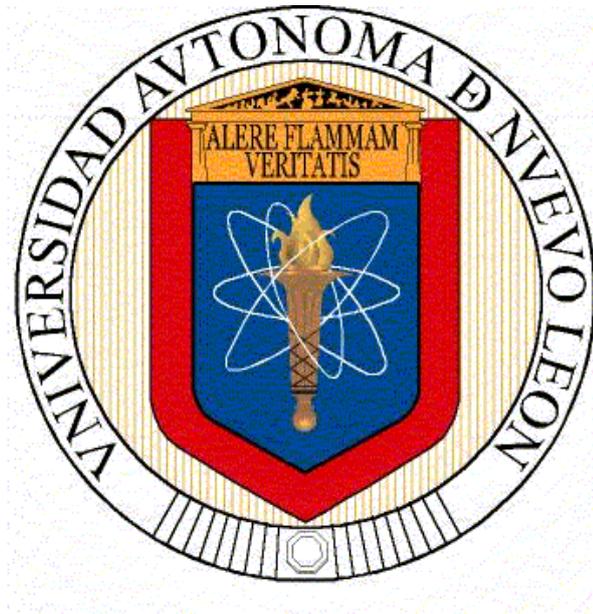


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VILLEMIN SOBRE  
PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS DE LA CUCARACHA *Periplaneta  
americana* L.**

**Por**

**PATRICIA MARIA CALLEJA GARCIA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**DICIEMBRE, 2018**

## **LUGAR DE TRABAJO**

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunobiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas ubicada en la Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Patricia Tamez Guerra.

**EFECTO DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VILLEMIN SOBRE  
PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS DE LA CUCARACHA *Periplaneta  
americana* L.**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Patricia Tamez Guerra  
Director de Tesis**

---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores  
Secretario**

---

**Dra. María Porfiria Barrón González  
Vocal 1**

---

**Dra. Licet Villareal Treviño  
Vocal 2**

---

**Dr. José Alberto Valadez Lira  
Vocal 3**

---

**Dra. Guadalupe González Ochoa  
Director Externo**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios padre gracias por acompañarme en cada paso que doy, por darme esa fuerza de seguir adelante y no caer, bendecirme en cada etapa de mi vida.

A mis asesores la Dra. Patricia Tamez Guerra y Dra. Guadalupe González Ochoa por el apoyo constante, sus enseñanzas, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, la confianza brindada hacia mi persona y proporcionarme espacio para la realización de este proyecto.

A mi comité por su colaboración, apoyo y consejo que me brindaron a lo largo de este proyecto a la Dra. María Porfiria Barrón González, Dra. Licet Villareal Treviño, Dr. Ricardo Gómez Flores y al Dr. José Alberto Valadez Lira.

Al MC. Alonso Orozco por compartir sus conocimientos, apoyarme en el proyecto y su paciencia. A mis compañeros de laboratorio por su apoyo Adán Galindo, MC Teodora Cavazos, Oziel Zúñiga, Andrea Abrego, Angello Martínez, Dra. Julissa Ek Ramos, Juan Ballesteros, Enriqueta Monreal, Dr. Cesar Romo.

A mi familia Regia Laiju Kuzhuppillymyal, Nora Mares, Rosalinda Navarro, por los consejos que me dieron en mi estancia en la ciudad, por hacerme sentir como en casa les tengo un aprecio y un cariño muy especial.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para el desarrollo de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional

A la Facultad de Ciencias Biológicas por la disposición y amabilidad brindada durante mi desarrollo profesional.

A mis compañeros de Maestría, Cesilia, Gustavo, Janeth, Luisa, Jesús Mares, Jorge y María Fernanda.

## DEDICATORIAS

A mi familia que han sido mi motor para salir adelante, mi mami Blanca García por estar en cada paso que doy así sea grande o pequeño siempre estar a mi lado, mi abuelita Dora Vallejo por darme esos sabios consejos y apoyarme a no darme por vencida. Mis tíos y tías, Angelita, Ramón, Francisco, Brunet, Trinidad y Dora; mis primos Angelita, Mauro, Alex, Estefanía, Francisco; mis hermanos Jesús Calleja y Guadalupe Calleja.

A mí prometido Antonio López por todo el apoyo, paciencia, consejos, fuerza y amor a lo largo de este proyecto y de nuestra estancia por la ciudad. Mi segunda familia mis suegros que me apoyaron en esta etapa Blanca Lidia García y Daniel López, mis cuñados y sobrinos Daniel, Luis, Emmanuel, Griselda, Danielito, Rebecca y Julieta.

A mi ángel que siempre me ha apoyado nunca me ha dejado sola en cada paso que doy está conmigo, gracias papi Jesús Calleja<sup>+</sup> a pesar de tu ausencia sigues a mi lado te amo.

A mis amigos Irma Velarde, Gustavo López, Virginia Flores, Guadalupe Quintero, Servando Cantú, Maribel Domínguez, por el apoyo emocional y brindarme sabios consejos para que no me diera por vencida y luchar por este sueños, ya son parte de mi familia los quiero mucho.

## ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Cucaracha <i>Periplaneta americana</i> .....	5
2.2 Ubicación taxonómica de <i>P. americana</i> .....	5
2.3 Ciclo de vida <i>P. americana</i> .....	6
2.4 Patogenicidad de la cucaracha urbana .....	7
2.5 Sistema Inmunológico.....	7
2.5.1 Respuesta Inmune Celular .....	7
2.5.2 Respuesta Inmune Humoral.....	10
2.5.2.2 Lisozimas.....	12
2.6 <i>Beauveria bassiana</i> .....	13
2.6.1 Ciclo de infección de <i>Beauveria bassiana</i> .....	14
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL .....	16
Objetivos Específicos.....	16
5.1 Recolección de la muestras .....	17
5.2 Cepa de <i>Beauveria bassiana</i> .....	17
5.3 Obtención del inóculo .....	17
5.4 Preparación de conidios aéreos.....	18
5.4.1 Inoculación de Conidios Aéreos en la cucaracha urbana .....	18
5.5 Actividad Fenoloxidasa (PO) .....	19
5.6 Conteo de Hemocitos. ....	19
5.7 Extracción de RNA de la cucaracha. ....	19
5.8 Diseño de oligonucleótidos ( <i>Primers</i> ) .....	20
5.8.1 Síntesis de cADN .....	21

5.9	Amplificación de lisozimas y péptidos antimicrobianos de <i>P. americana</i> .....	21
5.9.1	<i>PCR Tiempo Real</i> .....	22
6.	RESULTADOS.....	23
6.1	Evaluación de la cepa <i>BbPTG4</i> .....	23
6.2	Sistema inmunológico celular .....	25
6.3	Sistema inmunológico humoral .....	26
6.4	Detección de genes relacionados a la respuesta inmune de cucarachas .....	28
6.4.1	Expresión de lisozimas por qPCR .....	29
6.4.2	Expresión de <i>lisozimas</i> después de ser expuesta a <i>BbPTG4</i> .....	30
	DISCUSIÓN .....	32
	CONCLUSIONES .....	37
	PERSPECTIVAS .....	38
	BIBLIOGRAFÍA .....	39
	RESUMEN BIBLIOGRÁFICO .....	47

# ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
TABLA 1. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES <i>ACTINA, LISOZIMA C1, LISOZIMA C2, LISOZIMA I, PERIPLANETASIN Y PROLIXICIN</i> DE <i>P. AMERICANA</i> .....	20
TABLA 2. REACTIVOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE CDNA .....	22
TABLA 3. REACTIVOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES DE LISOZIMA POR QPCR .....	22
TABLA.4 MORTALIDAD DE CUCARACHAS (ADULTOS) Y CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN POR <i>B. BASSIANA</i> .....	23
TABLA 5. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA DETECCIÓN DE LISOZIMAS Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE <i>P. AMERICANA</i> .....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA. 1 TAMAÑO DE CUCARACHAS URBANA HEMBRAS Y MACHOS .....	6
FIGURA 2. FORMACIÓN DE CÁPSULA/NÓDULO EN INSECTOS DURANTE LA INVASIÓN DE MICROORGANISMO (PARÁSITO).....	8
FIGURA 3. TIPOS DE HEMOCITOS EN INSECTOS .....	10
FIGURA 4. PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>B. BASSIANA</i> EN INSECTOS .....	15
FIGURA 5. CONFIRMACIÓN DE INFECCIÓN Y MUERTE DE ADULTOS DE <i>P. AMERICANA</i> CAUSADA POR LA EXPOSICIÓN DE LA CEPA BBPTGA4 DE <i>B. BASSIANA</i> . .....	23
FIGURA 6. CRECIMIENTO DE <i>B. BASSIANA</i> EN MEDIO PDA CON ANTIBIÓTICO,.....	24
FIGURA7. TINCIÓN DEL CULTIVO DE <i>B. BASSIANA</i> CON AZUL DE LACTOFENOL. ....	24
FIGURA 8. A) COMPARACIÓN DE CONTEO DE HEMOCITOS ENTRE CUCARACHAS HEMBRAS TRATADAS Y CONTROL.....	25
FIGURA 9. B) COMPARACIÓN DE CONTEO TOTAL DE HEMOCITOS ENTRE LAS CUCARACHAS MACHOS TRATADOS Y CONTROL.....	25
FIGURA 10. COMPARACIÓN DE CONTEO TOTAL DE HEMOCITOS ENTRE HEMBRAS Y MACHOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	26
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (PO) ENTRE CUCARACHAS ADULTOS. ....	27
FIGURA 12. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA (PO) ENTRE CUCARACHAS HEMBRAS Y MACHOS TRATADOS CON LA CEPA PTG 4 DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> .....	27
FIGURA 13. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>ACTINA</i> (197Pb), <i>LYZ I</i> (186 Pb) Y <i>LYZ C2</i> (104 Pb) EN <i>P. AMERICANA</i> . ....	29
FIGURA 14. EXPRESIÓN DE GENES EN ADULTOS DE <i>P. AMERICANA</i> . ....	30
FIGURA 15. EXPRESIÓN DE LOS GENES LISOZIMA I ( <i>LYZ I</i> ) Y LISOZIMA C2 ( <i>LYZ C2</i> ) EN CUCARACHAS ADULTOS INOCULADOS CON LA CEPA BBPTG4 DE <i>B. BASSIANA</i> . 31	

## LISTA DE SÍMBOLOS DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
Mm	Milímetros
Cm	Centímetros
PO	Actividad fenoloxidasa
AMPs	Péptidos antimicrobianos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
PBS	Solución buffer fosfato salino
ARN	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Buffer borato de sodio
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Ct	Ciclo de umbral

## RESUMEN

A nivel mundial la cucaracha *Periplaneta americana* L. es un insecto importante por ser vector de agentes causales de infecciones y producir compuestos alergénicos a humanos. Para su control se han reportado cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin; sin embargo, se desconocen los mecanismos de respuesta inmune. En el presente estudio se determinaron los mecanismos de defensa en respuesta inmune celular (conteo de hemocitos) y humoral (actividad fenoloxidasa y expresión de lisozimas), en cucarachas en estadio adulto de *P. americana* expuestas a la cepa PTG4 de *B. bassiana* con una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de  $1 \times 10^8$  conidios/ml. La expresión de lisozimas se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR. Los resultados mostraron que el sistema inmunológico de tipo celular y humoral se activa significativamente ante la infección de la cepa PTG4 y la expresión del gen de *lisozima* tipo I se expresa significativamente más en el intestino de la cucaracha hembra que en macho ante la presencia de *B. bassiana*. Estos resultados permiten entender mejor los mecanismos relacionados a la resistencia de esta plaga ante agentes entomopatógenos fúngicos y su persistencia en el ambiente.

