



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inmunología de la infección bacteriana con *Micrococcus
luteus* a través del alimento en la mariposa *Melitaea cinxia*
(Lepidoptera: Papilionoidea; Nymphalidae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Rafael González Gómez



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Marjo Saastamoinen & M en C. Moisés
Armando Luis Martínez
2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Vive cada día como si fuera el último, deja la tristeza, el rencor y el odio a un lado pues opacan la vista de la belleza, el cariño y la paz... No le des importancia a personas que no te dan la importancia que mereces, no te dejes influenciar por las visiones o deseos de los demás, **DESCUBRE Y PERSIGUE** los tuyos... Jamás aceptes el consejo de aquellos que te quieren llevar por caminos que no te gustan y sobre todas las cosas **NUNCA, NUNCA** digas: No puedo...

-Rafael.

Agradecimientos:

Primero que nada, quisiera agradecer a la U.N.A.M por darme la formación y el conocimiento que me permitieron completar todas mis metas. Por apoyarme aun cuando no existía ningún acuerdo con la Universidad de Helsinki, y por brindarme las herramientas necesarias que me ayudaron a realizar un gran trabajo en el extranjero.

Al M. en C. Moisés Armando Luis Martínez por ayudarme a realizar este trabajo de tesis y a mi comité tutorial -----
----- por toda la atención y seguimiento de este trabajo.

En segundo lugar, quiero agradecerle a la Universidad de Helsinki y en particular a la estación biológica de Lammi por darme la oportunidad de completar este trabajo, por todo el apoyo y especialmente por mostrarme todas las cosas de las que soy capaz. Gracias a John Loehr, ya que sin él, esto simplemente no podría haberse realizado, por todo el apoyo y la ayuda provista en uno de los momentos más importantes de mi vida. Gracias a Suvi Ikonen por toda la paciencia y la guía que me permitieron completar esta gran meta. Gracias a todos los internos de la estación biológica, especialmente a Albert Palomino González, por impulsarme hacia adelante y siempre haber estado ahí en los momentos difíciles de esta empresa. Gracias a Aapo Kahilainen por mantenerme cuerdo cuando estaba perdiendo el camino y mostrarme que todo iba a estar bien.

Me gustaría agradecer especialmente a Marjo Saastamoinen por permitirme trabajar como parte del equipo del Centro de Investigación de Metapoblaciones, por revisar mi proyecto y ayudarme a realizar mi sueño. Gracias a Luisa Woestmann por toda la ayuda y todo el

conocimiento otorgado, por toda su voluntad de ayudarme con este proyecto y toda su confianza.

Así mismo me gustaría tomar unas líneas para agradecer profundamente a mi familia y amigos por todo el apoyo brindado a lo largo de los años, por toda la paciencia y todas esas pláticas y consejos, por siempre estar ahí para mí cuando más lo he necesitado, pero sobre todas las cosas, por mostrarme que todo es posible con esfuerzo y fuerza de voluntad.

Índice:

1. Introducción
2. Antecedentes
 - 2.1. Inmunidad en los insectos.
 - 2.2. *Melitaea cinxia* (Linnaeus, 1758)
 - 2.3. Historia de vida
 - 2.4. Antecedentes experimentales
3. Objetivo General
4. Objetivos particulares
5. Material y método
 - 5.1. Organismo de estudio
 - 5.1.1. Manejo de *Micrococcus luteus* (Schröter, Cohn, 1872)
 - 5.2. Diseño experimental
 - 5.2.1. Alimentación infectada
 - 5.2.2. Controles
 - 5.2.3. Mediciones
 - 5.2.4. Protocolo de encapsulamiento
 - 5.2.5. Protocolo de tiempo de vida
 - 5.3. Análisis estadístico
6. Resultados
 - 6.1. Protocolo de encapsulamiento
 - 6.2. Protocolo de tiempo de vida
7. Discusión
8. Conclusiones
9. Referencias

1. Introducción

El presente trabajo surge como parte de un proyecto mayor llevado a cabo actualmente por el grupo de excelencia en metapoblaciones, perteneciente a la Universidad de Helsinki en Finlandia. Éste proyecto, busca generar el conocimiento sobre las reacciones inmunológicas que ocurren en la mariposa *Melitaea cinxia*, la cual, ha sido modelo de estudio para la teoría de las metapoblaciones particularmente en el sur de Finlandia y Europa del este. El conocimiento de la relación que guarda el sistema inmunológico de esta especie y los diferentes agentes a los cuales combate, como son las infecciones bacterianas e invasiones parasitarias, se torna de interés al momento de analizar la dinámica de las poblaciones que se encuentran en Finlandia. En principio el objetivo central del presente proyecto es encontrar las diferencias que existen en la respuesta del sistema inmune de la mariposa al ser infectada por diferentes vías. El grupo de metapoblaciones (nombre que se le confiere al equipo de investigación perteneciente a la universidad de Helsinki), ha probado en condiciones de laboratorio lo que ocurre cuando la mariposa es infectada por una vía directa, es decir cuando se le inyecta el agente patógeno (bacteria: *Micrococcus luteus*) directamente a la hemolinfa. En la presente investigación, se probaron dos diferentes respuestas inmunológicas: a) El proceso de encapsulamiento que se lleva a cabo cuando la mariposa combate un parásito, siendo este proceso simulado con la inserción de un monofilamento directamente en el tórax y b) El tiempo que la mariposa sobrevive luego de ser infectada al combatir la infección bacteriana, la cual se transmitió a diferentes concentraciones (5mg/ml y 10mg/ml de bacteria), a través del alimento.

