



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD MORELIA  
ECOLOGÍA

**EL PAPEL DE LA VIRULENCIA DE LOS PATÓGENOS SOBRE  
LA MEMORIA INMUNITARIA INNATA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A:**

**GALIA MARINA ADAME RIVAS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. VÍCTOR HUGO ANAYA MUÑOZ**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM  
**DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA**  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA (I.N.S.P.)

**MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE, 2020**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD MORELIA  
ECOLOGÍA

**EL PAPEL DE LA VIRULENCIA DE LOS PATÓGENOS SOBRE  
LA MEMORIA INMUNITARIA INNATA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A:

**GALIA MARINA ADAME RIVAS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. VÍCTOR HUGO ANAYA MUÑOZ**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM  
**DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA**  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA (I.N.S.P.)

**MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE, 2020**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ENTIDAD ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA**

**OFICIO CPCB/474/2020**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **26 de agosto de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** de la estudiante **ADAME RIVAS GALIA MARINA** con número de cuenta **517011364** con la tesis titulada **“El papel de la virulencia de los patógenos sobre la memoria inmunitaria innata”**, realizada bajo la dirección del **DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
Vocal: DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA  
Secretario: DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA  
Suplente: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI  
Suplente: DR. RODRIGO MACIP RÍOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 07 de agosto de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar, quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; a la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, por ofrecerme un espacio en sus instalaciones y la oportunidad de desarrollarme académica y culturalmente.

Al CONACyT, a la ENES Unidad Morelia (UNAM) y PAPIIT (proyectos no. IA207716 e IA205318) quienes proporcionaron el apoyo económico para poder vivir en Morelia, realizar estancias de investigación y llevar a cabo los proyectos.

Al Dr. Jorge Contreras Garduño por ofrecerme un lugar en su laboratorio y darme la oportunidad de estudiar con él y transmitirme sus conocimientos en torno a la inmunología de invertebrados. También al Dr. Víctor Anaya por ser miembro de mi comité tutor, por su apoyo, sus consejos y por su paciencia en los tutoriales. Al Dr. Humberto Lanz por ser miembro de mi comité y por permitirme realizar una estancia de investigación en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP, Cuernavaca, Morelos), así mismo, agradezco a sus estudiantes de doctorado por enseñarme la técnica de RT-PCR, en especial a su estudiante Maya por enseñarme muchos detalles de las técnicas de extracción de RNA, por ayudarme a mejorar y por su noble amistad.

Al Dr. Juan Carlos Torres Guzmán y a la Dra. Gloria Angélica González Hernández del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas del Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato (UG) por proporcionar las cepas de *Metarhizium brunneum*.

A todos mis profesores de la maestría, al Dr. Mauricio Quesada y a la Dra. Silvana Martén porque al admitirme en su curso me dieron la oportunidad de conocer Costa Rica.

A los coautores de mi primer artículo y finalmente a los doctores del jurado que cuidadosamente revisaron mi tesis: Alejandra Ochoa, Ek del Val, Rodrigo Macip, Humberto Lanz y Julio César Carrero.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi mamá, Irma Victoria Rivas Manzano por apoyarme incondicionalmente y darme la oportunidad de estudiar, y vivir lejos de casa, por mostrarme las bondades de la biología y ser el mejor ejemplo académico del mundo. A mis hermanos, Andrés y Germán por su apoyo en todo momento y por facilitar mi aprendizaje en la vida. A mi papá, Jorge Adame Cisneros que me motivó a seguir adelante persiguiendo ideas locas.

A mi gran amigo, Jorge Canales Lazcano “Dr. Canalitos” por sus infinitas enseñanzas y consejos, por los desvelos, por cada aventura y palabra de aliento en los momentos más oscuros. A todas las personas con las que logré entablar una buena amistad en el Laboratorio de Ecología Evolutiva: Marcos Ibarra “Marquitos”, Ivette Galicia, a mi buen amigo Javier Borráz, Sagrario Cordero, Víctor Meléndez y a Augusto Alonso. Y finalmente a todos los colegas que me acompañaron y que fueron testigos de mi crecimiento durante la Maestría.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico a todas las mujeres de mi familia que con esfuerzo han logrado enfrentar los retos y sobresalir satisfactoriamente en diversos ámbitos durante su desarrollo personal y profesional, a ellas, que han influido sustancialmente en mi vida con su ejemplo y apoyo y sobre todo por preservar la unión de mi gran familia y hacerla un refugio para cualquier persona.

Principalmente, dedico este trabajo a mis abuelitas Gloria Estela Manzano Domínguez y Nelly Cisneros Vargas por ser de las mujeres que más admiro en el mundo por su moral inquebrantable, por sus logros y su tenacidad a la vida.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

**GALIA MARINA ADAME RIVAS**



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	8
<i>El sistema inmunitario en animales.....</i>	8
<i>Sistema inmunitario innato y de memoria.....</i>	9
<i>Sistema inmunitario en invertebrados.....</i>	11
<i>Memoria inmunitaria en invertebrados.....</i>	15
<i>Modelo de estudio.....</i>	18
OBJETIVO GENERAL.....	21
<i>Objetivos particulares.....</i>	21
HIPÓTESIS.....	22
MATERIALES Y MÉTODO.....	23
<i>Larvas de Tenebrio molitor.....</i>	23
<i>Cepas de Metarhizium brunneum.....</i>	24
<i>Extracción de RNA.....</i>	27
<i>Obtención de cDNA.....</i>	29
<i>RT-PCR tiempo real.....</i>	29
<i>Análisis de supervivencia.....</i>	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
<i>Supervivencia.....</i>	33
<i>Respuesta inmunitaria.....</i>	43
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52
APÉNDICE 1.....	60
<i>Detalles del método.....</i>	60
APÉNDICE 2.....	63
<i>Supervivencia.....</i>	63
APÉNDICE 3.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	72

## RESUMEN

El sistema inmunitario es moldeado por la interacción parásito (patógeno)-hospedero y con ello diferentes mecanismos de reconocimiento y defensa han surgido a lo largo de la historia evolutiva. Los invertebrados, por ejemplo, de manera análoga a los vertebrados tienen la facultad de reconocer específicamente a los parásitos y patógenos, para así montar una respuesta adecuada, dotada de memoria. Sin embargo, existen factores que influyen en la capacidad del hospedero para defenderse, como la virulencia de los patógenos, lo que dificulta el estudio de los mecanismos detrás de la memoria inmunitaria. Por lo anterior, en este trabajo se abordó el tema de especificidad desde la perspectiva del patógeno utilizando como hospedero al escarabajo de la harina *Tenebrio molitor*, ya que es un buen modelo para medir respuesta inmunitaria y memoria inmunitaria. Se evaluó su capacidad para generar memoria inmunitaria contra cepas genéticamente modificadas del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*. (Cherry, GFP, 2NP1, 2NP5, y CAT) que difieren en virulencia. Los resultados de supervivencia muestran que el escarabajo se defiende mejor ante retos homólogos (similares) que ante retos heterólogos (diferentes), y que la virulencia del hongo influye en la capacidad de respuesta del hospedero tal como en la expresión de péptidos antimicrobianos (tenecina 1 y tenecina 3) como el inductor TmCactin que regula positivamente la expresión de algunos péptidos antimicrobianos. Esto apoya la hipótesis de la presencia de memoria en invertebrados y demuestra la especificidad a nivel de cepa.

**PALABRAS CLAVE:** Interacción parásito-hospedero, entomopatógeno, virulencia, memoria inmunitaria, *Tenebrio molitor*.

## ABSTRACT

The immune system of organisms is heavily shaped by host-parasite (pathogen) interactions, in such dynamic process differential recognition and defense mechanisms have emerged throughout evolution history. Invertebrates are not an exception because, analogously to vertebrates, they can produce a wide repertoire of recognition molecules that allow them to identify pathogens in a very specific way and set an appropriate response against an invader through an immune response endowed with memory. However, diverse factors influence the host's ability to defend itself, such as pathogens' virulence, which makes even harder to study the underpinning mechanisms of innate immune memory. Therefore, we tested the ability of the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) to generate specific memory against genetically modified *Metarhizium brunneum* strains (Cherry, GFP, 2NP1, 2NP5 and CAT) to have a better approach from the perspective of the pathogen. Survival outcomes showed that the beetle exhibited immune memory as it defends itself better against homologous challenges than heterologous challenges of the fungus, also this study partially exposed that the degree of virulence of the pathogen influence the host's expression of antimicrobial peptides and the inductor TmCactin. These data provide evidence of immune priming in invertebrates and demonstrate that pathogen recognition can be species-specific at strain level.

KEYWORDS: Host-parasite interactions, entomopathogen, virulence, immune priming, *Tenebrio molitor*

## INTRODUCCIÓN

Haldane (1949) señaló a los parásitos y patógenos (desde virus, bacterias, protozoarios y hongos) como una fuerte presión selectiva que moldea la dinámica poblacional, densidad, abundancia y diversidad genética de sus hospederos. Esta presión selectiva afecta los patrones de crecimiento y reproducción del hospedero e induce su muerte prematura porque los parásitos evolucionan a una tasa más acelerada que sus hospederos (Schmid-Hempel, 2008a). Por su parte, en los hospederos evolucionan estrategias de defensa contra las estrategias de ataque de los parásitos; la adaptación clave de los hospederos es la respuesta inmunitaria adaptativa, es decir, la capacidad de reconocer patógenos de manera específica y responder de manera más robusta en futuros encuentros (Schmid-Hempel, 2008a), evitando que la infección acelere su muerte o reduzca su fecundidad (Greenwood et al., 2017); sin embargo, diversos factores podrían afectar la respuesta del hospedero desde el primer encuentro, impidiendo que se consolide la memoria inmunitaria en cualquier momento de la infección (Schmid-Hempel, 2008a).

Se han descrito mecanismos de patógenos que afectan al humano con los cuales los parásitos son capaces de evadir el sistema inmune del hospedero, y con ello, lograr satisfactoriamente la infección. Por ejemplo, a través de la manipulación del sistema para evitar ser detectados por las moléculas de reconocimiento. La variación antigénica es una estrategia de algunas bacterias en la cual alternan dos fenotipos reversiblemente regulando la expresión de proteínas en su superficie y con ello evitan ser detectadas y eliminadas (Finlay y McFadden, 2006; Schulenburg et al., 2008). Un par de casos en los que se ha descrito esta estrategia son el de la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* al infectar

la mucosa del tracto genitourinario y el de *Haemophilus influenzae* al invadir el tracto respiratorio de humanos (van der Woude y Bäumlér, 2004). Otra estrategia es interferir la regulación de la respuesta inmunitario, como lo hacen *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp. y *Tripanosoma* sp., ya que desencadenan una “tormenta de citocinas” en el organismo, las cuales incrementan la producción de citotoxinas (moléculas responsables de la inflamación), originando una inmunopatología que resulta mortal para el individuo infectado (Graham et al., 2005). Además, los hongos entomopatógenos como *Metarhizium brunneum* Petch (Morales-Hernández et al., 2010), *Beauveria bassiana* (Ali et al., 2012) y *Lecanicillium muscarium* (Huang et al., 2012) producen moléculas detoxificadoras como catalasas y peroxidasas que ayudan al hongo a germinar, resistir el estrés causado por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y con ello incrementan la virulencia para invadir al hospedero. El peróxido de hidrógeno se genera como subproducto del metabolismo aeróbico y, a través de diversas reacciones puede generar radicales libres que en grandes cantidades tienen un efecto citotóxico (Lushchak, 2014). Sin embargo, en el hospedero, el  $H_2O_2$  tiene una función de defensa y señalización durante ataques infecciosos. Por ejemplo, en *Anopheles albimanus* se observó que la cantidad de  $H_2O_2$  incrementa en respuesta a la infección, provocando a su vez un incremento de los transcritos los genes de los AMPs atacina, gambicina y cecropina (Herrera-Ortiz et al., 2010). En este sentido, la catalasa producida por los hongos contrarrestaría el estado hiperoxidante del hospedero al disociar el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ , logrando satisfactoriamente la infección.

La investigación en torno a los mecanismos de la respuesta inmunitaria (innata y adaptativa) en vertebrados es vasta debido a la necesidad de obtener modelos adecuados para realizar investigación clínica y terapéutica (aplicable). No obstante, los

invertebrados al ser vectores de diversos patógenos tienen una participación sumamente importante en la diseminación de dichas enfermedades a diversas especies, mismos que amenazan la supervivencia del humano. Los estudios de inmunología en invertebrados se remontan a Elias Metschnikoff en 1882 y Paul Ehrlich en 1900, ya que, sentaron las bases de la inmunología. Metschnikoff descubrió la fagocitosis en larvas de estrellas de mar y Ehrlich propuso la teoría de la formación de anticuerpos como agentes de la especificidad inmunológica (Kaufmann, 2008). Este último descubrimiento volcó los trabajos de inmunología de invertebrados a vertebrados y, aunque había evidencia de memoria inmunitaria en invertebrados con los estudios de Pasteur, Lackie y Karp, la memoria inmunitaria de invertebrados fue quedando en el olvido (Contreras-Garduño y Lanz, 2018). Fue hasta 2003 cuando de manera independiente, Kurtz, Franz y Schmid-Hempel mostraron evidencia contundente de la memoria inmunitaria en invertebrados. Desde entonces, cambió el paradigma de que solamente los vertebrados poseían un atributo adaptativo en la respuesta inmunitaria (Contreras-Garduño et al., 2016; Contreras-Garduño y Lanz, 2018). Actualmente, la creciente evidencia ha permitido indagar en los mecanismos que componen la memoria inmunitaria (en invertebrados), sin embargo, se desconoce qué determina su activación, por ejemplo, si la virulencia de los patógenos tiene un efecto sobre la capacidad de generar o evocar la memoria inmunitaria. Resolver esto ayudaría a entender que la aparente ausencia de memoria inmunitaria no se debe a la falta del mecanismo sino a la capacidad de los patógenos de manipular a su favor dicha respuesta. Por lo anterior, surgió la pregunta de si la capacidad para generar memoria innata estaba determinada por la especie de patógeno en términos de virulencia. Para evaluar esta capacidad se han utilizado larvas de *Tenebrio molitor* contra tres especies de patógenos: *Bacillus turingiensis* (bacteria Gram-positiva), *Serratia marcescens* (bacteria Gram-negativa) y *Metarhizium anisopliae*

(hongo). En estos trabajos se corroboró la capacidad de tenebrio para generar memoria contra *B. turingiensis* pero *S. marcescens* impidió la memoria aún en retos homólogos (similares) y, lo más importante, fue que las larvas de tenebrio son capaces de generar resistencia contra retos homólogos *M. anisopliae* (Medina-Gómez et al. 2018a; apéndice 3). En síntesis, se deduce que la capacidad para generar resistencia depende en gran medida de la virulencia del patógeno.

La información anterior dio lugar a preguntarse qué tan específica era la respuesta memoria inmunitaria de tenebrios. Por lo cual, el objetivo de esta tesis fue describir y comparar el efecto de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* (GFP, 2NP1, 2NP5, y CAT que difieren entre sí por la inserción o eliminación de genes involucrados en la virulencia) sobre la supervivencia de *Tenebrio molitor* ante retos homólogos, es decir, dos retos consecutivos similares donde el primer reto se realiza con una dosis subletal de una cepa de referencia y el segundo reto con una dosis letal de una cepa muy similar; y heterólogos (diferentes), donde en el segundo reto se aplica una dosis letal de una cepa diferente. Así mismo, se evaluó la expresión del gen TmCactin (un péptido cuya función se asocia a la regulación de la transcripción de péptidos antimicrobianos como tenecinas, atacinas, defensinas y colepterinas), la expresión de tenecina 1, y la expresión de tenecina 3. TmCactin participa en la vía de señalización Toll; la activación de esta vía desencadena la síntesis de diversos AMPs entre ellos tenecina 1 y tenecina 3.

Los invertebrados poseen diversas y complejas estrategias para evitar las infecciones por parásitos y patógenos, por ello, a continuación, se expone el tema de defensa inmunitaria, incluyendo el sistema inmune innato, la respuesta inmunitaria en

vertebrados y finalmente, lo que se sabe de la memoria inmunitaria en invertebrados, particularmente, en el modelo de estudio de este trabajo, el escarabajo de la harina *Tenebrio molitor*.



## ANTECEDENTES

### El sistema inmunitario en animales

El sistema de defensa contra parásitos y patógenos comienza con las barreras no inmunitarias, por ejemplo, las medidas profilácticas de evasión (evitar consumir alimento que podría causar alguna infección), los hábitos higiénicos individuales y sociales como el acicalamiento (tanto propia, como de los conespecíficos) y mantenimiento (limpieza) del ámbito hogareño (Parker et al., 2011). Estas barreras ocurren tanto en vertebrados (Jansen, 1978), como en invertebrados; tal es el caso de las abejas que remueven pupas infestadas con *Varroa jacobsoni* (Spivak, 1996) y las hormigas *Formica paralugubris* incorporan trozos solidificados de resina al nido para evitar el crecimiento de hongos y bacterias que atenten contra la colonia (Castella et al., 2008). Se ha documentado también que diversas especies se protegen de los agentes infecciosos mediante la automedicación. Este método puede ser una medida profiláctica o un auxiliar para combatir a los patógenos durante la infección (de Roode et al., 2013). Este comportamiento es común entre vertebrados con altas capacidades cognitivas como primates y aves (Jansen, 1978), pero, no es exclusivo, pues diversas especies de insectos utilizan este mismo método (de Roode et al., 2013). La polilla *Grammia incorrupta* ingiere alcaloides pirrolizidínicos para combatir a los parasitoides del género *Tachinidae* y así incrementa su esperanza de vida (Singer et al., 2009). Esta protección puede ser transgeneracional como en la mariposa monarca (*Danaus plexipus*), ya que las hembras infectadas depositan sus huevecillos sobre las hojas de *Asclepias* sp. que contienen cardenólidos (químico tóxico que ayuda a evitar la depredación) porque al eclosionar sus larvas se alimenten de las hojas, y esto les permite combatir la infección (de

Roode et al., 2008).

Dentro de las barreras externas también está considerada la cutícula de los artrópodos, compuesta principalmente de quitina, lípidos e hidrocarburos. Ésta es una capa relativamente delgada pero muy resistente y flexible. Si rodea el cuerpo de los organismos se denomina exoesqueleto y cumple múltiples funciones, entre ellas proveer resistencia al cuerpo, resguardar los órganos internos, evitar la desecación y proteger al organismo de las infecciones (Moret y Moreau, 2012). La cutícula también recubre el tejido epitelial de los tractos digestivo, respiratorio y reproductivo al ser vías recurrentes de entrada de agentes infecciosos. Estas barreras tienen un carácter innato por lo que desde el punto de vista de algunos autores estas estrategias deben ser consideradas dentro del sistema inmunitario innato (Gallo y Hooper, 2012; Otti et al., 2014), al igual que los péptidos antimicrobianos y enzimas con actividad antibacteriana y lisozimas (Medzhitov y Janeway, 2000). Ciertamente, estas barreras disminuyen la probabilidad de infección, la carga parasitaria y la prevalencia de la infección (Parker, 2011; de Roode et al., 2011, 2013).

### **Sistema inmunitario innato y de memoria**

Cuando un patógeno logra evadir los mecanismos profilácticos y atravesar la cutícula, se enfrenta a los mecanismos de defensa internos. En este sistema interno participan diversos tejidos, células e infinidad de moléculas para conseguir la homeostasis en el organismo y, por tanto, su salud (Lanz y Contreras-Garduño, 2018).

Tradicionalmente, los ratones son el modelo más utilizado para estudiar el sistema

inmunitario para fines de investigación biomédica básica, la justificación es que hacer estudios *in vivo* en humanos es complicado y representan problemas éticos. Alrededor de 1980 se desarrollaron ratones “humanizados”, es decir, quimeras creadas mediante la incorporación de células o tejidos hematolinfoides humanos en ratones con inmunodeficiencia, con la finalidad de crear un ambiente casi idéntico al de un ser humano en el pequeño cuerpo de un ratón y lograr la interacción exitosa entre los tejidos y los agentes infecciosos de interés (Brehm et al., 2014). Esto ha permitido tener una descripción más acertada de los mecanismos subyacentes para entender la inmunidad, además, posibilita su aplicación clínica (Legrand et al., 2006) y, al mismo tiempo, permite tener una idea más clara del funcionamiento de este sistema en vertebrados. Dado que el parasitismo tiene un impacto en la adecuación (supervivencia y reproducción) de los organismos, es posible comparar y contrastar esta maquinaria con respecto a la de otros grupos taxonómicos, como las plantas y los invertebrados.

