tras el tiempo del anticuerpo primario, las muestras se enjuagaron con Triton X-100 durante 1 h 30 min (3 × 30 min) y se incubaron con anticuerpo secundario Alexa Fluor 555 (Invitrogen) en una dilución 1:200 junto a tinción de NucBlue (5 µL por vial) durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de enjuagarlas en PBS, se procedió a la deshidratación en serie graduada de etanol (50, 70, 90, 95 y 100 %) durante 10 minutos cada una, con una repetición adicional en etanol absoluto (100 %) tres veces (3 × 10 min) para *Tr.*

pretiosum, asegurando la deshidratación adecuada. Para clarificar los tejidos internos se utilizó metil salicilato 100% durante 1 - 4 días (*Te. podisi* y *Trissolcus spp.*) (Fig. 13) o 2 horas (*Tr. pretiosum*) (Fig. 14). En la mayoría de las muestras, se removieron las alas para mejorar la visualización en el microscopio confocal y se separó la cabeza del cuerpo con pinzas finas (Dumont no. 5, Sigma) para su análisis detallado (Haverkamp & Smid, 2014; Smolla et al., 2014).



Figura 12. Avispas *Telenomus podisi* al nacer de los huevos de *Oebalus insularis*.

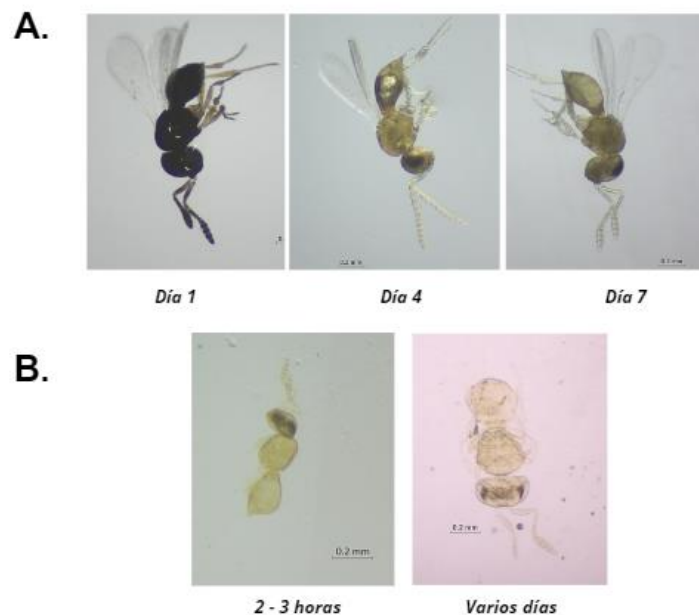


Figura 13. Proceso de aclarado de cutícula y tejidos internos en *Telenomus podisi*

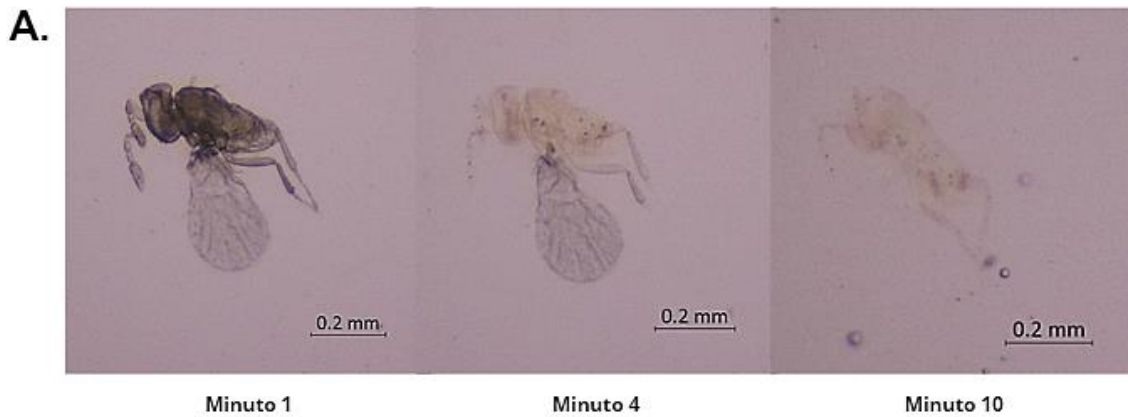


Figura 14. Proceso de aclarado en tejidos internos en *Tr. pretiosum*.

3.3 Microscopía confocal

Las muestras fueron montadas utilizando metil salicilato como medio dentro de arandelas pegadas a portaobjetos largos de 1 mm por medio de esmalte de uñas Sally Hansen®, y se cubrieron con cubreobjetos regulares. Primero, se colocaron las avispas enteras para obtener las imágenes tridimensionales completas, y posteriormente imágenes de la cabeza, orientando la parte de abajo de la misma hacia la parte inferior de los cubreobjetos largos, con el fin de poder obtener una imagen desde la parte de atrás del cerebro. Se utilizó un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss FLV 3000. Las cabezas de *Te. podisi* se escanearon utilizando un objetivo de 10X, así como también las imágenes del cuerpo completo. Para *Tr. pretiosum* se utilizó el objetivo de 20X tanto para el cuerpo como la cabeza. La resolución se mantuvo en 1024 × 1024 píxeles.

3.4 Análisis de datos y procesamiento de imágenes

3.4.1 Reconstrucción tridimensional

La reconstrucción de los cerebros se realizó con el software Reconstruct (John C. Fiala, Ph.D.) obtenido online en la página de SynapseWeb, disponible en la página web de la Universidad de Texas en Austin. Las fotos utilizadas por el microscopio confocal se descargaron en formato .jpg, e importadas para tener un archivo .ser que pudiera modificarse con el software. Una vez importadas, se calibraron con la escala de barra para tener las medidas correctas y se configuró el tamaño de los píxeles. El grosor de todas las imágenes se ajustó a 2 μm . Para cada tipo de trazo en la imagen (cabeza, cerebro, esófago, etc.) se atribuyó un color y nombre específico. Al tener la reconstrucción completa, se obtuvo el volumen de cada grupo de trazos específicos.

3.4.2 Mediciones

Las mediciones corporales se realizaron en el software Canvas X. Las imágenes, en formato .jpg, se calibraron a 100 μm (*Trichogramma pretiosum*) o 200 μm (*Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*) con la escala de barra para tener las mediciones correctas. Para *Te. podisi* y *Tr. pretiosum* se realizaron las mismas mediciones. En las fotos obtenidas del cuerpo completo, se realizaron mediciones del largo de fémur y del cuerpo completo, desde el extremo del abdomen hasta la base de la cabeza. Luego, se realizó una medición del largo de la cabeza. Para aquellas muestras en las que la posición de las avispas complicaba la captura de imágenes adecuadas para medir la longitud total del cuerpo, se optó por sumar la distancia desde el abdomen al tórax y, a esta, añadirle la longitud de la cabeza, considerando este total como la medida del “cuerpo completo”. En las imágenes de la cabeza, se realizaron mediciones del largo (sin contar las mandíbulas ni el aparato bucal), hasta la parte superior de la cabeza. Para el ancho, se hicieron mediciones desde la parte más externa de los ojos.

3.4.3 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos por medio de los dos softwares mencionados anteriormente, Reconstruct y Canvas X, se analizaron estadísticamente en GraphPad Prism 5. Las variables que se analizaron fueron el volumen de la cabeza y el volumen del cerebro; la relación de volumen de cabeza/volumen de cerebro, ancho de la cabeza, largo del fémur y cuerpo completo. Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio y la desviación estándar (DE).

Para garantizar que las variables fuesen comparables, fue necesaria una estandarización logarítmica luego de estudiar la naturaleza de los datos de cada variable. Se utilizó un modelo de análisis paramétrico. Para determinar las diferencias significativas de las medias de tres grupos o más para cada variable, se utilizó un modelo de ANOVA One-Way a un factor. Al ser significativos los resultados ANOVA, se procedió a un análisis post-hoc de Tukey HSD (Diferencia Significativa Honesta) para evaluar las diferencias específicas entre los grupos. Para la comparación estadística entre solamente dos grupos se utilizó el Test de Student con corrección de Welch.

Se consideraron significativos los resultados donde $p < 0.05$. Se realizó una correlación de Pearson para examinar la relación entre las variables, la fuerza (R^2) y la dirección de la asociación de las variables (positiva o negativa), así como una regresión lineal para realizar un modelo predictivo de las variables que corresponden a las especies estudiadas. Se estableció un valor de $p < 0.05$ como umbral para la significancia estadística, y se utilizó un intervalo de confianza del 95 % para evaluar la precisión de las estimaciones.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

4.1 Protocolo para imágenes con microscopía confocal y reconstrucciones tridimensionales de un organismo completo

Mediante el protocolo de microscopía confocal desarrollado, se capturaron imágenes de alta resolución de los cerebros de *Tr. pretiosum*, *Trissolcus spp.* y *Te. podisi* sin recurrir a la disección (Fig. 15), permitiendo la reconstrucción completa de las cabezas y cerebros (Fig. 16). Es decir, las imágenes se obtuvieron con la cabeza intacta para cada especie. Estas imágenes muestran con claridad las estructuras cerebrales junto con otros componentes internos como músculos, sistema nervioso, aparato digestivo, y otros (Fig. 17).

Este método permitió la visualización detallada de estructuras internas sin alterar la integridad física de los especímenes, facilitando el estudio de su anatomía interna. Una vez estandarizado este protocolo, nuestro porcentaje de éxito al replicarlo fue del 95 – 99 %.

El procedimiento se optimizó (Tabla 1), y logró la visualización de estructuras ocultas bajo pigmentos densos o cutículas gruesas. Como resultado, se obtuvieron vistas transparentes completas del cuerpo y la cabeza de las especies investigadas, permitiendo una observación detallada de áreas específicas, como las mandíbulas, o el área del cerebro que se encuentra bajo los omatidios en las tres especies estudiadas (Fig. 18).

Durante el desarrollo de nuestro estudio, encontramos la presencia de una avispa parasitoide, *Trissolcus spp.*, dentro del cultivo suministrado de *Telenomus podisi*, a pesar de las medidas de clasificación y bioseguridad implementadas por la institución proveedora para garantizar la multiplicación específica de *Telenomus podisi*. Debido a esto, tuvimos una menor cantidad de *Te. podisi* a la esperada, por lo que se decidió analizar las tres especies.

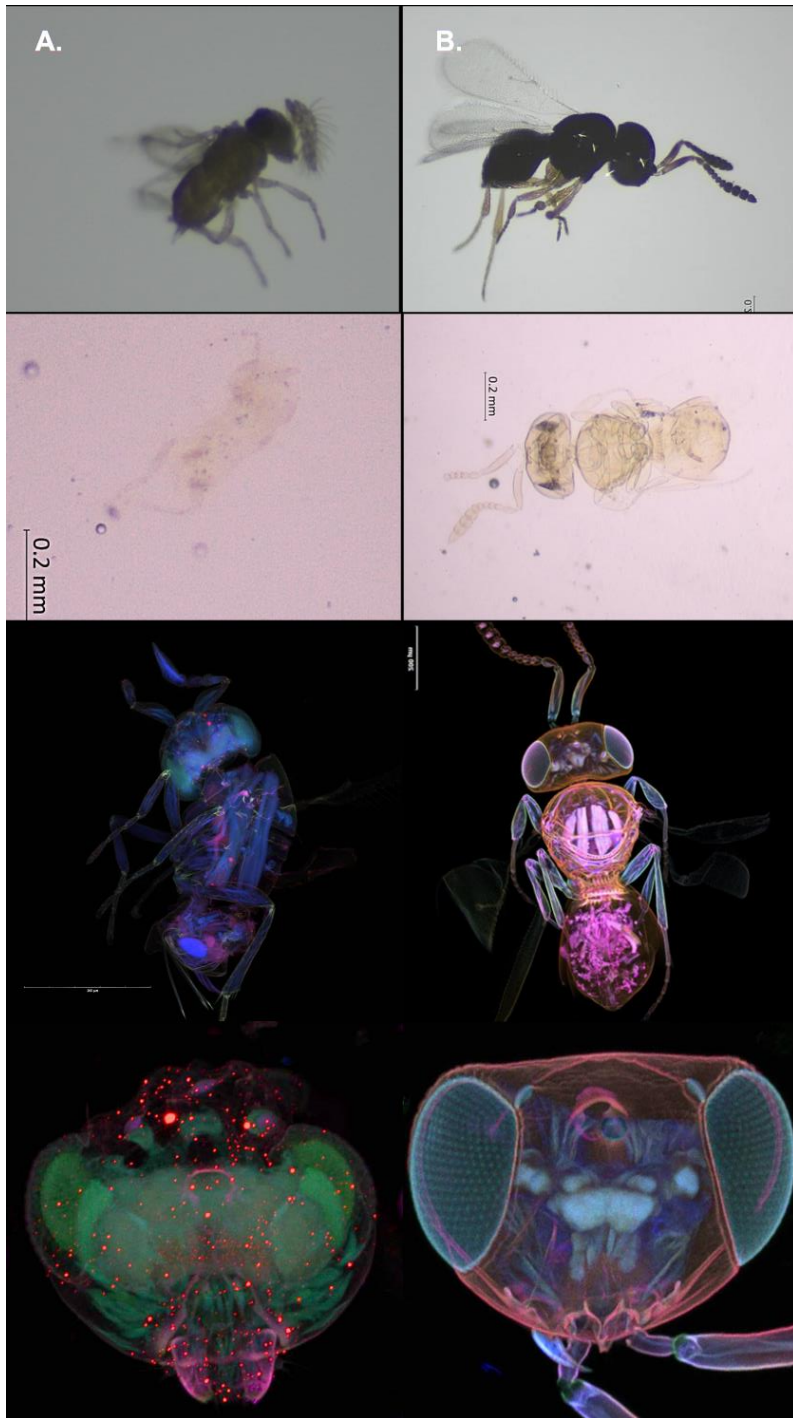


Figura 15. Resultados obtenidos a través del protocolo de inmunofluorescencia para el estudio de avispas parasitoides, utilizando microscopía confocal para examinar el cuerpo entero y visualizar estructuras internas. A) *Tr. pretiosum* B) *Te. podisi*

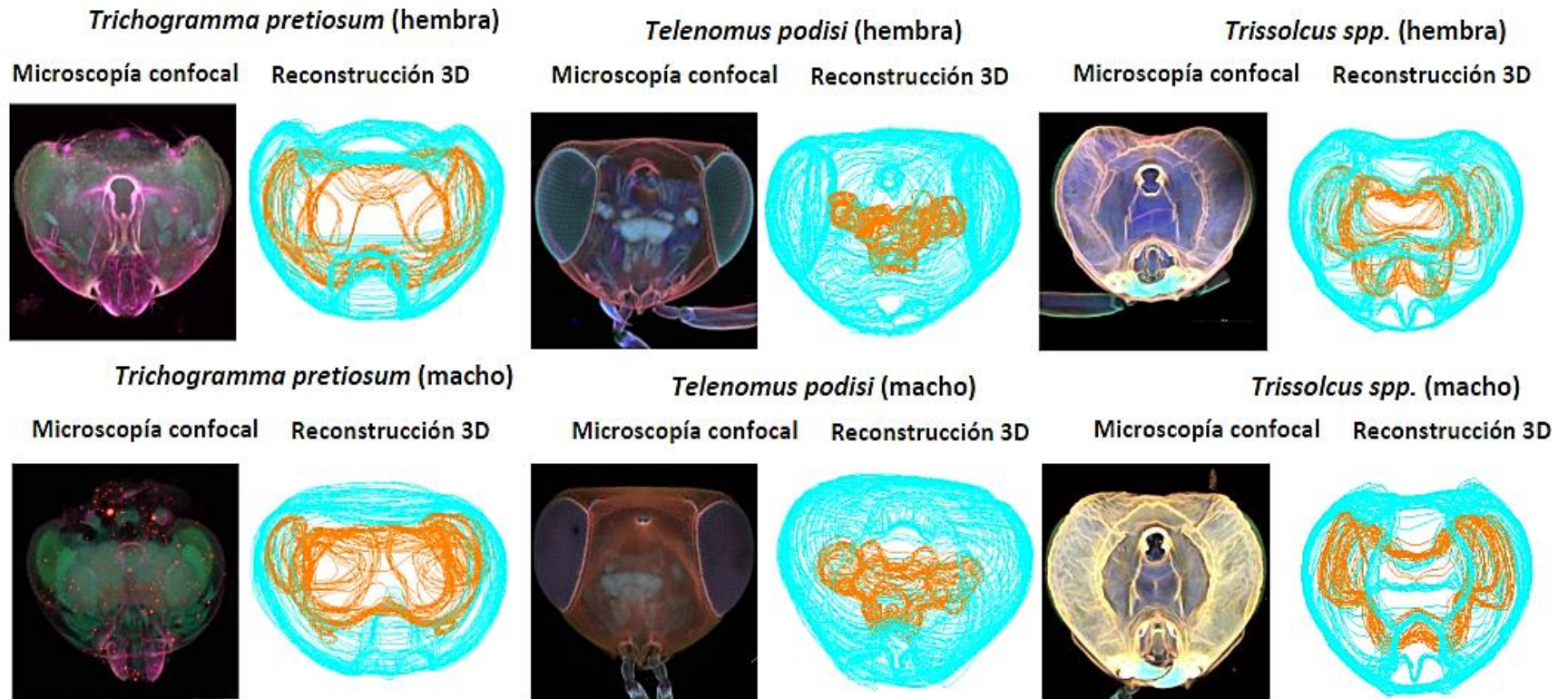


Figura 16. Reconstrucción tridimensional de las cabezas de *Tr. pretiosum*, *Te. podisi* y *Trissolcus spp.* Microscopía confocal: observación de los cerebros de *Tr. pretiosum*, *Te. podisi* y *Trissolcus spp.* Imágenes con resolución 1024x1024 tomadas con objetivos de 10X y 20X junto a su reconstrucción 3D.