Es importante tomar en consideración el estado de salud del adulto cuando combate a un parásito, ya que el sistema inmune podría estar disminuido de manera considerable si se

encuentra luchando contra algún otro tipo de infección. Esta última variable arroja las siguientes preguntas: ¿al estar combatiendo una infección bacteriana la mariposa obtiene una ventaja para combatir la infección parásita al estar ACTIVO su sistema inmune? o ¿sucede precisamente el efecto contrario y el parásito es el que obtiene la ventaja?

2. Antecedentes

2.1. Inmunidad en los insectos

Los insectos están expuestos constantemente al contagio de enfermedades producidas por microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Para sobrevivir, cuentan con un potente mecanismo de defensa que reconoce y elimina estas amenazas. Dicho mecanismo es dependiente de inmunidad innata (inmunidad con la que nace cada individuo) la cual se divide en dos clases: a) respuesta celular y b) respuesta sistémica¹.

Los insectos tienen hemolinfa para el transporte de gases y nutrientes, ésta se encuentra circulando en el hemocele gracias a la acción de un corazón tubular y a la de la musculatura corporal en general. La hemolinfa, contiene tres tipos celulares que conforman la respuesta celular de la inmunidad innata: 1) Plasmátocitos fagocitan, lisan y digieren a los microorganismos patógenos que detectan en la hemolinfa; 2) Células cristal, almacenan moléculas antimicrobiales que son liberadas cuando existe una infección y son letales para los microorganismos, y 3) Lamelocitos, son células que se encargan de combatir microorganismos más grandes de los que pueden manejar los plasmátocitos^{1,2}.

Otra respuesta inmune muy importante es la encapsulación, que es una respuesta celular constitutiva, no específica³ (en otras palabras, la primera barrera defensiva del organismo que no requiere una sensibilización previa). Este mecanismo es una de las

principales formas utilizadas por los insectos para defenderse en contra de patógenos multicelulares como los nemátodos del género *Heterorhabditis* y *Steinernema*, hongos y de parasitoides específicos como *Hyposoter hortícola* y *Cotesia melitaearum*³. También se ha probado que la respuesta de encapsulamiento tiene una relación con la defensa en contra de algunas bacterias⁴, en el caso de la mariposa *Melitaea cinxia* se ha demostrado que dicho proceso consiste en la línea primaria de defensa en contra de parásitos específicos⁵. Además, el encapsulamiento tiene una correlación directa con las tasas de supervivencia de *M. cinxia* en contra de infecciones bacterianas⁶.

En este trabajo, no se hablará de todas las proteínas específicas que se involucran en esa cadena de respuesta, pero sí de los mecanismos generales. En la hemolinfa existen proteínas que, al reconocer un microorganismo, activan a otras proteínas (receptores) que se encuentran en la membrana celular de células grasas. Estas proteínas (receptores) en respuesta iniciarán una cascada de más proteínas que mandarán un factor de transcripción (una proteína que induce la producción de otras proteínas a través de DNA y RNA) hacia el núcleo de la célula e iniciarán la producción de mRNA. Este mRNA será secretado en el citoplasma celular y ahí será traducido a proteína. Estas nuevas proteínas, péptidos antimicrobiales (AMPs) son secretadas hacia la hemolinfa y mientras ésta circula a través del cuerpo del insecto, los AMPs alcanzarán a los patógenos reconociéndolos, atacándolos y eliminándolos^{1,2}.

La otra clase del sistema inmune de los insectos, es la respuesta sistémica o humoral, en la cual los insectos sintetizan otros péptidos antimicrobiales (AMPs) para combatir la infección. Éstos requieren una sensibilización previa, es decir, se sintetizan después de que el insecto ha sido infectado a diferencia de la respuesta innata que está presente desde el nacimiento del insecto. Primero, la infección necesita ser reconocida (sensibilización previa), dicho

reconocimiento induce una reacción en cadena que lleva a la producción de AMPs. Esta reacción en cadena (o señal de transducción) trabaja debido a que las diferentes subunidades que actúan en esta cadena ya están presentes al momento del reconocimiento.² Estos AMPs pueden ser producidos en el cuerpo graso de los insectos, originando grandes cantidades de AMPs que se secretan a la hemolinfa en donde combaten a la infección. Diversos análisis genéticos^{7,8} han demostrado que los genes para AMPs son regulados por las vías Toll e IMD. La vía Toll es activada principalmente por bacterias gram positivas y hongos, controlando en gran medida la expresión de AMPs activos en contra de dichos hongos, mientras que la vía IMD responde principalmente a bacterias gram negativas y controla la expresión genética de los péptidos antibacteriales^{7,8}.