En general, tanto en vertebrados como en invertebrados el sistema inmunitario funciona gracias a su habilidad para diferenciar células propias sanas de células dañadas; lo “propio” de lo “no propio” (Söderhäll, 2010) y algo aún más increíble, es su capacidad de discernir entre agentes infecciosos y no infecciosos y responder oportunamente con la respuesta adecuada (Medzhitov y Janeway, 2000). Este sistema se integra de dos tipos de respuesta: (a) innata, que es la primera línea de defensa y se caracteriza por ser una respuesta rápida, no específica y mediada por células que fagocitan y encapsulan al agente invasor (Gourbal et al., 2018), además de activar la alerta para poner en marcha el segundo mecanismo que es la (b) respuesta adaptativa (específica de vertebrados). Esta respuesta requiere un estímulo para ser activada y posee memoria; un rasgo evolutivo que beneficia la permanencia de las especies a lo

largo de la historia evolutiva (Gourbal et al., 2018).

### **Sistema inmunitario en invertebrados**

Los invertebrados, al igual que los vertebrados, poseen respuesta innata constituida por mecanismos celulares y humorales. Ambas taxa dependen de manera importante de las células sanguíneas para la defensa innata. Los invertebrados cuentan con células llamadas hemocitos, análogas a los macrófagos y monocitos de los vertebrados que cumplen funciones similares. Los más comunes son: prohemocitos, granulocitos, plasmacitos, esferulocitos y oenocitos (Lavine y Strand, 2002), que reconocen, fagocitan, nodulan o encapsular agentes extraños, o reparan heridas (Siva-Jothy et al., 2005). Aunado a esto, la presencia constitutiva de fenoloxidasa (PO) permite la melanización y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno que dañan las proteínas, las membranas y el DNA de los microbios y que junto con las lisozimas que participan en la lisis de las células infecciosas, componen la línea de defensa de los invertebrados.

A pesar de que los patógenos son antigénicamente muy variables, es posible detectarlos a nivel molecular mediante los receptores extracelulares de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) que interactúan con moléculas estructurales altamente conservadas llamadas PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern), que activan las vías de señalización celular para que pueda llevarse a cabo una respuesta inmunitaria contra los enemigos involucrados. Cada tipo de patógeno posee PAMPs asociados a un grupo taxonómico en particular. Estos PAMPs son reconocidos por el hospedero mediante moléculas específicas: las bacterias Gram-positivas tienen PAMPs

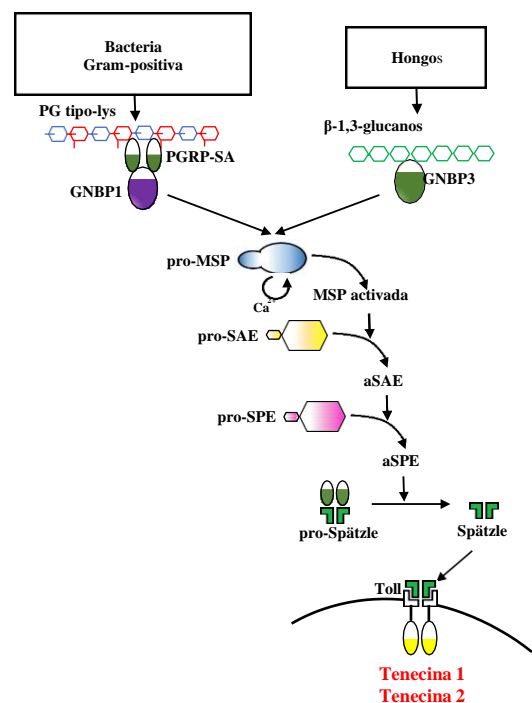
de tipo peptidoglicanos (PGs), las bacterias Gram-negativas tienen PAMPs de tipo lipopolisacáridos (LPSs) y los hongos tienen  $\beta$ -1,3 glucanos. Los PRRs responsables de reconocer PGs son la PGRP-SA (Peptidoglycan recognition protein-SA), mientras que GNBP1 (Gram-negative binding protein 1) reconoce los LPSs con los LRPs (LPS recognition protein) y finalmente, los  $\beta$ -1,3 glucanos de los hongos son reconocidos por GNBP3 (Gram-negative binding protein 3). Cada tipo de PAMP activa una vía de señalización en particular que amplifica la respuesta (Park et al., 2010).

Se han descrito diversas vías de señalización que se activan dependiendo de diferentes factores como el tipo de patógeno, y la más estudiada es la vía Toll (que significa fantástico en alemán. Figura 1), que debe su nombre a la proteína receptora transmembranal Toll que no es de tipo PRR, pero se activa después del reconocimiento de bacterias Gram-positivas y hongos por medio de las PGRPs y GNBPs (Park et al., 2010). Estos PRRs activan la cascada de la serina proteasas en el cuerpo graso, y a su vez, activan la proteína Spätzle que sirve como ligando para el receptor Toll que está unido a un complejo enzimático Myd88, que promueve la activación de kinasas. Las kinasas desencadenan una cascada de señalización intracelular que resultan en la activación de los factores de transcripción Dorsal y Dif que pertenecen a la familia de los NF- $\kappa$ B, que se translocan en el núcleo para transcribir genes específicos que codifican para péptidos antimicrobianos (Lamaitre y Hoffmann, 2007). Los factores de transcripción Dif y Dorsal tienen un I $\kappa$ B homólogo llamado Cactus que modula negativamente la activación de la vía Toll (Matova y Anderson, 2006).

Existe otra vía de señalización llamada “vía de inmunodeficiencia” (Imd) que se activa al detectar los lipopolisacáridos de una bacteria Gram-negativa por el receptor

PGRP-LC. A través de esta interacción se recluta el adaptador intracelular Imd (Lamaitre y Hoffmann, 2007); la señal producida provoca la escisión de Relish cuyo dominio Rel se transloca al núcleo promoviendo la transcripción de AMPs como diptericina (Tsakas y Marmaras 2010). Por otro lado, la vía JAK/STAT, nombrada así por las proteínas Janus Kinasa y el factor de transcripción STAT se activa cuando los hemocitos encuentran una bacteria y estos producen UPD3 que es un ligando para la proteína Domeless. Al activar esta vía se acumulan moléculas STAT en el núcleo y comienza la transcripción genética (Lamaitre y Hoffmann, 2007).

**Figura 1. Vía de señalización Toll de *Tenebrio molitor* activada por bacterias Gram-positivas y hongos.** Los peptidoglicanos tipo-lisina (PG tipo-lys) de la pared celular de las bacterias Gram-positivas son reconocidos por el PRR extracelular PGRP-SA, una vez formado el complejo se recluta al receptorGNBP1. Por otro lado, los  $\beta$ -1,3 glucanos de la pared celular de los hongos son identificados por el receptor GNBP3. Cualquiera de estos complejos activa la serin proteasa modular (MSP), esta a su vez activa la proteasa SAE (SPE-activating enzyme) que hidroliza a SPE (Spätzle processing enzyme) y finalmente ocasiona la activación de la proteína Pro-Spätzle permitiendo su interacción con el receptor Toll para inducir la síntesis de AMPs. Modificado de Park et al. (2010).

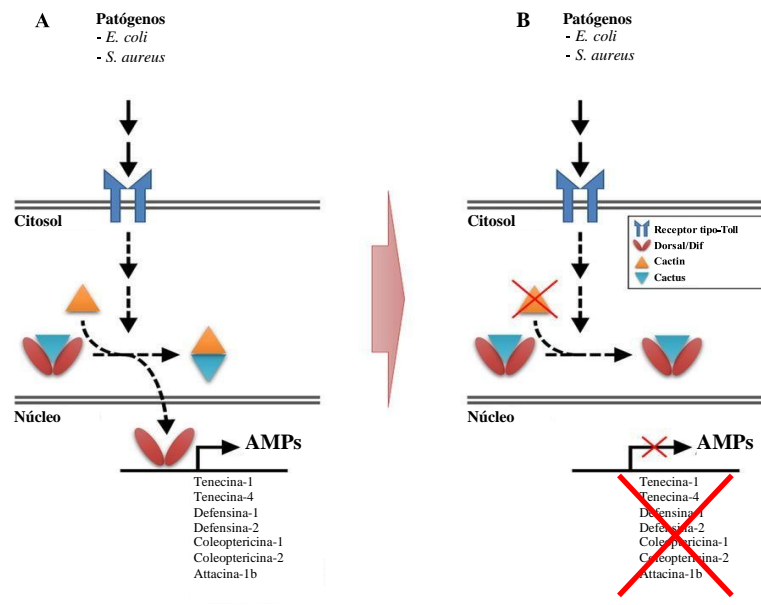


Los péptidos antimicrobianos son producidos en el tejido graso y en algunos hemocitos, su función principal es defender al organismo mediante la interacción directa con los patógenos (Johnston et al., 2014). En *Drosophila melanogaster* se han descrito diversos AMPs que se agrupan de acuerdo a su objetivo: los AMPs que actúan en contra

de las bacterias Gram-positivas, se denominan defensinas; las que atacan a bacterias Gram-negativas son dipterocinas, colóptericinas, atacinas, cecropinas y drosomicinas; las drosomicinas también actúan contra los hongos. En los últimos 30 años se han descrito en *T. molitor* AMPs homólogos a los de *D. melanogaster* y otros dípteros, cuyos objetivos abarcan a los tres grupos (bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos). La tenecina 1 es homóloga a la sapecina (encontrada en *Sarcophaga peregrina*) que ataca bacterias Gram-positivas y hongos (Moon et al., 1994); la tenecina 2, llamada inicialmente coleoptericina por su similitud con la coleoptericina en *D. melanogaster*, se activa en presencia de bacterias Gram-negativas (Roh et al., 2009); tenecina 3 es un péptido constitutivo que protege al organismo de los hongos (Lee et al., 1996) y finalmente, la tenecina 4 es similar a las atacinas contra Gram-negativas (Chae et al., 2012).

Jo et al. (2017) identificaron un péptido responsable de regular la expresión de 7 péptidos antimicrobianos en *T. molitor*: TmCactin es homólogo a Cactin de *D. melanogaster* y es clave para que se lleve a cabo la transcripción de genes específicos de AMPs como tenecinas, defensinas, coleoptericinas y atacinas (ver figura 2). Jo et al. (2017) observaron que TmCactin se activa a partir de las tres horas post infección en retos con bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocitogenes*), Gram-negativas (*Escherichia coli*) y hongos (*Candida albicans*). Posteriormente, mediante la utilización de RNAi observaron que se reduce significativamente la expresión de genes que codifican para AMPs como tenecina 1, tenecina 4, defensina 1, defensina 2, coleoptericina 1, coleoptericina 2 y atacina 1b ante retos con bacterias como *E. coli* (Gram-negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) pero no contra la bacteria *L. monocitogenes* y la levadura *C. albicans*. Estos resultados no descartan la posibilidad

de una regulación positiva de estos mismos péptidos durante la defensa contra otro tipo de hongos. Por otro lado, el RNAi no tuvo efecto contra tenecina 2, tenecina 3 y atacina 1b. Dado que no encontraron función inductora durante un ataque contra *C. albicans* descartaron la evaluación de péptidos. Además, en este trabajo únicamente evalúan la respuesta inmunitaria después de un primer reto, es decir no se evaluó la expresión de péptidos ante un segundo reto homólogo.



**Figura 2. Vía de señalización Toll y el papel de TmCactin como inductor.** (A) La interacción entre TmCactin y Cactus en el citosol permite la activación de genes de AMPs. (B) La inhibición de TmCactin evita que los factores de transcripción Dif y Dorsal entren al núcleo, impidiendo la producción de AMPs. Tomado de Jo et al. (2017) y modificado.

## Memoria inmunitaria en invertebrados

Uno de los problemas que enfrentan los que los organismos es reconocer la diversidad de patógenos que los atacan. Estos patógenos son molecularmente variables y por ello,



en los hospederos vertebrados, también existe una gran diversidad de moléculas que reconocen específicamente a sus enemigos (Pancer y Cooper, 2006). Dada la creciente evidencia, ahora se sabe que tanto las plantas como los invertebrados tienen un componente de memoria en el sistema inmune innato, dotado de especificidad, pero dado que estos dos grupos difieren de vertebrados a nivel de mecanismos y tejidos, en plantas se denomina “resistencia sistémica adquirida” (SAR) (Reimer-Michalski y Conrath, 2016) y en invertebrados “memoria inmunitaria”, “preparación inmunitaria” o “immune priming” (Kurtz y Franz, 2003). Este último se ha observado en diversas especies de crustáceos (Hauton et al., 2007; Kurtz y Franz, 2003; Ng et al., 2014; Witteveldt et al., 2004), insectos (Christofi y Apidianakis, 2013; Contreras-Garduño et al., 2014; Contreras-Garduño et al., 2015; Faulhaber y Karp, 1992; Futo et al., 2016; Gálvez y Chapuisat, 2014; Garbut et al., 2014; Lin et al., 2013; Miyashita et al., 2014; Moreno-García et al., 2014; Pham et al., 2007; Ramirez et al., 2015; Rodrigues et al., 2010; Rosengaus et al., 2013; Roth et al., 2009; Sadd y Schmid-Hempel, 2006; Shi et al., 2014; Tidbury et al., 2010; Wu et al., 2015; Zhao et al., 2013) y bivalvos (Cong et al., 2008, Zhang et al., 2014).

La preparación inmunitaria o memoria de la inmunidad inmunitaria innata se define como la capacidad para generar una respuesta inmune más vigorosa en el segundo encuentro con el mismo patógeno y que confiere protección contra microbios de la misma índole, en términos de supervivencia (Rimer et al., 2014; Contreras-Garduño et al., 2016). La memoria innata fue demostrada por primera vez por Kurtz y Franz en 2003 en el copépodo *Macrocyclus albidus*. Estos investigadores desarrollaron 24 grupos del cestodo *Schistocephalus solidus* (parásito natural del copépodo) con diferentes características antigénicas, unos más parecidos entre sí que otros. Inicialmente

indujeron una primera infección con tres larvas de céstodo en cada copépodo, tres días después se expuso a cada individuo a otros tres cestodos, ya sea, de un grupo hermano relacionado al del primer reto o de un grupo hermano menos relacionado. En síntesis, encontraron que los copépodos expuestos consecutivamente a cepas antigénicamente semejantes tuvieron un porcentaje de infección e intensidad de infección más bajo que aquellos expuestos a cepas antigénicamente diferentes, es decir, que el sistema inmune innato fue capaz de discernir entre patógenos con diferente grado de similitud (Kurtz y Franz, 2003; Dhinaut et al., 2017). Posteriormente, Roth y Kurtz (2009) demostraron en *Tribolium castaneum* que la especificidad puede darse contra bacterias a nivel de cepa, sin embargo, la diversidad de bacterias con la cual es capaz de generar resistencia es limitada, ya que hubo mejor respuesta contra los enemigos naturales (*Bacillus thuringiensis*) que contra bacterias que no infectan insectos (*Escherichia coli*). También se ha observado la especificidad en abejorros obreros de *Bombus terrestris* contra la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas fluorescens* y las bacterias Gram-positivas *Paenibacillus alvei* y *P. larvae*. En dicho estudio se llegó a la conclusión de que un primer reto, semejante al segundo (homólogo), confiere una mejor protección que cuando ambos retos son diferentes (heterólogos) (Sadd y Schmid-Hempel, 2006). Por otra parte, esta especificidad únicamente ha sido evaluada utilizando diferentes especies de bacterias o diferentes patógenos (bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y hongos) como primer reto para inducir memoria inmunitaria contra cualquiera de las mismas, sin controlar por especie de patógeno (Dhinaut et al., 2017). Medina-Gómez et al. (2018), evaluaron la eficacia de la respuesta ante retos homólogos y heterólogos con respecto a diferentes patógenos, utilizaron *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens* y *Metarhizium brunneum*. Sus resultados sugieren que el tipo de patógeno, por sí mismo, tiene un impacto sobre la capacidad de generar resistencia. Es por ello que para lograr

una evaluación mucho más minuciosa de la especificidad es necesario controlar la especie de patógeno, pero con distinto grado de virulencia para poder describir qué tan eficiente es la memoria inmunitaria.

### **Modelo de estudio**

Recientemente se han usado tenebriónidos como modelos de estudio para establecer las bases ecológicas y evolutivas de la memoria innata debido a que son insectos que poseen características evolutivas altamente conservadas. *T. molitor* es una especie cosmopolita cuyo estilo de vida se caracteriza por tener generaciones que coinciden en espacio y tiempo, es decir, se desarrollan en condiciones de alta densidad poblacional que junto con su baja movilidad dentro del hábitat, favorecen la propagación de infecciones. Dentro de las barreras no inmunitarias se ha reportado que *T. molitor* exhibe un comportamiento evasivo ante alimento (Shea, 2010) y parejas infectadas (Rantala et al. 2002), además de que la esclerotización y la melanización de la cutícula es fundamental para resistir infecciones por patógenos como *Metarhizium anisopliae* (Barnes y Siva-Jothy, 2000). Al ser una especie colonial presenta profilaxis dependiente de la densidad (DDP), lo cual permite a los individuos responder eficientemente ante patógenos recurrentes (Wilson y Reeson, 1998).

Las barreras inmunitarias de *T. molitor*, como en muchos invertebrados están basadas en un sistema innato de reconocimiento y efector (PRRs, AMPs, hemocitos). Después de que los PRRs reconocen a un invasor se activa la respuesta humoral intensamente dentro de las primeras 48 horas (Johnston et al. 2014) incluyendo la cascada de profenoloxidasa (proPO) y las vías de señalización Toll e IMD que inducen

la producción de péptidos antimicrobianos. Estos péptidos se encargan de atenuar o eliminar al agresor. La actividad de las moléculas efectoras dura hasta 10 días y cesa a niveles basales, después de este evento el insecto es capaz de sobrevivir a una segunda infección con el mismo patógeno gracias a la respuesta bifásica propia de la memoria inmunitaria (Faulhaber y Karp, 1992; Kurtz, 2005; Contreras-Garduño et al., 2015). En un estudio del grupo de Yannick Moret se puso a prueba la especificidad de la memoria en adultos de tenebrio utilizando cuatro bacterias; dos bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (no entomopatógena) y *Bacillus thuringiensis* (entomopatógena) y dos bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* (no entomopatógena) y *Serratia entomophila* (entomopatógena). En este experimento se establecieron cinco grupos, cada uno con una cepa diferente mediante inyecciones de 5µL de una suspensión salina de fosfatos (PBS) de bacterias inactivadas. Veinte días después, cada grupo se dividió equitativamente en cuatro grupos para colocar un segundo reto con cada una de las cepas de interés, y así tener todas las combinaciones posibles. Los resultados evidenciaron la capacidad de tenebrio para generar resistencia de acuerdo al tratamiento, siendo más efectiva la protección al interactuar previamente con *B. thuringiensis* (bacteria Gram-positiva), comparado con el efecto de *S. entomophila* en términos de supervivencia. Finalmente, en otro trabajo de Medina-Gómez et al. (2018b) también se evaluó la especificidad. Larvas de *Tenebrio molitor* fueron sometidas a retos homólogos y heterólogos utilizando cepas diferentes del hongo *Metarhizium anisopliae*; una cepa virulenta que sobre expresa catalasa (CAT) y una cepa menos virulenta (Ma10). En dicho trabajo se demostró que la memoria variaba no solamente entre especies de patógenos, sino también, dentro de cepas de *M. anisopliae* que variaban en virulencia. Sin embargo, este trabajo no incluyó una cepa control menos virulenta, ni se registró la respuesta inmunitaria.

La memoria inmunitaria se ha demostrado numerosas veces en *Tenebrio*, sin embargo, aún faltan saber si es específica a nivel de cepa, y cómo es la respuesta inmunitaria. *Tenebrio molitor* es un buen modelo de estudio porque se ha descrito su respuesta inmunitaria humoral (Haine et al., 2008; Cerenius et al., 2010; Johnston et al., 2014) y la capacidad para generar resistencia contra *M. anisopliae* (Medina-Gómez et al., 2018a). Por lo tanto, el tema de mi tesis fue analizar si la especificidad de memoria en *Tenebrio molitor* es a nivel de cepa y conocer la expresión de péptidos antimicrobianos Tenecina 1 y 3 y su inductor TmCactin.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si la memoria inmunitaria en larvas de *Tenebrio molitor* es específica contra diferentes cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum*.