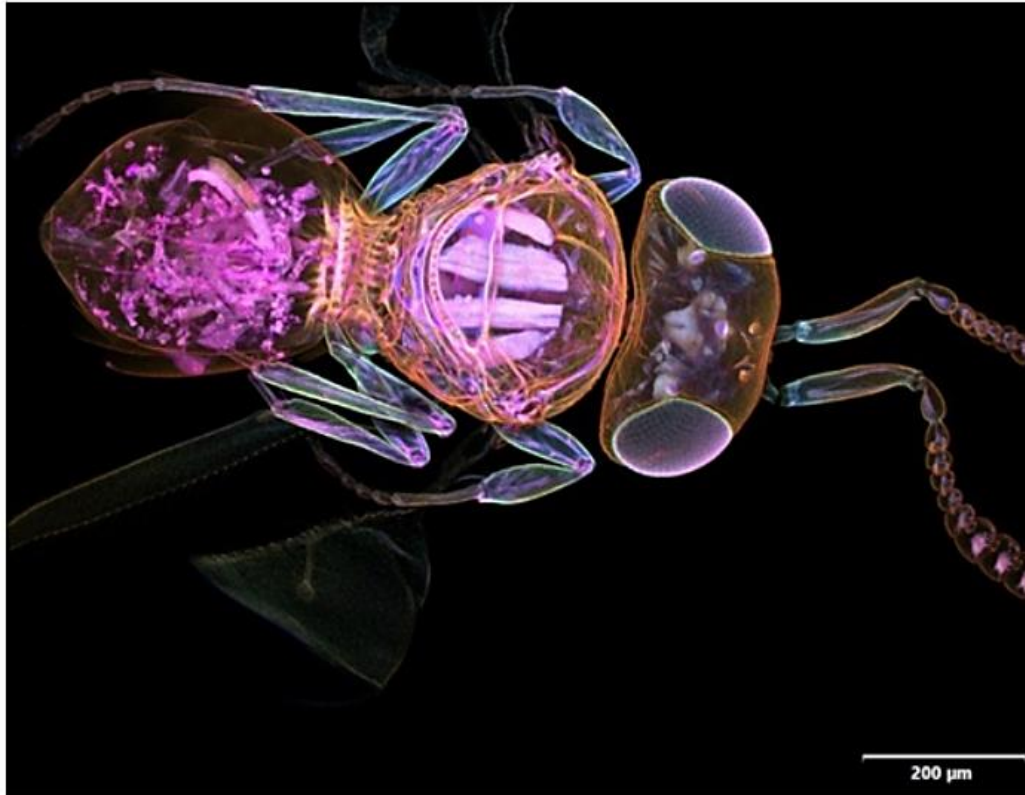


Figura 17. Reconstrucción tridimensional de *Te. podisi*. A la izquierda, microscopía confocal: observación de *Te. podisi* hembra completa 1024x1024 - 10X. A la derecha, reconstrucciones 3D de la cabeza y cuerpo completo.

TABLA 1

Evaluación de protocolos de inmunofluorescencia en artrópodos: un análisis comparativo del estudio realizado por Smolla et al. (2014) y este estudio

Característica	Smolla et. al (2014)	Este estudio	¿Proceso similar o diferente?
Fijación	2 horas a temperatura ambiente o un día a 4 °C	24 horas a temperatura ambiente	Diferente: Duración de la fijación y temperatura Similar: uso de paraformaldehído al 4 % en PBS
Disección	Se realizaron disecciones	No se recurrió a la disección; se mantuvo la cabeza intacta	Diferente: Método de preparación de la muestra.
Aclaración con H₂O₂	H ₂ O ₂ al 35 % , 8–10 días	H ₂ O ₂ al 30 %, 7–10 días para <i>Te. podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i> ; 4–8 días para <i>Tr. pretiosum</i>	Diferente: Concentración del tratamiento con H ₂ O ₂ . Similar: Duración del tratamiento con H ₂ O ₂ .
Permeabilización con Triton X-100	0.2 %, en PBS durante 24 horas a temperatura ambiente, o 3 días a 4 °C	0.5 % en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente	Diferente: Concentración y tiempo de exposición al Triton X-100.
Aplicación de suero	No especificado	Suero de cabra al 1% en PBS durante 24 horas	-
Uso de colorantes específicos y anticuerpos	Dextran biotin, Streptavidin Alexa Fluor 488, DAPI	Anti-Synapsin, Alexa Fluor 555, NucBlue	Similar: Colorantes para teñir y uso de anticuerpos.
Deshidratación y aclaración	Serie graduada de etanol y metil salicilato (duración desconocida).	Serie graduada de etanol y uso de metil salicilato con tiempos específicos por especie. Tiempo de metil entre 10 minutos para <i>Tr. pretiosum</i> y >4 días para <i>Te. podisi</i> o <i>Trissolcus spp.</i>	Similar: Proceso de deshidratación y aclaración con metil salicilato.

Montaje	Cámaras de escaneo personalizadas con metil salicilato	Montaje en portaobjetos con arandelas y esmalte de uñas para sellado.	Diferente: Técnica de montaje.
Microscopio utilizado	TCS SP2 AOBS (Leica), LSM 510 Meta (Zeiss)	Olympus FV-3000	Diferente: Modelo de microscopio confocal.
Análisis de datos y mediciones	Reconstrucción 3D y segmentación manual o automatizada	Reconstrucción cerebral con Reconstruct y mediciones corporales con Canvas X	Diferente: Herramientas de análisis y medición.

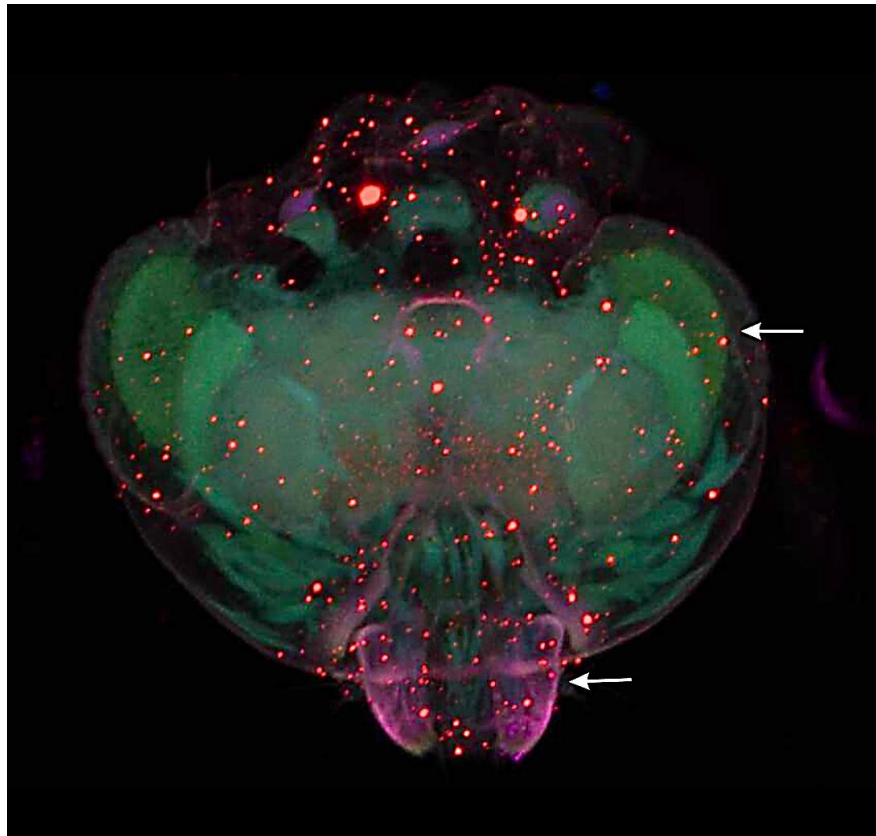


Figura 18. Vistas detalladas de la transparencia obtenida para mandíbulas y omatidios en avispa parasitoides. La imagen permite una observación transparente hasta el nivel de las mandíbulas, demostrando la capacidad de esta técnica para penetrar y revelar estructuras internas de difícil visualización.

4.2 Relaciones alométricas de *Trichogramma pretiosum*, *Trissolcus spp.* y *Telenomus podisi*

Siguiendo el tercer objetivo establecido, enfocado en investigar las relaciones alométricas y evaluar las correlaciones entre el tamaño cerebral y características morfológicas en avispa parasitoides de Panamá, hemos descubierto diferencias significativas en la proporción del volumen del cerebro en comparación con el tamaño de la cabeza y otras partes morfológicas entre las especies examinadas.

Sin embargo, es importante considerar que una limitación encontrada durante el estudio fue la escasez de machos dentro de las muestras que cumplieron exitosamente con el procedimiento, las cuales representaron solo aproximadamente el 18.73 % del total de muestras. Para asegurar una cantidad adecuada de muestras para el análisis, y considerando que no se encontraron diferencias significativas al evaluar el volumen de cerebro y cabeza entre hembras y machos, se optó por combinar los datos de ambos sexos en el estudio. Aunque se mostrarán los datos separados por sexo para brindar la información recolectada completa del volumen del cerebro (Tabla 2) y el volumen de la cabeza (Tabla 3), es importante tener en cuenta que las conclusiones principales se basan en analizar el volumen total del cerebro y la cabeza sin distinguir entre machos y hembras. Este enfoque nos permitió concentrarnos en entender las características generales del cerebro en cada especie.

4.2.1 Volumen promedio del cerebro y la cabeza en hembras y machos de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

En los resultados del volumen cerebral total entre hembras vs machos de las tres especies, se observaron variaciones de interés. Para *Trichogramma pretiosum* no hubo una diferencia significativa, siendo el volumen promedio del cerebro de las hembras de $506\,617\ \mu\text{m}^3$, mientras que para los machos fue ligeramente menor, con $496\,750\ \mu\text{m}^3$. En el caso de *Trissolcus spp.*, las hembras presentaron un volumen cerebral de $1.19 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$, en contraste con los machos, que tuvieron un volumen de $869\,852\ \mu\text{m}^3$. Por último, en *Telenomus podisi*, se observó que los machos mostraron un volumen cerebral de $821\,238\ \mu\text{m}^3$, y las hembras de $642\,335\ \mu\text{m}^3$. Sin embargo, es importante destacar que para *Telenomus podisi* solo se obtuvo un macho dentro de las muestras analizadas exitosamente. Para las especies *Trichogramma pretiosum* y *Trissolcus spp.* no se encontraron diferencias significativas en el volumen del cerebro entre machos y hembras. Debido a que solo se contó con un macho de *Telenomus podisi*, no fue posible realizar este análisis.

En la parte comparativa del volumen de la cabeza entre sexos de las tres especies estudiadas, se llegó a la misma conclusión. Para *Trichogramma pretiosum*, la diferencia en el volumen de la cabeza entre hembras y machos no resultó ser significativa, con las hembras mostrando un volumen promedio de $1.51 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ y los machos un volumen ligeramente menor de $1.41 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$. Por otro lado, *Trissolcus spp.* tampoco mostró una diferencia significativa alcanzando las hembras un volumen de $7.76 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$, en comparación con los $6.32 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ observados en los machos. Para *Telenomus podisi* tampoco fue posible realizar esta comparación debido a la falta de muestras en machos.

TABLA 2

Volumen promedio del cerebro para muestras de las tres especies estudiadas <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>, con segregación entre hembras (H) y machos (M).				
Especie	Sexo	Vol promedio \pm DE (μm^3)	Valor de <i>p</i>	Significancia estadística entre sexos
<i>Trichogramma pretiosum</i> n = 13	H	506 617 \pm 9.78 \times 10 ⁴	0.8856	Diferencia no significativa
<i>Trichogramma pretiosum</i> n = 4	M	496 750 \pm 1.16 \times 10 ⁵		
<i>Trissolcus spp.</i> n = 21	H	1.19 \times 10 ⁶ \pm 2.46 \times 10 ⁵	0.1498	Diferencia no significativa
<i>Trissolcus spp.</i> n = 4	M	869 852 \pm 3.13 \times 10 ⁵		
<i>Telenomus podisi</i> n = 5	H	642 335 \pm 1.47 \times 10 ⁵	-	No se pudo realizar una comparación por falta de muestras
<i>Telenomus podisi</i> n = 1	M	821 238		

No se encontraron diferencias significativas entre el volumen promedio del cerebro de hembras y machos de cada especie. Sin embargo, para la especie *Telenomus podisi* no fue posible realizar el análisis por falta de muestras en machos.

TABLA 3

Volumen promedio de la cabeza para muestras de las tres especies estudiadas <i>Trichogramma pretiosum</i>, <i>Telenomus podisi</i> y <i>Trissolcus spp.</i>, con segregación entre hembras (H) y machos (M)				
Especie	Sexo	Vol promedio \pm DE (μm^3)	Valor de p	Significancia estadística entre sexos
<i>Trichogramma pretiosum</i> n = 13	H	$1.51 \times 10^6 \pm 2.68 \times 10^5$	0.6114	Diferencia no significativa
<i>Trichogramma pretiosum</i> n = 4	M	$1.41 \times 10^6 \pm 3.38 \times 10^5$		
<i>Trissolcus spp.</i> n = 21	H	$7.76 \times 10^6 \pm 1.78 \times 10^6$	0.735	Diferencia no significativa
<i>Trissolcus spp.</i> n = 4	M	$6.32 \times 10^6 \pm 1.07 \times 10^6$		
<i>Telenomus podisi</i> n = 5	H	$10.51 \times 10^6 \pm 2.27 \times 10^6$	-	No se pudo realizar una comparación por falta de muestras
<i>Telenomus podisi</i> n = 1	M	10.40×10^6		

No se encontraron diferencias significativas entre el promedio del volumen de la cabeza de hembras y machos para *Trichogramma pretiosum* ni *Trissolcus spp.* Para *Telenomus podisi* no fue posible realizar el análisis por falta de muestras en machos.