2.2. Melitaea cinxia

Es un insecto diurno de gran interés científico en el norte de Europa, especialmente en los campos de la ecología, biología molecular, genética y evolución. *M. cinxia* denominada comúnmente como Glanville fritillary, es una mariposa de tamaño medio, con coloración naranja, negra y blanca en inglés “checkerspot” que habita en planicies abiertas. Desde 1991, se han realizado un gran número de estudios empleando a esta especie como modelo, lo cual ha generado una gran cantidad de conocimiento en cada uno de estos campos de estudio⁹. En Finlandia, sólo existe naturalmente en las islas de Åland al sureste del país, donde es univoltina. Los adultos pueden ser encontrados volando entre junio y principios de julio. Las hembras producen racimos de 150 – 200 huevos, que depositan en el envés de las hojas de cualquiera de sus dos plantas huésped, *Plantago lanceolata* y *Veronica spicata*^{10,11}. Después de 1 a 2 semanas, las larvas eclosionan y comienzan a alimentarse de forma gregaria formando una red alrededor de la planta huésped. Durante el otoño las larvas de quinto

estadio, forman un nido de invierno mucho más compacto que la red inicial en la base de la planta huésped donde hibernan¹⁰. Dicho evento y el hecho de que ocurre antes del inicio del invierno, facilita el censo a gran escala que se realiza de sus poblaciones^{10,11}. Este padrón, consiste en el registro anual de las poblaciones de *M. cinxia* en las islas Åland. Durante tres semanas, varios investigadores van a las islas y buscan los nidos de invierno, con la finalidad de monitorear cuales han sido re-colonizados, cuales tienen una población consistente y cuales han desaparecido, constituyendo con todo lo anterior el proyecto de investigación a gran escala del grupo de metapoblaciones en Finlandia.

De esta forma, *M. cinxia* es un modelo idóneo para la investigación de metapoblaciones, siendo concebido en un principio como un sistema de prueba para las ideas en proceso de esta teoría¹². Una metapoblación consiste de un grupo separado de poblaciones de una misma especie que interactúan en algún nivel. El término fue concebido por Richard Levins en 1969, para describir un modelo de dinámica poblacional de plagas de insectos dentro del campo de la agricultura, pero la idea ha sido aplicada a especies en hábitats naturales o artificialmente fragmentados. En palabras del propio Levins consiste de una “población de poblaciones”^{13,14}.

Durante el invierno, las larvas dejan de alimentarse e hibernan hasta la primavera cuando despiertan del letargo y vuelven a la actividad. Las larvas sobrevivientes a los parásitos, depredadores y enfermedades, después de 4 ó 5 semanas se convertirán en crisálidas; éstas, que son crípticas, cuelgan del tallo de la planta o sobre la hojarasca durante una semana y media, hasta que la nueva generación emerge durando activas de tres a cuatro semanas¹².

2.3. Historia de vida

Una parte especialmente importante que se relaciona directamente con el presente estudio, es la historia que se desarrolla cuando las larvas son infectadas por algún parásito, por ejemplo, las avispas *Hyposoter horticola* y *Erycia festinans*. Estos himenópteros parasitoides depositan sus huevos en las larvas de *M. cinxia*, los cuales, en algunos casos, permanecen latentes hasta que la pequeña oruga se transforma en crisálida. Las larvas de estas avispas eclosionan indistintamente dentro de la larva, crisálida o el adulto, emergiendo de la región torácica en este último caso¹⁵. Cuando esto sucede, la mariposa inicia un proceso de defensa, el cual consiste en un proceso inmunológico denominado encapsulamiento. El primer paso es el reconocimiento del parásito mediante el sistema inmune del imago. Es entonces cuando la proteína melanina es adherida de manera constante alrededor del parásito con el objetivo de encapsularlo dentro de una “costra” de esta proteína y así, inactivarlo.

Asimismo, es importante tomar en consideración el estado de salud del adulto cuando combate a un parásito, ya que el sistema inmune podría estar disminuido de manera considerable si se encuentra luchando contra algún otro tipo de infección. Esta última variable arroja las siguientes preguntas: ¿al estar combatiendo una infección bacteriana la mariposa obtiene una ventaja para combatir la infección parásita al estar activo su sistema inmune? o ¿sucede precisamente el efecto contrario y el parásito es el que obtiene la ventaja?

M. cinxia, también ha sido utilizada para estudios de historia de vida y preguntas relacionadas sobre su ecología, como la influencia de la restricción alimentaria en su desarrollo y las condiciones de estrés en los adultos inducidas por un vuelo forzado^{16,17}. Estos dos estudios demostraron que las restricciones alimentarias en combinación con altos niveles de estrés en los adultos, activan su sistema inmune. Este fenómeno permite al sistema volverse más eficiente en los tiempos de encapsulamiento, hecho que fue positivamente

correlacionado con el protocolo de tiempo de vida realizado¹⁷. Es necesario entender la necesidad de cada individuo para dar una defensa apropiada. Los insectos son considerados como un modelo adecuado para realizar experimentos de inmunidad ya que su sistema es mucho más simple comparado con el de los vertebrados y dada la duración de sus ciclos de vida, se puede obtener un mayor número de observaciones en periodos de tiempo relativamente cortos.