### **Objetivos particulares**

- a) Evaluar la capacidad de las larvas de *Tenebrio* para generar resistencia contra las diferentes cepas de *M. brunneum*.
  
- b) Analizar la protección de *Tenebrio* contra las diferentes cepas de *M. brunneum* mediante la expresión de tenecinas 1 y 3, así como de el inductor TmCactin de acuerdo con el tratamiento.

## **HIPÓTESIS**

La memoria inmunitaria será específica ante retos homólogos lo cual favorecerá la supervivencia y la respuesta inmunitaria a nivel de moléculas efectoras.

Tenecina 1 y TmCactin se expresarán más contra retos homólogos del patógeno a diferencia de tenecina 3 que actuará indistintamente.

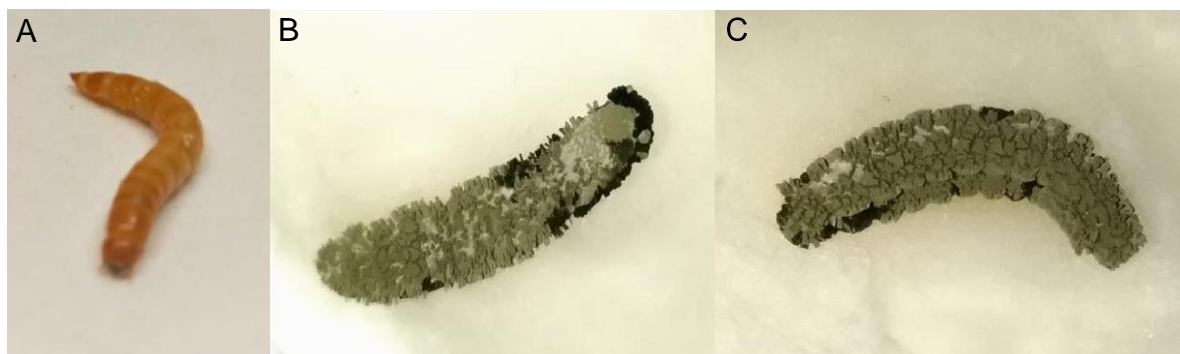
En el tratamiento con la cepa virulenta, a diferencia de la no virulenta, habrá menor supervivencia y respuesta inmunitaria.

La cepa virulenta evitará el establecimiento de la memoria evitando la expresión de cualquier péptido.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Larvas de *Tenebrio molitor*

Los experimentos se efectuaron en larvas de 1.5 a 1.7cm que corresponden al instar 10 u 11 de desarrollo (Park et al., 2013). Dichas larvas provienen del insectario Maria Sibylla Merian de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia. Estas fueron criadas a una temperatura de  $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$  en oscuridad y alimentadas *ad libitum* con harina de maíz y salvado de trigo (1:1), así como con cuadritos de manzana cada tercer día (Castro-Vargas et al., 2017). El alimento fue esterilizado a  $125 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 15 minutos para eliminar microorganismos que pudieran estar presentes al momento de ser ingerido por las larvas y así evitar cualquier posible infección por algún otro patógeno que pueda influir o sesgar los resultados (Castro-Vargas et al., 2017).



**Figura 3. Fotografías de una larva sana y dos infectadas con *Metarhizium brunneum*.** A) Larva sana de *Tenebrio molitor* de 10° u 11° instar de desarrollo. B) y C) Larvas en cámaras húmedas infectadas con la cepa Cherry de *Metarhizium brunneum* diez días post infección.



## **Cepas de *Metarhizium brunneum***

Las cepas de *M. brunneum* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Genética Molecular de Hongos del Departamento de Biología de la División de Ciencias Exactas del Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato (UG), ya que, fue necesario utilizar cepas genéticamente modificadas para obtener diferentes grados de virulencia. Las cepas se prepararon con Tween al 0.01% (Tween-PBS) como medio para disociar las conidias y se realizaron diluciones seriadas para las concentraciones deseadas (para los detalles de las diluciones ver Apéndice 1). Las cepas fueron: Cherry (expresa un marcador fluorescente rojo), GFP (expresa la proteína verde fluorescente), CAT (sobrexprea catalasa), 2NP1 (carece del gen 2NP1 involucrado en la infección), 2NP5 (posee eliminación del gen 2NP5 involucrado en la infección). La cepa Cherry y la cepa GFP son homólogas, es decir, estructuralmente similares, pero se diferencian entre sí por el marcador fluorescente que posee cada uno: rojo la cepa Cherry y verde la cepa GFP, dichos marcadores no afectan la virulencia (Castro-Vargas et al., 2017).

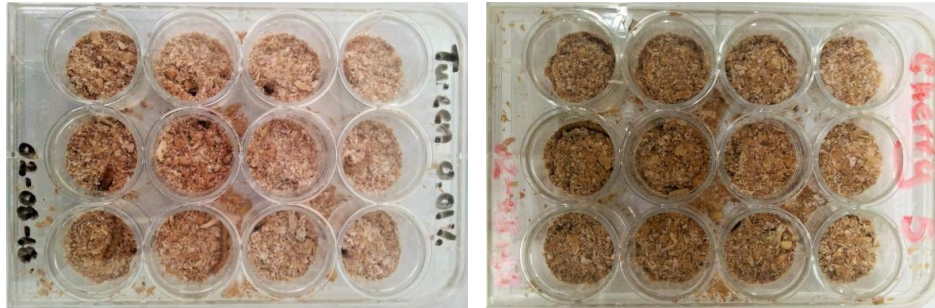
Se realizaron al menos dos réplicas independientes por cada experimento, los cuales consistieron en tomar larvas de la misma edad, pero de diferentes cohortes (para tener variabilidad genética) de la colonia general de tenebrios. Cada réplica recibió todos los retos inmunitarios (Figura 5). Estos retos constaron en inyecciones en la membrana cuticular del surco anterolateral izquierdo, entre el 6° y 7° segmento abdominal, con diferentes concentraciones de conidias de *M. brunneum* y el solvente en el cual el hongo fue diluido como control. Finalmente, una vez inyectadas las larvas fueron colocadas individualmente en cajas Corning de 12 pozos con alimento estéril (ver Figura 4) y diariamente se examinó la supervivencia durante 10 días (Castro-Vargas et al., 2017,

Medina-Gómez et al., 2018a, 2018b). Cada larva que sucumbió ante la infección fue colocada en una cámara húmeda para corroborar la muerte por el hongo (ver Figura 3).

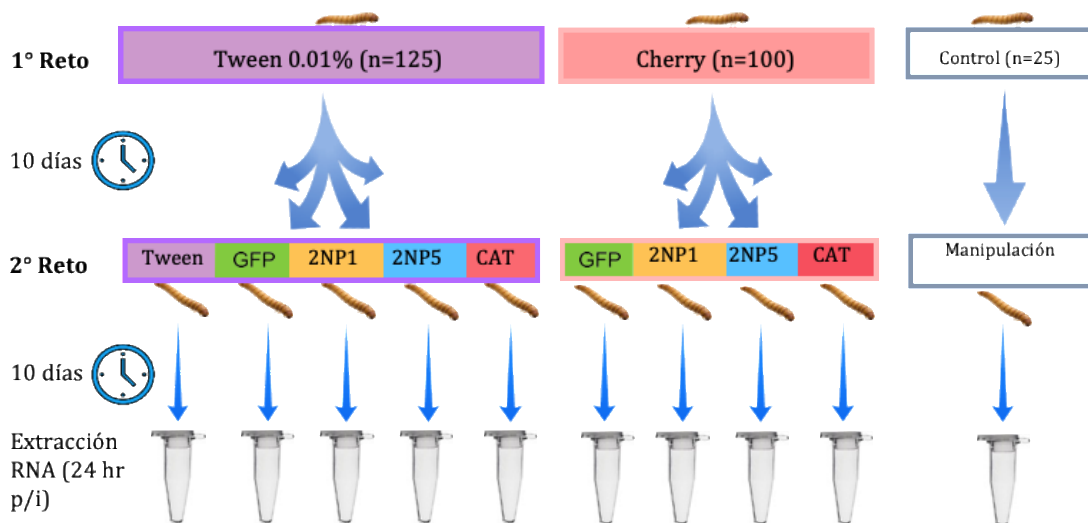
Para evaluar la virulencia de cada una de las cepas mutantes se llevó a cabo un experimento en el cual 150 larvas fueron inyectadas con 1  $\mu$ L de una dosis subletal (5 conidias/ $\mu$ L) de los diferentes tratamientos (30 larvas por cepa), junto con un grupo control al que sólo se le inyectó Tween 0.01% (n = 30) y un grupo de manipulación (N = 210). Se registró la supervivencia 10 días después de la inyección (ver Figura 5). Posteriormente, se realizó un experimento similar, pero utilizando diferentes concentraciones de las cepas (5, 50, 100, 150, 200 y únicamente de 400 y 600 para la cepa 2NP1; ver Apéndice 2, Figura 12). Esto se realizó para establecer las dosis-respuesta y así determinar las dosis letales (100%) y subletales (20-30%).

Para probar la memoria inmunitaria con la cepa GFP se realizó una primera inyección en 25 larvas de tenebrio con una dosis subletal (DL<sub>20-30</sub>, 5 conidias/ $\mu$ L) de la cepa Cherry, transcurridos 10 días se inoculó con una dosis letal (DL<sub>100</sub>, 200 conidias/ $\mu$ L) de la cepa GFP. Este mismo procedimiento se siguió para cada una de las cepas, así, la memoria con la cepa 2NP1 se puso a prueba inyectando como primer reto 1  $\mu$ L (DL<sub>20-30</sub>) de la cepa Cherry y posteriormente a los 10 días una dosis letal de la cepa de interés (GFP, 2NP1, 2NP5, CAT). Un grupo control fue necesario en este experimento, el cual consistió en inyectar 1  $\mu$ L de Tween 0.01% (Tween-PBS) como primer reto, para asegurar que la dilución de Tween 0.01% por sí misma no contribuyera a la formación de la memoria, y posteriormente, en el segundo reto se utilizó cada una de las cepas con un tamaño de muestra de 25 individuos por tratamiento. Finalmente se agregó un grupo control de manipulación para poder realizar las comparaciones correspondientes y tener

un tamaño de muestra total de 250 larvas (ver Figura 5).



**Figura 4. Cajas Corning de experimentación.** Cajas de 12 pozos con una larva por pozo y alimento estéril. A la izquierda el grupo control de inyección Tween 0.01% y a la derecha el grupo de experimentación Cherry con primera dosis subletal.



**Figura 5. Esquema del método con los diferentes grupos experimentales desde el primer reto (día 1) hasta las disecciones (día 21).** Tween-Tween, Tween-GFP, Tween-2NP1, Tween-2NP5, Tween-CAT; este grupo control SIN MEMORIA (n = 125) tiene como primer reto únicamente inyectar Tween 0.01% y como segundo reto las cepas de interés (n = 25 por cepa). El segundo grupo (DE MEMORIA n = 100) está compuesto por: Cherry-GFP, Cherry-2NP1, Cherry-2NP5, Cherry-CAT. Todos se inyectaron con una dosis subletal (LD20) de Cherry y el segundo reto con las cepas diferencial (n = 25 por cepa). El tercer grupo fue control de manipulación (n = 25). El segundo reto se realizó a los 10 días posteriores al primer reto con cada una de las cepas mutantes (GFP, 2NP1, 2NP5 y CAT).

Para evaluar la especificidad en la interacción hongo-coleóptero en términos moleculares, se cuantificaron tres péptidos que podrían estar involucrados en la especificidad. Tenecina 1 fue purificado y caracterizado por Moon et al. (1994) a partir de hemolinfa de larvas de *Tenebrio molitor*, cuya actividad antimicrobiana fue probada contra diferentes especies de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos, dando como resultado una actividad más efectiva contra Gram-positivas y hongos. Esta tenecina pertenece a las defensas inducibles y se produce como consecuencia de la activación de la vía Toll. También se registró la expresión de tenecina 3, que al igual que la tenecina 1, elimina hongos, sin embargo, este pertenece a las defensas constitutivas. Además de medir moléculas de ataque, se registró un péptido encargado de regular la expresión de AMPs: TmCactin. Para evaluar la expresión de tenecinas 1 y 3 y el inductor TmCactin se realizó un experimento de memoria muy parecido al anterior (figura 5) pero en este caso sólo se analizaron los tratamientos con las cepas GFP, 2NP5 y CAT (GFP, 2NP5, CAT, Tween-GFP, Tween-2NP5, Tween-CAT, Cherry-GFP, Cherry-2NP5 y Cherry-CAT) y ambos controles, Tween-Tween y manipulación (N = 33) y se procedió a hacer la extracción de RNA.

### **Extracción de RNA**

Las disecciones se llevaron a cabo 24 horas después del segundo reto (ver figura 5). Se utilizaron diez larvas por tratamiento teniendo un total de 100 muestras (dos réplicas); se extrajo el tubo digestivo de las larvas para evitar cualquier posible contaminación del tejido graso con bacterias u otros microorganismos y se desprendió el tejido lipídico de la cutícula con cuidado con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5mL con 500µL de la muestra y

fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En el Instituto Nacional de Salud Pública se llevó a cabo la técnica de extracción de RNA con TRIzol®. Después de colocar el tejido graso en 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol®, se maceró la muestra con un pistilo a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, el material genético fue precipitado con 100  $\mu\text{L}$  de Cloroformo a  $4^{\circ}\text{C}$  (en proporción 1:5); se mezcló nuevamente en un VORTEX durante unos cuantos segundos y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se colocó en una centrífuga con control de temperatura a 12,500 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para separar el material genético de proteínas, lípidos y DNA presentes en las muestras.

Se tomaron aproximadamente 200 $\mu\text{L}$  del sobrenadante que contenía el RNA y se colocó en un tubo nuevo rotulado adecuadamente; a este nuevo tubo se le agregaron también 400 $\mu\text{L}$  de isopropanol (en proporción 2:1), se mezcló suavemente y se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora para acelerar la precipitación. Una hora después, se colocaron las muestras en la centrífuga a 12,500 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Dado que el templado de RNA se encuentra precipitado en el fondo del tubo, se decantó el sobrenadante con isopropanol y se hicieron dos lavados con 500 $\mu\text{L}$  de Etanol al 70% en cada ocasión, agitando en VORTEX unos segundos y centrifugando a velocidad máxima (13,000rpm) durante 5 minutos, para obtener el templado de RNA lo más puro posible. Después de ambos lavados, se colocaron los tubos destapados boca abajo en papel absorbente previamente esterilizado con luz UV para evitar contaminación. Una vez seco, se resuspendió en 20 $\mu\text{L}$  de agua inyectable y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Obtención de cDNA**

Primero, se analizó la pureza del templado de RNA en un NanoDrop que es un espectrofotómetro compacto de ultravioleta visible que mide rápidamente la pureza de proteínas, DNA o RNA con tan solo una micromuestra. Los valores obtenidos fueron utilizados para diluir cada muestra a 500 ng/μL y proceder con la síntesis del cDNA. Cada muestra se colocó en un tubo nuevo rotulado, con la cantidad correspondiente a 500 ng/μL, 0.5μL de DNasa, 0.8μL de BufferDNasa aforado a 8μL con agua DEPC. Adicionado ya todo lo necesario se colocaron los tubos en un termociclador BioRad a 37°C por 50 minutos, se agregaron 0.5μL de EDTA 50nM y se introdujo de nuevo en el termociclador para incubar a 65°C por 10 minutos.

## **RT-PCR tiempo real**

Posteriormente, en otro juego de tubos pequeños para termociclador BioRad se vertieron 5 μL de agua DEPC, 0.5μL de hexámeros, 1μL de dNTP's y al final 8.5μL de la muestra, y para tener un volumen total final de 15μL. Dicha mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos y se le adicionó 4μL de Buffer RT 5x (Thermo Scientific), 0.5μL de Inhibidor de RNasa RiboLock (Thermo Scientific) y RevertAid Trascriptasa Reversa (Thermo Scientific). De nuevo se colocaron las muestras en el termociclador y se configuró para que incubara a 25°C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos y 85°C por 15 minutos. Una vez terminado el ciclo se almacenaron las muestras a una temperatura de -20°C.

Para realizar el RT-PCR fue necesario diluir con anticipación los oligonucleótidos a 10nM. Estos fueron solicitados al Instituto de Biotecnología de UNAM y sus respectivas

concentraciones se encontraban en la ficha técnica que proporciona el Instituto en una base de datos disponible en línea en <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/busquedas.html>.

Se utilizaron cuatro genes: TmCactin que corresponde al inductor de AMPs, tenecina 1 y tenecina 3 que tienen actividad antifúngica y, el gen endógeno RPL27 que corresponde a la proteína ribosomal 60S (ver Tabla 1) el cual fue utilizado como control interno por ser un gen de expresión constitutiva.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de la expresión de péptidos (Tenecina 1, Tenecina 3, TmCactin y el gen endógeno RPL27).** \*Todas las secuencias fueron tomadas de NCBI Genbank y son específicas de *Tenebrio molitor*.

Primer	Secuencia	Fuente
TmCactin-Fw	5'-AAGCGGCGCAATTTGAAGAG-3'	Jo et al., 2017
TmCactin-Rv	5'-TCCGCGCTTATGTATTTTCGC-3'	Jo et al., 2017
Tenecina 1-Fw	5'-GGAAGCGGCAACAGCTGAAGAAAT-3'	Moon et al., 1994
Tenecina 1-Rv	5'-AACGCAGACCCTCTTTCCGTTACA-3'	Moon et al., 1994
Tenecina 3-Fw	5'-GCGCATCCTCTGGGTGGTCACCAAACCG-3'	Lee et al., 1996
Tenecina 3-Rv	5'-GCGGATCCAGGTCCATGCTGCCCGTGTT-3'	Lee et al., 1996
RPL27-Fw	5'-TCATCCTGAAGGCAAAGCTCCAGT-3'	En Chae et al., 2012
RPL27-Rv	5'-AGGTTGGTTAGGCAGGCACCTTTA-3'	En Chae et al., 2012

Debido a que se utilizaron cuatro oligonucleótidos, fue necesario cuadruplicar los tubos de RT-PCR para llevar a cabo las reacciones de cada muestra, así, el número total de tubos aumentó a 120. Para cada péptido (TmCactin, Tenecina 1, Tenecina 3 y RPL27) se realizó una mezcla que contenía 5µL de SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 0.4µL de la secuencia forward, 0.4µL de la secuencia reverse, 3.2µL agua libre de RNasas y 1µL de cDNA para tener un volumen total de 10µL para cada una de las muestras y se

centrifugaron. Se introdujeron las muestras en un Bio-Rad CFX96 Real Time PCR y se programó de la siguiente manera: 95°C durante 2 minutos; 95°C por 0.05 minutos; 60°C por 30 segundos; se repitieron las últimas dos temperaturas 39 veces, posteriormente aumentó la temperatura de nuevo a 95°C por 5 segundos; bajó a 65°C otros 5 segundos y finalizó a 95°C.