## ABSTRACT

World, the cockroach *Periplaneta americana* L. is an important insect because it is a vector of causative agents infections and produces an allergenic compounds to humans. For its control, native strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin have been reported; however, the mechanisms immune response are unknown. In the present study, the defense mechanisms in cellular immune response (hemocyte count) and humoral (phenoloxidase activity and lysozyme expression), in adult stage cockroaches of *P. american* exposed to the PTG4 strain of *B. bassiana* were determined with a mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>), of  $1 \times 10^8$  conidia/ml. Expression of lysozymes was performed by qPCR technique. Results showed that the cellular and humoral immune system is significantly activated against the infection of the PTG4 strain and the expression of *lysozyme* type I gene is significantly expressed more in female cockroach intestine that in the male in the presence of *B. bassiana*. These results contributed to a better understanding of the mechanisms related to the resistance of this pest against fungal entomopathogenic agents and its persistence in the environment.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Periplaneta americana* es una especie de insectos blatodeos de la familia Blattidae. Conocida como cucaracha urbana, puede llegar a medir hasta 40 mm, siendo una de las más grandes de esta familia. En condiciones óptimas, las hembras pueden vivir hasta 20 meses más que los machos (Fakoorziba et al. 2010). Las cucarachas adultas tienen la capacidad de sobrevivir sin alimento durante varias semanas, así como reproducirse durante todo el año en condiciones ambientales adecuadas. El insecto se desarrolla en áreas húmedas, con temperaturas de 29°C; tienen preferencia por los lugares oscuros ya que sufren de fotofobia, por lo que sus hábitats son grietas, sótanos, alcantarillas, etc.

A diferencia de otras plagas, la cucaracha urbana se encuentra presente durante todo el año, alimentándose de materiales que se encuentran en descomposición, restos de comida, cadáveres, etc. (Baumhotz et al. 1997), por lo que estos insectos son un vínculo importante en la transmisión de agentes patógenos a humanos como bacterias, virus, hongos y algunos protozoarios, causantes de infecciones nosocomiales y de importancia médica (Maketon et al. 2010; Cueto-Medina et al. 2015). En el intestino medio de las cucarachas *P. americana* y *B. orientalis* se han encontrado especies de bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, mientras que en el intestino posterior se han encontrado especies de *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Serratia* y *Streptococcus* (Bertino-Grimaldi et al. 2013). Se ha demostrado que los microorganismos que se encuentran en el tracto digestivo del insecto y pueden sobrevivir durante meses (Fathpour et al. 2003; Zarchi y Vatani 2008)

El uso de insecticidas químicos contra los insectos pone en riesgo la salud humana, ya que tienden a ser aplicados en espacios habitables (Murali et al. 1999). Además, el uso indiscriminado de insecticidas convencionales contra las cucarachas, ha llevado al desarrollo de resistencia ante estos productos químicos, complicando el control de esta plaga. *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin, es un hongo entomopatógeno utilizado como biopesticida para el control biológico de plagas de muchos insectos. En la fase virulenta, el hongo infecta al insecto por penetración directa de la cutícula, empleando diferentes enzimas (Pathan et al. 2007) y lo mata produciendo además algunas toxinas y alimentándose del cadáver para su

crecimiento. Se ha reportado que algunas cepas de *B. bassiana* tiene el potencial de empleo como agente en el control biológico contra la cucaracha *P. americana* (Hubner-Campos et al. 2013).

Los insectos han desarrollado mecanismos de defensa para evadir cualquier microorganismo patógeno e incluso agentes tóxicos (incluyendo insecticidas químicos) que pueda ocasionarles algún daño e incluso la muerte. Los mecanismos de defensa son reacciones tanto celular como a nivel sistemático, en las cuales están implicadas las células fagocíticas y la formación de cápsula, que es producida por células de la hemolinfa. Después de haber sido expuestos a una infección bacteriana, los insectos producen péptidos antimicrobianos en el cuerpo graso y se acumulan en las células de la hemolinfa de los insectos (Tamez-Guerra et al. 2008). Entre los mecanismos humorales de los insectos se tiene la actividad fenoloxidasa (PO) donde los insectos se defienden contra patógenos microbianos (Valadez-Lira et al. 2011).

La fenoloxidasa se encuentra en la hemolinfa y otros tejidos de muchos insectos. La actividad fenoloxidasa parece estar localizada en la hemolinfa de los insectos y su producción está mediada por los hemocitos. Algunas de las funciones de la fenoloxidasa es la melanización, la cual se presenta después de infecciones por parásitos o por la intoxicación por plaguicidas químicos. Debido a esto, la función de la fenoloxidasa en los insectos es de defensa. Además, la fenoloxidasa está implicada en la producción de difenoles para su uso en la cutícula (Fisher y Brandy, 1982).

Los hemocitos tienen funciones similares en la inmunidad de los insectos, los hemocitos varían entre las especies (Beckage et al. 2011). Los hemocitos se adhieren y forman cápsulas multicelulares alrededor de los objetos extraños que entran en la hemolinfa. Éstos circulan dentro de la cavidad corporal del insecto, para la producción de la encapsulación deben de haber cambios importantes en el comportamiento de los hemocitos; no sólo se requiere la adhesión del sustrato celular, sino también el reclutamiento y la adhesión de las células (Lackie et al. 1985).

Los péptidos antimicrobianos tienen un papel importante en la lucha contra patógenos invasores en insectos. Debido a las infecciones microbianas en insectos, los péptidos antimicrobianos se sintetizan en el cuerpo graso o en ciertas células de hemolinfa de los insectos, donde se liberan rápidamente para eliminar a los microorganismos invasores. Por lo tanto, los insectos cuentan con mecanismos

celulares y humorales para luchar contra los patógenos y posteriormente cambiar de inmunidad innata a inmunidad inducida (Tamez-Guerra et al. 2008; Basseri et al. 2016). Adicionalmente, se han descrito algunos inhibidores que pueden sintetizar péptidos antimicrobianos inducibles, como las lisozimas, que también son proteínas constitutivas de unión a lipopolisacáridos (LPS). Al respecto, en la cucaracha urbana se han logrado aislar LPS a partir de la hemolinfa. De forma general se han descrito **cinco** grupos principales de péptidos antimicrobianos de insectos, incluyendo cecropinas, defensinas, proteínas de tipo atacina (que son ricas en glicina), así como péptidos ricos en prolina (Basseri et al. 2016).

Anteriormente, en la Unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, se han realizado estudios relacionados a la virulencia de cuatro cepas nativas de *B. bassiana* contra los diferentes estadios del ciclo de vida de *P. americana*, entre las que destacaron dos por presentar mayor efectividad (Damas-Buenrostro, 2012). En esos estudios se observaron cambios en la producción de fenoloxidasa entre los diferentes estadios del ciclo de vida del insecto, además de los diferentes tratamientos de las cepas de *B. bassiana* (conidios aéreos, conidios sumergidos con micelio y sobrenadante), pero no se tiene información de la relación con la regulación en la producción de hemocitos ni sobre la producción de lisozima y péptidos antimicrobiales. Hasta el momento, solo se conoce la secuencia de oligonucleótidos para amplificar el transcrito del gen *periplanetasina*, relacionada a péptidos antimicrobiales en cucaracha. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es determinar las diferencias en el conteo de hemocitos, actividad fenoloxidasa y expresión de transcritos de *lisozima*, *periplanetasina* y otros péptidos antimicrobiales, entre adultos de *P. americana* expuestos a una cepa de *B. bassiana* nativa de México.

## 2. ANTECEDENTES

En la actualidad se estima que existen 4000 especies de cucarachas en todo el mundo, *Periplaneta americana* es una plaga común y es la especie más grande de la familia *Blattidae*. Las cucarachas se encuentran muy relacionadas con los humanos ya que comparten el mismo hábitat, se consideran una plaga y algunas son dañinas. Debido a sus hábitats y a los hábitos alimentarios de estos insectos, portan de una gran variedad de bacterias patógenas en la superficie corporal y tracto intestinal y la posibilidad de propagar parásitos intestinales, disentería, secreción de alérgenos, etc. (Zhang et al. 2017; Zhang et al. 2018).

Se conocen aproximadamente 45 patógenos que pueden ser transmitidos a través de patas, heces y regurgitamiento (Salehzadeh et al. 2007). Debido a su alta capacidad de habitar en ambientes insalubres y de resistir a enfermedades infecciosas indicando así su resistencia a los microorganismos patógenos, como las bacterias resistentes a los antimicrobianos, tóxicos y materiales peligrosos (Zhang et al. 2018). El uso de productos químicos para la eliminación de cucarachas, es un riesgo para la salud, ya que son aplicados en espacios habitables, además la resistencia que estos insectos han adquirido ha ido en aumento. Otra alternativa es el uso de hongos entomopatógenos para el biocontrol de plagas; los hongos entran en el huésped a través de la cutícula para causar infección en el insecto, ingresan por la hemolinfa, produciendo toxinas, utilizan los nutrientes presentes en el hemocele para evitar que el insecto active su respuesta inmune (Murali et al. 1999; Ambethgar 2009).

La aplicación de los hongos entomopatógenos puede ser en forma de conidios o micelios. Éstos en combinación con dosis bajas de insecticidas, ayuda a la disminución de resistencia de los insectos a los insecticidas (Ambethgar 2009). Estudios han demostrado que las cucarachas son susceptibles a algunas especies de hongos como *B. bassiana*, *Isarea (Paecilomyces) farinosus* y *Metarhizium anisopliae* (Zukowski y Bajan 1997; Murali et al. 1999; Zimmermann 2008). Existe amplia información acerca de la aplicación de estos hongos para el control de plagas en insectos de cultivo; sin embargo, son pocos los trabajos de investigación que reportan el uso de especies de *Beauveria* y *Metarhizium* para el control de cucarachas (Quesada-Moraga et al. 2004; Hubner-Campos et al. 2013).

## 2.1 Cucaracha *Periplaneta americana*.

Las cucarachas son insectos (Arthropoda: Hexapoda) pertenecientes al orden *Blattodea*, el cuerpo de estos insectos se encuentra quitinizado, aplanado dorsalmente y está dividido en tres regiones, cabeza, tórax y abdomen (Grandcolas 1996). Son reconocidos por su forma oval aplanada, con su cabeza dorsalmente cubierta por el pronoto, sus antenas son largas, filiformes y multisegmentadas, dos ojos compuestos y un aparato bucal masticador, sus patas son largas, espinosas y su torso consta de cinco segmentos (Triplehorn y Johnson 2005).

Su tórax está compuesto por tres segmentos conocidos como Protórax, mesotórax y metatórax. No todas las especies de este insecto tienen las alas completamente desarrolladas, algunas presentan alas cortas o rudimentarias (Arango y Angudelo 2004).

Las principales familias de importancia urbana son *Blattidae*, *Blattellidae*, *Blabberidae* y *Polyphagidae*. La familia *Blattidae* está formada por varias especies de plagas domesticas como; *P. americana*, *B. orientalis*, *B. lateralis* y *P. fuliginosa* (Domínguez 1994).

La cucaracha urbana es la especie más grande mide aproximadamente 4 cm de longitud. Esta especie la podemos encontrar tanto en el interior (casas, restaurantes, panaderías, etc.) como exterior (Drenaje, alcantarillas, túneles de vapor, etc.). Estas plagas se encuentran generalmente en zonas oscuras y húmedas (Kathryn 2008).