4.2.2 Proporción del volumen del cerebro en el volumen total de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

Los resultados muestran que *Trichogramma pretiosum* (n= 17) tiene la mayor proporción de cerebro en la cabeza, con un valor de 33.37 %, *Trissolcus spp.* tiene una proporción aún menor, de 15.54 %, y *Telenomus podisi* posee la menor de todas, con una relación de proporción que equivale al 6.15 % (Fig. 19).

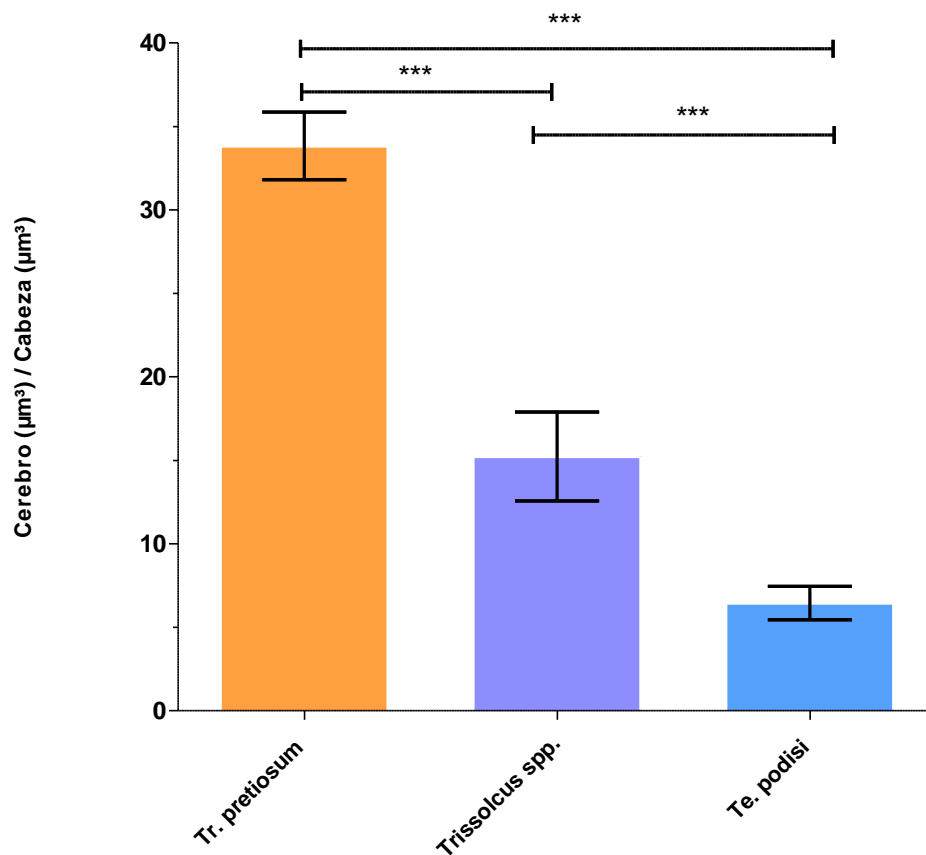


Figura 19. Proporción del volumen del cerebro en el volumen total de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

4.2.2.1 Correlación entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza *Trichogramma pretiosum*

En *Tr. pretiosum* ($n = 17$), se demostró que existe una relación positiva y significativa entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza ($R^2 = 0.9169$, $p < 0.0001$). Se interpreta que el volumen del cerebro aumenta consistentemente a medida que aumenta el volumen de la cabeza (Fig. 20).

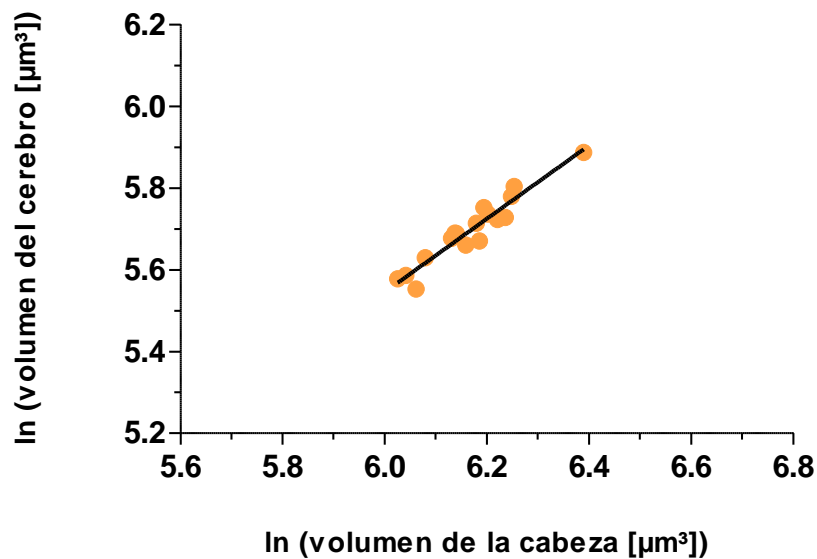


Figura 20. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en *Tr. pretiosum*.

4.2.2.2 Correlación entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza de *Trissolcus spp.*

La regresión lineal de *Trissolcus spp.* ($n = 25$), mostró una correlación positiva y significativa entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza ($R^2 = 0.4883$, $p < 0.001$). Esto sugiere una correlación moderada en la que el volumen del cerebro tiende a aumentar a medida que lo hace el volumen de la cabeza (Fig. 21).

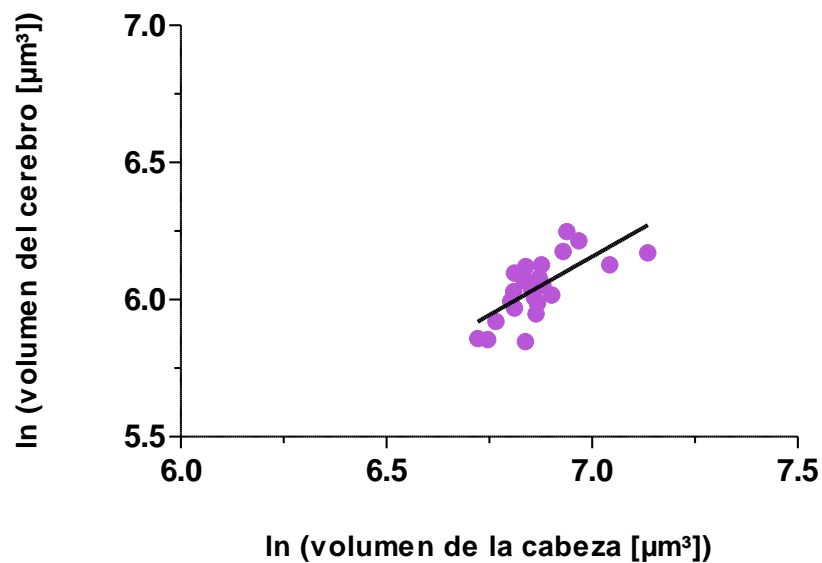


Figura 21. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en *Trissolcus spp.*

4.2.2.3 Correlación entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza de *Telenomus podisi*

Para *Telenomus podisi* ($n = 6$) no pudimos obtener una mayor cantidad de individuos, debido a que, como se mencionó anteriormente, las muestras brindadas como *Te. podisi* pertenecían en realidad a *Trissolcus spp.* Sin embargo, al analizar las 6 muestras, el análisis indicó una correlación positiva pero no significativa entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza ($R^2 = 0.5363$ $p = 0.0979$). Este resultado sugiere que a pesar de que esta relación no es estadísticamente significativa, la tendencia de la correlación es positiva, es decir, un aumento en el volumen de la cabeza podría estar asociado con un aumento en el volumen del cerebro (Fig. 22).

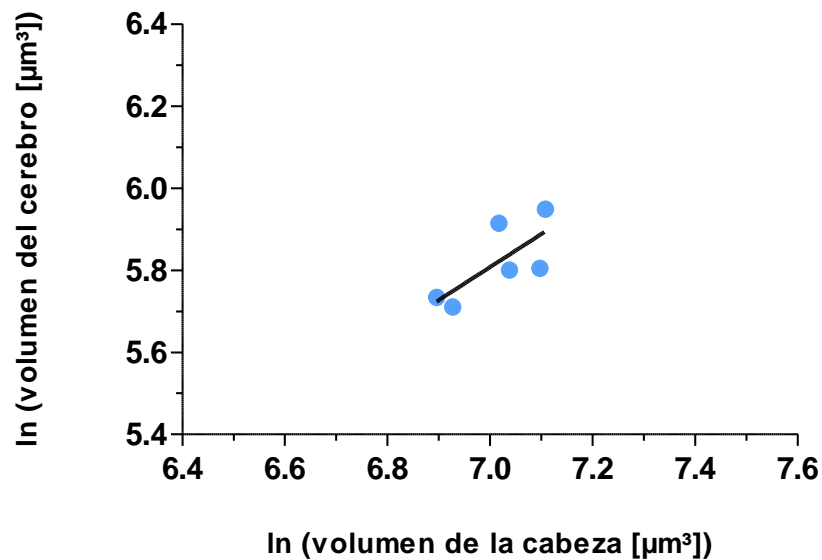


Figura 22. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en *Te. podisi*.

4.2.3 Volumen promedio de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

El volumen promedio de la cabeza en las especies analizadas varía significativamente. *Telenomus podisi* se distingue por tener el volumen promedio más grande, aproximadamente de $1.04 \times 10^7 \mu\text{m}^3$. A continuación, *Trissolcus spp.*, presenta un volumen promedio significativo de $7.53 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. En tercer lugar, *Trichogramma pretiosum* tiene un volumen promedio menor, también con diferencia significativa, de $1.48 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (Fig. 23).

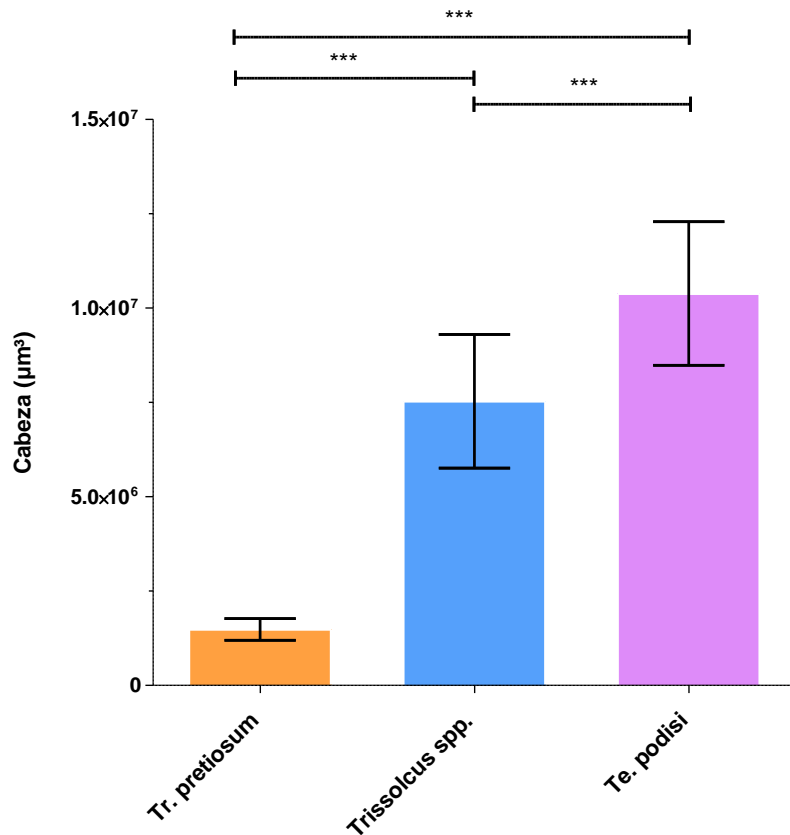


Figura 23. Volumen promedio de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

4.2.4 Volumen promedio del cerebro de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

Para los análisis del volumen del cerebro, *Trissolcus spp.* lidera con el mayor volumen, siendo este de aproximadamente $1.19 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. A continuación, *Telenomus podisi* muestra un volumen promedio de $618\,960 \mu\text{m}^3$, situándolo como un tamaño intermedio en comparación con las otras dos especies. Finalmente, *Trichogramma pretiosum* muestra el volumen promedio más bajo, con $494\,645 \mu\text{m}^3$ (Fig. 24).

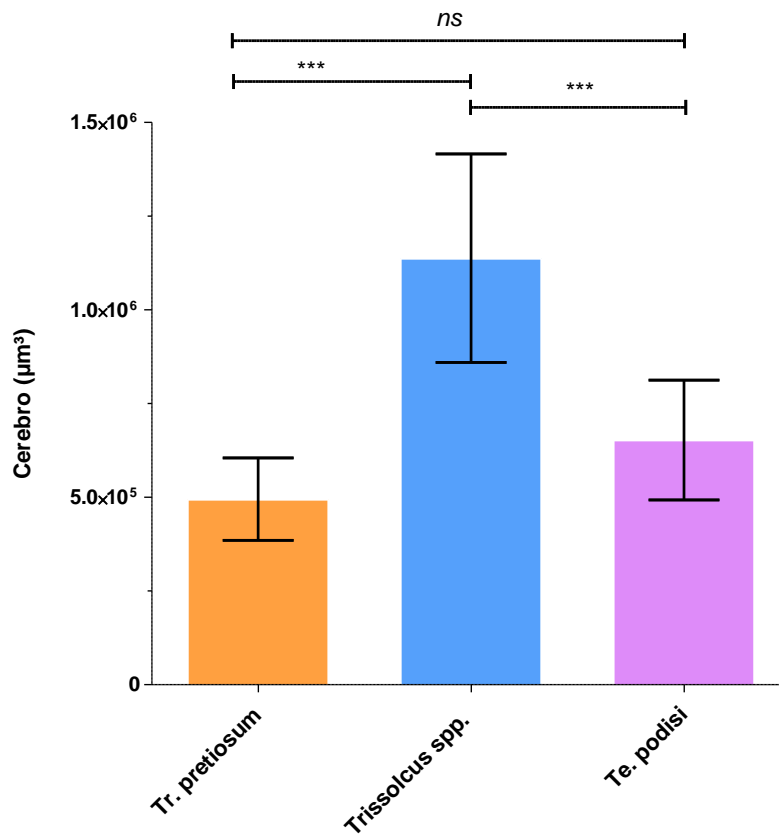


Figura 24. Volumen promedio del cerebro de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.*

4.2.5 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*, *Trissolcus spp.* y *Telenomus podisi*

4.2.5.1 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*

En *Tr. pretiosum* ($n = 17$), se observó una correlación positiva y significativa entre el ancho y el volumen de la cabeza, lo que indica que el volumen de la cabeza aumenta con su ancho ($R^2 = 0.6300$, $p < 0.0001$). La relación entre estas dos medidas es estadísticamente significativa, con un valor p de 0.0001 (Fig. 25).