### **Análisis de supervivencia**

Los análisis de supervivencia fueron realizados con Graphpad Prism6. Se utilizó la prueba Log-rank para evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos (ver tablas 2, 3 4 y 5). Se construyó una base de datos en la cual la primera columna corresponde al tiempo, de la segunda en adelante los tratamientos; las celdas de la columna de tiempo se llenaron con la cantidad de días evaluados repitiendo cada número las veces que un evento tomó lugar, es decir, si para el día 3 habían muerto 5 larvas, se repetía el número 3 cinco veces y se colocó un cero 5 casillas correspondientes a la columna del tratamiento en cuestión. Este programa se utilizó para realizar los gráficos Kaplan-Meier de supervivencia (ver figuras 6, 7 y Apéndice 2) y las gráficas de barras del análisis de expresión de péptidos antimicrobianos y TmCactin.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variaciones poblacionales en la capacidad del sistema inmunitario de los hospederos son determinantes en la supervivencia (Schmid-Hempel, 2009). Sin embargo, los parásitos y patógenos no son agentes pasivos y son capaces de mantener una relación cercana y duradera con sus hospederos gracias a su capacidad para adaptarse rápidamente a las nuevas defensas del hospedero (Schmid- Hempel y Ebert, 2003). Frecuentemente se seleccionan mecanismos de evasión inmunológica y el resultado puede ser alguna modificación en la virulencia (Schmid- Hempel, 2008b). La virulencia depende de diversos factores y la capacidad para causar daño y reducir la adecuación del hospedero depende de la susceptibilidad de este último dada la naturaleza de la interacción (Casadevall y Pirofski, 2001). Los factores de virulencia son componentes genéticos de los patógenos que incluyen moléculas esenciales para la viabilidad que al mismo tiempo facilitan la infección, lo que contribuye a la patogenicidad (Casadevall y Pirofski, 1999). Es así que, los estudios de sistema inmunitario deben dar la misma importancia a la virulencia y a la respuesta inmunitaria. *M. brunneum* posee adaptaciones que le permiten ser saprobio o entomopatógeno. En el primer caso, hay un incremento en la expresión de genes relacionados con el crecimiento, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, la reorganización de la pared celular, y la señalización al llegar a la hemolinfa. Cuando se desarrolla como entomopatógeno hay mayor expresión de proteasas y  $\beta$ -glucosidasas (Wang et al., 2005). Es decir, que el cambio en el ambiente podría resultar en una ventaja para su adecuación. Respecto a la virulencia de *M. brunneum* contra insectos, se logró crear una cepa mutante que sobreexpresa catalasa (Morales-Hernández et al., 2010). Esta enzima degrada el peróxido de hidrógeno (una molécula oxidante de defensa del hospedero) en agua y oxígeno acelerando el tiempo

de germinación y, por lo tanto, incrementa la virulencia (Morales-Hernández et al., 2010). Además, Salazar et al. en 2015 realizaron la eliminación de genes de tipo 2NP (cepa  $\Delta$ 2NP1, cepa  $\Delta$ 2NP5) que se activan durante la invasión al hospedero en la hemolinfa. Estos genes de la enzima 2-nitropropano dioxigenasa forman parte de una familia de enzimas oxidantes de nitroalcanos, que catalizan la desnitrificación oxidante de los nitroalcanos a sus correspondientes compuestos carbonilo y nitro (Ha et al., 2006), lo que da como resultado una variación en la virulencia. Estos trabajos sugirieron que la defensa pro-oxidante del insecto es importante para acabar con el hongo y basándonos en esto, se usaron distintas cepas para saber su efecto en la memoria inmunitaria. Sin embargo, dado de no se sabía de qué manera contribuyen al éxito de la infección durante la invasión, primero se hizo un experimento de dosis-respuesta para determinar su virulencia.

A continuación, se muestran los resultados de supervivencia ante un primer reto donde se visualiza el efecto diferencial de las distintas cepas para evaluar la virulencia. Posteriormente, se muestran los resultados de memoria (resistencia) y por último la respuesta inmunitaria (protección) durante la memoria.

## **Supervivencia**

### ***Virulencia de las cepas de *M. brunneum* como primer reto***

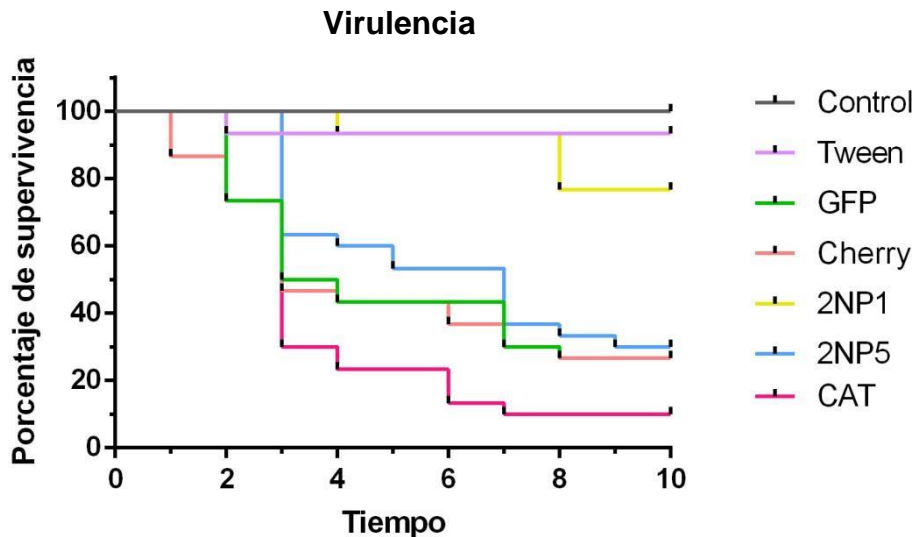
Los análisis de Log-rank (ver Tabla 2) no arrojaron diferencias significativas entre el grupo de manipulación y el grupo inyectado con Tween 0.01% (Tabla 2, Apéndice 2, Figura 12). Esto es importante porque muestra que es el patógeno y no el medio de dilución del

patógeno lo que afecta la supervivencia del hospedero (Medina-Gómez et al., 2018a). Por otra parte, se corroboró que las cepas Cherry y GFP no tuvieran diferencias significativas en cuanto a la supervivencia del hospedero (Tabla 2, Figura 5). Esto es fundamental porque al ser cepas homólogas la inserción de genes que les confiere una fluorescencia no debería influenciar su virulencia (Castro-Vargas et al., 2017). Debido a este resultado, la cepa GFP fue usada como control de virulencia en el experimento de memoria (para el segundo reto).

La virulencia de la cepa 2NP5 no fue estadísticamente diferente respecto a la cepa control de virulencia GFP (Tabla 2, Figura 5), lo cual sugiere que el gen eliminado, no contribuye de manera importante en la patogenicidad de *Metarhizium brunneum*. Sin embargo, la cepa 2NP1 sí tuvo una menor virulencia con respecto a la cepa GFP al afectar negativamente a más individuos (Tabla 2, Figura 6). De hecho, esta cepa no mostró diferencias en supervivencia con respecto al grupo control Tween 0.01% (Tabla 2, Figura 6) lo cual sugiere que el hongo pierde virulencia sin el gen 2NP1. Finalmente, la cepa CAT fue la más virulenta, porque las concentraciones bajas de esta cepa mataron una mayor cantidad de insectos y en menor tiempo que las cepas 2NP1, 2NP5 y GFP (Tabla 2, Figura 6). Esto concuerda con que la sobreexpresión del gen de catalasa favorece la virulencia (Morales-Hernández et al., 2010; Medina-Gómez et al., 2018b). Se ha propuesto que en la interacción genotipo-genotipo, la expresión genética de la respuesta inmunitaria del hospedero se ve afectada directamente por la expresión genética del parásito en cuestión. En este sentido, un gen podría adquirir tal relevancia al grado de afectar sustancialmente la susceptibilidad de su antagonista (Hamilton, 1993). Esto podría explicar por qué la sobreproducción de catalasa incrementa considerablemente la virulencia de *M. brunneum* contra *T. molitor* y a futuro se debería

investigar el papel de estos genes de catalasa en otros entomopatógenos.

Cabe resaltar que esta es la primera vez que se reporta la virulencia en función de los genes 2NP1 y 2NP5. Contra insectos, se sabía que se expresan durante todo el ciclo infectivo y aún más sobre la cutícula como fuente de carbono, pero, el gen 2NP1 se expresó hasta 7 veces más que el gen 2NP5 (Padilla-Guerrero, 2010). Por tanto, este análisis genético y nuestros resultados de supervivencia sugieren que 2NP1 tiene un papel más importante en la virulencia que 2NP5 y sería interesante comparar su papel con respecto a los otros genes del complejo 2NP (en total se conocen 6 genes en este complejo; Padilla-Guerrero, 2010).



**Figura 6. Supervivencia (en días) de larvas de tenebrio contra las cepas de *M. brunneum*.** En el eje "Y" se observan los valores porcentuales de larvas que sobreviven a lo largo del tiempo (eje "X", 10 días) con los diferentes tratamientos. En color gris se presenta el grupo Control (manipulación) que tuvo el 100% de supervivencia; en color morado se aprecia el grupo inyectado con Tween 0.01%; en amarillo se observa el grupo inyectado con la cepa 2NP1; en azul el grupo inoculado con la cepa 2NP5; en verde el grupo inyectado con la cepa GFP; en salmón la cepa de referencia Cherry, y en rosa mexicano la cepa virulenta CAT. Cada tratamiento consistió en 50 larvas inyectadas (dos réplicas N = 350). Dado que la distribución de los datos no fue normal, se utilizó un análisis no paramétrico utilizando el estimador Kaplan-meier en función de la supervivencia.

La Tabla 3 muestra las comparaciones entre grupos (de acuerdo con la concentración de conidias) cuando se aplica un reto. Se establecieron concentraciones de 5, 50, 100, 150, 200 para CAT, Cherry, GFP y 2NP5 y 400 y 600 para 2NP1. En todos los grupos y concentraciones se detectaron diferencias significativas en la mortalidad de las larvas con respecto al control de manipulación. Hubo diferencias significativas cuando se administró una dosis subletal de la cepa CAT con respecto a la cepa 2NP1 con 5 conidias/ $\mu$ L. En el caso de 50 conidias/ $\mu$ L, las cepas que mostraron una marcada disparidad fueron GFP y 2NP1. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la concentración de 100 conidias/ $\mu$ L entre tratamientos, pero sí en el de 150 conidias/ $\mu$ L entre la cepa 2NP1 y la cepa 2NP5. Con la concentración de 200 conidias/ $\mu$ L hubo diferencias significativas entre GFP y 2NP5. Esto demuestra que los análisis de supervivencia de acuerdo a la infección deben tomar en cuenta la dosis del patógeno, así como la virulencia de las cepas. Lo anterior muestra que 2NP1 en *M. brunneum* es un gen clave en la virulencia del hongo porque su eliminación favorece la resistencia del hospedero. También se mostró que la sobreexpresión del gen de la catalasa (CAT) es importante como factor de virulencia (ver Figura 6, Apéndice 2).

**Tabla 2. Comparación de la supervivencia de larvas de *T. molitor* después de una dosis subletal (DL50) de las cepas GFP, 2NP1, 2NP5 y CAT de *M. brunneum*. \*En rojo se muestran las diferencias significativas.**

Grupo 1	Grupo 2	Log-rank	Valor de p
Control	Tween	2.034	0.1538
Control	GFP	35.93	< 0.0001
Control	2NP1	7.796	0.0052
Control	2NP5	33.36	< 0.0001
Control	CAT	53.77	< 0.0001
Tween	GFP	26.96	< 0.0001

Grupo 1	Grupo 2	Log-rank	Valor de p
Tween	2NP1	2.928	0.087
Tween	2NP5	24.95	< 0.0001
Tween	CAT	43.76	< 0.0001
GFP	2NP1	18.03	< 0.0001
GFP	2NP5	0.179	0.6723
GFP	CAT	4.784	0.0287
2NP1	2NP5	14.96	< 0.0001
2NP1	CAT	36.18	< 0.0001
2NP5	CAT	6.305	0.012
GFP	Cherry	0.0008764	0.9764

**Tabla 3. Comparación de la supervivencia de larvas de *T. molitor* de acuerdo con la dosis (A) 5 conidias/μL, (B) 50 conidias/μL, (C) 100 conidias/μL, (D) 150 conidias/μL, (E) 200 conidias/μl y (F) 400 y 600 conidias/μl de las cepas de *M. brunneum*. \*En rojo se muestran las diferencias significativas.**

**(A) 5 conidias/ μL**

Grupo 1	Grupo 2	Log-rank	Valor de p
Control	GFP 5	23.37	< 0.0001
Control	2NP1 5	13.52	0.0002
Control	2NP5 5	26.56	< 0.0001
Control	CAT 5	33.56	< 0.0001
GFP 5	2NP1 5	2.549	0.1103
GFP 5	2NP5 5	0.3839	0.5355
GFP 5	CAT 5	1.152	0.2832
2NP1 5	2NP5 5	0.01508	0.9023
2NP1 5	CAT 5	7.326	0.0068
2NP5 5	CAT 5	0.1196	0.7295

**(B) 50 conidias/ μL**

Control	GFP 50	37.13	< 0.0001
Control	2NP1 50	29.78	< 0.0001
Control	2NP5 50	32.59	< 0.0001
Control	CAT 50	45.92	< 0.0001
GFP 50	2NP1 50	12.85	0.0003
GFP 50	2NP5 50	0.1278	0.7207
GFP 50	CAT 50	0.03574	0.85

Grupo 1	Grupo 2	Log-rank	Valor de p
2NP1 50	2NP5 50	0.5626	0.4532
2NP1 50	CAT 50	2.015	0.1558
2NP5 50	CAT 50	0.3344	0.5631

### (C) 100 conidias/ $\mu$ L

Control	GFP 100	83.72	< 0.0001
Control	2NP1 100	67.46	< 0.0001
Control	2NP5 100	93.19	< 0.0001
Control	CAT 100	82.91	< 0.0001
GFP 100	2NP1 100	0.5925	0.4414
GFP 100	2NP5 100	0.01425	0.905
GFP 100	CAT 100	0.002922	0.9569
2NP1 100	2NP5 100	0.2742	0.6005
2NP1 100	CAT 100	0.5051	0.4773
2NP5 100	CAT 100	0.0126	0.9106

### (D) 150 conidias/ $\mu$ L

Control	GFP 150	101.5	< 0.0001
Control	2NP1 150	78	< 0.0001
Control	2NP5 150	100.1	< 0.0001
Control	CAT 150	104.4	< 0.0001
GFP 150	2NP1 150	6.714	0.0096
GFP 150	2NP5 150	0.2842	0.594
GFP 150	CAT 150	1.076	0.2996
2NP1 150	2NP5 150	4.917	0.0266
2NP1 150	CAT 150	3.504	0.0612
2NP5 150	CAT 150	0.271	0.6027

### (E) 200 conidias/ $\mu$ L

Control	GFP 200	109.9	< 0.0001
Control	2NP1 200	91.48	< 0.0001
Control	2NP5 200	109.5	< 0.0001
Control	CAT 200	112.6	< 0.0001
GFP 200	2NP1 200	2.421	0.1197
GFP 200	2NP5 200	4.355	0.0369
GFP 200	CAT 200	2.84	0.092
2NP1 200	2NP5 200	0.1047	0.7463
2NP1 200	CAT 200	0.06299	0.8018
2NP5 200	CAT 200	0.03863	0.8442

### (F) 400 y 600 conidias/ $\mu$ L

Control	2NP1 400	105.9	< 0.0001
Control	2NP1 600	103.6	< 0.0001

Finalmente, los bioensayos muestran un efecto dosis dependiente del hongo. Las gráficas en el apéndice 2 (Figura 11) revelan que entre 5 y 50 conidias/ $\mu$ L existe una virulencia que puede abatir el insecto en un 50%. No obstante, entre 50 y 100 conidias, incluso llegó a una mortalidad de 100%. En conjunto, todos estos bioensayos revelan el papel de distintos genes de *M. brunneum* implicados en la virulencia, y esto permitió conocer su efecto en la memoria inmunitaria descrito a continuación.

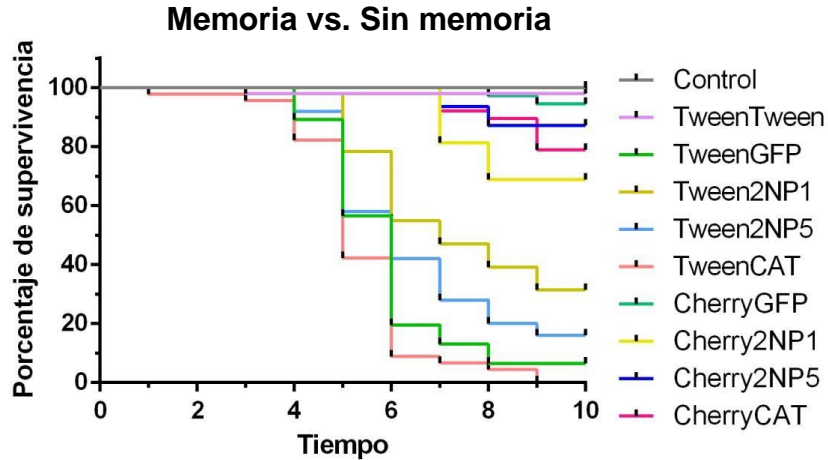
### ***Resistencia de las larvas ante retos homólogos y heterólogos de las cepas de M. brunneum***

Se corroboró que la memoria favorece la supervivencia, ya que, con retos homólogos de *M. brunneum* (Cherry-GFP), las larvas vivieron más que con retos los heterólogos del hongo (por ejemplo, Cherry-CAT), o que con retos heterólogos de Tween 0.01% en un primer reto y cualquier cepa del hongo como segundo reto. Esta memoria parece ser tan efectiva que los retos homólogos Cherry-GFP no mostraron diferencias significativas en supervivencia con respecto a retos homólogos de Tween 0.01% (Tabla 4, Figura 7). Otros trabajos corroboran la existencia de memoria innata dentro de las generaciones en *T. molitor* (Castro-Vargas et al., 2017; Medina-Gómez et al., 2018a; Medina-Gómez et al., 2018b), pero en esta tesis se demuestra por primera vez que la memoria de *T. molitor* contra *M. brunneum* puede ser a nivel de cepa.

Por otro lado, también se observó que el contacto con un agente extraño (Tween 0.01%) activa una respuesta inmunitaria, aunque esto no genera memoria cuando se expone a un patógeno en un segundo evento. Esto se observó con los tratamientos Tween-GFP y Tween-2NP5, Tween-2NP5 y Tween-CAT (ver Apéndice 2 Figura 14), aunque CAT siguió siendo la más virulenta en el segundo reto. Cabe destacar que también



hubo coincidencia en que 2NP1 fue menos virulenta que CAT (ver Tabla 4 B).



**Figura 7. Supervivencia de larvas de *Tenebrio* ante retos homólogos y heterólogos de *M. brunneum* en grupos de memoria y sin memoria.** En el grupo sin memoria el primer reto es Tween 0.01% y el segundo las cepas mutantes. En el grupo de memoria Cherry). Existe una marcada diferencia entre ambos grupos, el grupo de memoria está agrupado en la parte superior de la gráfica pues en general tuvo mayor supervivencia, mientras que el grupo sin memoria se encuentra en la parte inferior con el menor porcentaje de supervivencia.

En cuanto al grupo de memoria, los resultados concuerdan con los de Dhinaut et al. (2017), porque la supervivencia dependió del tratamiento y del primer reto. Sin embargo, aunque 2NP1 en primer reto no es virulenta, el tratamiento Cherry-2NP1 fue incluso más virulento que Cherry-CAT. Este fenómeno quizás se deba a que el insecto al inicio no detecte que 2NP1 es virulento y en un segundo encuentro no lo ataque de manera agresiva, y entonces, el hongo aproveche para matar. Estos resultados plantean su investigación a futuro tomando en cuenta la respuesta inmunitaria del insecto a diferentes tiempos.

Cabe destacar que los grupos con infecciones duales tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo de manipulación a excepción del tratamiento Cherry-GFP. Esto corrobora que la memoria puede ser específica a nivel de cepa (ver tabla 4 B).

El resultado se contrapone a lo que obtuvo Dhinaut et al. (2017) porque no encontró evidencia de especificidad en la respuesta de adultos de tenebrio. No obstante, en dicho experimento, indujeron la memoria con bacterias inactivadas y esto no produce el mismo efecto que con bacterias vivas, aunque Haine et al. (2008) no encontraron diferencias en la respuesta inmunitaria (PO, proPO, actividad lítica y hemocitos) en adultos de tenebrio contra bacterias vivas o inactivadas en el primer reto. Esto sugiere inespecificidad en la respuesta de defensa e incapacidad para discernir entre patógenos vivos y muerto. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la señal de daño difiera al encontrar un patógeno vivo o inactivado, siendo mayor la intensidad contra los organismos vivos, y por ello, en el segundo reto con organismos vivos, sea más probable encontrar memoria y que esta sea específica. La señal de daño es inducida tanto por productos microbianos como por productos mismos del hospedero llamados en conjunto DAMPs (por sus siglas en inglés Danger Associated Molecular Patterns) que contribuyen a la activación de la respuesta y la intensidad de esta depende de la intensidad de la señal de daño (Raymond et al., 2017). Esto también podría explicar por qué en esta tesis, los tratamientos con memoria en comparación con los tratamientos sin memoria derivaron en una mayor supervivencia de tenebrio. Por lo tanto, proponemos que se deben analizar las moléculas responsables de la señal de daño ante un reto con un patógeno vivo y compararlo con su actividad después de un reto con un patógeno muerto tanto en el primero y segundo reto para saber si efectivamente, los patógenos vivos en comparación con los inactivos, activan con mayor probabilidad la memoria inmunitaria. Sin embargo, otra hipótesis más probable es que los adultos no inviertan en memoria inmunitaria por invertir en reproducción (Contreras-Garduño et al., 2016) y que las larvas inviertan en el reconocimiento inclusive a nivel de cepa. El primer punto debe investigarse a futuro.