## 2.2 Ubicación taxonómica de *P. americana*.

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Atelocerata

Clase: Hexapoda

Orden: Blattodea

Familia: Blattidae

Género: *Periplaneta*

Especie: *americana* (Linneo)

### 2.3 Ciclo de vida *P. americana*.

El ciclo de vida *P. americana* consta de tres estadios, huevo, ninfa (diversos estadios) y adulto. Los huevos de la cucaracha urbana se encuentran acomodados en forma pareada dentro de una funda dura llamada ooteca, la cual puede contener aproximadamente 16 huevos (Ogg et al. 2007). Los huevos individuales son de forma oval alargada, puntiagudos en cada extremo, con una superficie interna cóncava. Las hembras buscan sustratos específicos como carbohidratos y una concentración suficiente de humedad para la ovoposición y embriogénesis. Se ha reportado que la embriogénesis dura aproximadamente 31 días, tiempo en el que eclosionan los huevos (Bell y Adiyodi 1982). La etapa ninfal inicia con la eclosión del huevo y termina en adulto. La cantidad en que la cucaracha muda es de seis a 14 veces en 18 meses (Ogg et al. 2007), antes de llegar a la etapa adulto. Después de la eclosión del huevo, sale la ninfa de color gris, después de su primera muda, cambia a un color marrón rojizo. Para la maduración tardan entre 6 a 20 meses, esto va a depender de la temperatura en la que se encuentre (Smith y Whitman 1992; Altunar-López 2016). La cucaracha es estadio adulto mide aproximadamente de 3,4 a 5,3 cm de longitud, son de color marrón rojizo, con una línea amarilla alrededor del borde del pronoto (Smith y Whitman 1992). Los machos son más largos que las hembras debido a sus alas que se extienden de 4 a 8 mm más allá de la punta del abdomen (Barbara 2008) (Fig. 1).



**Figura. 1** Tamaño de cucarachas urbana hembras y machos. Tomado de Smith y Whitman 1992.

## **2.4 Patogenicidad de la cucaracha urbana**

De las 4,000 especies de cucarachas, la cucaracha alemana (*Blattella germanica*) y la cucaracha urbana (*P. americana*), son las plagas domésticas más comunes y se han documentado los compuestos tipo alérgenos que producen (Lee et al. 2012). Ya que son un vector mecánico importante para la transmisión de muchos microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, protozoos, hongos y virus a humanos. Las infecciones de cucarachas siempre han sido un problema importante en la salud pública, esto debido a la capacidad que tienen de transportar y almacenar patógenos transmitidos (García et al. 2012). Se han aislado más de 100 especies de bacterias, así mismos se ha podido aislar micobacterias no tuberculosas de cucarachas que habitan en hospitales (Pai et al. 2005).

Se ha detectado bacterias colonizando a *P. americana* hasta por un periodo de más de 10 meses; entre éstas se encuentra *Salmonella* spp. aunque estudios han mostrado que las especies de *Salmonella* spp. no se establecen fácilmente en el tracto intestinal del insecto; se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* se multiplica en el intestino de *B. germanica* y la excreción de la bacteria continua hasta 114 días posteriores a su establecimiento (Pai et al. 2005). Por tal motivo, se considera que las cucarachas son un reservorio para microorganismos patógenos.

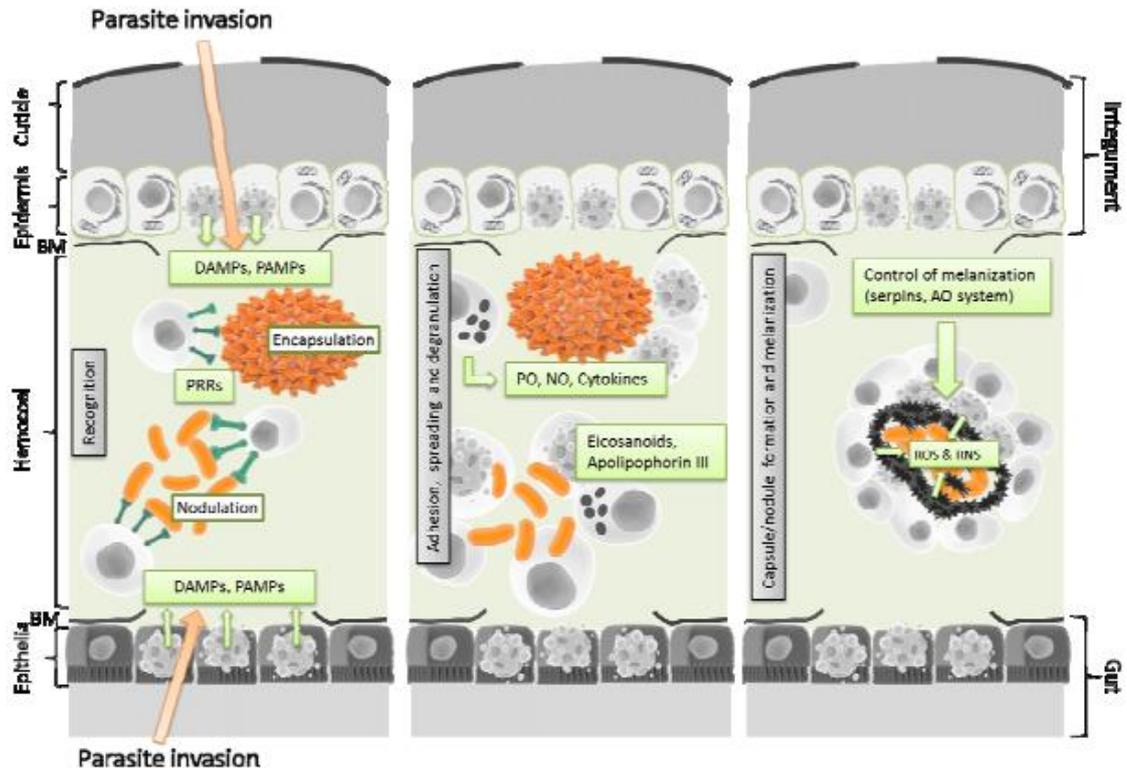
Las cucarachas contienen proteínas que son potentes alérgenos ambientales, especialmente en América, Europa, Taiwán, Tailandia y Sudáfrica. Estudios han demostrado que pacientes problemas en vías respiratorias son sensibles a las cucarachas, debido a la exposición con alérgenos que este aporta, además se encuentra asociado al desarrollo de asma en los primeros años de vida en niños (Lee et al. 2012).

## **2.5 Sistema Inmunológico**

### **2.5.1 Respuesta Inmune Celular**

Una vez que los patógenos entran al cuerpo de un insecto, se establece en el intestino medio, hemocele u otras células y órganos. El reconocimiento de patógenos como extraños y peligrosos induce una respuesta inmune que es impulsada por múltiples tipos de células y tejido inmune (Hillyer 2016).

El sistema inmune de los insectos consiste en respuesta celular y respuesta humoral. Estudios realizados acerca del sistema inmune del insecto, han demostrado que la barrera más importante para una infección es la respuesta celular (Khosravi et al. 2016). La respuesta celular es mediada por los hemocitos como la fagocitosis, la nodulación y encapsulación (Pech y Strand 2000; Lavine y Strand 2002). La fagocitosis se refiere a la presencia de un pequeño número de blancos microbianos como bacterias o levaduras, por un hemocito individual. La nodulación y encapsulación son respuestas inmunitarias innatas más eficaces contra un mayor número de patógenos o parásitos en insectos, conduciendo a la captura del invasor junto con los biopolímeros, melanina y esclerotina y proteínas. La encapsulación se refiere a múltiples hemocitos que se unen a un invasor grande como protozoos, nemátodos y parasitoides, que no pueden ser fagocitados por una sola célula. La unión de múltiples hemocitos a agregaciones de bacterias, hongos y protozoos también se denominan nodulación (Dubovskiy et al. 2016), por lo que los hemocitos desempeñan un papel importante en el mecanismo de defensa contra microorganismos en el hemocele (Khosravi et al. 2016) (Fig. 2).



**Figura 2.** Formación de cápsula/nódulo en insectos durante la invasión de microorganismo (parásito). Tomado de Dubovskiy et al. 2016.

Las poblaciones de hemocitos se pueden dividir utilizando dos criterios: estado espacial y propiedades funcionales, los hemocitos circulan con la hemolinfa, el cual se denomina hemocitos circulantes o se unen a tejidos, denominado hemocitos sésiles; los hemocitos sésiles pueden liberarse de su punto de unión y entrar en circulación, mientras que los hemocitos circulantes pueden unirse a tejidos y convertirse en sésiles (Hillyer 2016)

La sangre de la cucaracha o mejor conocida como hemolinfa, es la que lleva a cabo las funciones duales de la sangre y la linfa, es una sustancia incolora, que se encuentra bajo una presión baja y es filtrada lentamente por las cavidades corporales como el hemocele y se encuentra directamente en contacto con los tejidos. La hemolinfa realiza todas las funciones de transporte de productos como la digestión que lleva desde el intestino hasta los demás órganos y tejidos. Consiste en un plasma, con una concentración alta en aminoácidos libres y ácido úrico, con numerosas células incoloras de diferentes formas y tamaños, llamados hemocitos, quienes realizan la función protectora (Cameron 1961).

El proceso de encapsulación son mecanismos complejos que incluyen una amplia gama de reacciones inmunes de tipo celular y humoral; se ha demostrado la contribución de señales asociadas a daño (DAMP), generado durante la acción mecánica o enzimática al insecto por microorganismos invasores. Los receptores de reconocimiento de patrones celulares y humorales de insectos (PRR) son capaces de reconocer invasores e iniciar la adhesión de hemocitos al microorganismo. Después de haber estado en contacto con los microorganismos invasores, los hemocitos comienzan a extenderse y conducen a la formación de una vaina superpuesta alrededor del objeto. Estos procesos juntos desencadenan vías de señalización que producen varios activadores de inmunidad.

El sistema inmune innato de los insectos se divide defensas humorales que incluye, producción de moléculas efectoras solubles y defensas celulares (fagocitosis y encapsulación). Los insectos producen varios tipos de hemocitos que se distinguen por morfología. Los hemocitos que circulan en los insectos en etapa larval o ninfa son originados de dos fuentes: células progenitoras, éstas son producidas durante la embriogénesis y órganos hematopoyéticos (Strand, 2008).

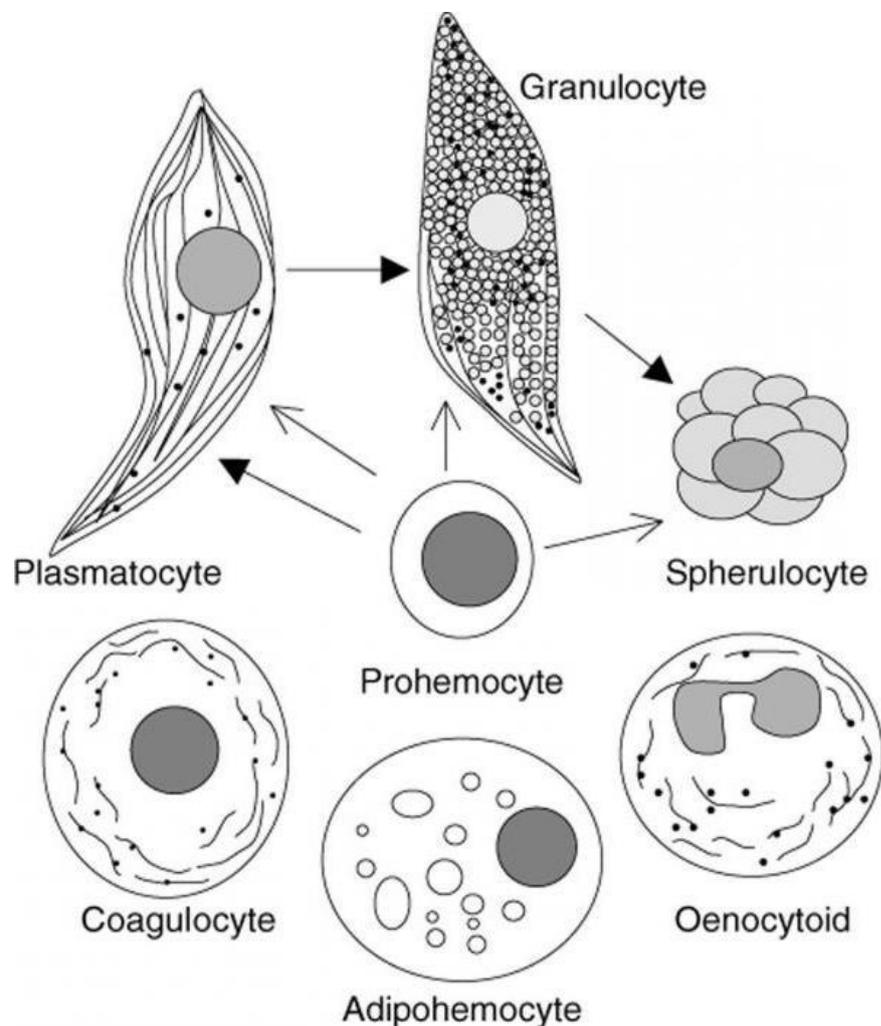
Los tipos de hemocitos reportados en la literatura son prohemocitos, células granulares (granulocitos), plasmotocitos, células esféricas (esferocitos) y oenocitoides; estos tipos de hemocitos se han descrito de las especies de diversos

ordenes como Lepidoptera, Diptera, Ortoptera, Blattaria, Coleoptera, etc. (Lavine y Strand 2002) (Fig. 3).