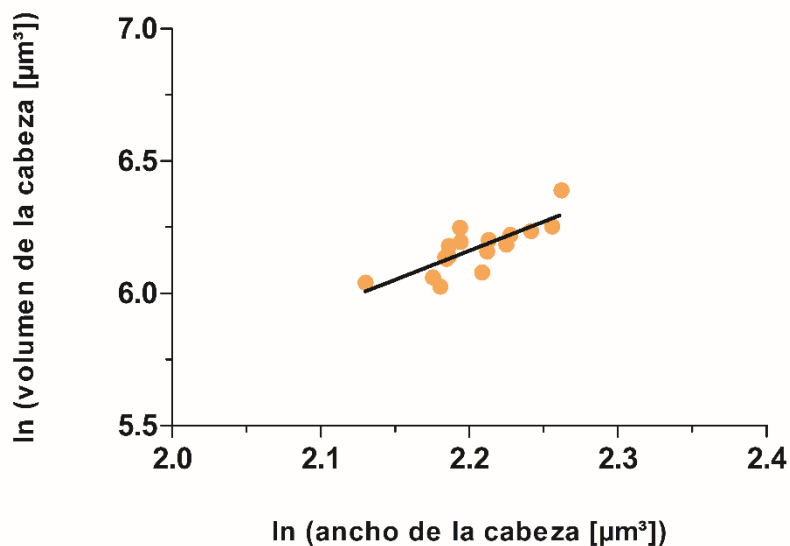


Figura 25. Relación de volumen de la cabeza y ancho de la cabeza en *Tr. pretiosum*.

4.2.5.2 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de *Trissolcus spp.*

En *Trissolcus spp.* ($n = 25$), los análisis revelaron una relación positiva y estadísticamente significativa entre las variables estudiadas ($R^2 = 0.1889$, $p < 0.0299$). Este resultado sugiere que existe una dependencia positiva entre las variables, aunque la correlación es moderada. La significancia estadística de esta relación se evidencia a través del valor p , subrayando su relevancia en el contexto de las variables analizadas (Fig. 26).

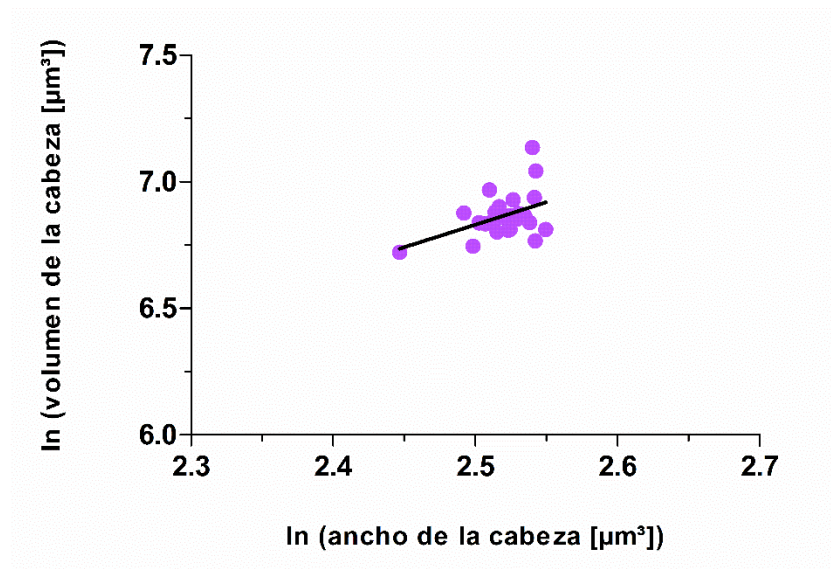


Figura 26. Relación de volumen de la cabeza y ancho de la cabeza en *Trissolcus spp.*

4.2.5.3 Correlación entre el volumen de la cabeza y el ancho de la cabeza de *Telenomus podisi*

En *T. podisi* ($n = 6$), se demostró una correlación positiva fuerte y significativa entre las variables analizadas, con un coeficiente de determinación alto ($R^2 = 0.8048$, $p = 0.01531$). (Fig. 27). Sin embargo, debido al tamaño de la muestra, los análisis deberían repetirse para confirmar este resultado.

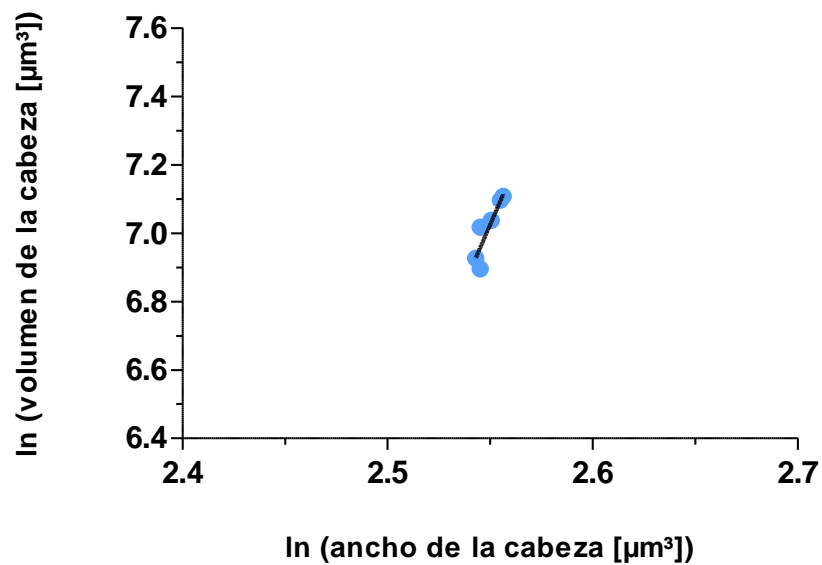


Figura 27. Relación de volumen de la cabeza y ancho de la cabeza en *Te. podisi*.

4.2.6 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*, *Trissolcus spp.* y *Telenomus podisi*

4.2.6.1 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de *Trichogramma pretiosum*

En *Tr. pretiosum* ($n = 17$), se demostró que existe una relación positiva y significativa entre las variables analizadas ($R^2 = 0.5085$, $p < 0.0013$). Esto indica una correlación positiva moderada, donde el volumen del cerebro aumenta a medida que aumenta el ancho de la cabeza (Fig. 28).

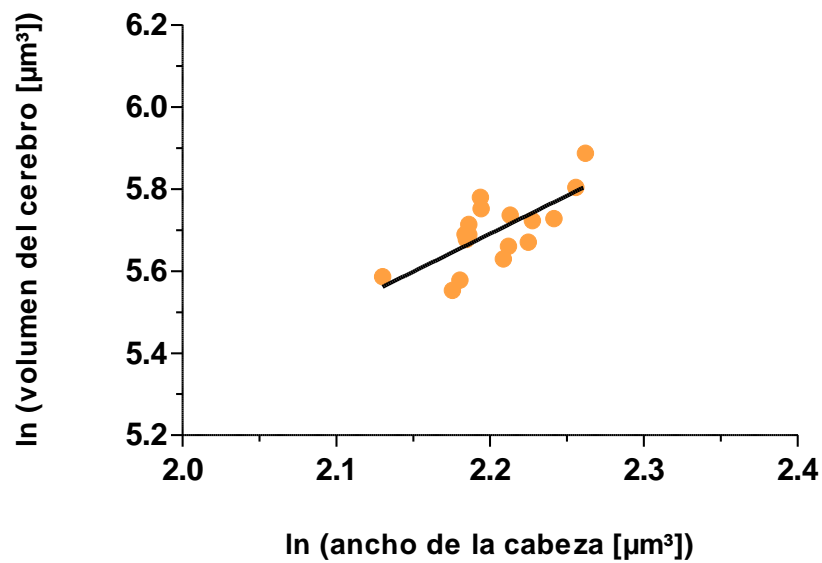


Figura 28. Relación de volumen del cerebro y ancho de la cabeza en *Tr. pretiosum*.

4.2.6.2 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de *Trissolcus* spp.

En *Trissolcus* spp. (n = 25), se identificó una relación positiva y estadísticamente significativa entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza ($R^2 = 0.1583$, $p < 0.0489$). Esto señala una correlación positiva, aunque modesta, indicando que el volumen del cerebro tiende a aumentar con el ancho de la cabeza (Fig. 29).

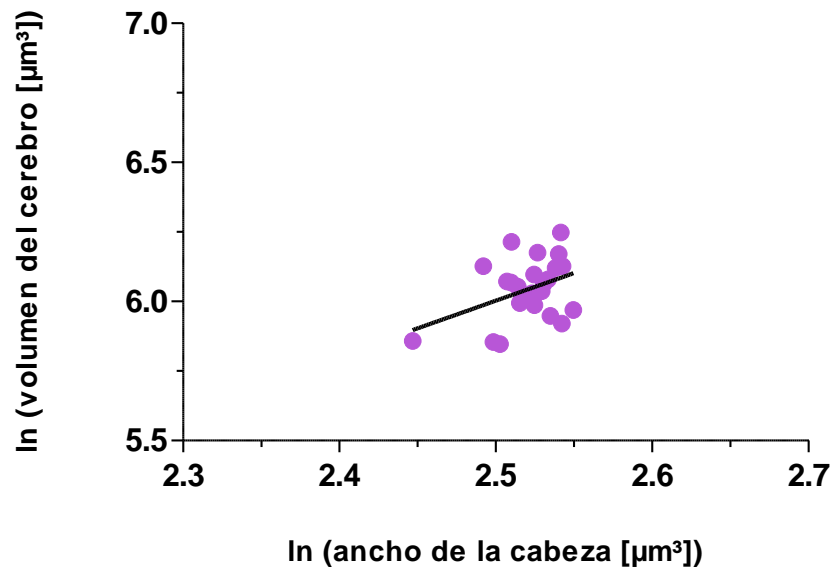


Figura 29. Relación de volumen del cerebro y ancho de la cabeza en *Trissolcus* spp.

4.2.6.3 Correlación entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza de *Telenomus podisi*

Para *Telenomus podisi* ($n = 6$) se contó con pocas muestras. Estos resultados indican una correlación positiva no significativa ($R^2 = 0.5363$, $p = 0.0683$). A pesar de que el valor p (0.0683) sugiere que esta relación no es estadísticamente significativa, la tendencia de la correlación es positiva, es decir, nuestros resultados indican que un aumento en el volumen de la cabeza podría estar asociado con un aumento en el volumen del cerebro. Estos resultados no son concluyentes (Fig. 30).

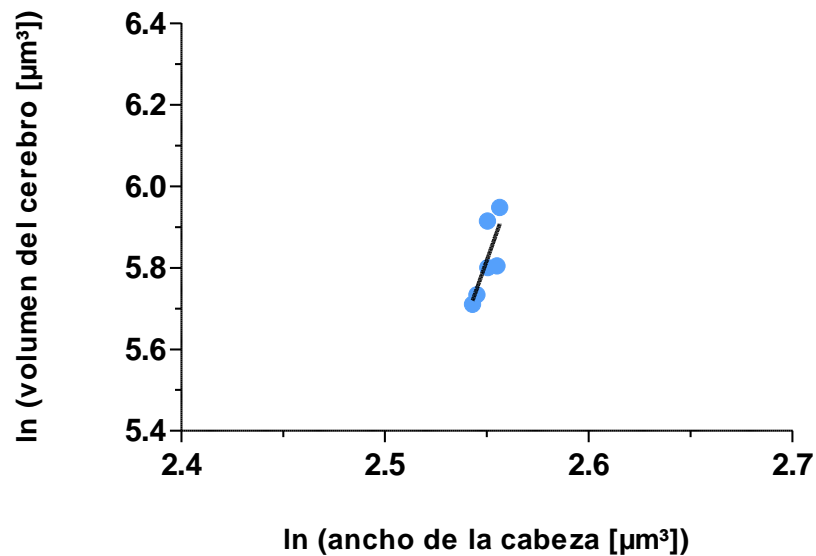


Figura 30. Relación de volumen del cerebro y ancho de la cabeza en *Te. podisi*.

4.2.7 Correlación entre el volumen de la cabeza y el largo del fémur de *Trichogramma pretiosum* y *Trissolcus spp.*

4.2.7.1 *Trichogramma pretiosum*

En la gráfica que muestra la relación entre el volumen de la cabeza y el tamaño del fémur en *Trichogramma pretiosum*, la pendiente de la línea es de aproximadamente 0.1915 ± 0.6621 , existiendo gran variabilidad. Esta relación no es estadísticamente significativa, como lo indica el valor de p de 0.7763 y un R^2 de 0.005547. Esto sugiere que no hay una asociación clara y definida entre el volumen de la cabeza y el largo del fémur para esta especie (Fig. 31).

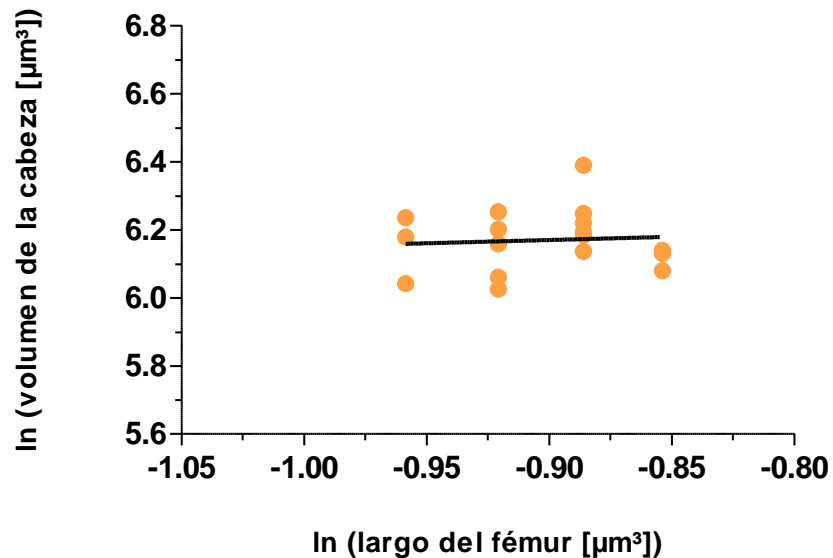


Figura 31. Relación del volumen de la cabeza con el largo del fémur en *Tr. pretiosum*.

4.2.7.2 *Trissolcus spp.*

La relación entre el volumen de la cabeza y el largo del fémur en avispas de *Trissolcus spp.* indica una relación alométrica positiva, con una pendiente de 2.957 ± 0.6175 R^2 de 0.4993. Estos resultados nos indican que existe una relación estadísticamente significativa, respaldado por el valor de p obtenido (< 0.0001) (Fig. 32).

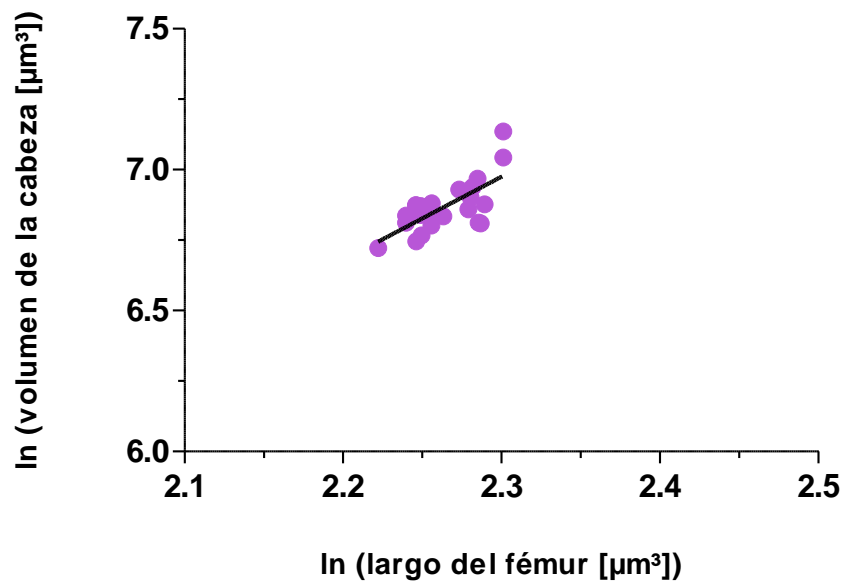


Figura 32. Relación del volumen de la cabeza con el largo del fémur en *Trissolcus spp.*

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

5.1 Protocolo para imágenes con microscopía confocal y reconstrucciones tridimensionales de un organismo completo

En el contexto de nuestro estudio, establecimos dos objetivos principales que orientaron la fase inicial de nuestra investigación: en primer lugar, la mejora de técnicas de microscopía confocal y métodos de inmunomarcaje para lograr una visualización detallada de estructuras cerebrales, empleando marcadores moleculares específicos; y en segundo lugar, el desarrollo de protocolos de fijación y permeabilización optimizados que faciliten una mejor penetración de anticuerpos y marcadores, permitiendo así un análisis más exhaustivo de dichas estructuras.