**Tabla 4. Comparación de supervivencia de larvas de *T. molitor* después de una dosis letal (DL<sub>200</sub>) de las cepas de *M. brunneum*. (A) Entre el grupo Tween (sin memoria), (B) Entre el grupo Cherry (de memoria), (C) Grupo Tween contra el grupo Cherry. \*En rojo se muestran las diferencias significativas.**

<b>(A) Grupo Tween</b>			
<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Log-rank</b>	<b>Valor de p</b>
Control	TweenTween	1	0.3173
Control	TweenGFP	91.43	< 0.0001
Control	Tween2NP1	52.97	< 0.0001
Control	Tween2NP5	76.47	< 0.0001
Control	TweenCAT	105.5	< 0.0001
TweenTween	TweenGFP	84.1	< 0.0001
TweenTween	Tween2NP1	47.79	< 0.0001
TweenTween	Tween2NP5	70.07	< 0.0001
TweenTween	TweenCAT	97.57	< 0.0001
TweenGFP	Tween2NP1	15.64	< 0.0001
TweenGFP	Tween2NP5	2.894	0.0889
TweenGFP	TweenCAT	3.284	0.07
Tween2NP1	Tween2NP5	5.058	0.0245
Tween2NP1	TweenCAT	30.3	< 0.0001
Tween2NP5	TweenCAT	11.38	0.0007
<b>(B) Grupo Cherry</b>			
Control	CherryGFP	2.761	0.0966
Control	Cherry2NP1	17.61	< 0.0001
Control	Cherry2NP5	6.623	0.0101
Control	CherryCAT	11.33	0.0008
CherryGFP	Cherry2NP1	7.988	0.0047
CherryGFP	Cherry2NP5	1.164	0.2807
CherryGFP	CherryCAT	3.778	0.0519
Cherry2NP1	Cherry2NP5	3.07	0.0798
Cherry2NP1	CherryCAT	1.186	0.2761
Cherry2NP5	CherryCAT	0.6713	0.4126
Cherry2NP5	CherryCAT	0.6713	0.4126

---

**(C) Cherry vs Tween**

---

Grupo 1	Grupo 2	Log-rank	Valor de p
CherryGFP	TweenTween	0.7196	0.3963
CherryGFP	TweenGFP	68.78	< 0.0001
CherryGFP	Tween2NP1	34.5	< 0.0001
CherryGFP	Tween2NP5	53.79	< 0.0001
CherryGFP	TweenCAT	81.76	< 0.0001
Cherry2NP1	TweenTween	13.66	0.0002
Cherry2NP1	TweenGFP	46.45	< 0.0001
Cherry2NP1	Tween2NP1	13.09	0.0003
Cherry2NP1	Tween2NP5	28.75	< 0.0001
Cherry2NP1	TweenCAT	63.41	< 0.0001
Cherry2NP5	TweenTween	3.673	0.0553
Cherry2NP5	TweenGFP	55.49	< 0.0001
Cherry2NP5	Tween2NP1	23.8	< 0.0001
Cherry2NP5	Tween2NP5	40.52	< 0.0001
Cherry2NP5	TweenCAT	69.44	< 0.0001
CherryCAT	TweenTween	8.05	0.0046
CherryCAT	TweenGFP	62.3	< 0.0001
CherryCAT	Tween2NP1	22.98	< 0.0001
CherryCAT	Tween2NP5	42.85	< 0.0001
CherryCAT	TweenCAT	78.56	< 0.0001

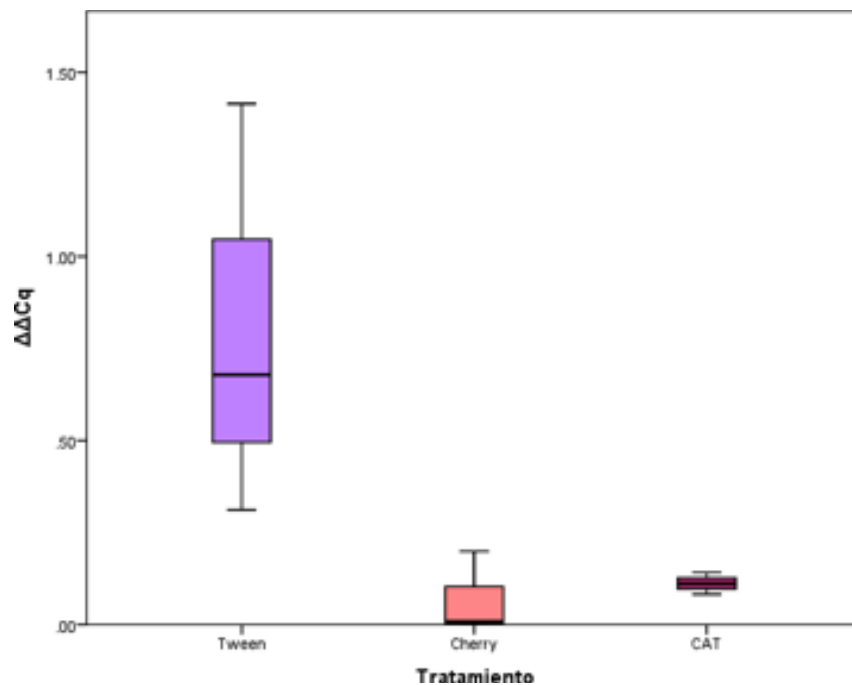
---

## Respuesta inmunitaria

### *Primer reto (Tween 0.01%, Cherry, CAT)*

Se aplicó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis para comparar la expresión de péptidos en los diferentes tratamientos (ver Tabla 5). Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión del inductor TmCactin 24 horas después de un solo reto con el vehículo de inyección (Tween 0.01%), Cherry o CAT (ver Tabla 5). Esto podría deberse a que esta molécula es necesaria para fabricar péptidos antimicrobianos para combatir la infección independientemente del tipo de patógeno, y tal vez, es por ello que no se observa especificidad de acuerdo con el tratamiento.

En cuanto a la expresión de Tenecina 1, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 5), mientras que la expresión de Tenecina 3 sí tuvo diferencias significativas de acuerdo con el tratamiento (ver Figura 7): en las larvas inyectadas con hongo, independientemente de la cepa, la expresión de este péptido fue mucho menor que cuando las larvas recibieron Tween 0.01%. Cabe recordar que Tenecina 3 es un péptido constitutivo que carece de especificidad. Por tanto, es posible un compromiso en la producción de moléculas efectoras de tal forma que, a menos que el invasor sea un patógeno, se regula negativamente la producción de Tenecina 3 para dar prioridad a la producción de otras moléculas de defensa como el péptido Tenecina 1. La inespecificidad de la expresión genética, en el primer reto, del péptido Tenecina 1 y Tenecina 3 no descarta la posibilidad de generar memoria a nivel de moléculas efectoras después del segundo reto cuando este es de carácter homólogo.



**Figura 8. Expresión relativa de Tenecina 3 a las 24 horas de un sólo reto.** Expresión del gen Tenecina 3 ( $\Delta\Delta Cq$  en el eje "Y" normalizado con respecto al gen endógeno RPL27) a las 24hrs post infección de acuerdo con el tratamiento (eje "X") ante un primer reto inmunitario: Tween 0.01% (morado); ce Cherry (en salmón) y la cepa virulenta CAT (rojo).

### ***Segundo reto (grupo tween 0.01% sin memoria)***

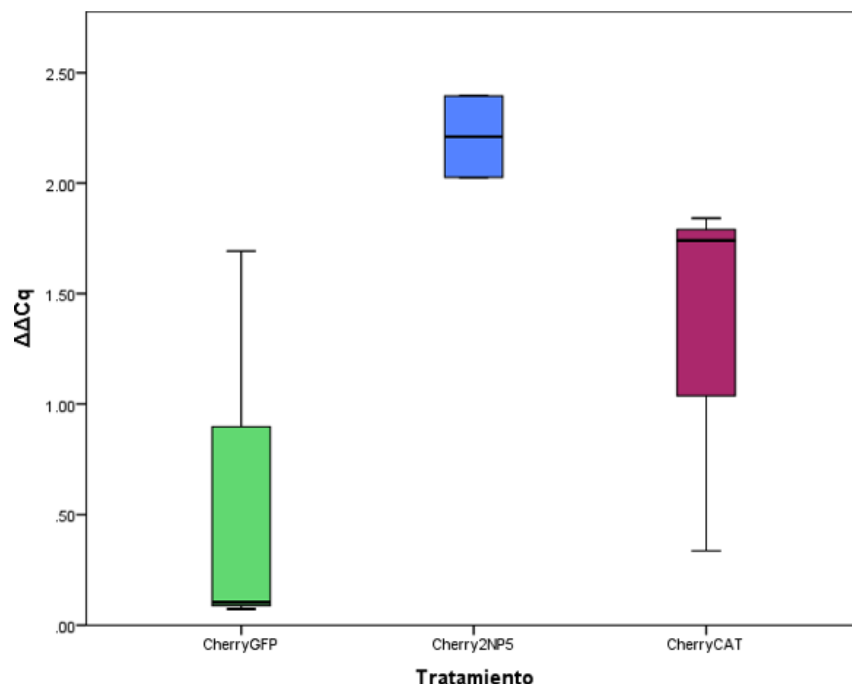
La expresión de TmCactin a las 24 horas post infección fue significativamente más alta cuando se trató de una cepa virulenta (ver Figura 8), aunque su expresión en general fue muy baja comparada con la expresión de los péptidos. Jo et al. (2017) reportan que, al ser inductor, su síntesis inicia las 3 horas y alcanza su máxima expresión a las 9 horas, así que esta molécula se sintetiza antes de los péptidos para permitir la producción masiva de péptidos antimicrobianos. Por lo tanto, sería interesante analizar la producción de este péptido antes de las 24 horas, por ejemplo, a las 9 horas según lo propuesto por Jo et al. (2017), comparando los tratamientos homólogos y heterólogos de memoria para tratar de describir algún patrón de su papel en la memoria.

Finalmente, los péptidos antimicrobianos de doble reto sin contacto previo con el hongo (Tween 0.01% como primer reto) tuvieron la expresión de Tenecina 1 y 3 más alta contra la cepa virulenta que con cualquier otro tratamiento (ver Figura 9). Esto revela la batalla molecular que está librando el sistema inmune contra los patógenos para lograr la supervivencia del hospedero (Schmid-Hempel, 2008a).

### ***Segundo reto (grupos de memoria)***

En este análisis se observa cómo TmCactin tuvo un comportamiento muy peculiar. En primera instancia tuvo una expresión casi imperceptible a las 24 horas después del segundo reto comparado con su expresión con un solo reto, esto quiere decir posiblemente que su nivel máximo de transcripción ocurrió en menor tiempo y llegó a niveles basales pasadas 24 horas después del segundo encuentro, pero, sólo para los

tratamientos en los que el segundo reto fue el hongo (ver Figura 10). Por otro lado, al no haber infección y señal de daño en el grupo control Tween 0.01%, su expresión fue más alta significativamente, debido quizá a que no fue necesario montar una respuesta tan eficiente y específica que le confiera una ventaja en la supervivencia. Esto refuerza la idea de analizar la cinética de producción de este péptido con respecto al tiempo y a los grupos de memoria.



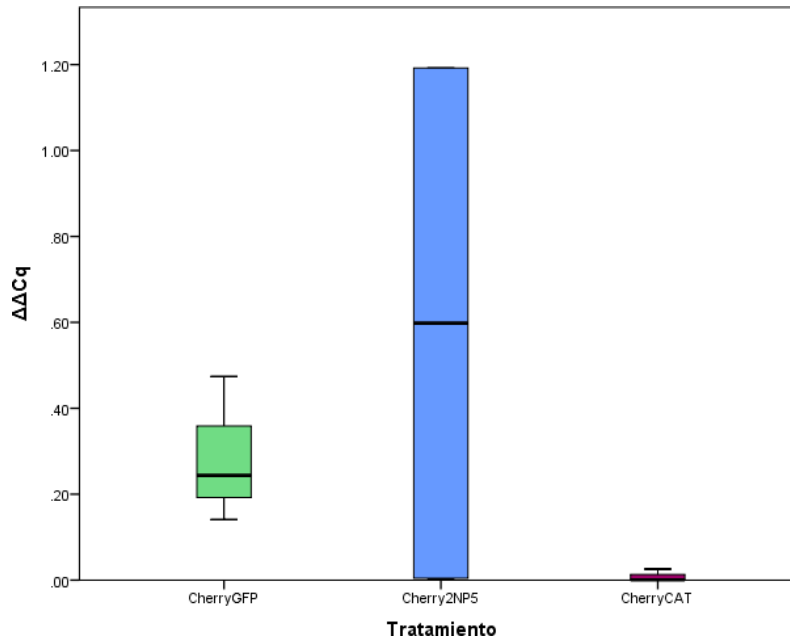
**Figura 9. Expresión relativa de TmCactin (eje “Y”) en larvas inyectadas consecutivamente (CherryGFP reto homólogo y Cherry2NP5, CherryCAT retos heterólogos).** En este grupo de memoria el gen TmCactin tuvo una mayor expresión con respecto al control. La cepa homóloga GFP se muestra en verde; la cepa 2NP5 en azul y la cepa virulenta CAT en rojo.

Curiosamente, la expresión de Tenecina 1 fue más baja en los grupos sin memoria, y podría deberse a que, en un segundo reto, ataque de manera más oportuna y eficiente al agente invasor. Esto garantiza investigación a futuro tomando en cuenta la respuesta bifásica (Contreras-Garduño et al., 2015). En cuanto a tenecina 3, su expresión

no fue tan específica como Tenecina 1 o su síntesis tal vez sea más rápida para actuar de manera complementaria en un complejo sistematizado. Sin embargo, su expresión fue mayor para los tratamientos que involucraban a la cepa CAT y al tratamiento de memoria con 2NP5 quizás porque dicho péptido aumenta su producción para amenazas más fuertes.

Por otro lado, al contrastar los grupos de memoria (Cherry-GFP, Cherry-2NP5, Cherry-CAT) con los grupos sin memoria (Tween-GFP, Tween-2NP5, Tween-CAT), se nota una expresión bastante alta con los grupos de memoria, lo que corresponde con que la respuesta inmunitaria es elevada a partir de las 24 horas. Estos resultados de la respuesta inmunitaria van de la mano con los de la supervivencia y proponemos aumentar el tamaño de muestra y realizar una cinética de la respuesta inmunitaria desde el primero al segundo reto, tomando en cuenta los retos homólogos y heterólogos de infección.





**Figura 10. Expresión relativa de Tenecina 3 en el grupo de memoria.** En el eje “Y” están los valores de  $\Delta\Delta Cq$  del gen TmCactin con respecto al control de acuerdo con el tratamiento, el segundo reto se trata de la cepa homóloga GFP (la barra verde); la cepa  $\Delta 2NP5$  (en azul) o la cepa virulenta CAT (en rojo) 24hr post infección. En este análisis únicamente se utilizaron 3 individuos por tratamiento y no hubo réplicas, las comparaciones se realizaron con respecto al control Tween y se incluyó el error estándar. Dado que el tamaño de muestra es muy bajo el error fue muy grande y por eso no fue posible observar el efecto de la virulencia sobre la expresión de este péptido.

**Tabla 5. Comparación de la expresión relativa de TmCactin, tenecina 1 y tenecina 3 con respecto al control de inyección Tween de acuerdo con el tratamiento.** \*En rojo se muestran las diferencias significativas.

<b>Primer reto (sin memoria)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
TmCactin	0.638
Tenecina 1	0.638
Tenecina 3	0.043
<b>Segundo reto (sin memoria)</b>	
TmCactin	0.083
Tenecina 1	0.980
Tenecina 3	0.721

Segundo reto (con memoria)	Valor de <i>p</i>
TmCactin	0.050
Tenecina 1	0.264
Tenecina 3	0.069

Los resultados del presente trabajo aportan evidencia de memoria específica en coleópteros dentro de las generaciones. Sin embargo, poco se sabe sobre la capacidad para transmitir esta memoria a través de las generaciones. Se ha descrito, por ejemplo, que las larvas de la polilla de la cera, *Galleria mellonella*, generan memoria por lo menos hasta la vigesimoquinta generación al crecer bajo constante presión de selección con *Beauveria bassiana* (Dubovskiy et al., 2013). Otra incógnita es el mecanismo a través del cual se almacena la memoria. Se ha propuesto que una de las moléculas implicadas en este proceso es Dscam (Down syndrome cell adhesion molecule, por sus siglas en inglés). Esta molécula genera variación como resultado del splicing alternativo de los dominios de los receptores exhibiendo potencialmente 18,000 isoformas de receptores transmembranales y extracelulares (Armitage et al., 2014), dando como resultado una mayor diversidad de receptores, de tal manera que con un amplio repertorio es más fácil identificar patógenos y priorizar la síntesis de moléculas específicas para el patógeno en cuestión.

Finalmente, los hongos entomopatógenos como *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. han sido muy utilizados para control biológico como una alternativa a los pesticidas no sólo por su efectividad contra las plagas de cultivos, sino también, por infectar artrópodos de importancia médica como mosquitos. El uso tan amplio y constante de estos hongos podría desencadenar un efecto adverso a largo plazo, es decir que es muy probable que

los insectos adquieran resistencia al igual que han logrado sobrevivir a los pesticidas. Por ello, es necesario tomar en cuenta esta habilidad de los invertebrados al momento de establecer medidas para el control biológico en la producción agrícola. El estudio de la memoria inmunitaria dentro y a través de las generaciones dará resultados que aporten conocimiento a nivel básico y aplicado.

## CONCLUSIONES

Las larvas de *Tenebrio molitor* generan memoria contra hongos y esta memoria es específica a nivel de cepas de *M. brunneum*.

La virulencia del parásito determina el alcance de la memoria inmunitaria del hospedero.

Independientemente del tratamiento, el inductor TmCactin no se expresa diferencialmente a las 24 horas posteriores a un primer reto inmunitario, pero sí se expresa diferencialmente 24 horas después del segundo reto en los grupos retados consecutivamente con el mismo patógeno (memoria).

Tenecina 3 se expresa de manera diferencial a las 24 horas cuando el segundo reto es virulento contra *T. molitor* y después del segundo reto homólogo. Esto sugiere que podría ser una molécula efectora durante la memoria.

## REFERENCIAS

Ali, S., Xia, J., Ren, S., y Huang, Z. (2012). Catalase production influences germination, stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana* conidia. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(2), 537-544.

Armitage, S. A., Peuss, R., y Kurtz, J. (2015). Dscam and pancrustacean immune memory—a review of the evidence. *Developmental and Comparative Immunology*, 48(2), 315-323.

Barnes, A. I., y Siva-Jothy, M. T. (2000). Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1439), 177-182.

Béréanos, C., Schmid - Hempel, P., y Mathias Wegner, K. (2009). Evolution of host resistance and trade - offs between virulence and transmission potential in an obligately killing parasite. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(10), 2049-2056.

Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530.

Brehm, M. A., Wiles, M. V., Greiner, D. L., y Shultz, L. D. (2014). Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *Journal of Immunological Methods*, 410, 3-17

Casadevall, A., y Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8), 3703-3713.

Casadevall, A., y Pirofski, L. A. (2001). Host - pathogen interactions: the attributes of virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(3), 337-344.

Castella, G., Chapuisat, M., y Christe, P. (2008). Prophylaxis with resin in wood ants. *Animal Behaviour*, 75(4), 1591-1596.

Castro-Vargas, C., Linares-López, C., López-Torres, A., Wrobel, K., Torres-Guzmán, J. C., Hernández, G. A., y Contreras-Garduño, J. (2017). Methylation on RNA: a potential mechanism related to immune priming within but not across generations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 473.

Cerenius, L., Kawabata, S. I., Lee, B. L., Nonaka, M., y Söderhäll, K. (2010). Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 575-583.

Chae, J. H., Kurokawa, K., So, Y. I., Hwang, H. O., Kim, M. S., Park, J. W., y Lee, B. L. (2012). Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Developmental and Comparative Immunology*, 36(3), 540-546.

Christofi, T., y Apidianakis, Y. (2013). *Drosophila* immune priming against *Pseudomonas aeruginosa* is short-lasting and depends on cellular and humoral immunity. *F1000Research*, 2.