## 2.5.2 Respuesta Inmune Humoral

### 2.5.2.1 Actividad Fenol Oxidasa (PO).

La prophenoloxidasas (proPO) es la forma inactiva de la fenoloxidasas (PO). PO es sintetizada principalmente por los hemocitos de los insectos (Ebrahimi et al. 2018). Cuando un insecto se encuentra ante la presencia de algún microorganismos patógeno se activa la actividad fenoloxidasas, esta se encuentra en la hemolinfa de la cucaracha lo que da la melanización del insecto a través de este sistema de defensa del insecto, además de la formación de difenoles en la cutícula del insecto (Fisher y Brady 1982).



**Figura 3.** Tipos de hemocitos en insectos. Tomado de: Senyukovich Stanilova 2017.

La activación de esta enzima son una serie de eventos provocada por el sistema proactivador (proPO) proteínas capaces de unirse a polisacáridos y otros compuestos asociados con microorganismos, proteinasas que se activan en presencia de productos microbianos y otros factores (Söderhäll y Cerenius 2008). La enzima fenoloxidasa (PO), cataliza la tirosina 3,4-dihidroxifenilalanina para iniciar la melanización, se encuentra presente en todos los artrópodos. En insectos el precursor inactivo (proPO) es activado por la presencia de organismos extraños en el hemocele (Dunn 1986).

Se sabe que los activadores endógenos (serina proteasa) detectados en la cutícula del insecto, activa la producción de PO durante la reacción de reparación de la herida (Hung y Buocias 1996).

La enzima fenoloxidasa está implicada en la formación de melanina. Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, que posteriormente se polimerizaran no enzimáticamente a melanina. Los mono- como los di-fenoles son oxidados por la fenoloxidasa y los compuestos intermedios formados son tóxicos para los microorganismos (Söderhäll y Cerenius 1998).

#### 2.5.2.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos tienen un papel importante en la lucha contra patógenos invasores en insectos. Debido a las infecciones microbianas en insectos, los péptidos antimicrobianos se sintetizan en el cuerpo graso o en ciertas células de hemolinfa de los insectos, y rápidamente se liberan en la hemolinfa para matar a los microorganismos (Basseri et al. 2016).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) se identificaron y se aislaron de la hemolinfa de las pupas de cecropias (polilla de gusano de seda de América del Norte); hasta el momento se han identificado y purificado aproximadamente 150 péptidos antibacterianos. Así mismo se han identificado cinco grupos principales de péptidos antimicrobianos como, cecropinas, defensinas de insectos, proteínas de tipo atacina (ricas en glicina), péptidos ricos en prolina y lisozima (Latifi et al. 2015).

Los AMPs como las defensinas y catelicidinas dan una respuesta protectora contra infecciones y son componentes principales en la inmunidad innata en vertebrados. Las bacteriocinas suprimen a las especies competidoras. Los AMPs han

sido evaluados como una nueva alternativa como antibióticos, sustituyendo a los antibióticos convencionales (Sang y Blecha 2008).

Las cucarachas son una buena fuente de agentes antimicrobianos, los tejidos cerebrales de la cucaracha urbana muestran una actividad de amplio espectro. Kim *et al.* (2016) realizaron un análisis del transcriptoma *de novo* de *P. americana*, donde fueron inmunizados y no inmunizados con *Escherichia coli*, y como resultado obtuvieron una expresión de AMPs muy fuerte (Yun et al. 2017).

#### 2.5.2.2 Liozimas

Las liozimas son un grupo evolutivamente conservado de enzimas, efector inmunológico en el sistema inmune. Las liozimas de tipo C están estructuralmente relacionadas con liozimas caracterizadas que se encuentra en la albúmina de los huevos de gallina, y poseen actividad muramidasa, permitiendo la descomposición de las paredes de las células bacteriana (Beckert et al. 2015).

Dentro del reino animal, las liozimas se pueden clasificar en seis tipos: liozimas de pollo (C), liozimas de tipo ganso (G) y liozimas de tipo invertebrados (I), planta, fago y bacteriano (Kong et al. 2016; Wang et al. 2018). Las liozimas de tipo C, presentes en vertebrados como invertebrados, son las liozimas más estudiadas (Wang et al. 2018).

Las liozimas son enzimas que destruyen las paredes de las células bacterianas al hidrolizar componente polisacárido del peptidoglicano. En los insectos hay dos clases de liozimas, la liozima de tipo C (Lyz C) con actividad muramidasa y liozima de tipo I (Lyz I) poseen actividad muramidasa e isopeptidasa (Beckert et al. 2016). Las liozimas tipo C como I tienen lugar en insectos. La mayoría de los genomas de insectos contienen liozimas de tipo C excepto por el pulgón del ácaro, *Acyrtosiphon pisum* (Harris 1776). Debido a la capacidad que lisan bacterias, varios estudios han demostrado un aumento en la expresión de liozimas tipo C después de la infección bacteriana, las liozimas de tipo C también responden a diferentes tipos de patógenos, como hongos, virus y algunos parásitos. Además, algunas de estas liozimas de tipo C se potencian en el intestino del insecto y participan en procesos biológicos mediante el control de la microbiota intestinal; así como, facilitar la

digestión de bacterias como recurso alimenticio (Waterhouse et al. 2007; Wang et al. 2018).

Se han encontrado ocho nuevos genes de lisozimas de tipo C en el genoma de *Anopheles gambiae*, las cuales tienen variación considerable en la estructura de genes y patrones de expresión. Los genes *lyz C1*, *lyz C6* y *lyz C7* se expresan constitutivamente en todas las etapas de desarrollo desde el huevo hasta el adulto. Los genes *lyz C2* y *lyz C4* también se encuentran en todas las etapas, pero sus niveles son relativamente más altos en estadio adulto. Los niveles de los genes *lyz C3* y *lyz C8* son más altos en estadio larval. Los genes *lyz C1*, *lyz C6* y *lyz C7* se encuentran en todos los tejidos en estadio adulto, donde *lyz C2* y *lyz C4* tienen una expresión restringida. Los genes *lyz C1* y *lyz C2* son más inmunoreactivos, ya que su expresión se incrementa a las 6- 12 h después de la exposición con bacterias (Li et al. 2005).

## **2.6 *Beauveria bassiana***

El uso de productos químicos para la eliminación de cucarachas, es un riesgo para la salud, ya que son aplicados en espacios habitables. Los hongos entomopatógenos son utilizados para el biocontrol de plagas. Éstos entran en el huésped a través de la cutícula para causar infección en el insecto, ingresan por la hemolinfa, produciendo toxinas, utilizan los nutrientes presentes en el hemocele para evitar que el insecto active su respuesta inmune (Murali et al. 1999; Ambethgar 2009).

Una de las características de los insectos es su exoesqueleto quitinoso, la mayoría de los hongos y omicetos entomopatógenos necesitan quitinasas para penetrar al insecto hospedero; algunos de los hongos como *Metarhizium* y *Beauveria* del orden *Hypocreales*, filo *Ascomycota*, crecen dentro del huésped como cuerpos de hifas en forma de levadura, multiplicándose así por germinación (Arájuzo y Hughes 2016).

*B. bassiana* es un hongo entomopatógeno cosmopolita, con un amplio rango de hospedadores cubriendo la mayoría de los órdenes de insectos como por ejemplo, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Lepidoptera*, así como también artrópodos. *B. bassiana* es utilizado como agente de control biológico para diferentes plagas de artrópodos. En algunos países como china han utilizado *B. bassiana* para control de plagas contra la oruga del pino (*Thaumetopoea pityocampa*, Denis y Schiffermüller,

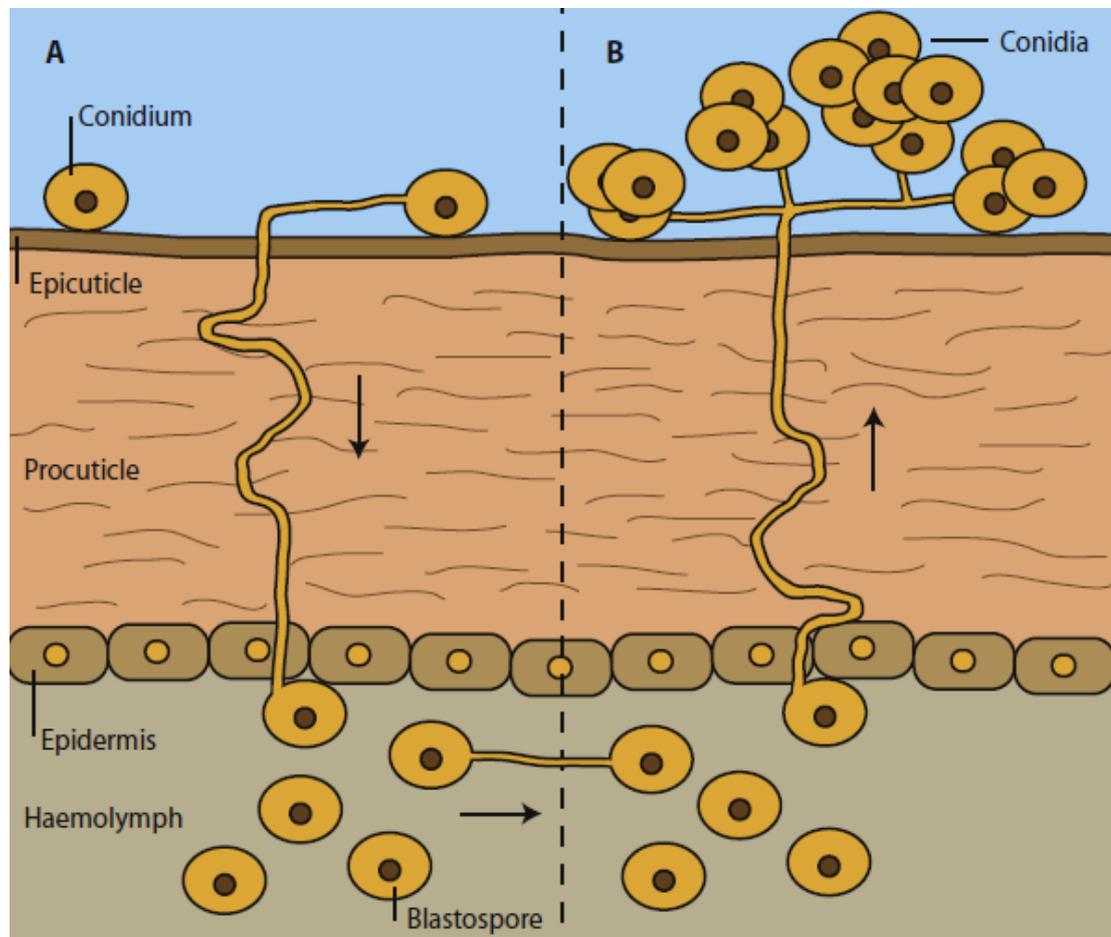
1775), el barrenador de maíz (*Ostrinia furnacalis*, Guenée, 1854), el áfido del melocotón (*Myzus persicae*, Sulzer, 1776) y aserrador de pino (*Bursaphelenchus xylophilus*, Steiner y Buhner 1934). *B. bassiana* también se está usado como una herramienta de control biológico para vectores de enfermedades humanas, como lo es el mosquito *Anopheles* que transmite enfermedades como la malaria, el mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) que es un vector transmisor de los virus causantes del Dengue, Chikungunya y virus Zika, el insecto *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas y garraptas como *Ixodes ricinus* (L.) que transmiten la enfermedad de Lyme (Valero-Jiménez et al. 2016).