2.4. Antecedentes experimentales

Como antecedente directo del presente estudio se tienen las investigaciones que se están realizando en el Laboratorio de Metapoblaciones perteneciente a la Unidad de Biociencias de la Universidad de Helsinki, respecto a la diferencia de la infección en esta especie con base en el efecto de la inoculación a través del alimento o por inyección; hasta ahora la segunda parece provocar una respuesta más drástica en términos de encapsulación y tiempo de vida, en comparación con la infección que se realiza a través del alimento. Esta investigación tiene como objetivo reunir más información acerca de lo que ocurre cuando *M. cinxia*, es infestada con la bacteria por medio del alimento infectado, enfocándose en la respuesta inmune de la infección bacteriana mientras lucha contra una infección parasitaria simulada.

La hipótesis general es que las mariposas regularán de manera positiva la expresión de los genes cuando estén infectadas, es decir, al estar combatiendo una infección la producción de proteínas del sistema inmune debería incrementarse, así que deberíamos ver un aumento en los porcentajes de encapsulamiento y los tiempos de vida, cuando estos se comparan contra las mariposas del grupo testigo (grupo bajo condiciones normales sin ningún tipo de tratamiento).

La respuesta inmune del modelo *M. cinxia* por diferentes vías de infección se vuelve un estudio interesante para la investigación de las metapoblaciones. La interacción dentro de una metapoblación es una influencia muy poderosa en la historia de vida de las especies, ésta puede ser afectada fuertemente por el medio ambiente, en particular cuando una mariposa queda expuesta a una infección. La eficacia con la que dicha mariposa responda ante la infección puede tener consecuencias determinantes en el desarrollo de las poblaciones. Estas interacciones, pueden llegar a ser claves para la teoría de las metapoblaciones, conocerlas puede proveer información muy útil a la hora de tomar decisiones en los campos de la ecología y la investigación de las poblaciones. Puede también influenciar la decisión de colocar un área de conservación en una locación determinada, haciéndola más eficiente y proporcionando una mejor solución, e incluso ayudar en la predicción de la dinámica poblacional de una especie determinada.

3. Objetivo General

El objetivo de este estudio, es entender cómo la especie *Melitaea cinxia* (Glanville fritillary) responde a la infección bacteriana por *Micrococcus luteus*, que ocurre mediante el alimento. Además de enfocarse en la respuesta inmune de la encapsulación, con base en un parásito simulado.

4. Objetivos particulares

- Cuantificar la diferencia de la mortandad de *Melitaea cinxia*, al ser infectada con diferentes concentraciones con *Micrococcus luteus* a través del alimento.

- Probar el efecto en la supervivencia y la respuesta inmune de la mariposa después de la infección con diferentes concentraciones bacterianas en el alimento, considerando el peso y sexo de los individuos.
- Comparar el porcentaje de encapsulamiento en un microfilamento insertado en el tórax de la mariposa, simulando la infección de un parásito, entre individuos infectados y sin infección bacteriana.

5. Material y método

5.1. Organismo de estudio

La especie *Melitaea cinxia* (Glanville fritillary) pertenece a la familia Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). Esta mariposa pasa la mayor parte de su vida como una oruga espinosa y negra. Como adulto, presenta un patrón naranja y negro viviendo un máximo de cuatro semanas, completando un ciclo de vida anual (univoltino).



A



B



C

Imagen 1: A) Larva de *M. cinxia*; B) Crisálida de *M. cinxia*; C) Adulto de *M. cinxia*

De esta forma, se seleccionaron 700 larvas de *M. cinxia* nacidas en condiciones de laboratorio, provenientes de diferentes familias genéticas, las cuales fueron despertadas de la

hibernación al incrementar su temperatura y divididas en cajas familiares, marcando cada una de ellas con el número de familia y hembra de origen. Todos los individuos estaban alojados dentro de la cámara de crecimiento desde su llegada a la etapa de hibernación, en la cual se mantuvieron hibernando hasta su selección aleatoria para este experimento. Cada caja fue alimentada diariamente con suficientes hojas de *P. lanceolata* separando a los individuos que iban muriendo y las hojas de días previos. Finalmente, cada caja era humedecida con un rocío ligero de agua. En el momento de la pupación, cada una de ellas fue pesada y colocada en una copa individual. A cada individuo le fue asignado un número único de identificación y después de la eclosión, las mariposas fueron sexadas y marcadas en la parte anterior baja del ala derecha usando un marcador permanente.