Nuestra contribución ha sido el desarrollo de un protocolo optimizado, fundamentado en una amplia revisión de la literatura científica. Este trabajo se apoya en las bases sentadas por investigaciones anteriores, como el innovador estudio de Klaus & Schwaroch (2006) que introdujo un método para la visualización de estructuras cuticulares autofluorescentes en insectos mediante microscopía confocal, junto a los aportes de otros investigadores destacados, tales como P. E. Chetverikov (2012), Smolla et al. (2014), y van der Woude et al. (2011), cuyas contribuciones han sido importantes para el desarrollo de un protocolo mejorado para la microscopía confocal y las reconstrucciones tridimensionales en especies de insectos y otros posibles artrópodos, y para facilitar la observación de estructuras internas sin comprometer la integridad física de los tejidos estudiados.

Durante el desarrollo de protocolo de nuestro estudio, encontramos la presencia de una avispa parasitoide, *Trissolcus spp.*, dentro del cultivo suministrado de *Telenomus podisi*. A través de este protocolo, se logró discernir entre ambas especies y confirmar la presencia de *Trissolcus spp.* Este hallazgo fue posible gracias a la diferenciación en el tamaño y estructura del cerebro entre estas dos especies de avispas parasitoides.

De manera similar, autores como Chetverikov (2012) han publicado trabajos sobre la anatomía interna y externa de ácaros eriofioideos, donde también, por medio de la

microscopía confocal, se pudo discernir y diferenciar entre las estructuras morfológicas de especies cercanas, lo cual respalda nuestra observación de que las técnicas de microscopía avanzadas pueden ser herramientas esenciales para identificar variaciones morfológicas que no son fácilmente visibles.

Nuestros resultados no solo revelaron la presencia de *Trissolcus spp.* en cultivos de *Telenomus podisi* mediante la diferenciación en tamaño y estructura del cerebro, sino que también nos permitieron contribuir con algunas incógnitas surgidas en estudios previos sobre el cerebro de estas avispas parasitoides. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por van der Woude et al. (2011), el cual, al intentar capturar imágenes completas del cerebro de organismos como *Trichogramma evanescens*, enfrentó dificultades con la metodología, ya que este procedimiento no lograba visualizar estructuras ocultas bajo los pigmentos oculares. Debido a esto, el procedimiento subsecuente involucró el uso de microscopía de luz convencional. Por medio de nuestro protocolo, este obstáculo se superó, logrando la visualización del cerebro y otras estructuras internas de la cabeza a través de los ojos.

Del mismo modo, otros autores (Smolla et. al, 2014), han descrito protocolos innovadores para el estudio de artrópodos pequeños que facilitan la visualización de estructuras internas sin la necesidad de diseccionar el organismo. El protocolo propuesto en su estudio sirvió como base para el protocolo de esta investigación. Se realizaron modificaciones que permitieron obtener imágenes completas del cuerpo y la cabeza de las especies *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus spp.* sin afectar los tejidos internos, de modo que puedan no solo observarse con mayor claridad, sino también con el individuo intacto.

Algunas similitudes encontradas fueron el uso de paraformaldehído al 4 % en PBS para la fijación (esto es estándar en la preparación de material biológico para microscopía), el uso de peróxido de hidrógeno para aclarar la cutícula con tiempos de exposición bastante cercanos (7 – 10 días), basándose ambos estudios en la pigmentación de la cutícula; el uso de permeabilización con Triton X-100; anticuerpos para teñir diferentes áreas, así como el uso adicional de DAPI (en el estudio de Smolla et. al 2014) y NucBlue (en este estudio); la

deshidratación en serie con etanol y el uso de metil salicilato para la aclaración de tejidos internos.

Nuestras modificaciones se reflejan mayormente en el tiempo y temperatura empleados para estas fases. Por ejemplo, el estudio de Smolla et. al (2014) utiliza una fijación de 2 horas a temperatura ambiente, o de un día a 4 °C, mientras que nosotros decidimos extender este periodo a 24 horas y en temperatura ambiente. Otra diferencia entre ambos protocolos es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Mientras que en ese estudio se utiliza una concentración al 35 %, en este estudio se utilizó una concentración del 30 %.

También, durante el procedimiento hubo modificaciones en el tiempo de exposición al Triton X-100. Durante el protocolo proporcionado por Smolla et. al (2014), se aplicó a temperatura ambiente durante 24 horas, o hasta 3 días a 4 °C. Nuestro protocolo exhibe una exposición menor, de máximo 3 horas a temperatura ambiente, cambiando el volumen utilizado en el vial cada hora, seguido inmediatamente por la aplicación de suero de cabra durante 24 horas. Al finalizar esta parte, nuevamente se lavaron con Triton X-100 durante 5 minutos.

Smolla et. al 2014 no proporcionó información detallada sobre la duración de las muestras en metil salicilato, sin embargo, esto podría ser de importancia, debido a que durante nuestros primeros experimentos las muestras eran incubadas en metil salicilato durante aproximadamente 24 horas, teniendo mejores resultados después de incubarlas por lo menos entre 3 – 5 días, e inclusive se obtuvieron resultados notables al mantener las muestras en metil durante semanas. Esto último fue debido a causas mayores, sin embargo, fue de utilidad para determinar la funcionabilidad de las muestras al sobrepasar el tiempo estimado. El tiempo máximo en que dejamos una muestra de *Te. podisi* o *Trissolcus spp.* en metil salicilato sin que los tejidos se dañaran al observarlos en el microscopio fue de 3 meses, pero esto podría variar en cada muestra de acuerdo con su correcto procesamiento.

Para muestras más pequeñas, como *Tr. pretiosum*, después de 10 minutos de exposición al metil las muestras tenían una gran transparencia. Estas muestras no pudieron dejarse en metil durante un periodo tan largo como el de *Te. podisi* o *Trissolcus spp.*, debido a

que tendían a desintegrarse u oxidarse. Por último, otra variación importante que podría ser de importancia, aunque no estuvo detallada en el estudio de Smolla et. al 2014, fueron las configuraciones específicas del microscopio y sus objetivos. Durante este estudio, se utilizaron cuatro láseres distintos (405 nm (50 mW), 488 nm (20 mW), 561 nm (20 mW), 640 nm (40 mW)).

El perfeccionamiento de estas técnicas de microscopía es una herramienta que se necesita para análisis más profundos, permitiendo el realizar mediciones y reconstrucciones 3D. Además, basados en nuestros hallazgos, coincidimos con otros autores en que estos protocolos mejoran significativamente la investigación, permitiendo estudios más eficientes y sencillos sin depender de técnicas complejas o materiales costosos.

5.2 Relaciones alométricas de *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi*, *Trissolcus spp.*

Siguiendo el tercer objetivo establecido, enfocado en investigar las relaciones alométricas y evaluar las correlaciones entre el tamaño cerebral y características morfológicas en avispa parasitoides de Panamá, hemos descubierto diferencias significativas en la proporción del volumen del cerebro en comparación con el tamaño de la cabeza y otras partes morfológicas entre las especies examinadas.

Uno de los desafíos metodológicos enfrentados fue la proporción menor de machos en las muestras, representando aproximadamente el 18.73 %, por lo que nuestros primeros resultados se enfocaron en la descripción de la comparación del volumen de cerebro y cabeza para las tres especies, segregando las hembras de los machos. Sin embargo, dado que las comparaciones de estos volúmenes totales de cabeza y cerebro entre machos y hembras de *Trichogramma pretiosum* y *Trissolcus spp.* no fueron significativamente diferentes, y para facilitar un mejor análisis, posteriormente se consideraron los datos separados por especie, incluyendo ambos sexos. Para *Telenomus podisi* no fue posible realizar el análisis por falta de muestras en machos.

En particular, *Trichogramma pretiosum* y *Trissolcus spp.* presentaron volúmenes cerebrales y de cabeza muy similares entre sexos, aunque en ambos casos las hembras mostraron volúmenes ligeramente mayores que los machos, pero no fueron diferencias significativas.

Estos hallazgos enfatizan la necesidad de investigar diferencias sexuales al examinar la morfología y posibles adaptaciones en avispas parasitoides, sugiriendo que variaciones en el volumen cerebral y de la cabeza, o una estructuración interna diferente a pesar de tener un volumen similar, podrían reflejar adaptaciones específicas vinculadas al rol ecológico de cada sexo. La tendencia hacia cerebros y cabezas de mayor tamaño en hembras podría indicar ventajas adaptativas, potencialmente relacionadas con exigencias cognitivas o sensoriales específicas, como la búsqueda de hospederos o la oviposición. De aquí en adelante durante la discusión todos los resultados de hembras y machos se integrarán, representando a la especie en conjunto para cada análisis.

Otro de nuestros enfoques fue la comparación de proporción entre el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza. La avispa *Tr. pretiosum* presentó la mayor proporción de volumen cerebral (33.37 %), seguido por *Trissolcus spp.* (15.54 %) y *Telenomus podisi* con el menor volumen (6.15 %). De manera notable, *Tr. pretiosum*, a pesar de tener un tamaño corporal menor, con un promedio de aproximadamente 450 μm de largo, muestra un cerebro con mayor proporción en la cabeza, indicando una inversión significativa en el volumen cerebral. Esto podría interpretarse como una adaptación evolutiva que permite a *Tr. pretiosum* sostener funciones vitales esenciales, contribuyendo a su supervivencia y éxito reproductivo, a pesar de una reducción en el tamaño corporal general (van der Woude et al., 2013; van der Woude & Smid, 2016). Para este género fueron consistentes los hallazgos de una proporción significativamente elevada, ya que, de acuerdo con van der Woude (2011), se encontró que para otra avispa del género *Trichogramma*, *T. evanescens*, la proporción aproximada del volumen cerebral en comparación con el tamaño de la cabeza corresponde a 58.53 %.

Si comparamos esto con las otras dos especies investigadas en este trabajo, se destacan resultados diferentes. En *Trissolcus spp.* se observa una proporción intermedia (15.54 %) en

comparación con *Tr. pretiosum*, y *Te. podisi* muestra una proporción mucho menor (6.15 %). Esto podría indicar que tanto *Trissolcus spp* como *Te. podisi* han buscado equilibrar el tamaño y su capacidad cerebral, no dependiendo de tener un cerebro de mayor tamaño, sino invirtiendo en el tamaño de su cabeza para realizar otras funciones, lo cual se discutirá más adelante.

Complementando los resultados anteriores sobre las relaciones alométricas, también se obtuvieron resultados importantes al comparar el volumen de la cabeza para cada especie. Esto demostró que *Tr. pretiosum* posee el volumen más pequeño $1.48 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, seguido por *Trissolcus spp* con un tamaño aproximado de $7.75 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ y *Te. podisi* con $1.04 \times 10^7 \mu\text{m}^3$. Esto nos indica que, como vimos anteriormente, a pesar de que *Tr. pretiosum* exhibe una proporción mayor de cerebro dentro de su cabeza (33.37 %), esta cabeza sigue siendo más pequeña que la de otras especies de manera significativa, lo cual se ha demostrado también para *T. evanescens*, con un volumen aproximado de $1.18 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (van der Woude, 2011), siendo este un tamaño similar al encontrado para *Tr. pretiosum*.

Sin embargo, a pesar de tener la menor proporción de cerebro, la cabeza de *Te. podisi* sigue siendo la más grande entre las tres especies. Al calcular el volumen de la cabeza de *Te. podisi*, se observó una alta cantidad de músculos alrededor del cerebro mediante imágenes de microscopio confocal, lo que podría sugerir que el gran tamaño de la cabeza de esta especie está arraigado a la necesidad de manipular sus mandíbulas con mayor precisión y fuerza. En otros insectos, como las hormigas, se ha descrito que estas partes bucales son herramientas importantes en insectos (Paul, 2001), ya que desempeñan funciones especializadas, según los requerimientos ecológicos de cada especie. Sin embargo, es importante destacar que esta observación se realizó de manera visual y no se ha comparado con medidas específicas de la musculatura para otras especies, lo que dificulta una conclusión directa en este aspecto. A pesar de esto, la diferencia en el volumen de la cabeza y la presencia de músculos alrededor del cerebro sugieren una posible adaptación relacionada con la manipulación de las mandíbulas en *Te. podisi*. Futuros estudios podrían abordar esta incógnita mediante mediciones precisas y comparativas de la musculatura de la cabeza en diferentes especies, dado que la fuerza y la velocidad del movimiento dependen de los músculos que lo controlan.

La relación entre el volumen del cerebro y el de la cabeza en estas avispas parasitoides sugiere una necesidad de comportamientos más complejos, posiblemente para la localización de huéspedes o la navegación en su entorno, como se mencionó anteriormente, y las restricciones físicas o energéticas asociadas con el desarrollo del cerebro.

Extendiendo el análisis previo, otro de nuestros enfoques fue estudiar también la comparación entre el volumen del cerebro para cada especie, independientemente del volumen de la cabeza. Los resultados encontrados nos indican que, como se esperaba para *Tr. pretiosum*, por ser una especie cercana a *T. evanescens*, el cerebro posee un tamaño bastante grande para el tamaño de su cabeza. *Tr. pretiosum* tiene la cabeza más pequeña en comparación con *Trissolcus spp.* o *Te. podisi*. Sin embargo, no tiene el cerebro más pequeño, indicando una inversión significativa en capacidad cerebral en relación con su tamaño físico. Por otro lado, al realizar el análisis de correlación, encontramos que *Tr. pretiosum* presenta una correlación casi isométrica, por lo que no parece ser una excepción a la Regla de Haller como se había previsto. Sin embargo, podría estar cerca de serlo.

Esta excepción a la regla de Haller se ha publicado con anterioridad para especies como *T. evanescens* (van der Woude et. al, 2013) y *Nasonia vitripennis* (Groothuis & Smid, 2017). En *N. vitripennis* se realizó un estudio en el cual tomaron una línea isogénica de la avispa para introducir variaciones en el tamaño, y se encontró que las avispas más pequeñas tenían una proporción cerebro – cuerpo que se mantenía constante, es decir, se mostraba isometría. Esto no ocurrió con avispas de esa misma línea que fueron de mayor tamaño.

Los autores indicaron que estas muestras pequeñas de *N. vitripennis* actuaban como un caso especial para conectar el comportamiento isométrico de las avispas muy pequeñas con la alometría negativa de las avispas de mayor tamaño. De acuerdo con Groothuis & Smid, esto significaría que el tamaño del cerebro en relación con el cuerpo varía dentro de la misma especie. Sería posible que, de acuerdo con nuestros resultados, *Tr. pretiosum* se mantenga cerca de estos resultados, con una casi isometría.