Las especies de *Beauveria* son patógenas de insectos, son hongos facultativos fácilmente cultivables que pueden crecer como saprófitos y aislarse de todos los ecosistemas. Especies y cepas de *Beauveria* aislados de cadáveres de insectos se han caracterizado filogenéticamente. La mayoría de las cepas, incluso las aisladas del insecto huésped, muestran un amplio rango de hospedadores incluyendo artrópodos (Ortíz-Urquiza y Keyhani 2016). *B. bassiana* infecta al insecto a través de esporas o conidios aéreos, al establecerse en la superficie del huésped. Todas las etapas del ciclo del hongo son infecciosas, incluyendo hifas, conidios aéreos, blastosporas y conidios sumergidos. Los conidios aéreos son considerados la principal forma de dispersión y las estructuras más infecciosas, ya que son capaces de resistir en mayor medida que las hifas y las blastosporas. Los conidios de *B. bassiana* se caracterizan por ser hidrofóbicos, uniéndose así a la epicutícula del insectos, estructura rica en hidrocarburos, ácidos grasos y ésteres de cera (Valero-Jiménez et al. 2016) (Fig. 4).

### **2.6.1 Ciclo de infección de *Beauveria bassiana***

El ciclo de infección de *B. bassiana* en insectos se dividen en siete pasos: 1) para la infección, los conidios se adhieren a la cutícula del huésped; 2) germinan y forman un tubo germinal; 3) la cutícula se rompe utilizando una combinación de presión mecánica y degradación enzimática; 4) permitiendo que las hifas crezcan a través de la cutícula e invadiendo el hemocele del insecto, donde cambia a blastospora unicelular; 5) estas células circulan libremente a través del hemocele, donde rompen la hemolinfa para la nutrición y secretar toxinas que ayudan a matar al huésped; 6) para una invasión sea exitosa requiere que las células fúngicas evadan o superen la respuesta inmune del huésped; 7) durante el crecimiento a través del

hemocele. Cuando el huésped está muerto, la cutícula se abre desde el interior, permitiendo la salida del hongo del cuerpo del insecto y permitiendo la esporulación sobre el cadáver, facilitando que los conidios se dispersen e inicien una nueva infección (Feng et al. 1994; Valero-Jiménez et al. 2016) (Fig. 4).



**Figura 4.** Proceso de infección de *B. bassiana* en insectos. Tomado de Valero-Jiménez 2016.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el vínculo que existe entre la respuesta inmunológica (humoral y celular) de la cucaracha urbana al estar infectada o ser expuesta a metabolitos de una cepa nativa de la muscarina blanca, ya que hasta el momento no se tiene información detallada de la respuesta inmunológica de la cucaracha después de exponerse a *B. bassiana*, ni se conocen las secuencias de oligonucleótidos que amplifiquen los transcritos de genes que expresen la producción de AMPs ni de lisozima producidos por *P. americana*.

### 3. HIPÓTESIS

El sistema inmune de la cucaracha *Periplaneta americana* es regulado por la respuesta inmune celular (estimulación de hemocitos y su actividad fenoloxidasa), y humoral (cascada fenoloxidasa, producción de péptidos antimicrobianos y lizosima) ante la infección o exposición a enzimas y toxinas producidas por la muscarina blanca *Beauveria bassiana*.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar las diferencias en la producción de hemocitos, actividad fenoloxidasa y expresión de transcritos de lizosima y péptidos antimicrobianos de la cucaracha *Periplaneta americana*, después de exponerlos a propágulos o sobrenadante del cultivo de la cepa nativa BbPTG4 de *Beauveria bassiana*.

#### Objetivos Específicos

- 4.1 Diseñar oligonucleótidos que permitan la amplificación de transcritos de genes que codifican para la producción de lizosima y de péptidos antimicrobianos en la cucaracha urbana *P. americana*.
- 4.2 Analizar las diferencias en la expresión de genes de lizosima y de péptidos antimicrobianos en adultos de *P. americana* después de exponerlos a propágulos o sobrenadante del cultivo de la cepa nativa BBPTG4 de *B. bassiana*.
- 4.3 Definir algunos marcadores de la respuesta del sistema inmune celular y humoral de *P. americana*, ante la infección o exposición de metabolitos de la cepa BBPTG4 de *B. bassiana*.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Recolección de la muestras

Se recolectaron muestras de la cucaracha urbana de las alcantarillas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), se recolectaron un total de 195 individuos de *P. americana* hembras y machos en estadio adulto. Las cucarachas fueron sometidas a 20 días aisladas para descartar que estuvieran enfermas o parasitadas. Posteriormente se estableció la colonia en la Unidad de Formulación de Biológicos del laboratorio de inmunología y Virología de la facultad de Ciencias Biológicas de UANL. Para lograrlo, las cucarachas se colocaron en cajas Petri bajo las condiciones de incubación de  $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$ , con una humedad relativa de  $70 \pm 5\%$  con un fotoperíodo 14:10 (luz:oscuridad). La dieta consistió tanto para las cucarachas hembras y machos en croquetas para mascota (Pedigree) y algodón con agua (Damas-Buenrostro 2012). Para posteriores ensayos se tomaron cucarachas de la colonia ya establecida.

### 5.2 Cepa de *Beauveria bassiana*

Se evaluó la cepa nativa *BbPTG4* (KC759728), esta cepa fue aislada de la cucaracha urbana y ha demostrado ser virulenta contra *P. americana*.

### 5.3 Obtención del inóculo

Para evaluar la cepa se inoculó una asada de la cepa *BbPTG4* en caldo PDA con Tween 80 al 0.05% en agua destilada estéril, se dejó incubar a temperatura ambiente ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ) por 10 días; al tener un crecimiento de conidios, posteriormente se inocularon 200  $\mu\text{L}$  en agar PDA, y se dejó incubar por 7 días en oscuridad a  $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$ .

Se observó la formación de conidios, posteriormente se tomó un inóculo de los conidios formados y se realizó un microcultivo, esto para observar el porcentaje de viabilidad de las esporas, se tomó el inóculo y se suspendieron en 5 mL de Tween, para la suspensión se mezcló en vortex hasta que se disolviera la muestra con el

adyuvante. Posteriormente se filtró la muestra con un embudo y una gasa, para eliminar cualquier residuo. Obtenida la suspensión, se cortaron tres cuadritos de agar PDA de 1x1 cm aproximadamente y se colocaron en porta objetos con tres diferentes volúmenes 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$  en los cuadros de PDA, se inocularon se les colocó el cubre objetos, posteriormente se colocaron en cajas Petri de un diámetro de 9 cm, con un algodón húmedo, por menos de 18 h; pasadas este tiempo se observó al microscopio y se realizó el conteo de esporas germinadas.

## 5.4 Preparación de conidios aéreos

Obtenida la viabilidad de los conidios en los microcultivos, se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, se contaron los 4 extremos de la cámara y el centro, en total se contaron 5 cuadrantes de la cámara. Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), que fue de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Para lograrlo, en un tubo Eppendorf se colocaron los conidios obtenidos de la placa de PDA, cuidadosamente con un bisturí estéril se realizó el raspado, se le adicionó Tween. De acuerdo a la viabilidad de los conidios obtenidos, se realizó el cálculo para poder tener la solución requerida de  $CL_{50}$ .

### 5.4.1 Inoculación de Conidios Aéreos en la cucaracha urbana

Para los bioensayos se expusieron 94 cucarachas en estadio adulto a la  $CL_{50}$  calculada para la cepa *BbPTG4*, de los cuales 60 eran hembras y 34 machos. Las cucarachas inoculadas se enfriaron a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 min o hasta que las cucarachas quedaran inmovilizadas, ya que a temperaturas bajas las cucarachas entran en un estado de dormancia, cuando son sacadas de ese estado tienen un tiempo de reacción de aproximadamente 20 minutos, en el cual se realizaba la inoculación.

Las cucarachas se desinfectaban con etanol al 70% con un hisopo, desinfectando toda la superficie de la cucaracha, posteriormente de inoculaban con 100  $\mu\text{L}$  de conidios aéreos en la parte abdominal de la cucaracha. En hembras y machos se realizaba el mismo procedimiento. A las cucarachas control tenían el mismo proceso de desinfección y se les inoculaba con 100  $\mu\text{L}$  de Tween. Las

cucarachas inoculadas y control se colocaron en cajas Petri con agua y alimento, y se monitorearon por 7 días.

### **5.5 Actividad Fenoloxidasa (PO)**

Pasados los 7 días posterior a la inoculación, a las cucarachas que quedaron vivas se les midió la actividad fenoloxidasa. Para esto, se tomaron 3  $\mu$ L de hemolinfa del esternón de la pata de la cucaracha con una micropipeta, y se agregaron 12  $\mu$ L de buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente, se realizaron diluciones 1:5 para realizar la medición de la actividad fenoloxidasa por triplicado. En una placa de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 5  $\mu$ L de la dilución de hemolinfa más 195  $\mu$ L de la reacción L-DOPA (SIGMA). La lectura se realizó en el lector de Elisa en un periodo de tiempo de 15 min. Como controles se agregó L-DOPA 195  $\mu$ L más PBS 5  $\mu$ L.

### **5.6 Conteo de Hemocitos.**

Para el conteo de hemocitos se tomaron 2  $\mu$ L de hemolinfa del esternón de la pata de la cucaracha y se le adicionaron 10  $\mu$ L de solución de PBS, posteriormente se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión y se colocaron en la cámara de Neubauer para su conteo.

### **5.7 Extracción de RNA de la cucaracha.**

Para la extracción de ARN de la cucaracha se realizó por el método trizol (TRI REAGENT, MRC). La muestra se tomó del intestino de la cucaracha; se extrajo la cabeza, ya que está conectada al tubo digestivo de esta, y se le cortó el extremo de abajo, para eliminar heces de la cucaracha. Posteriormente, se colocó en tubo de 1.5 mL y se le adicionó 1 mL de trizol y se homogenizó la muestra con un pistilo, hasta suspender la mayor parte del intestino.

Posteriormente, se le agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo, se mezcló por inversión y se dejó reposar por 10 min. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL, y se agregó la misma cantidad de volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min.

Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min y se descartó el etanol. Se dejó secar la pastilla formada (con el ARN) durante 30 min. Posteriormente se re-suspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas, se dejó calentar a 65°C durante 10 min, finalmente se almacenó a -20°C.

La medición de ARN se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop Lite 120V Thermo Scientific®. Primero se calibró el equipo con 1 µL de agua miliQ que es la misma agua utilizada para diluir el ARN. Posteriormente se adicionó 1 µL del ARN y se midió las concentraciones a 260 nm con relación de pureza de 260/280 nm.

## 5.8 Diseño de oligonucleótidos (*Primers*)

Los primers se diseñaron tomando la secuencia completa de algunos péptidos y lisozimas ya descritas para *P. americana*, usando el programa *Integrated DNA Technologies* (IDT). Los *primers* diseñados fueron para amplificar los genes de actina, *lisozima i*, *lisozima C2*, *prolixicin*, *periplanetasin* y *lisozima C1* de *P. americana* (Tabla 1).

**Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para la detección de los genes *actina*, *lisozima c1*, *lisozima c2*, *lisozima i*, *periplanetasin* y *prolixicin* de *P. americana***

<b>Actina</b>	GenBank: F5'-ACAATGAACTTCGAGTAGCTCC-3'	197 pb
	AY116670 R5'-ACCGGAATCCAGCACAAATAC-3'	
<b>Lisozima C1</b>	GenBank: F5' -ATGTGCCAGAAAGATCCAGAG3'	159 pb
	JQ754174 R'5 -ACAAGTCTGAACCCCAAG-3'	
<b>Lisozima C2</b>	GenBank: F5'-GACGAACTCTAATGCTTTTGGTG 3'	109 pb
	JQ754175 R5'-CCGAAACCTTGGGCTCTAAG-3'	
<b>Lisozima I</b>	GenBank: F5' -TTCAGAATCACATGGGCCTAC-3'	186 pb
	JQ754173 R5' -GTCAAAACAGGTCACAACGC-3'	
<b>Periplanetasin</b>	F5' -TAYCCNTGYAARTTR-3'	45 pb
	R5' -AARGUNCCNUUYCAY-3'	
<b>Prolixicin</b>	GenBank: F5' -AAGGAAACATCTACCGAAGCC-3'	195 pb
	JX915873.1 R5' -TTGCGGACTAGAAAGAGGAAC-3	

### 5.8.1 Síntesis de cADN

Para la síntesis de cADN se realizó con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermofisher®), de acuerdo al protocolo que proporcionó el proveedor. Se preparó la mezcla con Buffer RT 10X, dNTP mix 25 X (100mM), *RT random Primers* 10X, *Nuclease-free H<sub>2</sub>O* y *Multiscribe™ Reverse Transcriptase*, hasta alcanzar un volumen final de 20 µL. En la Tabla 2 se muestra la reacción de retro-transcriptasa realizada. Posteriormente la mezcla se colocó en un termociclador Axygen Maxygene® se sometió a 4°C por 10 min, seguido de 2 h a 37°C, finalmente a 84°C por 5 min.

### 5.9 Amplificación de lisozimas y péptidos antimicrobianos de *P. americana*

El cADN obtenido se sometió a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la finalidad de observar cuál de los oligonucleótidos realizados nos amplificaba, se utilizaron 6 juegos de oligonucleótidos (Tabla 1). La mezcla se preparó de la siguiente manera: Buffer 1X (Green Go Taq, PROMEGA), los oligonucleótidos sentidos 100 nanomolar (*actina F*, *lyz C1 F*, *lyz C2 F*, *lyz I F*, *periplanetasin F*, *prolixicin F*), y los oligonucleótidos antisentido (*actina R*, *lyz C1 R*, *lyz C2 R*, *lyz I R*, *periplanetasin R*, *prolixicin R*) y 1 microlitro de cDNA para un volumen final de 20 µL se colocó en un termociclador (Tabla 2). La reacción se sometió a un ciclo de 95°C por 5 min, a 34 ciclos de 3 etapas de 95°C por 30 seg, 54°C por 30 seg y 72°C por 30 seg y finalmente un ciclo de 72°C por 5 min. El producto de PCR se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en un buffer borato de sodio (SB) a un voltaje de 100 volts por 60 min y se visualizó con bromuro de etidio en exposición a luz ultravioleta en el transluminador (ChemiDoc XRS+ Bio-Rad).

**Tabla 2. Reactivos y soluciones empleados para la obtención de cDNA**

10X RT Buffer	2.0 $\mu$ L
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 $\mu$ L
10X RT Random Primers	2.0 $\mu$ L
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 $\mu$ L
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4.2 $\mu$ L
cDNA	10 $\mu$ L

### 5.9.1 PCR Tiempo Real

La amplificación de transcritos en tiempo real (qPCR) se realizó de acuerdo al protocolo que proporciona el proveedor de la marca Thermofisher®. Primeramente el cADN se realizó diluciones de 1:5 en agua destilada. Para generar la curva de estandarización, las muestras se analizaron por triplicado. Generada la curva, las muestras se analizaron individualmente para cada juego de oligonucleótido. La mezcla se realizó de la siguiente manera: 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied biosystems), oligonucleótidos sentidos de lisozimas, AMPs y el cDNA para alcanzar un volumen total 10  $\mu$ L (Tabla 3). Posteriormente, las muestras se colocaron en el termociclador Applied Bse, donde el equipo determinó el ciclo de umbral (Ct) de nuestras muestras.

**Tabla 3. Reactivos y soluciones empleados para la amplificación de genes de lisozima por qPCR**

SybrGreen®	10 $\mu$ L
<i>Primer</i> forward	2.50 $\mu$ L
<i>Primer</i> Revers	2.50 $\mu$ L
cADN	3.0 $\mu$ L

## 6. RESULTADOS

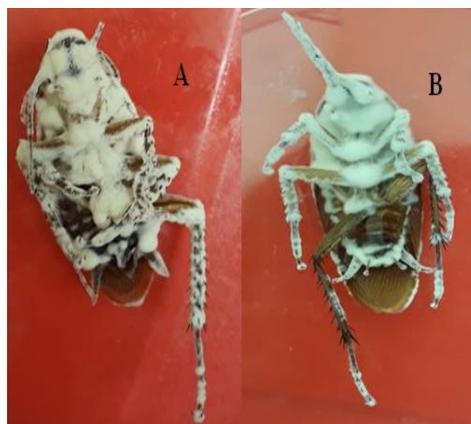
### 6.1 Evaluación de la cepa *BbPTG4*

Evaluada la cepa *BbPTG4*, se midió el porcentaje de viabilidad que tenían las esporas, el cual su porcentaje de viabilidad fue del 99%. Para el tratamiento se utilizaron conidios aéreos (CA) con una  $CL_{50}$  de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Los resultados mostraron una mortalidad del 30% para hembras y del 23.5% para machos (Tabla 4).

**Tabla.4 Mortalidad de cucarachas (adultos) y confirmación de infección por *B. bassiana*.**

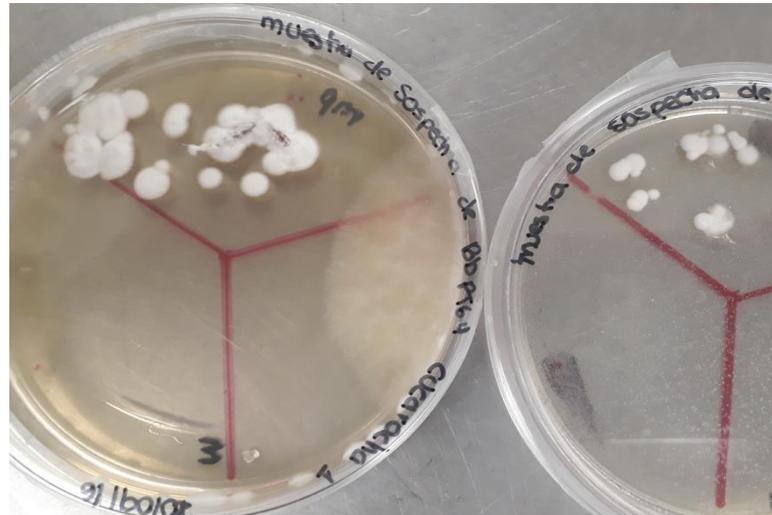
Cucarachas	Inoculadas	Control	Muertas	<i>B. bassiana</i>
Hembras	60	70	21	18
Machos	34	31	8	8

Se verificó que la mortalidad de las cucarachas fuera debido al hongo, colocando el cadáver individualmente en cámara con humedad, donde se observó la generación de micelio aéreo y esporulación de *B. bassiana* (Fig. 5).



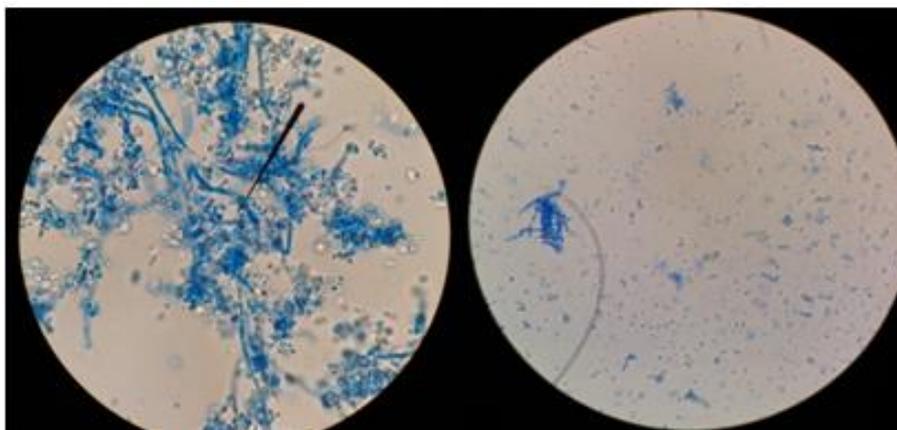
**Figura 5.** Confirmación de infección y muerte de adultos de *P. americana* causada por la exposición de la cepa *BbPTGA4* de *B. bassiana* después de colocar los cadáveres en cámara húmeda. A) Esporulación sobre el cadáver de una hembra; B) Esporulación sobre el cadáver de un macho.

Además, se tomó una de las extremidades (pata) del cadáver de la cucaracha y se inoculó en medio PDA con antibiótico (Fig. 6), hasta observar la formación del micelio aéreo.



**Figura 6.** Crecimiento de *B. bassiana* en medio PDA con antibiótico, se colocó alguna extremidad que tuviera crecimiento del hongo.

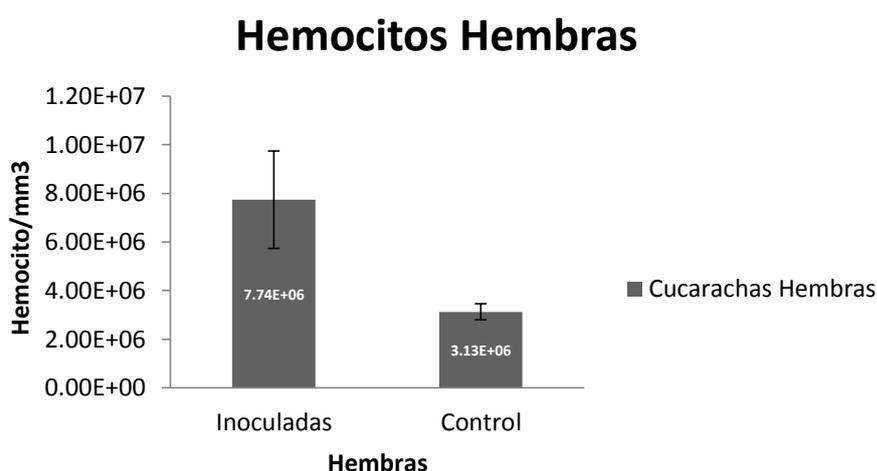
Si después del periodo de incubación había crecimiento del hongo en el medio de cultivo, se tomaba una muestra y se confirmaba morfológicamente con azul de lactofenol (Fig. 7), observando hifas y conidios de *B. bassiana*.