Imagen 2: Adulto de *M. cinxia* con el ala derecha marcada

5.1.1. Manejo de *Micrococcus luteus*

Para el experimento se utilizó la bacteria gram-positiva, *Micrococcus luteus*, para infectar a las mariposas. Se trata de una bacteria sapotrófica que pertenece a la familia Micrococcaceae y es capaz de sobrevivir en condiciones de alto estrés, como las bajas temperaturas y falta de alimento. *M. luteus*, no forma esporas como estructuras de supervivencia, que son un

prerrequisito para la supervivencia a largo plazo de otras bacterias como los bacilos y los actinomicetos^{18,19}

El alimento infectado fue preparado de manera diaria para asegurar que las mariposas siempre se alimentaran de comida fresca. La bacteria *M. luteus* fue tomada de tubos muestra que se guardaban a -20°C, cada tubo era una muestra procesada y controlada. Para su preparación se tomó el tubo del congelador y se pesó 0.250g de bacteria seca para la disolución de 5mg/ml (tratamiento 1) y 0.5g para la disolución de 10mg/ml (tratamiento 2). Inmediatamente después de ser pesada la bacteria seca fue disuelta en 50ml de agua con miel al 20% de concentración.

5.2. Diseño experimental

5.2.1. Alimentación infectada

A partir de la eclosión (día cero), los individuos fueron inmediatamente colocados bajo el tratamiento de las soluciones de alimento infectado con *M. luteus*, a las concentraciones de 5mg/ml y 10mg/ml, previamente preparadas. Este proceso se repitió de manera diaria hasta obtener una “N” de 90 machos y 90 hembras por tratamiento.

5.2.2. Controles

Al día cero (eclosión), los individuos fueron inmediatamente colocados bajo el tratamiento de comida normal usando agua con miel al 20% de concentración previamente preparada. Este procedimiento se repitió de manera diaria hasta obtener una “N” de 90 machos y 90 hembras.

5.2.3. Mediciones

Al tercer día después de la eclosión, es decir, al tercer día del tratamiento, se midió la respuesta inmune de las mariposas en dos formas diferentes, en la primera se ingresaron 30 machos y 30 hembras de cada uno de los tres tratamientos (T1, T2 y control) al protocolo de tiempo de vida, y la segunda, consistió en el ingreso de 30 machos y 30 hembras de cada tratamiento al protocolo de encapsulamiento.

5.2.4. Ensayo de encapsulamiento

Al tercer día, los individuos tratados (5mg/ml, 10mg/ml o controles) fueron tomados de las jaulas de tratamiento. Cada individuo fue sujetado a una esponja usando una pequeña red de mosquitero sostenida por cuatro alfileres. Cada uno de los individuos fue perforado en la región posterior del tórax usando una aguja esterilizada. Dentro de esta perforación fue colocado un monofilamento de 2 ± 0.1 mm de largo¹⁶. Un nudo en el monofilamento aseguraba que la longitud insertada en el tórax fuera igual para cada caso. Después de una hora, el monofilamento fue removido y guardado dentro de un tubo Eppendorf el cual se congeló a -80°C para su conservación. Dicho procedimiento fue repetido hasta completar los 30 individuos de cada muestra.

Después de la colecta de las muestras, cada filamento fue colocado bajo un microscopio estereoscópico mediante el cual se tomaron tres fotografías, rotando el monofilamento sobre su propio eje en tercios. Una vez que todos los monofilamentos fueron digitalizados, cada imagen fue analizada utilizando el software “ImageJ”²¹ (marca, fabricante, país) para determinar el promedio de área obscurecida (promedio de las tres imágenes pertenecientes a cada monofilamento obtenido a partir del porcentaje de área

obscurificada creada sobre el monofilamento por el proceso de encapsulamiento) para cada monofilamento.

5.2.5. Ensayo de tiempo de vida

Para el ensayo de tiempo de vida, 30 individuos de cada tratamiento (5mg/ml, 10mg/ y controles) y sexo fueron colocados en las diferentes jaulas marcadas, las cuales fueron alimentadas de manera diaria con el tratamiento infectado fresco o con alimento normal según fuera el caso, por todo el tiempo que las mariposas vivieran. Así, cada vez que un individuo moría era retirado de la jaula y el evento registrado en una bitácora, para de esta forma generar la comparación del tiempo de vida *vs* el tratamiento en el que fueron colocadas *vs* el sexo del individuo.

5.3. Análisis estadístico

Pruebas de T pareadas y no pareadas fueron utilizadas para analizar los datos obtenidos por el programa ImageJ del protocolo de encapsulamiento y los datos crudos provenientes del protocolo de tiempo de vida. Cada uno de las mediciones estadísticas fueron procesadas utilizando el programa GraphPad Prism²², dicho análisis evaluó los datos usando un valor de P de dos colas, buscando un intervalo de confianza del 95%. Solamente los valores de P menores a 0.05 fueron tomados como diferencia significativa entre las medias.

6. Resultados

6.1. Protocolo de encapsulamiento

El primer protocolo que se llevó a cabo en los experimentos fue el de encapsulamiento, el cual fue dividido por sexo, en la Figura 1A, podemos observar, la comparación de los

diferentes tratamientos en el grupo de las hembras, en donde se muestra que no se encontraron diferencias significativas entre los mismos. En la Figura 1B, se observa que, en los machos, tampoco se encontraron diferencias significativas en el análisis estadístico. A simple vista, se corrobora que el error es muy bajo y que prácticamente los tres tratamientos en ambos sexos se comportaron de manera muy similar.