Cong, M., Song, L., Wang, L., Zhao, J., Qiu, L., Li, L., y Zhang, H. (2008). The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(2), 191-196.

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Rodríguez, M. H., Alvarado-Delgado, A., y Lanz- Mendoza, H. (2014). Cost of immune priming within generations: trade-off between infection and reproduction. *Microbes and Infection*, 16(3), 261-267.

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., y Argotte-Ramos, R. (2015). *Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co- infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 52(2), 172-181.

Contreras-Garduño, J., Lanz, M. H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., y Canales- Lazcano, J. (2016). Insect Immune priming: ecology and experimental evidence. *Ecological Entomology*, 41(4), 351-366.

Demas, G., y Nelson, R. (2012). *Ecoimmunology*. Oxford University Press. New York. USA.

De Roode, J. C., Lefèvre, T., y Hunter, M. D. (2013). Self-medication in animals. *Science*, 340(6129), 150-151.

De Roode, J. C., Fernandez de Castillejo, C. L., Faits, T., y Alizon, S. (2011). Virulence evolution in response to anti - infection resistance: toxic food plants can select for virulent parasites of monarch butterflies. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(4), 712-722.

De Roode, J. C., Pedersen, A. B., Hunter, M. D., y Altizer, S. (2008). Host plant species affects virulence in monarch butterfly parasites. *Journal of Animal Ecology*, 77(1), 120-126.

Dhinaut, J., Chogne, M., y Moret, Y. (2017). Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *Journal of Animal Ecology*, 87(2), 448-463.

Dubovskiy, I. M., Whitten, M. M., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov, V. Y., Grizanov, E. V. y Butt, T. M. (2013). Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi? *PloS One*, 8(4), e60248.

Faulhaber, L. M., y Karp, R. D. (1992). A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunology*, 75(2), 378.

Finlay, B. B., y McFadden, G. (2006). Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, 124(4), 767-782.

Futo, M., Armitage, S. A., y Kurtz, J. (2016). Microbiota plays a role in oral immune priming in *Tribolium castaneum*. *Frontiers in microbiology*, 6, 1383.

Gallo, R. L., y Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defense of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 503.

Gálvez, D., y Chapuisat, M. (2014). Immune priming and pathogen resistance in ant queens. *Ecology and Evolution*, 4(10), 1761-1767.

Garbutt, J. S., O'Donoghue, A. J., McTaggart, S. J., Wilson, P. J., y Little, T. J. (2014). The development of pathogen resistance in *Daphnia magna*: implications for disease spread in age-structured populations. *Journal of Experimental Biology*, 217(21), 3929-3934.

Graham, A. L., Allen, J. E., y Read, A. F. (2005). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36, 373-397.

Greenwood, J. M., Milutinović, B., Peuß, R., Behrens, S., Esser, D., Rosenstiel, P., y Kurtz, J. (2017). Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. *BMC Genomics*, 18(1), 329.

Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G. J., Van Der Meer, J. W., Conrath, U., y Netea, M. G. (2018). Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunological Reviews*, 283(1), 21-40.

Haine, E. R., Pollitt, L. C., Moret, Y., Siva-Jothy, M. T., y Rolff, J. (2008). Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 1090-1097.

Haldane, J. B. S. (1949). Disease and evolution. *La Ricerca Scientifica*, 19, 68-76.

Ha, J. Y., Min, J. Y., Lee, S. K., Kim, H. S., Kim, do J., Kim, K. H., Lee, H. H., Kim, H. K., Yoon, H. J., Suh, S. W. (2006). Crystal structure of 2-nitropropane dioxygenase complexed with FMN and substrate. Identification of the catalytic base. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18660-7.

Hamilton, W. D. (1993). Haploid dynamic polymorphism in a host with matching parasites: effects of mutation/subdivision, linkage, and patterns of selection. *Journal of Heredity*, 84(5), 328-338.

Hauton, C., Brockton, V., y Smith, V. J. (2007). Changes in immune gene expression and resistance to bacterial infection in lobster (*Homarus gammarus*) post-larval stage VI following acute or chronic exposure to immune stimulating compounds. *Molecular Immunology*, 44(4), 443-450.

Hernandez, C. E. M., Guerrero, I. E. P., Hernandez, G. A. G., Solis, E. S., y Guzman, J. C. T. (2010). Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 1033-1044.

Huang, Z., Ali, S., y Ren, S. (2012). Catalase production influences germination, stress tolerance and virulence of *Lecanicillium muscarium* conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 22(3), 249-260.

Janeway Jr, C. A., y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.

Janzen, D. H. (1978). Complications in interpreting the chemical defenses of trees against tropical arboreal plant-eating vertebrates. *The ecology of arboreal folivores: a symposium held at the Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, May 29-31, 1975-ecologyofarborea00mont bw*

Johnston, P. R., Makarova, O., y Rolff, J. (2014). Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(6), 947-955.

Jo, Y. H., Kim, Y. J., Park, K. B., Seong, J. H., Kim, S. G., Park, S., y Han, Y. S. (2017). TmCactin plays an important role in Gram-negative and-positive bacterial infection by regulating expression of 7 AMP genes in *Tenebrio molitor*. *Scientific Reports*, 7, 46459.

Kaufmann, S. H. (2008). Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology*, 9(7), 705.

Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, 26(4), 186-192.

Kurtz, J., Schulenburg, H., y Reusch, T. B. (2016). Host–parasite coevolution-rapid reciprocal adaptation and its genetic basis. *Zoology*, 119(4), 241-243.

Kurtz, J., y Franz, K. (2003). Innate defense: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425(6953), 37.

Lemaitre, B., y Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743.

Lanz-Mendoza H., Contreras-Garduño J. (2018) Insect Innate Immune Memory. *Advances in Comparative Immunology*. Springer, Cham. 193-211.

Lavine, M. D., y Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309.

Lee, Y. J., Chung, T. J., Park, C. W., Hahn, Y., Chung, J. H., Lee, B. L., y Lee, Y. (1996). Structure and Expression of the Tenecin 3 Gene in *Tenebrio molitor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(1), 6-11.

Legrand, N., Ploss, A., Balling, R., Becker, P. D., Borsotti, C., Brezillon, N., y Eisenbarth, S. (2009). Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host and Microbe*, 6(1), 5-9.

Lin, Y. C., Chen, J. C., Morni, W. Z. W., Putra, D. F., Huang, C. L., Li, C. C., y Hsieh, J. F. (2013). Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. *PLoS One*, 8(7), e69722.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological Interactions*, 224, 164-175.

Matova, N., y Anderson, K. V. (2006). Rel/NF- $\kappa$ B double mutants reveal that cellular immunity is central to *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16424-16429.



Medina-Gómez, H., Rivas, G. A., Hernández-Quintero, A., Hernández, A., Torres-Guzmán, J. C. T., Lanz, H., y Contreras-Garduño, J. (2018a). The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 361-364.

Medina-Gómez, H., Farriols, M., Santos, F., González-Hernández, A., Torres-Guzmán, J. C. T., Lanz, H., y Contreras-Garduño, J. (2018b). Pathogen-produced catalase affects immune priming: A potential pathogen strategy. *Microbial Pathogenesis*, 125, 93-95.

Medzhitov R. y Janeway C. Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, 89-97.

Miyashita, A., Kizaki, H., Kawasaki, K., Sekimizu, K., y Kaito, C. (2014). Primed immune responses to Gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms. *Journal of Biological Chemistry*, 289(20), 14412-14421.

Morales-Hernández, C. E., Padilla-Guerrero, I. E., Gonzalez-Hernández, G. A., Salazar-Solis, E., y Torres-Guzman, J. C. (2010). Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 1033-1044.

Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Shapiro-Ilan, D. I., y Tedders, W. L. (2010). Developmental plasticity in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): analysis of instar variation in number and development time under different diets. *Journal of Entomological Science*, 45(2), 75-90.

Moreno-García, M., Recio-Tótoro, B., Claudio-Piedras, F., y Lanz-Mendoza, H. (2014). Injury and immune response: applying the danger theory to mosquitoes. *Frontiers in Plant Science*, 5, 451.

Moon, H. J., Lee, S. Y., Kurata, S., Natori, S., y Lee, B. L. (1994). Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *The Journal of Biochemistry*, 116(1), 53-58.

Moret, Y., y Moreau, J. (2012). The immune role of the arthropod exoskeleton. *Invertebrate Survival Journal*, 9(2), 200-206.

Ng, T. H., Hung, H. Y., Chiang, Y. A., Lin, J. H., Chen, Y. N., Chuang, Y. C., y Wang, H. C. (2014). WSSV-induced crayfish Dscam shows durable immune behavior. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(1), 78-90.

Otti, O., Tragust, S., y Feldhaar, H. (2014). Unifying external and internal immune defenses. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(11), 625-634.

Padilla-Guerrero I. E. (2010). Estudio de la participación de genes expresados de manera diferencial durante el proceso patogénico de *Metarhizium anisopliae*. Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Park, J. W., Kim, C. H., Rui, J., Ryu, K. H., Chai, J. H., Hwang, H. O., y Lee, B. L. (2010). Beetle immunity. *Invertebrate Immunity*. Springer, Boston, MA. 163-180.

Parker, B. J., Barribeau, S. M., Laughton, A. M., de Roode, J. C., y Gerardo, N. M. (2011). Non-immunological defense in an evolutionary framework. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(5), 242-248.

Pancer, Z., y Cooper, M. D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, 24, 497-518.

Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., y Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3(3), e26.

Ramirez, J. L., de Almeida Oliveira, G., Calvo, E., Dalli, J., Colas, R. A., Serhan, C. N., y Barillas-Mury, C. (2015). A mosquito lipoxin/lipocalin complex mediates innate immune priming in *Anopheles gambiae*. *Nature Communications*, 6, 7403.

Rantala, M. J., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A., & Suhonen, J. (2002). Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1501), 1681-1685.

Raymond, S. L., Holden, D. C., Mira, J. C., Stortz, J. A., Loftus, T. J., Mohr, A. M., ... & Efron, P. A. (2017). Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(10), 2564-2573.

Rimer, J., Cohen, I. R., y Friedman, N. (2014). Do all creatures possess an acquired immune system of some sort? *Bioessays*, 36(3), 273-281.

Reimer-Michalski, E. M., y Conrath, U. (2016). Innate immune memory in plants. *Seminars in Immunology* 28(4), 319-327.

Roh, K. B., Kim, C. H., Lee, H., Kwon, H. M., Park, J. W., Ryu, J. H., y Soderhall, K. (2009). Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19474-19481.

Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., y Barillas-Mury, C. (2010). Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*, 329(5997), 1353-1355.

Rosengaus, R. B., Malak, T., y MacKintosh, C. (2013). Immune-priming in ant larvae: social immunity does not undermine individual immunity. *Biology Letters*, 9(6), 20130563.

Roth, O., y Kurtz, J. (2009). Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Developmental y Comparative Immunology*, 33(11), 1151-1155.

Sadd, B. M., y Schmid-Hempel, P. (2006). Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, 16(12), 1206-1210.

Salazar, D. K. R., Hernández, G. A. G., y Hernández, C. E. M. (2015). Interacción hongo-planta, expresión de un gen 2np. *Jóvenes en la Ciencia*, 1(2), 614-618.

Schmid-Hempel, P. (2008a). Parasite immune evasion: a momentous molecular war *Trends in Ecology and Evolution*, 23(6), 318-326.

Schmid-Hempel, P. (2008b). Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1513), 85-98.

Schmid-Hempel, P., y Ebert, D. (2003). On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(1), 27-32.

Schrank, A., y Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274.

Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y., y Siva-Jothy, M. T. (2008). Introduction. *Ecological Immunology*, 364, 3-14.

Shea, J. F. (2010). Do male and female beetles (*Tenebrio molitor*) respond differently to rat feces containing eggs from the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*? *Natural Science*, 2, 855-859.

Shi, Z. H., Lin, Y. T., y Hou, Y. M. (2014). Mother-derived trans-generational immune priming in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Dryophthoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 104(6), 742-750.

Singer, M. S., Mace, K. C., y Bernays, E. A. (2009). Self-medication as adaptive plasticity: increased ingestion of plant toxins by parasitized caterpillars. *PLoS One*, 4(3), e4796.

Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., y Rolff, J. (2005). Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Advances in Insect Physiology*, 32, 1-48.

Soderhall, K. (2010). Invertebrate immunity, advances in experimental medicine and biology. Springer Science+Business media, LLC, New York, USA.

Spivak, M. (1996). Honeybee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 27(4), 245-260.

Tsakas, S., y Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 228-238.

Van Der Woude, M. W., y Bäumler, A. J. (2004). Phase and antigenic variation in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(3), 581-611.

Wang, C., Hu, G., y Leger, R. J. S. (2005). Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 42(8), 704-718.

Wilson, K., & Reeson, A. F. (1998). Density - dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera-baculovirus interactions? *Ecological Entomology*, 23(1), 100-101.

Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M., y van Hulten, M. C. (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology*, 78(4), 2057-2061.

Wu, G., Yi, Y., Lv, Y., Li, M., Wang, J., y Qiu, L. (2015). The lipopolysaccharide (LPS) of *Photobacterium luminescens* TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 63-72.

Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., y Song, L. (2014). The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), 141-150.

Zhao, Z., Wu, G., Wang, J., Liu, C., y Qiu, L. (2013). Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Helicoverpa armigera* larvae immune-primed with *Photobacterium luminescens* TT01. *PLoS One*, 8(11), e80146.

Zimmermann, G., Papierok, B., y Glare, T. (1995). Elias Metschnikoff, Elie Metchnikoff or Ilya Ilich Mechnikov (1845-1916): a pioneer in insect pathology, the first describer of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and how to translate a Russian name. *Biocontrol Science and Technology*, 5(4), 527-530.

## APÉNDICE 1

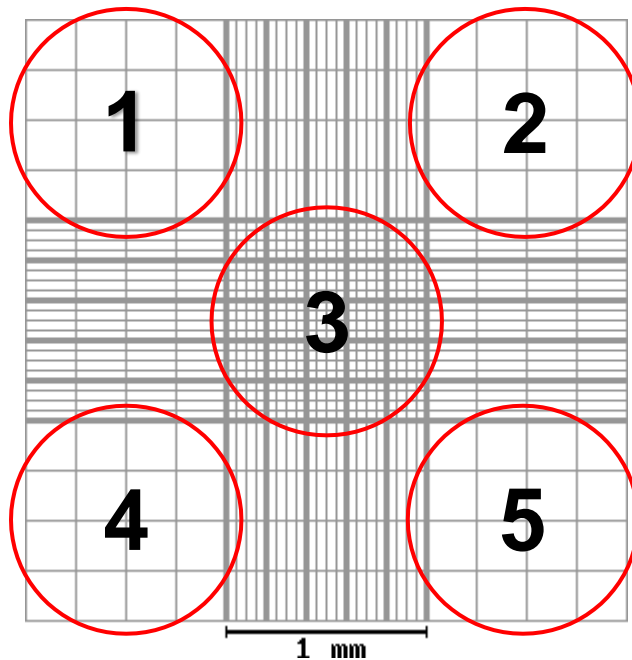
### Detalles del método

Una vez obtenidas las cepas mutantes se prepararon con Tween 80 al 0.01%-PBS, este se utilizó debido a que es un detergente no-iónico, es decir, la porción hidrofílica no tiene carga, lo cual le impide romper asociaciones proteínicas (lisis) o desnaturalizar proteínas de membrana y además no interfiere con la actividad de estas, permitiendo solubilizarlas. A diferencia de Tween 20, Tween 80 es un agente estabilizador de proteínas que permite la identificación de micobacterias. En este caso se utilizó para individualizar las conidias de *Metarhizium brunneum* y que fuera posible su cuantificación.

Para la preparación de las cepas, una vez obtenidas las concentraciones de conidias del hongo *M. brunneum*, se realizaron diluciones seriadas de la siguiente manera: primero se colocaron 1000  $\mu\text{L}$  de la solución stock (previamente agitado durante dos minutos en un vórtex a velocidad máxima) en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Este tubo se agitó en un vórtex durante dos minutos, una vez homogeneizada la solución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para colocarlos en un siguiente tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, estos 100  $\mu\text{L}$  se diluyeron en 900  $\mu\text{L}$  de Tween al 0.01% (Tween-PBS) y de esta manera se obtuvo la dilución 1:10. Para obtener la dilución 1:100, se vertieron 100  $\mu\text{L}$  de la solución 1:10 en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL para diluirlos en 900  $\mu\text{L}$  de Tween al 0.01% y se agitó en vórtex durante dos minutos para realizar la dilución 1:1000. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución anterior en un nuevo tubo eppendorf para diluirlo en 900  $\mu\text{L}$  de Tween al 0.01%. Finalmente, para conseguir la dilución 1:10000 se sigue el mismo procedimiento descrito.

En las pruebas de virulencia se realizaron diferentes concentraciones específicas para obtener las dosis letales y subletales de cada cepa (5, 50, 100, 150, 200, 400 y 600 conidias/ $\mu\text{L}$ ). Las cuantificaciones se realizaron con ayuda de una cámara de Neubauer (improved) con el fin de realizar los conteos en un microscopio óptico. Antes de cada conteo se homogeneizaron las muestras con un vórtex a velocidad máxima e inmediatamente se tomaban 10  $\mu\text{L}$  de y así llenar cada campo de la cámara, por ejemplo, de la dilución más alta (1:10000), se tomaron 10  $\mu\text{L}$  para observar a 40x y determinar el número de conidias en cinco de los nueve cuadros; los cuatro extremos y el centro (ver figura 10). Se sumó la cantidad de conidias de cada uno de los cinco cuadros para tener un valor total. Esta cuantificación se realizó 5 veces por campo (10 veces en total). El resultado de cada campo se sumó, se promedió y se utilizó la siguiente ecuación para conocer la concentración por microlitro:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Promedio total de conidias por campo}}{(\text{No. de cuadros}) (\text{Profundidad de la cámara})}$$



**Figura 11. Representación del método utilizado para los conteos de conidias en la cámara de Neubauer improved.** Los cuadros utilizados para los conteos se numeraron y se marcaron con círculos rojos.

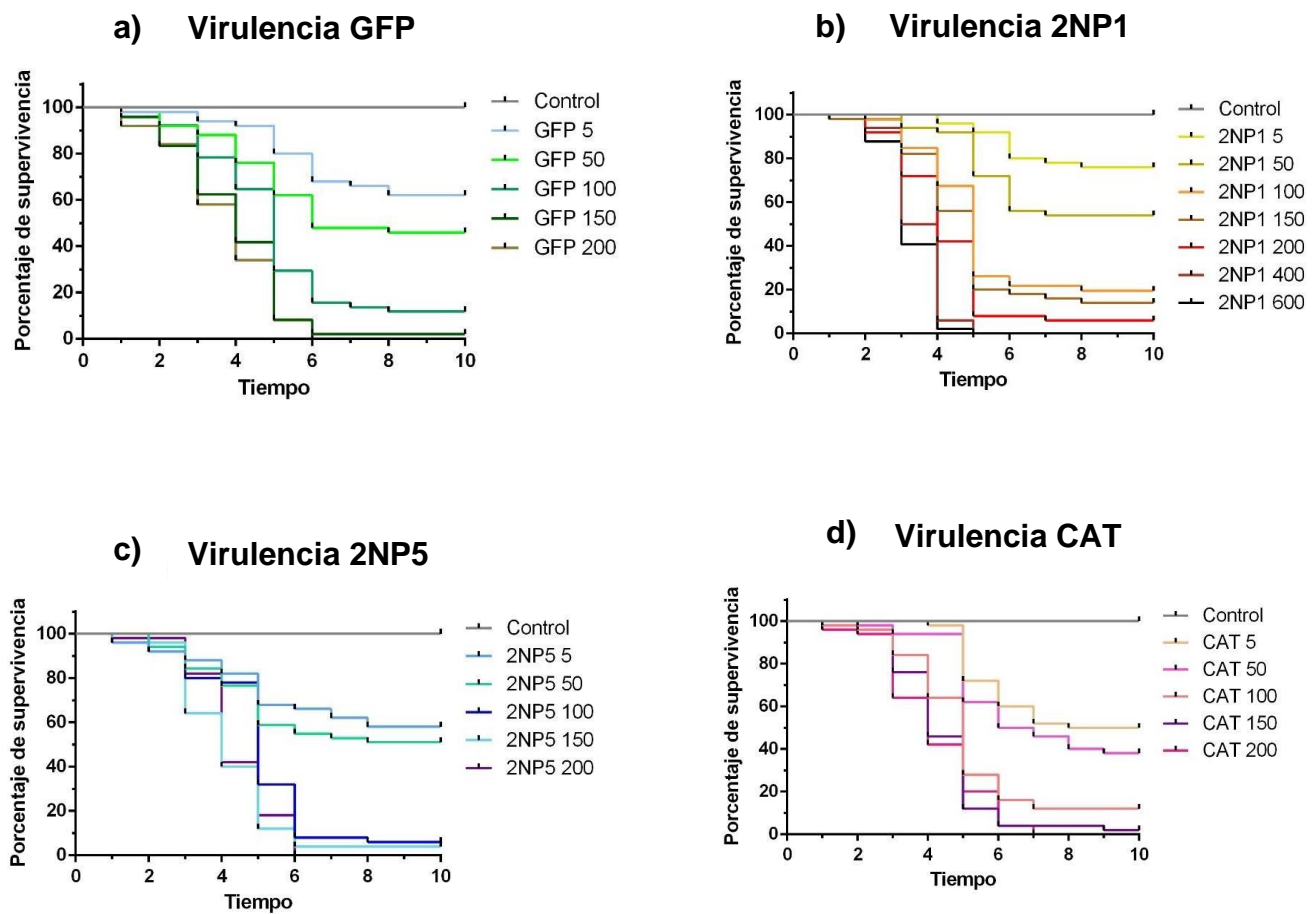
Posteriormente, para las pruebas de memoria inmunitaria se utilizaron concentraciones únicamente de 5 y 200 conidias/ $\mu$ L (dosis letal y subletal respectivamente), la dosis subletal (5 conidias/ $\mu$ L) para inyectar el primer reto y la dosis letal para el segundo reto para finalmente se registrar supervivencia 10 días posteriores a la segunda infección.