Al estudiar el cerebro de *Trissolcus spp.*, se destaca que una proporción significativa del mismo está compuesta por los lóbulos antenales. Esta característica es visualmente

comparable con especies como *Cataglyphis nodus* y *Nasonia vitripennis*, en las cuales los lóbulos antenales son notoriamente grandes. En contraste, *Trichogramma pretiosum* o *Telenomus podisi* presentan lóbulos antenales de menor tamaño. Cuando se compara esta estructura en *Trissolcus spp.* con la de otras especies de Hymenoptera, como *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* y *Megalopta genalis*, se observa una clara diferencia morfológica. En estas últimas especies, los lóbulos antenales representan una menor proporción del cerebro, lo que sugiere variaciones significativas en la estructura cerebral entre diferentes especies de Hymenoptera (Insect Brain Data base, 3D visualization). De este modo, *Trissolcus spp.*, con el volumen promedio más alto de cerebro ($1.19 \times 10^6 \mu\text{m}^3$), también parece priorizar el desarrollo cerebral, específicamente en estos lóbulos. Sin embargo, es importante considerar que esta comparación se basa en observaciones visuales y no en mediciones cuantitativas, por lo que se requieren investigaciones adicionales enfocadas en la morfología cerebral y su relación con el comportamiento para validar y profundizar en estos hallazgos.

Para *N. vitripennis*, una especie que también posee lóbulos de gran tamaño en comparación con otros insectos en el volumen total de su cabeza (Insect Brain Data base, 3D visualization), también se ha destacado su tamaño, con un volumen relativo (%) de 11.92 ± 0.67 , en comparación con *A. mellifera* que posee 5.67 ± 0.75 o *Drosophila melanogaster*, con 4.59 ± 0.44 . De acuerdo con Groothuis et. al 2019, en estas especies la variabilidad podría indicar una adaptación para funciones específicas, como el manejo de información de las feromonas lo que podría sugerir una inversión tanto en el desarrollo de capacidades para cumplir con las necesidades más avanzadas, como el tamaño de la cabeza para un mejor desarrollo de musculatura, glándulas y otros. Aunque no se determinó el volumen de los lóbulos olfativos en nuestro estudio, su tamaño sugiere la importancia de estudiarlos más a fondo. Por ende, análisis futuros enfocados en examinar estas regiones cerebrales son necesarios.

En un estudio realizado por van der Woude et. al, 2018, donde se comparó la memoria retentiva visual y olfatoria de *N. vitripennis* y *T. evanescens* en avispas con tamaños modificados, *N. vitripennis* presentó un nivel de retención de memoria visual y olfativa significativamente menor que *T. evanescens*. Sin embargo, al analizar las muestras pequeñas

vs las grandes, las avispas de menor tamaño obtuvieron una mayor tasa de respuesta durante las pruebas de memoria olfativa. Durante este estudio, se reveló que la retención olfativa era mucho más dominante que la visual, lo cual sugirió que, tanto en ambientes controlados como no controlados, estas avispas utilizan más sus facultades olfativas para la oviposición o reconocimiento de huéspedes.

Te. podisi, a pesar de tener el mayor volumen de cabeza ($1.04 \times 10^7 \mu\text{m}^3$), posee el menor tamaño de cerebro. Esto podría implicar que *Te. podisi* puede realizar sus funciones eficientemente sin tener que recurrir a un cerebro más grande, y, al igual que *Trissolcus spp.*, que exista la necesidad de tener espacio dentro de la cabeza para otras estructuras, como las ya mencionadas mandíbulas. Debido a la falta de información documentada previamente, no se podría afirmar si esto se ha observado o estudiado antes.

Estas observaciones podrían reflejar diferentes estrategias adaptativas o de supervivencia entre estas tres especies, donde el tamaño del cerebro y la inversión en capacidades de comportamiento o sensoriales no necesariamente se alinean con el tamaño de la cabeza. Sabemos que la miniaturización implica consecuencias en cómo evoluciona el sistema nervioso, especialmente si este cambio de tamaño alcanza niveles como los reportados para las especies presentadas en este estudio. De acuerdo con los trabajos por Polilov (2012, 2016), estas consecuencias pueden incluir la simplificación de ganglios, incremento en el tamaño del cerebro e inclusive una disminución en el tamaño o cantidad de neuronas. Las habilidades que pueden llevar a cabo estos insectos abarcan temas como la memoria y el aprendizaje, lo que involucra un desarrollo que puede variar para cada especie dependiendo de sus necesidades. De acuerdo con la investigación llevada a cabo por Polilov et. al (2019), en avispas como *Trichogramma* se han descrito estudios que reflejan la capacidad de aprendizaje asociativo y memoria de estímulos olfativos, y en ácaros también se han llevado a cabo estudios que demuestran el aprendizaje, pero hay pocas investigaciones que demuestran cómo los cambios en el sistema nervioso de insectos miniaturizados afectan el comportamiento y sus capacidades. A medida que se realicen más estudios sobre los cambios observados en el cerebro de estos insectos, se podría alcanzar un mayor entendimiento de su ecología y fisiología.

También se abordaron otro tipo de correlaciones. Se comparó el volumen del cerebro y el volumen de la cabeza con el ancho de la cabeza. Las comparaciones entre el volumen de la cabeza y ancho de esta para *Tr. pretiosum* indicaron una correlación significativa. Algo muy parecido se observó para las avispas *Te. podisi*, donde se exhibió una fuerte correlación positiva (R^2 de 0.8048 $p = 0.0153$). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para confirmar esta información, especialmente considerando que el análisis estadístico se basó en solo seis muestras. Este resultado podría indicar que el ancho de la cabeza no es un buen indicador para analizar el volumen de la cabeza en esta especie.

Los resultados obtenidos para la correlación entre el volumen de la cabeza con el ancho de la cabeza en *Tr. pretiosum* ($R^2 = 0.6300$) y un valor p de 0.0001, son consistentes con los obtenidos por van der Woude (2011), donde al comparar el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza se obtuvo un resultado similar. Las avispas parasitoides de *Trissolcus spp.*, presentaron resultados inconclusos, con un valor de $p = 0.0299$ y un R^2 de 0.1889. Al realizar esta comparación morfológica entre el volumen del cerebro y el ancho de la cabeza, tanto para *Tr. pretiosum* como para *Trissolcus spp.* se obtuvieron resultados que indican una correlación positiva moderada. *Te. podisi* mostró tendencia hacia una correlación positiva, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes. Esto puede deberse a la cantidad obtenida de muestras de esta especie, ya que no fueron suficientes.

Otro planteamiento que se realizó fue el análisis del volumen de la cabeza y el volumen del cerebro con el largo del fémur, donde obtuvimos resultados diferentes. Hasta el momento, en *Tr. pretiosum* no se encontró una relación estadísticamente significativa, con un valor de p de 0.7763 y un R^2 de 0.005547. Los resultados obtenidos para *T. evanescens* por van der Woude (2011), revelan que sí hubo una correlación significativa entre el fémur y el volumen del cerebro. Esta inconsistencia de resultados puede deberse a que tanto el tamaño del cerebro como el de la cabeza son independientes al tamaño del cuerpo en la avispa *Tr. pretiosum*, así como también fallos en la medición del fémur, debido a que en nuestro estudio la primera mitad de las muestras no fueron medidas con microscopía confocal, sino con el estereoscopio. No obstante, para *Trissolcus spp.* encontramos una relación significativa entre

el tamaño de la cabeza y el largo del fémur, con un valor de $p < 0.0001$, confirmando que la relación es fuerte y consistente.

La culminación de este estudio contribuye a la comprensión y aplicación de técnicas avanzadas de microscopía para la investigación de la morfología y biología de organismos complejos. Hemos aportado información basada en los esfuerzos y descubrimientos de investigadores previos, y a través de nuestras innovaciones y ajustes metodológicos, hemos ampliado el alcance y la eficacia de las técnicas de microscopía confocal y reconstrucción tridimensional. Nuestra investigación no solo ha enriquecido el conocimiento existente sobre la estructura cerebral de especies específicas, sino que también ha establecido una base firme para futuras exploraciones en este ámbito.

También, este estudio amplía nuestro conocimiento sobre las relaciones alométricas y la biología de importantes avispas parasitoides presentes en Panamá, y establece una base sólida para futuras investigaciones. Consideramos que es importante continuar perfeccionando los protocolos que hemos desarrollado. Además, el descubrimiento de *Trissolcus spp.* en cultivos de *Telenomus podisi* subraya la importancia de revisar y mejorar los protocolos de bioseguridad para asegurar una clasificación precisa de las especies. Este hallazgo refuerza la necesidad de estas técnicas avanzadas para la identificación, permitiendo confirmar la autenticidad de las muestras recolectadas, especialmente en situaciones donde las diferencias morfológicas externas no son evidentes, y para el estudio profundo de la anatomía interna y las relaciones alométricas.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1. La comparación entre el cerebro y la cabeza de las tres especies nos demuestra que, a pesar de que son avispas parasitoides con estilos de vida muy similares, podrían estar desarrollando su morfología de manera muy diferente, en base a tareas específicas que necesiten llevar a cabo, reflejando así diferencias evolutivas y adaptativas con diferencias significativas entre ellas.
2. Los hallazgos sugieren que el ancho de la cabeza no proporciona una medida fiable para inferir el volumen del cerebro de las avispas parasitoides.
3. Los resultados obtenidos para *Trichogramma pretiosum* indican isometría. Por otro lado, tanto *Trissolcus spp.* como *Telenomus podisi* sí parecen cumplir con la regla de Haller.
4. En las avispas *Trichogramma* no se demostró una relación entre el volumen del cerebro y el largo del fémur, a diferencia de *Trissolcus spp.*, lo que sugiere distintas adaptaciones evolutivas.
5. A pesar de que las hembras de las avispas *Trichogramma* y *Trissolcus spp.* llevan a cabo algunas funciones diferentes a los machos, no se encontraron diferencias significativas en el volumen total de la cabeza y cerebro.

CAPÍTULO VI. LIMITACIONES

El estudio ha logrado cumplir con los objetivos planteados; no obstante, deseamos señalar algunas limitaciones encontradas durante la realización de la investigación:

1. **Cantidad de machos en la muestra.** La escasa presencia de machos en los cultivos de avispas parasitoides observada durante el estudio podría obstaculizar los análisis necesarios para comparar la alometría entre sexos. Esto se debe a que el estudio detallado de la compartimentalización cerebral requiere de análisis estadísticos más refinados y específicos para cada sexo.
2. **Correcciones y ajustes del protocolo.** Aunque el uso del microscopio confocal representa una herramienta ideal para examinar los cerebros sin comprometer la integridad de los tejidos internos, el proceso de preparación de cada grupo de muestras puede prolongarse hasta aproximadamente dos semanas. Esto implica que cualquier corrección de errores o ajuste metodológico para optimizar los resultados puede demandar tiempo adicional.
3. **Cantidad total de muestras.** La imposibilidad de extender el periodo del protocolo, sumado a los desafíos iniciales en la aplicación de la técnica con todas las muestras, resultó en una cantidad de muestras inferiores a la anticipada. Este factor limitó nuestra capacidad de perfeccionar el método desde el principio.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

1. Para estudios alométricos que buscan entender las variaciones de tamaño y forma entre hembras y machos, es crucial realizar una recolección que tenga en consideración que en las poblaciones de avispas parasitoides observamos una predominancia de hembras. Esto contribuirá a lograr hallazgos más exactos y confiables.
2. Continuar con la innovación en las técnicas de preparación de muestras para reducir aún más el tiempo necesario. La implementación de protocolos mejorados o la adopción de nuevas tecnologías complementarias puede facilitar un procesamiento más rápido sin sacrificar la calidad de los resultados. Esto agilizará el proceso investigativo permitiendo correcciones y ajustes metodológicos de manera más eficiente.
3. Organizar el periodo experimental de forma estratégica para aprovechar al máximo la capacidad de la metodología. Esto permitiría acumular una mayor cantidad de datos y explorar en profundidad variaciones sutiles que pueda surgir al estudiar diferentes especies.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

- Albert, J. S., & Johnson, D. M. (2012). Diversity and Evolution of Body Size in Fishes. *Evolutionary Biology*, 39(3), 324–340. <https://doi.org/10.1007/s11692-011-9149-0>
- Allaire, A., Picard-Jean, F., & Bisailon, M. (2015). Immunofluorescence to Monitor the Cellular Uptake of Human Lactoferrin and its Associated Antiviral Activity Against the Hepatitis C Virus. *Journal of Visualized Experiments*, 104. <https://doi.org/10.3791/53053>
- Angelini, D. R., & Kaufman, T. C. (2005). Insect appendages and comparative ontogenetics. *Developmental Biology*, 286(1), 57–77. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.006>
- Austin, A. D., Johnson, N. F., & Downton, M. (2005). SYSTEMATICS, EVOLUTION, AND BIOLOGY OF SCELIONID AND PLATYGASTRID WASPS. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 553–582. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130500>
- Auzel, F. (2004). Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. *Chemical Reviews*, 104(1), 139–174. <https://doi.org/10.1021/cr020357g>
- Battisti, L., Warmling, J. V., Vieira, C. F., Oliveira, D. H. R., Lima, Y. R. A., Potrich, M., Bueno, A. F., & Lozano, E. R. (2020). Side Effects of Organic Products on *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygastridae). *Journal of Economic Entomology*, 113(4), 1694–1701. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa119>
- Blanckenhorn, W. U. (2000). The Evolution of Body Size: What Keeps Organisms Small? *The Quarterly Review of Biology*, 75(4), 385–407. <https://doi.org/10.1086/393620>
- Britton, A., Whitaker, R., & Whitaker, N. (2012). Here be a dragon: exceptional size in a saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) from the Philippines. *Herpetological Review*, 43, 541–546.
- Cabrera-del Sol, H., & Cervantes, F. A. (2023). ¿Ciervos o ratones? Conoce a los peculiares tragúlidos. *Therya ixmana*, 2(3), 99–101. https://doi.org/10.12933/therya_ixmana-23-389
- Carichner, G. (2013, marzo 25). Square-Cube Law Revisited for Airships. *AIAA Lighter-Than-Air Systems Technology (LTA) Conference*. <https://doi.org/10.2514/6.2013-1340>
- Chetverikov, S. S. (1915). The main factor of the evolution of insects. *Izv. Mok. Entomology*, 1, 14–24.
- Ciofi, C. (1999). THE KOMODO DRAGON. *Scientific American*, 280(3), 84–91.