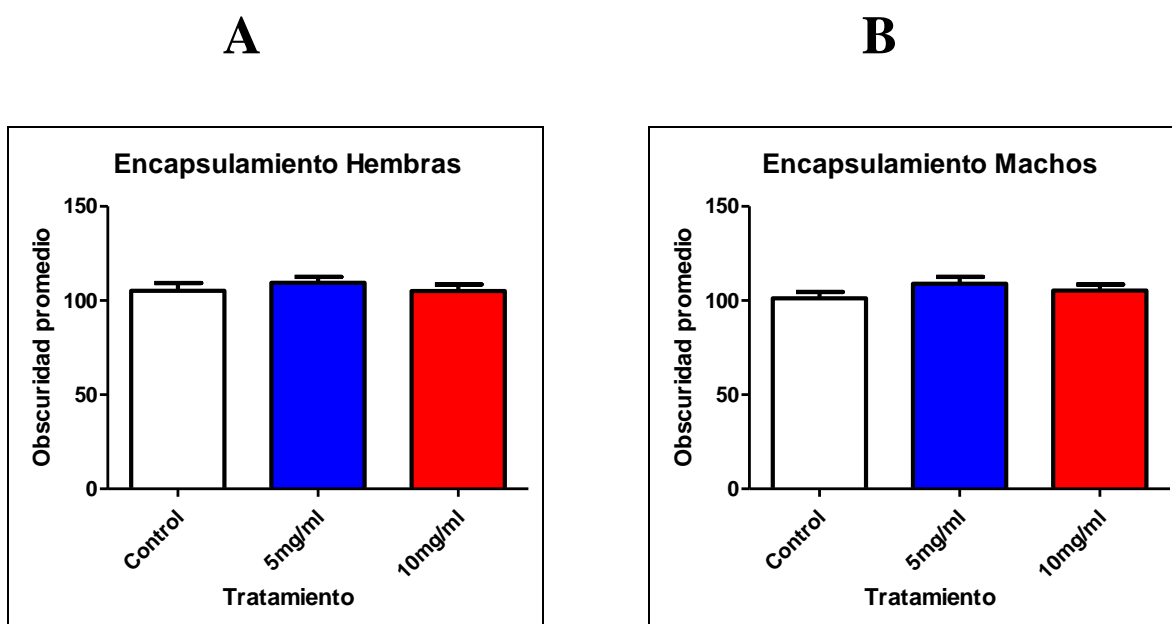


Figura 1: Protocolo de encapsulamiento

6.2. Protocolo de tiempo de vida

El segundo protocolo, fue el de tiempo de vida, el cual fue dividido por sexo y tratamiento. En la Figura 2A, se presentan las hembras por cada tratamiento (5mg/ml, 10mg/ml y control), en donde se encontró una diferencia significativa entre el grupo Control y las dos concentraciones empleadas, mientras que no hubo diferencias significativas entre éstas. En la Figura 2B, se observa que para los machos se encontraron diferencias significativas entre

los tres grupos experimentales, incluso éstas fueron aún más marcadas que en el caso de las hembras.