Se realizaron al menos dos réplicas por cada experimento, donde las larvas de la misma edad recibieron distintos retos inmunitarios con inyecciones en la membrana cuticular del surco anterolateral izquierdo, entre el 6° y 7° segmento abdominal, y el solvente en el cual el hongo fue diluido se usó como control. Finalmente, una vez inyectadas las larvas fueron colocadas individualmente en cajas Corning de 12 pozos con alimento estéril y diariamente se examinó la supervivencia durante 10 días.

## APÉNDICE 2

### Supervivencia

#### *Pruebas de virulencia y dosis letales y subletales*



**Figura 12. Virulencia de cada una de las cepas a diferentes concentraciones (5, 50, 100, 150 y 200 conidias por microlitro).** a) Virulencia de la cepa GFP; b) virulencia de la cepa 2NP1; c) virulencia de la cepa 2NP5 y d) virulencia de la cepa CAT. El grupo control está representado en color gris.



## Pruebas de memoria

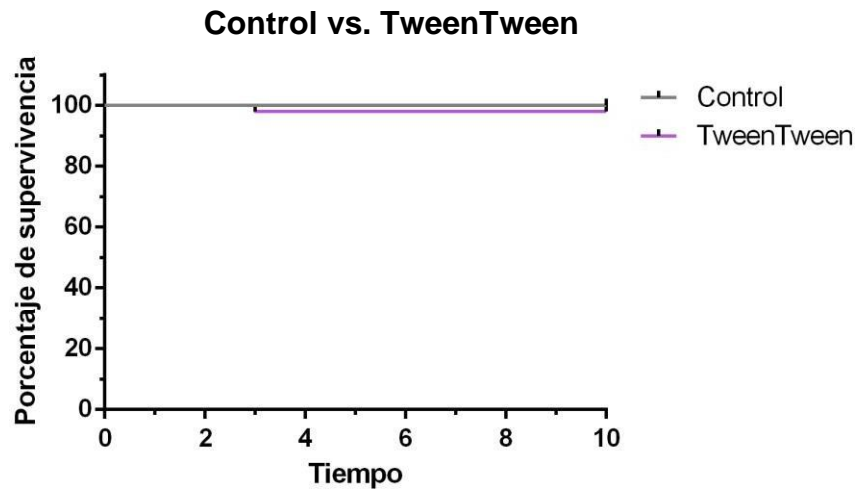


Figura 13. Comparación de la supervivencia entre el grupo de manipulación y el control de inyección (TweenTween). No se encontraron diferencias entre estos grupos ( $p > 0.0001$ ).

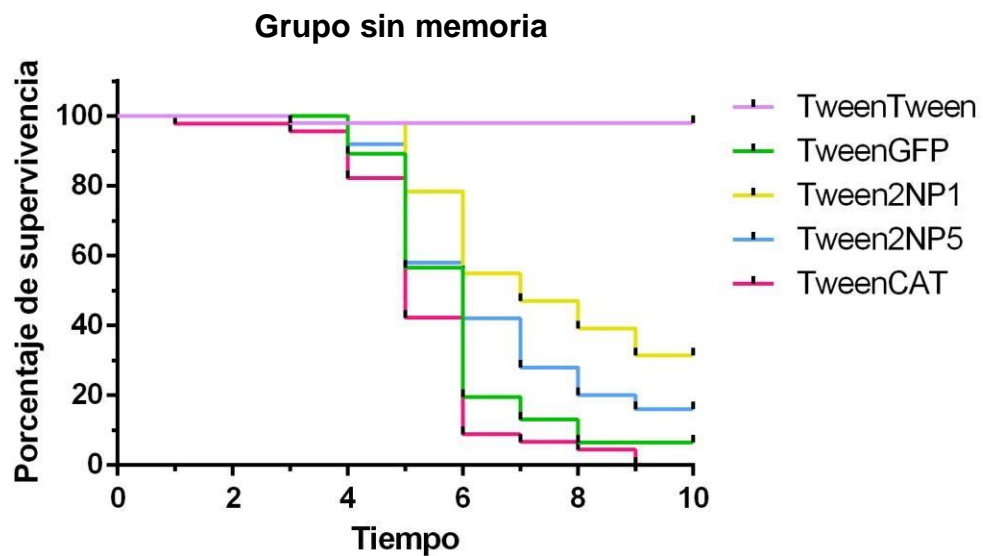


Figura 14. Comparación del porcentaje de supervivencia entre el grupo de manipulación y el grupo Tween (Tween-Tweenn, Tween-GFP, Tween-2NP1, Tween-2NP5 y Tween-CAT).

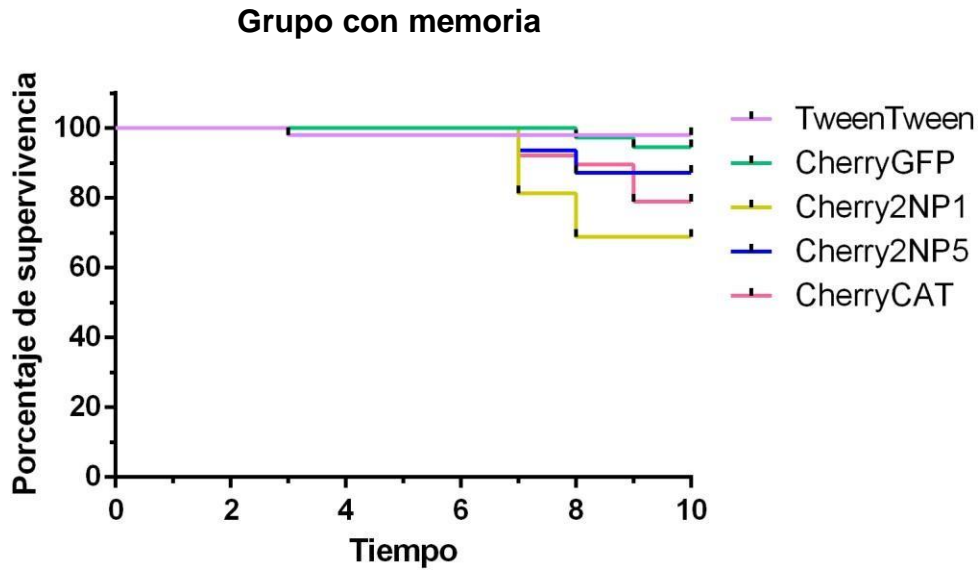


Figura 15. Comparación de la supervivencia entre el grupo control (Tween-Tween) y el grupo de memoria inmunitaria donde el primer reto fue la cepa fluorescente Cherry (Cherry-GFP, Cherry-2NP1, Cherry-2NP5, Cherry-CAT). Se observa que existen diferencias significativas entre el tratamiento Cherry-2NP1 y Cherry-CAT.

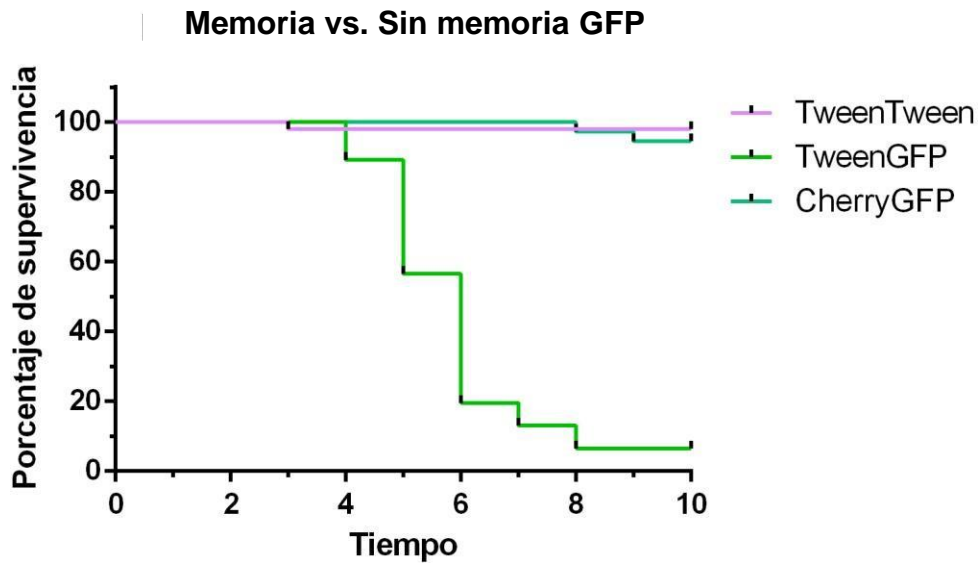


Figura 16. Comparación entre subgrupos homólogos (Tween-GFP, Cherry-GFP).

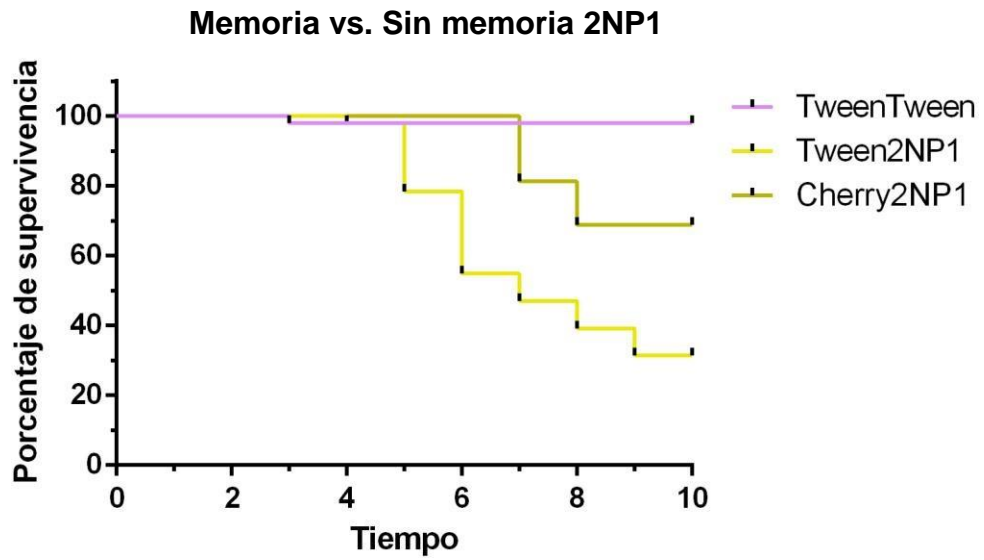


Figura 17. Comparación entre subgrupos homólogos (Tween-2NP1, Cherry-2NP1). Existen diferencias significativas entre ambos tratamientos.

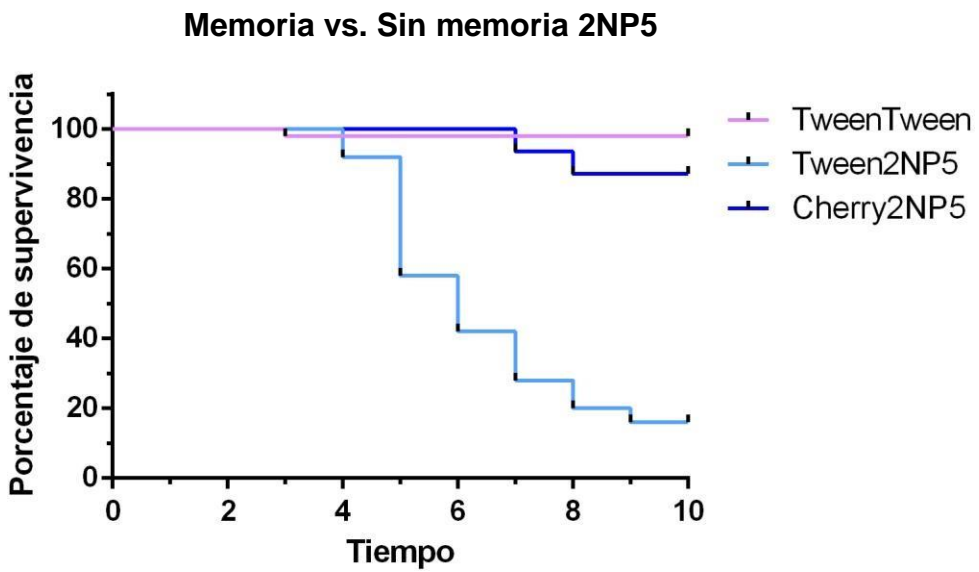


Figura 18. Comparación entre subgrupos homólogos (Tween-2NP5, Cherry-2NP5).

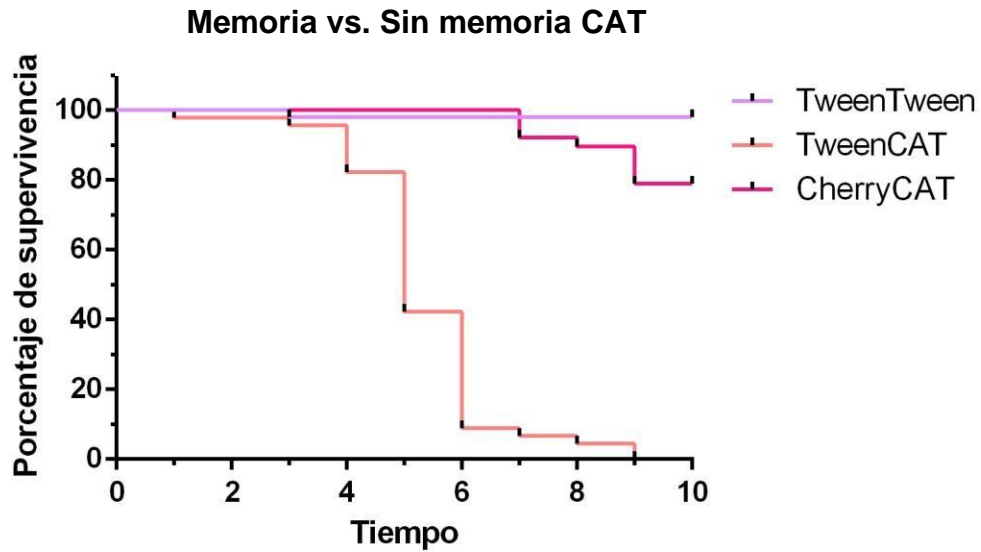


Figura 19. Comparación entre el grupo heterólogo Tween-CAT y el grupo heterólogo Cherry-CAT. No se obtuvieron diferencias significativas.

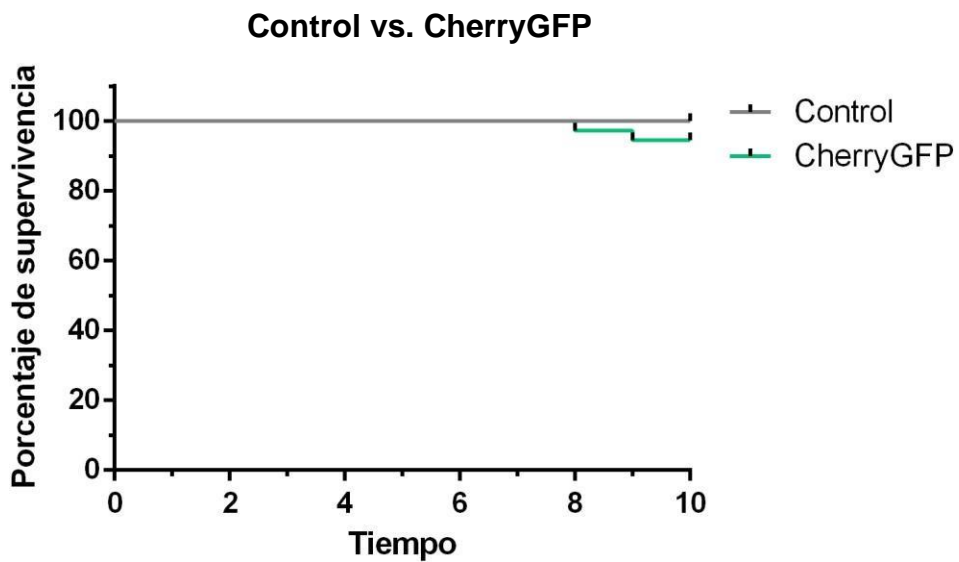


Figura 20. Comparación entre el grupo de manipulación (Control) y el grupo de memoria con retos homólogos (Cherry-GFP). no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.0001$ ).



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micpath](http://www.elsevier.com/locate/micpath)



## The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens



Héctor Medina Gomez<sup>a</sup>, Galia Adame Rivas<sup>b</sup>, Angélica Hernández-Quintero<sup>c</sup>,  
 Angélica González Hernández<sup>a</sup>, Juan Carlos Torres Guzmán<sup>a</sup>, Humberto Lanz Mendoza<sup>d</sup>,  
 Jorge Contreras-Garduño<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, Mexico

<sup>b</sup> ENES, Unidad Morelia, UNAM, Antigua Carretera a Pátzcuaro, No.8701, Col. Ex-Hacienda San José de la Huerta, 58190, Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>c</sup> Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Estadística, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Ecoimmunology  
 Innate memory  
 Entomopathogens  
 Immune priming

### ABSTRACT

Immune priming in invertebrates refers to an improved immune response (and therefore a better chance of survival) upon a second encounter with a specific pathogen. Although the existence of immune priming has been evaluated in invertebrate hosts, the ability of a particular entomopathogen species or strain to influence the occurrence of immune priming has not been thoroughly evaluated. The aim of the current study was to compare the occurrence of immune priming in *Tenebrio molitor* larvae after homologous challenges (a dual exposure to similar entomopathogens) with *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis* and *Metarhizium anisopliae*. Larvae presented more effective immune priming (measured as survival rates) when exposed to *M. anisopliae* or *B. thuringiensis* than when exposed to *S. marcescens*. We hypothesize that the toll pathway may help *T. molitor* survive these enemies and that the IMD pathway may be expressed to a lesser degree in this species, which may explain why they succumb to Gram-negative bacteria. This and other recent evidence suggest that the occurrence of immune priming in these organisms must not be ruled out until this phenomenon is tested with different entomopathogens.

### 1. Introduction

Invertebrates exhibit immune priming (innate memory) if the first exposure to a parasite or pathogen activates improved and specific protection against the same elicitor during a second encounter [1,2]. The bolstered immune response can be pathogen strain and/or species specific and provides advantages that contribute to survival [3–6]. New information suggests that for a given invertebrate, immune priming occurs against some pathogens but not others [5,6]. This question is very important, as a lack of immune priming could be due not to the absence of immune mechanisms but instead to the capacity of only some pathogens to affect the immune response [4,6,7]. In adult *Tenebrio molitor* better survival was reported against the Gram-positive bacteria *Bacillus thuringiensis* but not against the Gram-negative bacteria *Serratia marcescens* [6]. This result could be explained because Gram-positive bacteria are more threatening than Gram-negative bacteria [6]. The role of fungi in this process remains unknown, and in this case, *T. molitor* is susceptible to the fungus *Metarhizium anisopliae* [8]. Hence, if

immune priming is effective against threatening pathogens, we predicted to detect immune priming against *M. anisopliae* and *Bacillus thuringiensis* but not against the Gram-negative bacterium *S. marcescens*.