- Coyle, D. R., & Gandhi, K. J. K. (2012). The Ecology, Behavior, and Biological Control Potential of Hymenopteran Parasitoids of Woodwasps (Hymenoptera: Siricidae) in North America. *Environmental Entomology*, 41(4), 731–749. <https://doi.org/10.1603/EN11280>
- De Matos, L. L., Trufelli, D. C., De Matos, M. G. L., & Da Silva Pinhal, M. A. (2010). Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights*, 5, BMI.S2185. <https://doi.org/10.4137/BMI.S2185>
- Dendi, D., Ajong, S. N., Amori, G., & Luiselli, L. (2021). Decline of the Commercially Attractive White Morph in Goliath Beetle Polymorphic Populations. *Diversity*, 13(8), 388. <https://doi.org/10.3390/d13080388>
- dos Reis, S. F., Clemente-Carvalho, R. B. G., dos Santos, C. M. S. F. F., Lopes, R. T., Von Zuben, F. J., Laborda, P. R., & Perez, S. I. (2021). Skull diversity and evolution in miniaturized amphibians, genus *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae). *The Anatomical Record*, 304(6), 1329–1343. <https://doi.org/10.1002/ar.24554>
- Eberhard, W. G., & Wcislo, W. T. (2011). *Grade Changes in Brain–Body Allometry* (pp. 155–214). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387668-3.00004-0>
- Eberhard, W. G., & Wcislo, W. T. (2012, diciembre). Cerebros en miniatura. El modo en que las especies de menor tamaño resuelven el problema de alojar y mantener un cerebro voluminoso arroja nueva luz sobre la evolución del sistema nervioso. *American Scientist Magazine*.
- Essner, R. L., Pereira, R. E. E., Blackburn, D. C., Singh, A. L., Stanley, E. L., Moura, M. O., Confetti, A. E., & Pie, M. R. (2022). Semicircular canal size constrains vestibular function in miniaturized frogs. *Science Advances*, 8(24). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn1104>
- Etienne, R. S., de Visser, S. N., Janzen, T., Olsen, J. L., Olf, H., & Rosindell, J. (2012). Can clade age alone explain the relationship between body size and diversity? *Interface Focus*, 2(2), 170–179. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0075>
- Felipe-Victoriano, M., Talamas, E. J., & Sánchez-Peña, S. R. (2019). Scelionidae (Hymenoptera) parasitizing eggs of *Bagrada hilaris* (Hemiptera, Pentatomidae) in Mexico. *Journal of Hymenoptera Research*, 73, 143–152. <https://doi.org/10.3897/jhr.73.36654>
- Fritschy, J. (2008). Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *European Journal of Neuroscience*, 28(12), 2365–2370. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x>
- Galetti, M., Moleón, M., Jordano, P., Pires, M. M., Guimarães, P. R., Pape, T., Nichols, E., Hansen, D., Olesen, J. M., Munk, M., de Mattos, J. S., Schweiger, A. H., Owen-Smith,

- N., Johnson, C. N., Marquis, R. J., & Svenning, J. (2018). Ecological and evolutionary legacy of megafauna extinctions. *Biological Reviews*, *93*(2), 845–862. <https://doi.org/10.1111/brv.12374>
- Gallego, J. R., Guerrero-Manzano, J., Fernández-Maldonado, F. J., & Cabello, T. (2019). Susceptibility of the egg parasitoid *Trichogramma achaeae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to selected insecticides used in tomato greenhouses. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *17*(2), e1009. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019172-14413>
- Garzón, M. (2016). *Validación del protocolo de análisis de diversidad genética en Leoncillos (Cebuella pygmaea) mediante el uso de marcadores moleculares microsatelites*. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO.
- Gavrilov, V. M. (2013). Origin and development of homiothermy: A case study of avian energetics. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *04*(08), 1–17. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.48A1001>
- Gayon, J. (2000). History of the Concept of Allometry. *American Zoologist*, *40*(5), 748–758. <https://doi.org/10.1093/icb/40.5.748>
- Glaw, F., Köhler, J., Hawlitschek, O., Ratsavina, F. M., Rakotoarison, A., Scherz, M. D., & Vences, M. (2021). Extreme miniaturization of a new amniote vertebrate and insights into the evolution of genital size in chameleons. *Scientific Reports*, *11*(1), 2522. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80955-1>
- Groothuis, J., & Smid, H. M. (2017). *Nasonia* Parasitic Wasps Escape from Haller’s Rule by Diphasic, Partially Isometric Brain-Body Size Scaling and Selective Neuropil Adaptations. *Brain, Behavior and Evolution*, *90*(3), 243–254. <https://doi.org/10.1159/000480421>
- Gruner, L., & Chalumeau, F. (1977). Biologie et Élevage de *Dynastes H. Hercules* en Guadeloupe (Coleoptera, *Dynastinae*). *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*, *13*(4), 613–624. <https://doi.org/10.1080/21686351.1977.12278661>
- Hanken, J., & Wake, D. B. (1993). Miniaturization of Body Size: Organismal Consequences and Evolutionary Significance. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *24*(1), 501–519. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.002441>
- Hanken, J., Wake, D. B., & Freeman, H. L. (1999). Three New Species of Minute Salamanders (Thorius: Plethodontidae) from Guerrero, México, Including the Report of a Novel Dental Polymorphism in Urodeles. *Copeia*, *1999*(4), 917. <https://doi.org/10.2307/1447967>

- Hassan, S. A. (1993). The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: Achievements and outlook. *Pesticide Science*, 37(4), 387–391. <https://doi.org/10.1002/ps.2780370412>
- Haverkamp, A., & Smid, H. M. (2014). Octopamine-like immunoreactive neurons in the brain and subesophageal ganglion of the parasitic wasps *Nasonia vitripennis* and *N. giraulti*. *Cell and Tissue Research*, 358(2), 313–329. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1960-3>
- Hernández-Trejo, A., Estrada Drouaillet, B., Rodríguez-Herrera, R., García Giron, J. M., Patiño-Arellano, S. A. A., & Osorio-Hernández, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 803–813. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1665>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining* (pp. 299–311). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Jiménez-Martínez, E. (2009). *Métodos de Control de Plagas*. Universidad Nacional Agraria.
- Jonkman, J., & Brown, C. M. (2015). Any Way You Slice It—A Comparison of Confocal Microscopy Techniques. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 26(2), 54–65. <https://doi.org/10.7171/jbt.15-2602-003>
- Kruska, D. C. T. (2005). On the Evolutionary Significance of Encephalization in Some Eutherian Mammals: Effects of Adaptive Radiation, Domestication, and Feralization. *Brain, Behavior and Evolution*, 65(2), 73–108. <https://doi.org/10.1159/000082979>
- Kruska, D. C. T. (2007). The Effects of Domestication on Brain Size. En *Evolution of Nervous Systems* (pp. 143–153). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370878-8/00054-9>
- Kühnel, S., Brückner, A., Schmelzle, S., Heethoff, M., & Blüthgen, N. (2017). Surface area–volume ratios in insects. *Insect Science*, 24(5), 829–841. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12362>
- Lahiri, S., Orr, D., Sorenson, C., & Cardoza, Y. J. (2017). Behavior of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) Adults under Overwintering Conditions. *Journal of Entomological Science*, 52(1), 15–28. <https://doi.org/10.18474/JES16-06.1>
- Lanet, E., & Maurange, C. (2014). Building a brain under nutritional restriction: insights on sparing and plasticity from *Drosophila* studies. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00117>

- Laursen, L., & Bekoff, M. (1978). *Loxodonta africana*. *Mammalian Species*, 92, 1. <https://doi.org/10.2307/3503889>
- Lee, M. S. Y., Cau, A., Naish, D., & Dyke, G. J. (2014). Sustained miniaturization and anatomical innovation in the dinosaurian ancestors of birds. *Science*, 345(6196), 562–566. <https://doi.org/10.1126/science.1252243>
- Lindsey, A. R. I., Kelkar, Y. D., Wu, X., Sun, D., Martinson, E. O., Yan, Z., Rugman-Jones, P. F., Hughes, D. S. T., Murali, S. C., Qu, J., Dugan, S., Lee, S. L., Chao, H., Dinh, H., Han, Y., Doddapaneni, H. V., Worley, K. C., Muzny, D. M., Ye, G., ... Werren, J. H. (2018). Comparative genomics of the miniature wasp and pest control agent *Trichogramma pretiosum*. *BMC Biology*, 16(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0520-9>
- Livezey, B. C. (1993). An ecomorphological review of the dodo (*Raphus cucullatus*) and solitaire (*Pezophaps solitaria*), flightless Columbiformes of the Mascarene Islands. *Journal of Zoology*, 230(2), 247–292. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb02686.x>
- Löhr, B., Díaz Niño, M. F., Manzano, M. R., Narváez Vásquez, C. A., Gómez-Jiménez, M. I., Carabalí, A., Vargas, G., Kondo, T., & Bustillo Pardey, A. E. (2018). *Uso de parasitoides en el control biológico de insectos plaga en Colombia*.
- Lomolino, M. V. (2005). Body size evolution in insular vertebrates: generality of the island rule. *Journal of Biogeography*, 32(10), 1683–1699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01314.x>
- Makarova, A. A., Polilov, A. A., & Chklovskii, D. B. (2021). Small brains for big science. *Current Opinion in Neurobiology*, 71, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.09.007>
- Makarova, A. A., Veko, E. N., & Polilov, A. A. (2021). Metamorphosis of the central nervous system of *Trichogramma telengai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Arthropod Structure & Development*, 60, 101005. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.101005>
- Marcec, R., Kouba, A., Zhang, L., Zhang, H., Wang, Q., Zhao, H., Jiang, W., & Willard, S. (2016). SURGICAL IMPLANTATION OF COELOMIC RADIOTRANSMITTERS AND POSTOPERATIVE SURVIVAL OF CHINESE GIANT SALAMANDERS (*ANDRIAS DAVIDIANUS*) FOLLOWING REINTRODUCTION. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), 187–195. <https://doi.org/10.1638/2015-0044.1>
- Meiri, S., & Dayan, T. (2003). On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography*, 30(3), 331–351. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00837.x>

- Michael P. Hoffmann, & Anne C. Frodsham. (1993). *Natural Enemies of Vegetable Insect Pests*. Cornell University.
- Milla, S., Pasquet, A., El Mohajer, L., & Fontaine, P. (2021). How domestication alters fish phenotypes. *Reviews in Aquaculture*, *13*(1), 388–405.
<https://doi.org/10.1111/raq.12480>
- Minelli, A., & Fusco, G. (2019). No limits: Breaking constraints in insect miniaturization. *Arthropod Structure & Development*, *48*, 4–11.
<https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.11.009>
- Murphy, N. P., CAREY, D., CASTRO, L. R., DOWTON, M., & AUSTIN, A. D. (2007). Phylogeny of the platygastroid wasps (Hymenoptera) based on sequences from the 18S rRNA, 28S rRNA and cytochrome oxidase I genes: implications for the evolution of the ovipositor system and host relationships. *Biological Journal of the Linnean Society*, *91*(4), 653–669. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00825.x>
- Nuñez-Penichet, C., Osorio-Olvera, L., Gonzalez, V. H., Cobos, M. E., Jiménez, L., DeRaad, D. A., Alkische, A., Contreras-Díaz, R. G., Nava-Bolaños, A., Utsumi, K., Ashraf, U., Adeboje, A., Peterson, A. T., & Soberon, J. (2021). Geographic potential of the world's largest hornet, *Vespa mandarinia* Smith (Hymenoptera: Vespidae), worldwide and particularly in North America. *PeerJ*, *9*, e10690.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10690>
- Özder, N., & Kara, G. (2010). Comparative biology and life tables of *Trichogramma cacoeciae*, *T. brassicae* and *T. evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with *Ephestia kuehniella* and *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) as hosts at three constant temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, *20*(3), 245–255.
<https://doi.org/10.1080/09583150903497880>
- Palavalli-Nettimi, R., & Narendra, A. (2018). Miniaturisation decreases visual navigational competence in ants. *Journal of Experimental Biology*.
<https://doi.org/10.1242/jeb.177238>
- Parreira, D. S., Alcántara-de la Cruz, R., Rodrigues Dimaté, F. A., Batista, L. D., Ribeiro, R. C., Rigueira Ferreira, G. A., & Zanuncio, J. C. (2019). Bioactivity of ten essential oils on the biological parameters of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) adults. *Industrial Crops and Products*, *127*, 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.063>
- Paul, J. (2001). Mandible movements in ants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *131*(1), 7–20.
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00458-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00458-5)

- Pélabon, C., Firmat, C., Bolstad, G. H., Voje, K. L., Houle, D., Cassara, J., Rouzic, A. Le, & Hansen, T. F. (2014). Evolution of morphological allometry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1320(1), 58–75. <https://doi.org/10.1111/nyas.12470>
- Perez-Martinez, C. A., & Leal, M. (2021). Lizards as models to explore the ecological and neuroanatomical correlates of miniaturization. *Behaviour*, 158(12–13), 1121–1168. <https://doi.org/10.1163/1568539X-bja10104>
- Polilov, A. (2015a). How small is the smallest? New record and remeasuring of *Scydosella musawasensis* Hall, 1999 (Coleoptera, Ptiliidae), the smallest known free-living insect. *ZooKeys*, 526, 61–64. <https://doi.org/10.3897/zookeys.526.6531>
- Polilov, A. (2015b). Small Is Beautiful: Features of the Smallest Insects and Limits to Miniaturization. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 103–121. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020924>
- Polilov, A. A. (2012). The smallest insects evolve anucleate neurons. *Arthropod Structure & Development*, 41(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.09.001>
- Polilov, A. A. (2016). Limits to Insect Miniaturization. En *At the Size Limit - Effects of Miniaturization in Insects* (pp. 289–298). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39499-2_13
- Polilov, A. A., & Beutel, R. G. (2009). Miniaturisation effects in larvae and adults of *Mikado* sp. (Coleoptera: Ptiliidae), one of the smallest free-living insects. *Arthropod Structure & Development*, 38(3), 247–270. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2008.11.003>
- Price, G. J., & Piper, K. J. (2009). Gigantism of the Australian *Diprotodon* Owen 1838 (Marsupialia, Diprotodontoidea) through the Pleistocene. *Journal of Quaternary Science*, 24(8), 1029–1038. <https://doi.org/10.1002/jqs.1285>
- Qin, Z., Zhao, Q., Choiniere, J. N., Clark, J. M., Benton, M. J., & Xu, X. (2021). Growth and miniaturization among alvarezsauroid dinosaurs. *Current Biology*, 31(16), 3687–3693.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.013>
- Querino, R. B., Silva, N. N. P. da, & Zucchi, R. A. (2016). Natural parasitism by *Trichogramma* spp. in agroecosystems of the Mid-North, Brazil. *Ciência Rural*, 46(9), 1521–1523. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151352>
- Ramos, S. B., Caetano, S. L., Savegnago, R. P., Nunes, B. N., Ramos, A. A., & Munari, D. P. (2013). Growth curves for ostriches (*Struthio camelus*) in a Brazilian population. *Poultry Science*, 92(1), 277–282. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02380>
- Rensch, B. (1948). Histological Changes Correlated with Evolutionary Changes of Body Size. *Evolution*, 2(3), 218. <https://doi.org/10.2307/2405381>

- Reznik, S. Ya. (2011). Ecological and evolutionary aspects of photothermal regulation of diapause in trichogrammatidae. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 47(6), 512–523. <https://doi.org/10.1134/S0022093011060020>
- Romeis, J., Shanower, T. G., & Zebitz, C. P. W. (1999). *Trichogramma* egg parasitism of *Helicoverpa armigera* on pigeonpea and sorghum in southern India. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90(1), 69–81. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00424.x>
- Rozzi, R., Lomolino, M. V., van der Geer, A. A. E., Silvestro, D., Lyons, S. K., Bover, P., Alcover, J. A., Benítez-López, A., Tsai, C.-H., Fujita, M., Kubo, M. O., Ochoa, J., Scarborough, M. E., Turvey, S. T., Zizka, A., & Chase, J. M. (2023). Dwarfism and gigantism drive human-mediated extinctions on islands. *Science*, 379(6636), 1054–1059. <https://doi.org/10.1126/science.add8606>
- Rüber, L., Kottelat, M., Tan, H., Ng, P. K., & Britz, R. (2007). Evolution of miniaturization and the phylogenetic position of Paedocypris, comprising the world’s smallest vertebrate. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-38>
- Sears, R., & Perrin, W. F. (2009). Blue Whale. En *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 120–124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00033-X>
- Seid, M. A., Castillo, A., & Wcislo, W. T. (2011). The Allometry of Brain Miniaturization in Ants. *Brain, Behavior and Evolution*, 77(1), 5–13. <https://doi.org/10.1159/000322530>
- Sen, S. (2017). A review of the Pleistocene dwarfed elephants from the Aegean islands, and their paleogeographic context. *Fossil Imprint*, 73(1–2), 76–92. <https://doi.org/10.2478/if-2017-0004>
- Shapiro, B., Sibthorpe, D., Rambaut, A., Austin, J., Wragg, G. M., Bininda-Emonds, O. R. P., Lee, P. L. M., & Cooper, A. (2002). Flight of the Dodo. *Science*, 295(5560), 1683–1683. <https://doi.org/10.1126/science.295.5560.1683>
- Shawer, M. B., Sharshir, F. A., Taha, E.-K. A., Shenishen, E. Z., Hassan, M. M., & Elnabawy, E.-S. M. (2021). The impact of cold storage durations on *Trichogramma evanescens* (Westwood) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) during their pupal stage. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7202–7206. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.014>
- Shea, B. T. (1992). Developmental perspective on size change and allometry in evolution. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 1(4), 125–134. <https://doi.org/10.1002/evan.1360010405>