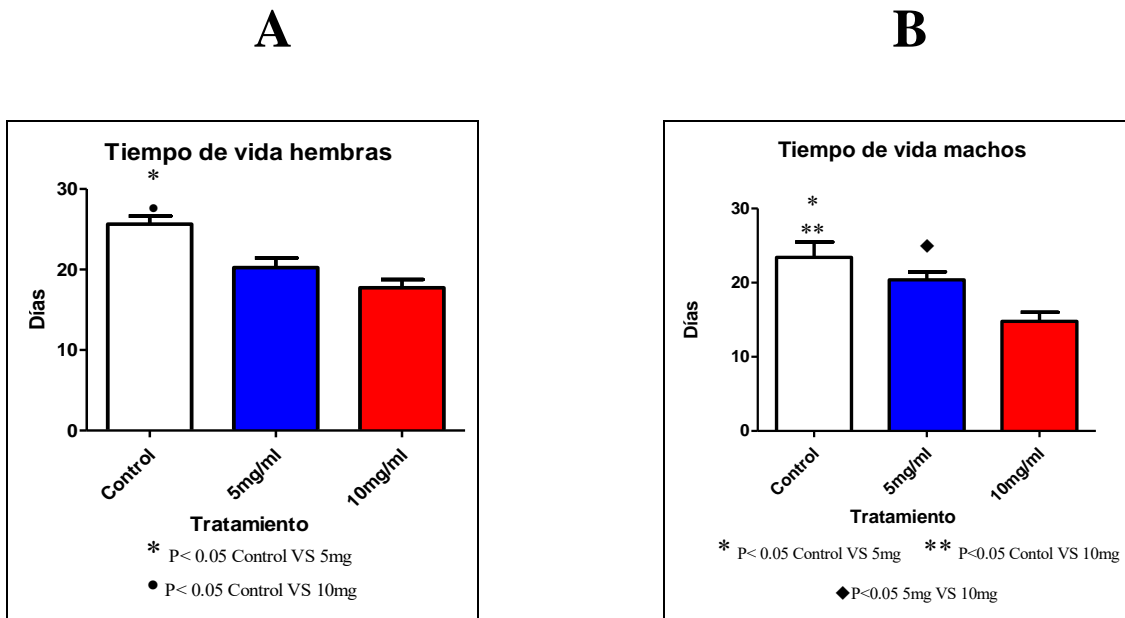


Figura 2: Protocolo de tiempo de vida

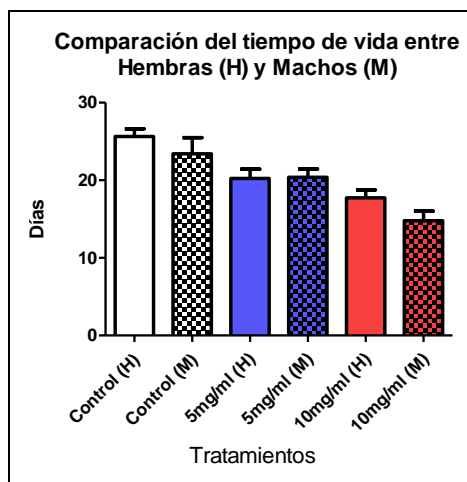


Figura 3: Gráfica comparativa entre sexos

7. Discusión

Experimentos que se están llevando a cabo por el grupo de Metapoblaciones en la Universidad de Helsinki, han mostrado diferencias en el proceso de encapsulamiento, cuando los individuos son expuestos a la bacteria mediante una infección vía inyección (Woestmann & Saastamoinen en preparación). En contraste a la ausencia de diferencias mostradas por la vía de alimento infectado en el protocolo de encapsulamiento, esto podría ser prueba de que la infección vía inyección es mucho más rápida que la vía alimentaria, lo que era de esperarse, ya que la bacteria tarda mucho más tiempo para infectar a la mariposa cuando es ingerida o a que hay mecanismos de inmunidad previos a la ingesta, como la saliva de la mariposa.

La hipótesis sobre la diferencia entre ambos protocolos, era que el efecto retardado de la infección no fuera reflejado en un proceso inmunológico como lo es el encapsulamiento, de la misma forma que lo hizo en el protocolo de inyección. Esto se debe principalmente a que la bacteria necesita viajar primero por el sistema digestivo antes de alcanzar el torrente hemolinfático (Woestmann & Saastamoinen en preparación). Varias investigaciones se han llevado a cabo para dilucidar los efectos de la infección vía inyección, lo cual se contrastará con los resultados de esta investigación.

Hasta ahora los resultados muestran que la vía de la inyección, provoca una reacción mucho más drástica en términos de encapsulamiento y tiempo de vida, ya que los individuos se ven afectados de forma inmediata o a las pocas horas de haber sido inoculadas. Mientras analizamos los resultados de este protocolo, se observó en la Figura 1, que la infección por la vía alimentaria no tiene ningún efecto en la reacción de la mariposa al encapsular al “parásito” simulado; sin importar, las diferencias de concentración bacteriana suministradas en el alimento (e.g 5mg/ml y 10mg/ml), ya que no se encontraron diferencias significativas al comparar todos los grupos entre sí, demostrando que al menos en términos de

encapsulamiento, las hembras, así como, los machos no son susceptibles a cambiar su respuesta inmunológica en etapas tempranas de la infección cuando ésta entra por el aparato digestivo.

Con respecto a lo observado en el protocolo de tiempo de vida, se puede encontrar un dramático cambio en el desarrollo de la infección. Al analizar la gráfica de las hembras (Figura 2A), se observa, que aquellos individuos que fueron tratados con la bacteria, mueren más rápido que los controles, arrojando una diferencia significativa ($P < 0.05$). Aparentemente las hembras presentan una mayor resistencia inmunológica a la bacteria, ya que algunas gráficas son muy parecidas entre el grupo de 5mg/ml y el de 10mg/ml, que sobrevivieron el mismo tiempo promedio. Sin embargo, estadísticamente no hubo diferencias significativas entre ambos.

De acuerdo a lo anterior, la infección bacteriana afecta negativamente el tiempo de vida de las mariposas, tal como fue estimado en la hipótesis de este trabajo. Por otro lado, se encontró que los machos de *M. cinxia* tienen una menor resistencia a la infección bacteriana producida por *M. luteus*. En la Figura 2B, se observa una diferencia significativa al comparar todos los grupos entre sí; en el caso de los machos el grupo de 10mg/ml mostró una falta de capacidad inmunológica completa para combatir la infección. Comparados contra las hembras, los machos de este tratamiento fueron claramente superados en el tiempo de vida. En la Figura 3, la mayor concentración de la bacteria tuvo consecuencias fatales para los machos de *M. cinxia*, al observar en la gráfica una diferencia significativa al comparar los grupos de 5mg/ml y el de 10mg/ml y por supuesto, se encontró una gran diferencia al comparar ambos grupos contra el control, lo que confirma la hipótesis planteada.

Se podría establecer, que el sexo en las mariposas juega un papel importante en la supervivencia, cuando se trata de una infección bacteriana; sin embargo, al comparar los

grupos de 10mg/ml hembras y 10mg/ml machos Figura 3, no se ven diferencias significativas entre ellos, por lo cual se establece que este nos es un factor determinante para la supervivencia, al no existir una variación representativa con respecto a su tasa de vida ya que en ambos sexos la infección tuvo consecuencias fatales a altas concentraciones.