We evaluated the specificity of immune priming in *T. molitor* to determine if they survive better with homologous challenges (a dual challenge with similar elicitors) than with heterologous challenges (a dual challenge with different elicitors) using *B. thuringiensis*, *S. marcescens* and *M. anisopliae*. Therefore, we compared larval survival taking into account homologous challenges with these bacteria to test whether immune priming conferred better survival against more threatening pathogens (*B. thuringiensis* and *M. anisopliae*) than against a less threatening pathogen (*S. marcescens*).

### 2. Materials and methods

The study was carried out with larvae that were 1.5–1.7 cm long and kept at a temperature of 27 ± 0.5 °C [9,10]. Insects were fed wheat bran and MASECA® corn flour (cornstarch) (1:1 proportion) *ad libitum*,

\* Corresponding author.

E-mail address: [jcg@enesmorelia.unam.mx](mailto:jcg@enesmorelia.unam.mx) (J. Contreras-Garduño).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.063>

Received 25 November 2017; Received in revised form 30 March 2018; Accepted 30 March 2018

Available online 31 March 2018

0882-4010/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Table 1**Comparison of the survival of *T. molitor* after a lethal dose of *B. thuringiensis* (a), *S. marcescens* (b) and *M. anisopliae* (c).

a			
Group 1	Group 2	Log-rank Test	p-value
Naïve	PBS- <i>B. thuringiensis</i>	62.4	< 0.0001
Naïve	<i>B. thuringiensis</i> - <i>B. thuringiensis</i>	22.9	< 0.0001
Naïve	<i>S. marcescens</i> - <i>B. thuringiensis</i>	50.7	< 0.0001
Naïve	<i>M. anisopliae</i> - <i>B. thuringiensis</i>	62.2	< 0.0001
PBS- <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i> - <i>B. thuringiensis</i>	19	< 0.0001
PBS- <i>B. thuringiensis</i>	<i>S. marcescens</i> - <i>B. thuringiensis</i>	1.5	0.228
PBS- <i>B. thuringiensis</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>B. thuringiensis</i>	0.1	0.748
<i>B. thuringiensis</i> - <i>B. thuringiensis</i>	<i>S. marcescens</i> - <i>B. thuringiensis</i>	11.1	0.0008
<i>B. thuringiensis</i> - <i>B. thuringiensis</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>B. thuringiensis</i>	21.2	< 0.0001
<i>S. marcescens</i> - <i>B. thuringiensis</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>B. thuringiensis</i>	2.8	0.0917
b			
Naïve	PBS- <i>S. marcescens</i>	58	< 0.0001
Naïve	<i>B. thuringiensis</i> - <i>S. marcescens</i>	73	< 0.001
Naïve	<i>S. marcescens</i> - <i>S. marcescens</i>	70.2	< 0.0001
Naïve	<i>M. anisopliae</i> - <i>S. marcescens</i>	60.3	< 0.0001
PBS- <i>S. marcescens</i>	<i>B. thuringiensis</i> - <i>S. marcescens</i>	4.7	0.0306
PBS- <i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i> - <i>S. marcescens</i>	3.9	0.0492
PBS- <i>S. marcescens</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>S. marcescens</i>	0	0.929
<i>B. thuringiensis</i> - <i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i> - <i>S. marcescens</i>	0	0.898
<i>B. thuringiensis</i> - <i>S. marcescens</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>S. marcescens</i>	5.1	0.0244
<i>S. marcescens</i> - <i>S. marcescens</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>S. marcescens</i>	4.2	0.0412
c			
Naïve	<i>B. thuringiensis</i> - <i>M. anisopliae</i>	61.8	< 0.0001
Naïve	<i>S. marcescens</i> - <i>M. anisopliae</i>	74.8	< 0.0001
Naïve	<i>M. anisopliae</i> - <i>M. anisopliae</i>	3.7	0.0531
<i>B. thuringiensis</i> - <i>M. anisopliae</i>	<i>S. marcescens</i> - <i>M. anisopliae</i>	2.4	0.12
<i>B. thuringiensis</i> - <i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>M. anisopliae</i>	33.8	< 0.0001
<i>S. marcescens</i> - <i>M. anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>M. anisopliae</i>	44.7	< 0.0001

with apple slices provided every other day [11]. Food was sterilized ( $125 \pm 2^\circ\text{C}$  for 15 min) to avoid influencing the immune priming results [11]. Following the treatments, larvae were maintained individually in 6-well plates (Corning) and plates were deposited inside environmental chambers (Lumistell ICP-55).

The treatments consisted of inoculations with *Bacillus thuringiensis* (Tenebrionis strain), *S. marcescens* (LBSE17 strain) and *M. anisopliae* (MA10 strain). *Bacillus thuringiensis* was isolated from *Tenebrio*, *S. marcescens* from entomopathogenic nematodes [12] and *M. anisopliae* from the Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (Mexico). Using these strains, we have previously demonstrated that 5 colony-forming units (CFU) of *S. marcescens*, 100 CFU of *B. thuringiensis* and 5 conidia of *M. anisopliae* killed between 20 and 30% (LD 20–30) of *Tenebrio* in less than 10 days and that 12,000 CFU, 50 CFU and 200 conidia, respectively, killed 100% (LD 100) of *Tenebrio* in less than 10 days (submitted paper).

To investigate immune priming against *B. thuringiensis*, larvae were injected with 100 CFU of *B. thuringiensis* ( $n = 60$ ), 5 CFU of *S. marcescens* ( $n = 60$ ), 5 conidia of *M. anisopliae* ( $n = 70$ ), or with a control solution (PBS;  $n = 60$ ), and 10 days later all groups were injected with an LD 100 of *B. thuringiensis* ( $n = 70$ ). To test for immune priming against *S. marcescens*, the first injection was carried out as described, but in this case, 10 days afterward, all individuals were injected with an LD 100 of *S. marcescens* ( $n = 70$ ). To test for immune priming against *M. anisopliae* we established the same groups as above and then injected an LD 100 ( $n = 60$ ) to all larvae. A control group ( $n = 60$ ) or naïve was only manipulated. All injections were made through the pleural intersegmental membrane between the sixth and seventh abdominal segments with a sterilized micro syringe (10  $\mu\text{L}$ , Hamilton). A clean syringe was used for each treatment. We injected the pathogens to better control the number of pathogenic cells and therefore avoid undue variation in immune priming. Additionally, in all cases, we confirmed

that the animals succumbed to the present treatment, and verified the pathogen dose before each injection [11]. To do this, one day before the second challenge, we mashed 10 larvae per group in bacterial or fungal growth media in Petri dishes and then incubated them at  $37^\circ\text{C}$ . We did not observe any evidence of the entomopathogen used in the first challenge. For the fungus, we also used a microscope counting chamber (Neubauer Chamber) to corroborate the doses before infections. This was according to a previous result that found that the first challenge was clear before the second challenge [11].

Statistical methods were based on survival analysis using the R program (R 3.3.1). Subsequent to the second challenge, survival was recorded every day for 10 days, and we considered the survivors after this period to be censored cases. First, the log-rank test was employed to compare survival times (ten days after the second challenge) between the two groups. In the figures, a letter in parentheses indicates a significant difference between curves; the same letter shows that survival curves are statistically equivalent. Later, the Cox model was applied to explore the effect of pathogens on survival between the homologous challenge and the heterologous challenges. In Tables S1a, S1b, S1c and S1d, we verified the assumption of proportional risks to use the log-rank test for each experiment, while in Tables S2a, S2b, S2c and S2d, the assumption of proportional risks was verified before using the Cox model. Significance was considered at 1% in all cases.

### 3. Results and discussion

The lifestyle of *T. molitor* is characterized by overlapping generations and a short range of dispersal, which should favor the persistence of infections and perhaps the evolution of immune priming [13]. Previous reports on this species demonstrated immune priming within and across generations of adults [6,11,13,14]. We herein found immune priming within generations of *T. molitor* larvae when *B. thuringiensis* and

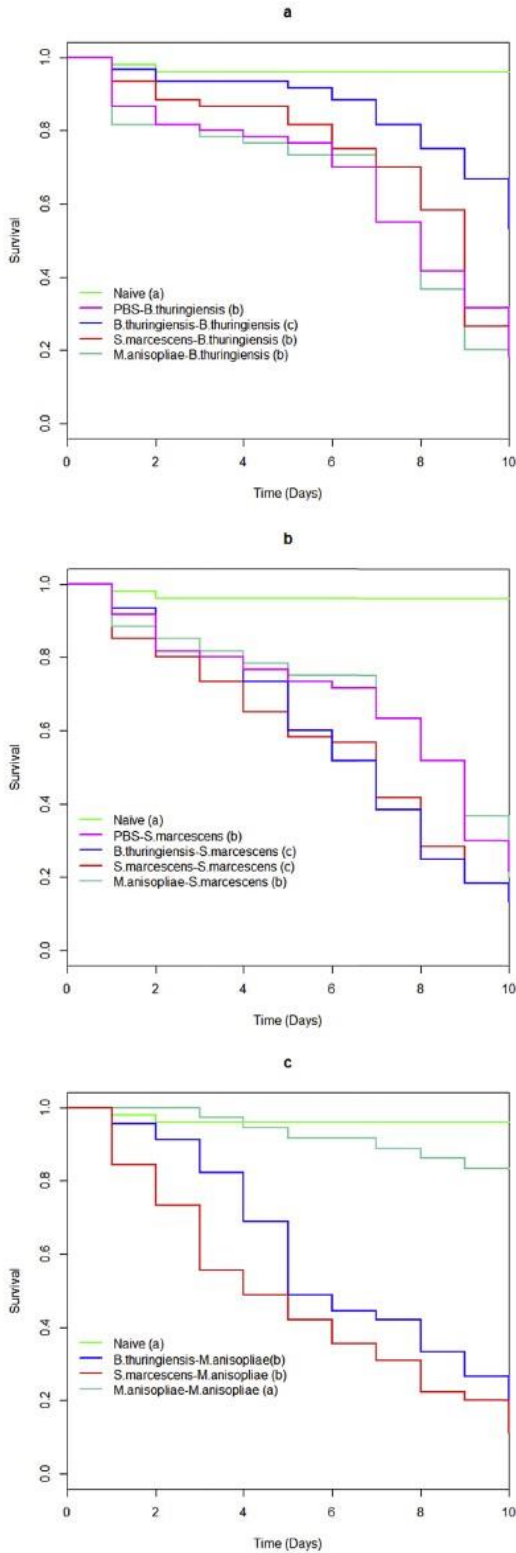


Fig. 1. Survival (in days) of *T. molitor* after homologous or heterologous challenges by *B. thuringiensis* (a), *S. marcescens* (b) and (c) *M. anisopliae*.

Table 2

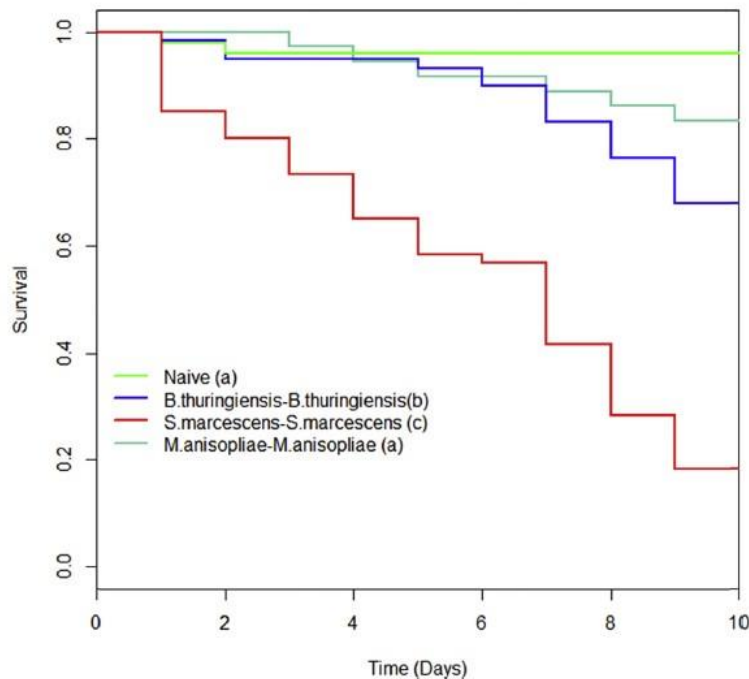
Comparison of the survival of *T. molitor* with homologous challenges with *B. thuringiensis* (a), *S. marcescens* (b) and *M. anisopliae* (c).

a			
	$\hat{\beta}$	$e^{\hat{\beta}}$	p-value
<i>M. anisopliae</i> - <i>B. thuringiensis</i>	1.1032	3.0137	< 0.0001
<i>S. marcescens</i> - <i>B. thuringiensis</i>	0.7946	2.2135	0.0010
PBS- <i>B. thuringiensis</i>	1.0074	2.7384	< 0.0001
b			
<i>B. thuringiensis</i> - <i>S. marcescens</i>	0.02745	1.02783	0.8893
<i>M. anisopliae</i> - <i>S. marcescens</i>	-0.39573	0.67319	0.0498
PBS- <i>S. marcescens</i>	-0.38436	0.68089	0.0579
c			
<i>B. thuringiensis</i> - <i>M. anisopliae</i>	2.1614	8.6831	< 0.0001
<i>S. marcescens</i> - <i>M. anisopliae</i>	2.5043	12.2346	< 0.0001

*M. anisopliae* were used in homologous but not heterologous challenges (Table 1a; Fig. 1a; Table 1c; Fig. 1c). In contrast, there was no evidence of immune priming against *S. marcescens* for either the homologous or heterologous challenges (Table 1b; Fig. 1b). In Tables 2a, 2b and 2c, we show the results of the Cox model for each experiment, which agree with the log-rank test presented in the previous tables. This result is according to increasing evidence that suggests that immune priming occurs against some but not all pathogens [4–6,15], and as far as we know, this is the first demonstration of immune priming of *T. molitor* against *M. anisopliae*.

Dhinaut et al. [6] found that *T. molitor* adults exhibited better immune priming against Gram-positive bacteria than against Gram-negative bacteria, and they suggest that these results may be explained by the fact that in the particular case of *T. molitor*, immune priming may have evolved in response to the most threatening pathogens, in this case, *B. thuringiensis* [6]. We compared homologous challenges of *B. thuringiensis* to those with *S. marcescens* and the fungus *M. anisopliae*. The survival of *T. molitor* larvae was longer when the dual exposure was to *B. thuringiensis* as opposed to *S. marcescens*, but insects challenged with *M. anisopliae* had higher rates of survival than insects challenged with *B. thuringiensis* (Table S3a; Fig. 2). The results of the Cox model for the homologous experiment are shown in Table S3b. Insects challenged with *M. anisopliae* and *B. thuringiensis* survived more days than those challenged twice with *S. marcescens*. This suggests that in *T. molitor*, improved protection from immune priming does not occur exclusively against bacteria but also occurs against fungi. We propose that Gram-positive bacteria and fungi may place potent selective pressures on *Tenebrio* [as proposed in ref. 6 only for Gram-positive bacteria]. Although we did not detect a potential mechanism, here, we hypothesize that the Toll pathway may be more effective than the IMD pathway for combating parasites in *T. molitor*. Gram-negative bacteria activate the latter pathway while the former is activated against Gram-positive bacteria and fungi [16]. In support of this hypothesis, in *Drosophila melanogaster*, flies with the Toll pathway blocked are more likely to die after immune priming than flies without the IMD pathway [15]. This idea should be better tested to understand the role of the Toll pathway in both immune priming performance and the role of pathogens to avoid such pathways and, hence, the avoidance of the immune priming strategy.

It was recently suggested that immune priming occurs not in an all-or-nothing manner but instead as a continuum [17]. The present and previous reports [4–6] put forward the idea that the effectiveness of immune priming in a particular invertebrate is impaired by some pathogen species but not by others. Hence, it is important to clarify the role of pathogens [4,18] as well as those played by the immune



**Fig. 2.** Survival (in days) of *T. molitor*, considering only homologous challenges with *B. thuringiensis*, *S. marcescens* and *M. anisopliae*. We also show the survival of insects that were manipulated twice but not injected (naive).

response mechanisms themselves, and in this way, studies that experimentally vary the pathogen species and levels of virulence may help to record how immune responses change accordingly.

#### Conflicts of interest

None of the authors have any conflict of interest.

#### Author's contribution

JCG and HL conceive and designed the experiments; HM, FS and GA performed the experiments; AHQ analysed data; and all authors wrote the manuscript and handled the revision.

#### Acknowledgements

Three anonymous reviewers provided helpful comments that substantially improved this paper. Gabriela López Barrera and Daniel Ramírez Martínez provided substantial help in the laboratory. The study was supported by Mexican grants from CONACYT (152666), CONACYT-LANASE (2017-280505) and PAPIIT (IA207716).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.063>.

#### References

- [1] J. Kurtz, Specific memory within innate immune systems, *Trends Immunol.* 26 (2005) pp186–192.
- [2] T.J. Little, D. Hultmark, A.F. Read, Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 651–654.
- [3] J. Kurtz, K. Franz, Innate defense: evidence for memory in invertebrate immunity, *Nature* 425 (2003) 37–38.
- [4] O. Roth, B.M. Sadd, P. Schmid-Hempel, J. Kurtz, Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, *Proc. R. Soc. B* 276 (2009) 145–151.
- [5] L. Mikonranta, F. Dickel, J. Mappes, D. Freitag, Lepidopteran species have a variety of defence strategies against bacterial infections, *J. Invertebr. Pathol.* 144 (2017) 88–96.
- [6] J. Dhinaut, M. Chogne, Y. Moret, Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect, *J. Anim. Ecol.* 87 (2018) 448–463.
- [7] J. Contreras-Garduño, H. Lanz, B. Franco, M. Pedraza-Reyes, A. Nava, J. Canales-Lazcano, Insect immune priming: ecology and experimental evidence, *Ecol. Entomol.* 41 (2016) 351–366.
- [8] A.I. Barnes, M.T. Siva-Jothy, Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity, *Proc. R. Soc. B* 267 (2000) 177–182.
- [9] I. Krams, J. Daukste, I. Kivleniece, T. Krama, M.J. Rantala, G. Ramey, L. Šauša, Female choice reveals terminal investment in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, after a repeated activation of the immune system, *J. Insect Sci.* 11 (2011) 56.
- [10] A. Vainikka, M.J. Rantala, O. Seppälä, J. Suhonen, Do male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, sustain the honesty of pheromone signals under immune challenge? *Acta Ethol.* 10 (2007) 63–72.
- [11] C. Castro-Vargas, C. Linares, A. López, K. Wrobel, J.C. Torres-Guzmán, A. González, H. Lanz-Mendoza, K. Wrobel, Jorge Contreras-Garduño, Methylation on RNA: a potential mechanism related to immune priming within but not across generations, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 473.
- [12] M.D.J. Ortega-Estrada, M.C. Del Rincón-Castro, R. Basurto-Ríos, J. Toledo, J.E. Ibarra, Phoresis between *Serratia marcescens* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: steinernematidae) during infection of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae, *Fla. Entomol.* 95 (2012) 120–127.
- [13] Y. Moret, Transgenerational immune priming: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, *Proc. R. Soc. B* 273 (2006) 1399–1405.
- [14] C. Zanchi, J.P. Troussard, J. Moreau, Y. Moret, Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect, *Proc. R. Soc. B* 279 (2012) 3223–3230.
- [15] L.N. Pham, M.S. Dionne, M. Shirasu-Hiza, D.S. Schneider, A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes, *PLoS Pathog.* 3 (2007) E26.
- [16] P.R. Johnston, O. Makarova, J. Rolff, Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*, *G3* 4 (2014) 947–955.
- [17] E.L. Cooper, Commentary: blurring borders: innate immunity with adaptive features, *Front. Microbiol.* 7 (2016).
- [18] P. Schmid-Hempel, Natural insect host–parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved, *Bioessays* 27 (2005) 1026–1034.



## BIBLIOGRAFÍA

Medina-Gómez, H., Rivas, G. A., Hernández-Quintero, A., Hernández, A., Torres-Guzmán, J. C. T., Lanz, H., y Contreras-Garduño, J. (2018a). The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 361-364.