- Shelomi, M. (2012). Where Are We Now? Bergmann's Rule Sensu Lato in Insects. *The American Naturalist*, 180(4), 511–519. <https://doi.org/10.1086/667595>
- Shingleton, A. W., Mirth, C. K., & Bates, P. W. (2008). Developmental model of static allometry in holometabolous insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1645), 1875–1885. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0227>
- Smith, F. A., Elliott Smith, R. E., Lyons, S. K., & Payne, J. L. (2018). Body size downgrading of mammals over the late Quaternary. *Science*, 360(6386), 310–313. <https://doi.org/10.1126/science.aao5987>
- Smith, S. M. (1996). Biological Control with *Trichogramma*: Advances, Successes, and Potential of Their Use. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 375–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002111>
- Smolla, M., Ruchty, M., Nagel, M., & Kleineidam, C. J. (2014). Clearing pigmented insect cuticle to investigate small insects' organs in situ using confocal laser-scanning microscopy (CLSM). *Arthropod Structure & Development*, 43(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2013.12.006>
- Storch, W. B. (2000). Introduction to the basic principles and techniques of immunofluorescence. En *Immunofluorescence in Clinical Immunology* (pp. 1–4). Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8376-4_1
- Tchernov, E., & Horwitz, L. K. (1991). Body size diminution under domestication: Unconscious selection in primeval domesticates. *Journal of Anthropological Archaeology*, 10(1), 54–75. [https://doi.org/10.1016/0278-4165\(91\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0278-4165(91)90021-0)
- Thomas, R., Holmes, M., & Morris, J. (2013). “So bigge as bigge may be”: tracking size and shape change in domestic livestock in London (AD 1220–1900). *Journal of Archaeological Science*, 40(8), 3309–3325. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.02.032>
- Tognon, R., Sant'Ana, J., & Jahnke, S. M. (2013). Aprendizagem e memória de *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygastridae). *Iheringia. Série Zoologia*, 103(3), 266–271. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212013000300009>
- Tognon, R., Sant'Ana, J., & Jahnke, S. M. (2014). Influence of original host on chemotaxic behaviour and parasitism in *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygastridae). *Bulletin of Entomological Research*, 104(6), 781–787. <https://doi.org/10.1017/S0007485314000649>
- Trut, L., Oskina, I., & Kharlamova, A. (2009). Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *BioEssays*, 31(3), 349–360. <https://doi.org/10.1002/bies.200800070>

- Valente, C., Afonso, C., Gonçalves, C. I., Alonso-Zarazaga, M. A., Reis, A., & Branco, M. (2017). Environmental risk assessment of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for classical biological control of the Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*. *BioControl*, *62*(4), 457–468. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9809-9>
- van der Geer, A. A., Lyras, G. A., Lomolino, M. V., Palombo, M. R., & Sax, D. F. (2013). Body size evolution of palaeo-insular mammals: temporal variations and interspecific interactions. *Journal of Biogeography*, *40*(8), 1440–1450. <https://doi.org/10.1111/jbi.12119>
- van der Woude, E. (2017). *The art of being small : brain-body size scaling in minute parasitic wasps* [Wageningen University]. <https://doi.org/10.18174/420849>
- van der Woude, E., Smid, H., & Huigens, T. (2011). *Tiny Eggheads Brain and body size relationship in the parasitic wasp Trichogramma evanescens*. Wageningen University.
- van der Woude, E., & Smid, H. M. (2016). How to escape from haller's rule: Olfactory system complexity in small and large *Trichogramma evanescens* parasitic wasps. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(9), 1876–1891. <https://doi.org/10.1002/cne.23927>
- van der Woude, E., & Smid, H. M. (2017a). Maximized complexity in miniaturized brains: morphology and distribution of octopaminergic, dopaminergic and serotonergic neurons in the parasitic wasp, *Trichogramma evanescens*. *Cell and Tissue Research*, *369*(3), 477–496. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2642-8>
- van der Woude, E., & Smid, H. M. (2017b). Maximized complexity in miniaturized brains: morphology and distribution of octopaminergic, dopaminergic and serotonergic neurons in the parasitic wasp, *Trichogramma evanescens*. *Cell and Tissue Research*, *369*(3), 477–496. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2642-8>
- van der Woude, E., Smid, H. M., Chittka, L., & Huigens, M. E. (2013). Breaking Haller's Rule: Brain-Body Size Isometry in a Minute Parasitic Wasp. *Brain, Behavior and Evolution*, *81*(2), 86–92. <https://doi.org/10.1159/000345945>
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, *63*(1), 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Vasily V. Grebennikov. (2008). How small you can go: Factors limiting body miniaturization in winged insects with a review of the pantropical genus *Discheramocephalus* and description of six new species of the smallest beetles

- (Pterygota: Coleoptera: Ptiliidae). *European Journal of Entomology*, 105(2), 313–328.
- Xiao, K., Han, B., Sun, J., Tan, J., Yu, J., Liang, S., Shen, Y., & Huang, X. (2019). Stokes Shift and Specific Fluorescence as Potential Indicators of Organic Matter Hydrophobicity and Molecular Weight in Membrane Bioreactors. *Environmental Science & Technology*, 53(15), 8985–8993. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02114>
- Yeagan, K. V. (1980). Effects of Temperature on Developmental Rate of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae)1. *Annals of the Entomological Society of America*, 73(3), 339–342. <https://doi.org/10.1093/aesa/73.3.339>
- Zachrisson, B. (2010). *Bioecología daños y muestreo de plagas en cultivos de arroz*. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP).
- Zachrisson, B., & Martinez, O. (2011). BIOECOLOGÍA DE *Telenomus podisi* (ASHMEAD) Y *Trissolcus basalis* (WOLLASTON) (HIMENOPTERA: SCELIONIDAE), PARASITOIDES ÓOFAGOS DE *Oebalus insularis* (KULGHAST) (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE). *Tecnociencia*, 13(1), 65–76.
- Zachrisson, B., Osorio, P., Polanco, P., & Camargo, I. (2016). Parasitismo natural de huevos del complejo de especies de Pentatomidae (Heteroptera), en el agroecosistema arroz en Panamá. . *Puente Biológico*, 8(1), 21–29.

CAPÍTULO X. ANEXOS

TABLA 4

Descripción de características morfológicas y volumétricas del cerebro y cabeza entre especies de avispas parasitoides de Panamá: *Tr. pretiosum*, *Te. podisi*, *Trissolcus spp.* en comparación con *T. evanescens* (todos los datos tomados de van der Woude, 2011)

Medida	Datos de especies analizadas en este estudio			Datos de especies analizadas en otros estudios	
	<i>Tr. pretiosum</i>	<i>Te. podisi</i>	<i>Trissolcus spp.</i>	<i>N. vitripennis</i> (datos tomados de (van der Woude, 2018))	<i>T. evanescens</i> (datos tomados de van der Woude, 2011)
% Vol cerebro / Vol cabeza	33.37	6.15	15.54	30.4 ± 0.59×106	58.53
Vol Cabeza (μm ³)	1.48×106	1.04×107	7.53×106	11.4×106 - 81.1×106	1.19×106
Vol Cerebro (μm ³)	494 645	618 960	1.189×106	11.4×106 - 81.1×106	694 328
Ancho de la cabeza (μm)	160.18	354.12	332.57	414.5–803.10	231.00
Fémur (mm)	0.13***	0.180	0.180	-	0.170
Largo del cuerpo completo (μm)	450.00	935.67	953.59	1,200–2,420	448.00

Nota:

*** Estas medidas se obtuvieron bajo condiciones que ahora consideramos no estandarizadas, lo que ha llevado a la conclusión de que es imperativo realizar un nuevo estudio.

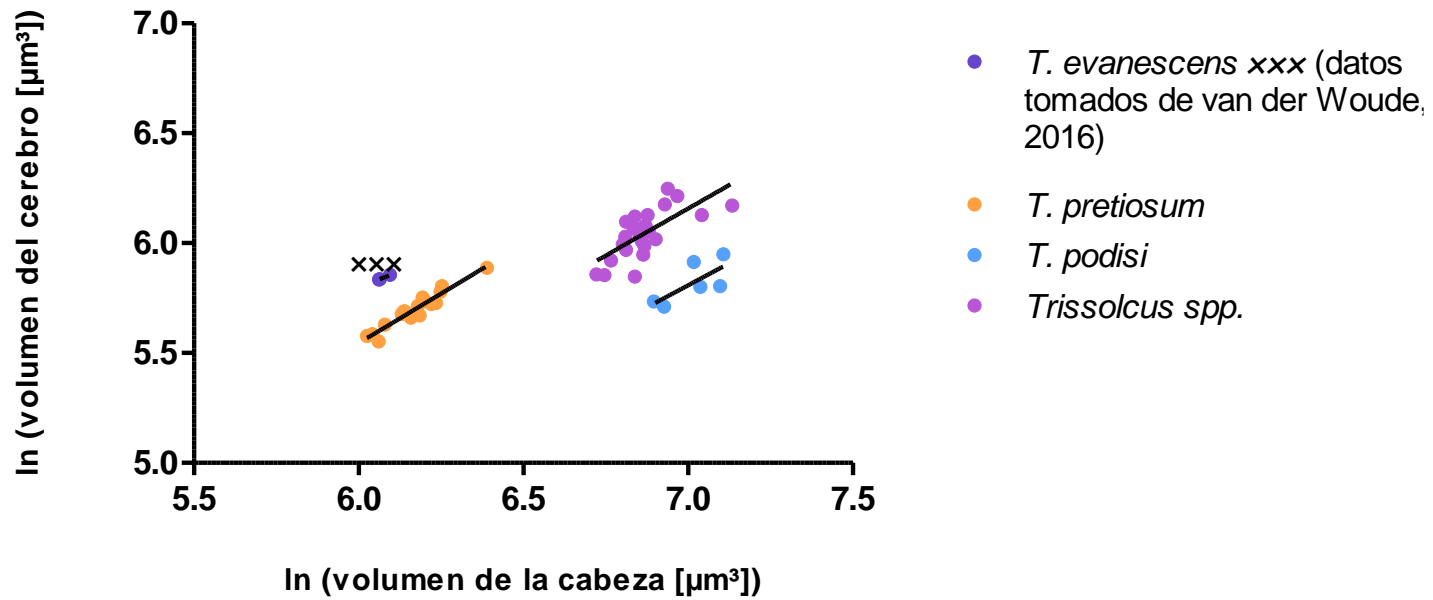


Figura 33. Relación de volumen del cerebro y volumen de la cabeza en *Trichogramma pretiosum*, *Telenomus podisi* y *Trissolcus* spp. en comparación con los datos publicados por van der Woude (2011) para *Tr. evanescens* con isometría.

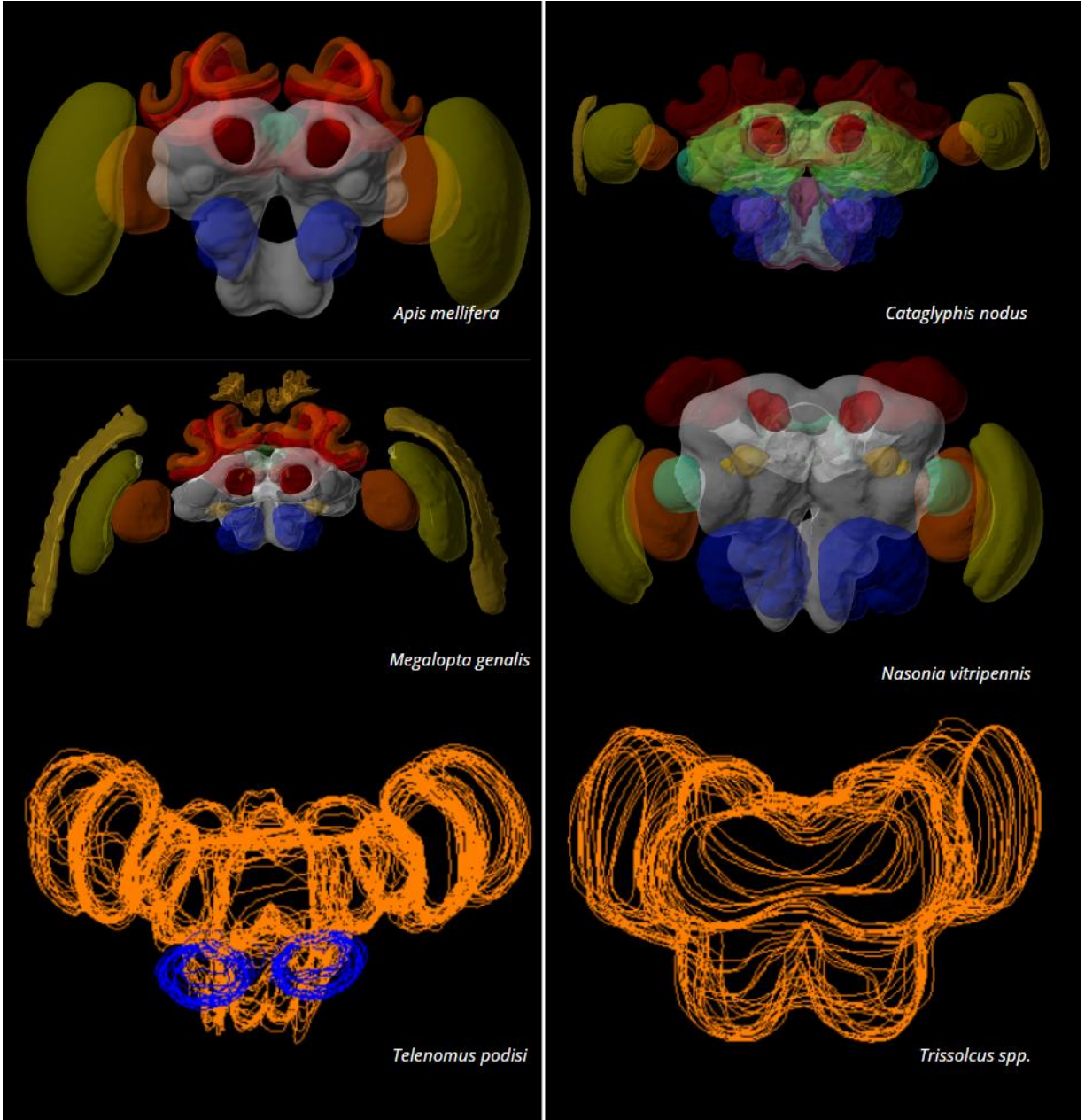


Figura 34. Diferencias en el tamaño de los lóbulos olfativos entre especies (comparación visual no cuantitativa). En el lado izquierdo, se presentan especies con lóbulos olfativos de tamaño reducido, incluyendo a *Te. podisi*. En el lado derecho, se destacan especies, incluyendo *Trissolcus spp.*, que característicamente poseen lóbulos olfativos de mayor tamaño. (Modificado de Insect Brain Data base, 3D visualization).