En el campo es difícil que una mariposa se encuentre expuesta de una manera tan constante y regular a una infección bacteriana, así que los resultados encontrados en el laboratorio son relativamente extrapolables a un ambiente real en el campo ya que es posible que la mariposa se infecte de manera considerable y durante un periodo largo en el campo, sin embargo, esta situación es poco probable.

8. Conclusión

- 8.1. Se observa que la infección por la vía alimentaria no tiene consecuencias directas en la mariposa a corto plazo.
- 8.2. A las 72 horas de infección en la respuesta de encapsulamiento, no existen efectos negativos o positivos, independientemente de la concentración bacteriana en el alimento.
- 8.3. La infección tiene un efecto negativo en la supervivencia de las mariposas y es dependiente de la concentración a la cual se encuentren expuestas de una manera constante.

La respuesta inmune observada en la mariposa *M. cinxia* no conlleva una diferencia determinante cuando se comparan los dos sexos, es decir, ambos se comportan de una manera muy similar.

9. Referencias

1. Lemaitre, B. y Hoffmann, J. 2007. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*.
2. Tsakas, S. y Marmaras, V. 2010. *Insect immunity and its signaling: an overview*. Department of Biology, University of Patras, 26500 Patras, Grecia.
3. Gillespie, JP. Kanost, MR. y Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*.
4. Gupta, AP. 2001. Immunology of Invertebrates: cellular. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, Londres, UK.
5. Van Nouhuys, S. Niemikapee, S. y Hanski, I. 2012. Variation in a hostparasitoid interaction across independent populations. *Insects*.
6. Laurentz, M. Reudler, JH. Mappes, J. Friman, V. Ikonen, S. y Lindstedt, R. 2012. Diet quality can play a critical role in defence efficacy against parasitoids and pathogens in the Glanville fritillary (*Melitaea cinxia*). *Journal of Chemical Ecology*.
7. Hoffmann, J.A. y Reichhart, J.M. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology*.
8. Rutschmann, S. Jung, A.C. Zhou, R. Silverman, N. Hoffmann, J.A. y Ferrandon, D. 2000. Role of *Drosophila* IKK γ in a Toll-independent antibacterial immune response. *Nature Immunology*.
9. Ojanen, S. Nieminen, M. Evgeniy, M. Pöyry, J. y Hanski, I. 2013. Long-term metapopulation study of the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*): survey methods, data management, and long-term population trends. Department of Biosciences, University of Helsinki, Natural Environment Centre, Finnish Environment Institute. Ecology and Evolution publicado por John Wiley & Sons Ltd.
10. Kuussaari, M. 1998. Biology of the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). Ph.D. Thesis, Universidad de Helsinki, Helsinki.
11. Nieminen, M., Siljander, M. y Hanski, I. 2004. Structure and dynamics of *Melitaea cinxia* metapopulations. Pp. 63–91 in P. R. Ehrlich, y I. Hanski eds. On the wings of Checkerspot: a model system for population biology. universidad de Oxford. Press, New York, NY.

12. Hanski I. Ehrlich, P. 2004. *On the wings of checkerspots a model sytem for population biology*. Universidad de Oxford. Press, New York, NY.
13. Levins, R. 1969, Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control, *Bulletin of the Entomological Society of America*
14. Kritzer, JP. Y Sale, PF.2006. *Marine metapopulations*, Academic Press, New York.
15. Lei G. C. Vikberg, V. Nieminen, M. y Kuussaari, M. 2007. The parasitoid complex attacking Finnish populations of the Glanville fritillary *Melitaea cinxia* (Lep: Nymphalidae), and endangered butterfly. *Journal of Natural History*.
16. Kvist, J. Mattila, A. Somervuo, P. Ahola, V. Koskinen, P. Paulin, L. Salmela, L. Fountain, T. Rastas, P. Ruokolainen, A. Taipale, M. Holm, L. Auvinen, P. Lehtonen, R. Frilander, M. y Hanski, I. 2015. Flight-induced changes in gene expression in the Glanville fritillary butterfly. *Molecular Ecology*.
17. Saastamoinen, M. Rantala, M. 2013. Influence of developmental conditions on immune function and dispersal – related traits in the Glanville fritillary (*Melitaea cinxia*) butterfly. *PLoS ONE*
18. Madigan, M. Martinko, J. (editors). 2005. *Brock Biology of Microorganisms (11th ed.)*. Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.
19. Greenblatt, C.L. Baum, J. Klein, B.Y. Nachshon, S. Koltunova, V. y Cano, R.J. 2004. *Micrococcus luteus* survival in amber. *Microbial. Ecology*.
20. Prokkola, J. Roff, DA. Kärkkäinen, T. Krams, I. y Rantala, MJ. 2013. Genetic and phenotypic relationships between immune defence, melanism and life history traits at different temperatures and sexes in *Tenebrio molitor*. *Heredity* (Edinburgh).
21. ImageJ V.1.50i 2016, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
22. GraphPad Prism 5 V.5.01, 2007