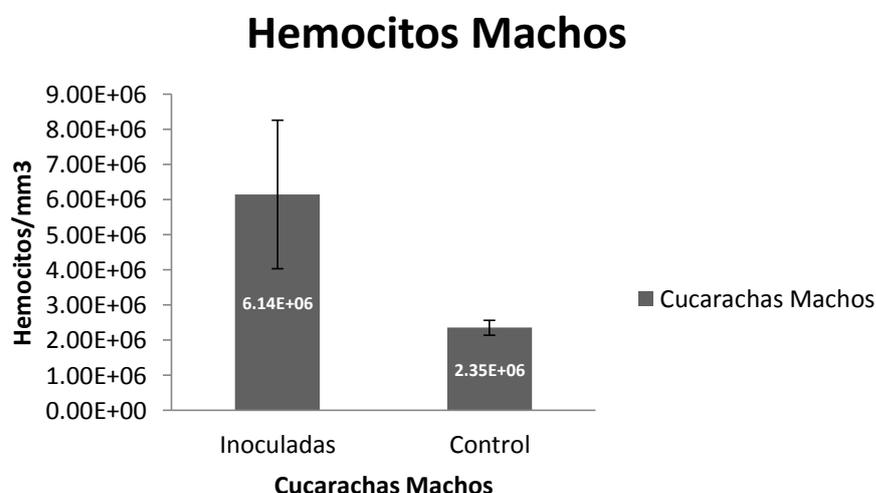
**Figura 7.** Tinción del cultivo de *B. bassiana* con azul de lactofenol. Muestra tomada del crecimiento en el medio de cultivo PDA con antibiótico.

## 6.2 Sistema inmunológico celular

Se evaluó el sistema inmunológico de la cucaracha después de haber sido expuesta a *B. bassiana* PTG4. Se realizó el conteo de hemocitos tanto en cucarachas hembras y machos inoculados y control, el cuál mostró un porcentaje altamente significativo en el conteo de hemocitos en cucarachas tratadas comparado con el control ( $P < 0.001$ ) (Fig. 8). Así mismo, se observó un porcentaje significativo mayor en el conteo total de hemocitos en cucarachas machos tratadas comparado con el control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9).

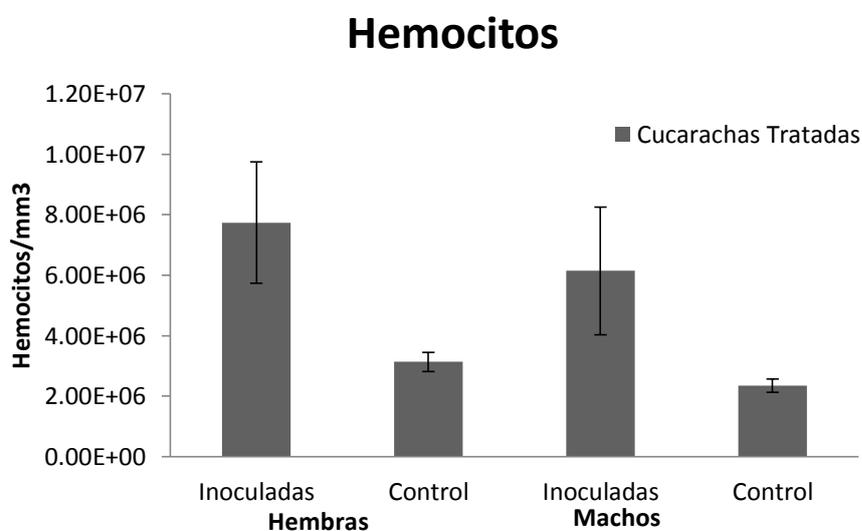


**Figura 8.** Comparación de conteo de hemocitos entre cucarachas hembras tratadas y control, con una diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ).



**Figura 9.** Comparación de conteo total de hemocitos entre las cucarachas machos tratados y control, con una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

Al comparar por conteo celular entre hembras y machos expuestos a *BbPTG4*, no se observaron diferencias significativas entre las hembras tratadas comparadas con los hemocitos totales de los machos tratados (Fig. 10). Los machos mostraron una expresión celular significativamente más alta que las hembras.

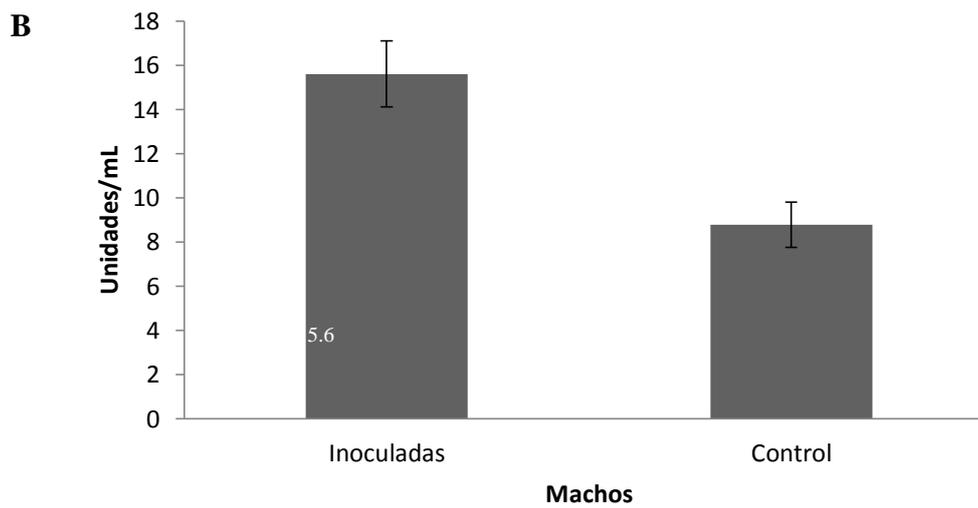
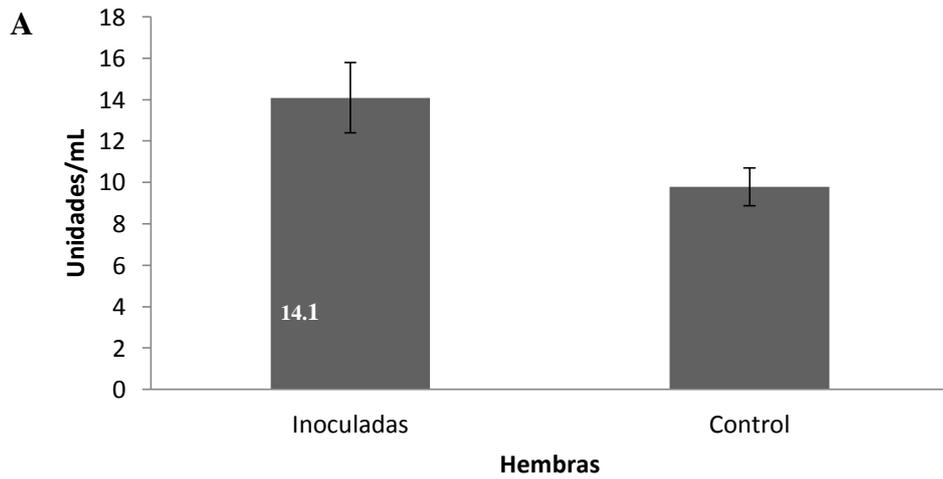


**Figura 10.** Conteo total de hemocitos entre hembras y machos después del tratamiento. No se observaron diferencias significativa entre el conteo total de hemocitos entre machos comparado contra las hembras.

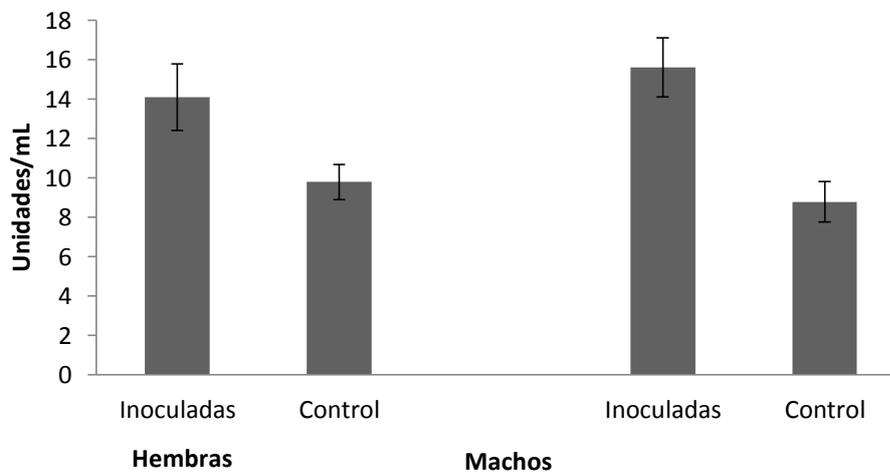
### 6.3 Sistema inmunológico humoral

Para la evaluación del sistema inmune tipo humoral de la cucaracha en estadio adulto ante la exposición de PTG4 de *B. bassiana*. Se realizó mediante la medición de la actividad fenoloxidasa (PO) de hembras y machos después de haber sido expuestos al tratamiento. En el cual se observa una diferencia significativa entre las hembras tratadas y el control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11A). Así mismo se observa una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre machos tratados y control (Fig. 11B).

Al comparar la actividad PO de las cucarachas hembras y machos tratados *B. bassiana*, se observó una diferencia significativa entre las hembras comparada con los machos (Fig. 12).



**Figura 11.** Comparación de la actividad fenoloxidasas (PO) entre cucarachas adultos A) hembras tratadas con BbPTG4 y control. B) P machos tratados con BbPTG4 y control.



**Figura 12.** Actividad fenoloxidasas (PO) entre cucarachas hembras y machos tratados con la cepa PTG 4 de *Beauveria bassiana*.

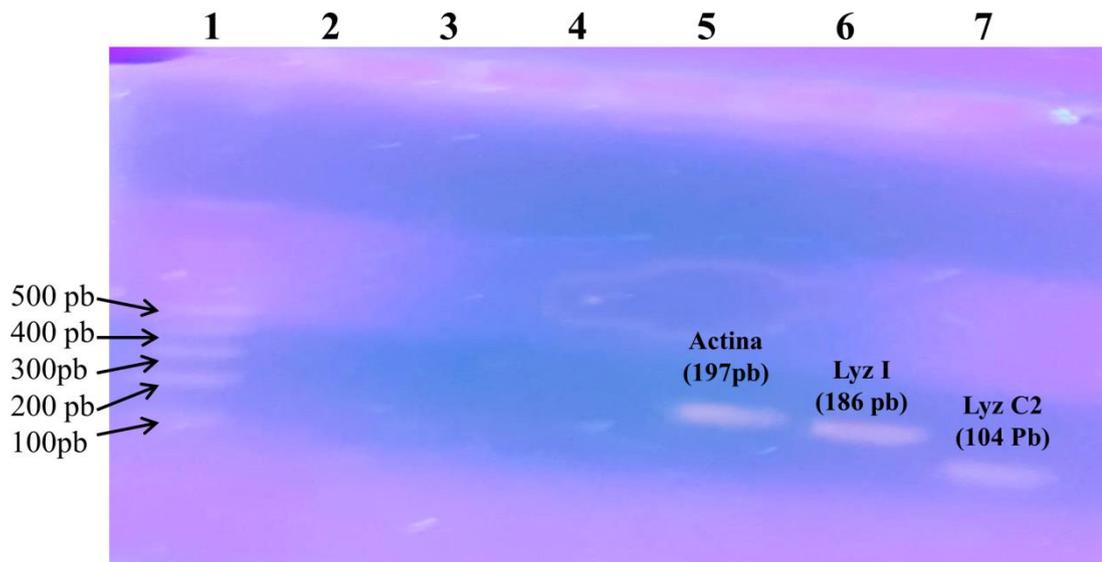
## 6.4 Detección de genes relacionados a la respuesta inmune de cucarachas

Se diseñaron seis juegos de oligonucleótidos para medir la expresión de lisozimas y péptidos antimicrobianos en las cucarachas tratadas con *B. bassiana*, así como un gen endógeno *actina* (Tabla 5), para realizar una comparación en cuanto a la expresión.

Después de haber realizado la extracción de RNA de las cucarachas, se procedió a la realización de cDNA para observar la amplificación de nuestros genes de interés por medio de PCR. En el cual se pudimos ver las amplificaciones de actina, *lisozima I* (*lyz I*) y *lisozima C2* (*lyz C2*), por medio de una electroforesis (Fig. 13).

**Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para la detección de lisozimas y péptidos antimicrobianos de *P. americana***

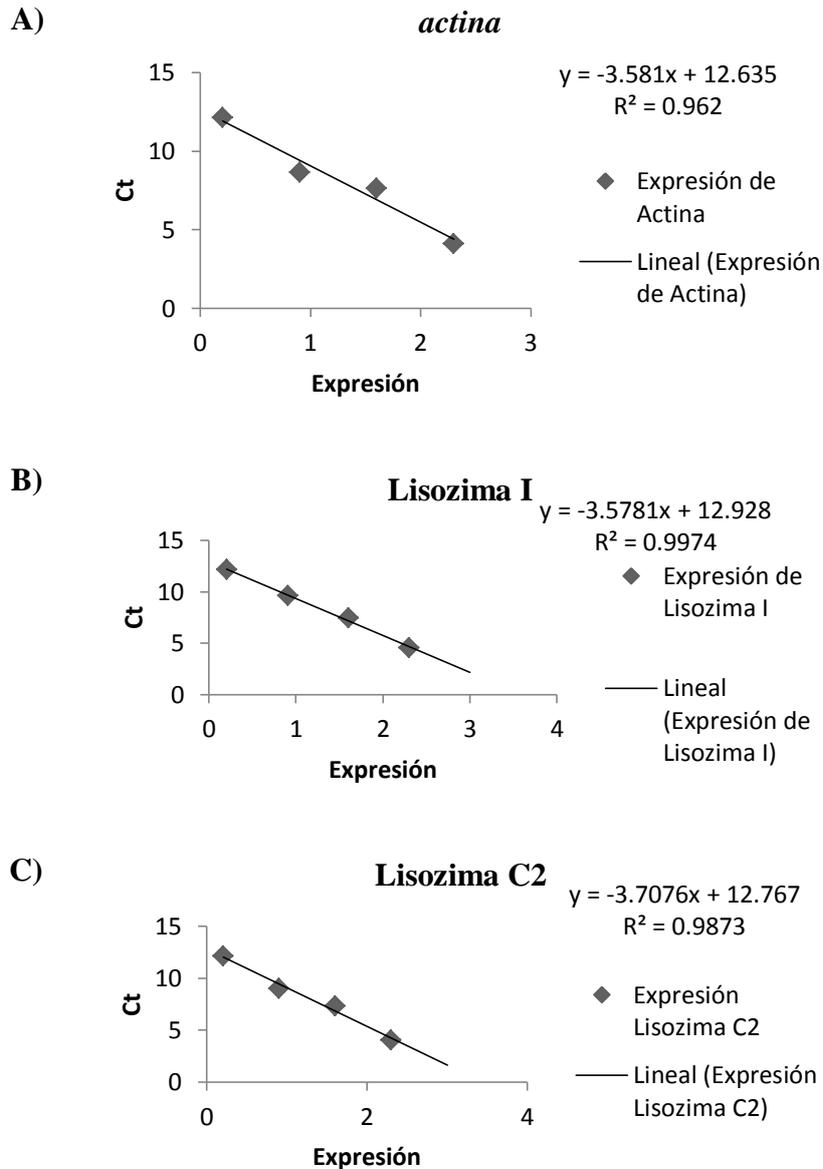
<i>actina</i>	GenBank: F5'-ACAATGAACTTCGAGTAGCTCC-3' AY116670	R5'-ACCGGAATCCAGCACAATAC-3'	197 Pb
<i>lisozima C1</i>	GenBank: F5'-ATGTGCCAGAAAGATCCAGAG3' JQ754174	R'5'-ACAAGTCTGAACCCCAAG-3'	159 Pb
<i>lisozima C2</i>	GenBank: F5'-GACGAACTCTAATGCTTTTGGTG 3' JQ754175	R5'-CCGAAACCTTGGGCTCTAAG-3'	109 Pb
<i>lisozima I</i>	GenBank: F5'-TTCAGAATCACATGGGCCTAC-3' JQ754173	R5'-GTCAAAACAGGTCACAACGC-3'	186 Pb
<i>periplanetasina</i>		F5'-TAYCCNTGYAARTTR-3' R5'-AARGUNCCNUUYCAY-3'	45 Pb
<i>prolixicina</i>	GenBank: F5'-AAGGAAACATCTACCGAAGCC-3' JX915873.1	R5'-TTGCGGACTAGAAAGAGGAAC-3'	195 Pb



**Figura 13.** Expresión de los genes *actina* (197Pb), *lyz I* (186 Pb) y *lyz C2* (104 Pb) en *Periplaneta americana*. Carril 1 = marcadores de peso molecular; carril 2 = control; carriles 3-7, amplificación de los genes de *periplanetasina*, *prolixicina*, *actina*, *lyz I* y *lyz C2*.

#### 6.4.1 Expresión de lisozimas por qPCR

Para ver la eficiencia de los genes de interés y del gen endógeno se realizaron diluciones seriadas para la estandarización de nuestra curva estándar (Fig. 14), donde se pudo observar la eficiencia de la amplificación del gen *lisozima I* (Fig. 14B) y *lisozima C2* (Fig. 13C) (genes de interés) y *actina* (gen endógeno) (Fig. 14A).

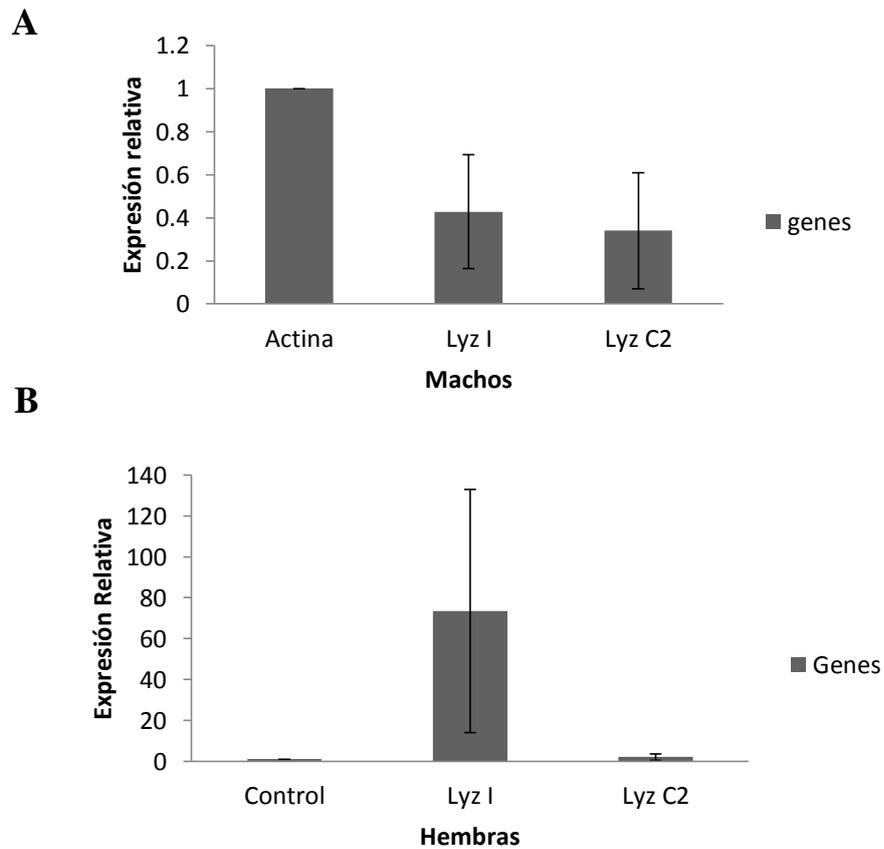


**Figura 14.** Expresión de genes en adultos de *P. americana*. A) gen endógeno *actina*; B) expresión de *lisozima I*; C) expresión de *lisozima C2*

#### 6.4.2 Expresión de *lisozimas* después de ser expuesta a *BbPTG4*

Las cucarachas hembras y machos que sobrevivieron a la exposición de *B. bassiana*, se realizó la expresión de los genes de lisozima I (*lyz I*) y lisozima C2 (*lyz C2*) por la técnica de qPCR. Los resultados mostraron que la expresión de estos dos genes fue diferente ( $P < 0.001$ ) entre los machos expuestos comparados con el control. Sin embargo, se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre el gen *lyz I* y *lyz C2* (Fig. 15A), comparado con el control.

En el caso de la expresión de genes de lisozima I (*lyz I*) y lisozima C2 (*lyz C2*), los resultados mostraron una diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) entre la expresión del gen *lyz I* comparada con el control; sin embargo, no se observaron diferencias entre el gen *lyz C2* comparado con el control. Haciendo una comparación entre los genes *lyz I* y *lyz C2*, se observaron diferencias ( $P < 0.001$ ) (Fig. 15B) entre estos dos genes en cucarachas hembras inoculadas con la cepa *BbPTG4* de *B. bassiana*.



**Figura 15.** Expresión de los genes lisozima I (*lyz I*) y lisozima C2 (*lyz C2*) en cucarachas adultos inoculados con la cepa *BbPTG4* de *B. bassiana*. A) hembras; B) machos.

## DISCUSIÓN

*P. americana* es una cucaracha sinantrópica más importante a nivel mundial. Esta especie es responsable de episodios graves y recurrentes de asma, alergias y de enfermedades de importancia médica. Por lo cual es importante desarrollar estrategias para controlar esta plaga. Los hongos entomopatógenos son ampliamente utilizados para el control de plagas agrícolas, se han realizado estudios acerca del efecto de hongos conocidos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra las cucarachas. (Hubner-Campos et al. 2013).

*B. bassiana* ocupa un lugar importante en el manejo de plagas. Es un parásito más versátil capaz de atacar y penetrar a su huésped en varias etapas de desarrollo. *B. bassiana* se ha utilizado para el control de varias plagas, como el gorgojo del camote (*Cylas formicarius* F.), la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) (Gennadius, 1889); el gusano de hoja de algodón (*Spodoptera littoralis*) (Boisduval), y la mariposa de la col *Pieris brassicae* L., entre otros insectos plaga. *B. bassiana* podría usarse para el control biológico de cucarachas debido al hábitat que estos insectos promueven la infección micótica inicial y su posterior diseminación (Mudoï et al. 2017, -2018).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que el aislamiento de *B. bassiana* fue efectivo contra *P. americana* mediante la exposición directa de conidios aéreos, mostrando diferencias en la virulencia del entomopatógeno en las diferentes fases del insecto (ninfas tardías y adultos: hembras y machos) (Damas-Buenrostro 2012). En este trabajo se optó por la utilización de conidios aéreos de *B. bassiana* en la fase adulta en hembras y machos. La mortalidad que obtuvimos fue del 37.5 % en hembras y un 27% entre machos. Mudoï et al. (2017) realizaron un estudio con *B. bassiana* inoculada en diferentes estadios de *P. americana* donde obtuvieron una mortalidad en el estadio adulto de un 26%; concluyendo en su trabajo que la infectividad varía con la composición genética de la cepa para la producción de toxinas fúngicas, obstrucción física de la circulación sanguínea, el agotamiento de nutrientes o por la variabilidad innata del hongo para invadir al insecto huésped.

Se han demostrado que *B. bassiana* es un patógeno fúngico prometedor para el control de cucaracha en donde ha demostrado una mortalidad del 100% dentro de los 6 días en condiciones de laboratorio para *B. germanica* y 11 días para *P. americana*,

mientras que los productos químicos han mostrado una acción más lenta para estas dos especies de cucarachas (Wang et al. 2016).

Otro estudio realizado por Hubner-Campos et al. (2013) demostró la eficacia que tienen los hongos entomopatógenos para el control biológico de la cucaracha urbana, dejando claro que *B. bassiana* y cepas de *Metarhizium* son activos contra esta plaga, produciendo toxinas que causaron la parálisis temprana de ninfas y adultos infectados y contribuyeron a la eficacia fúngica. Ellos mencionan que otras especies de hongos entomopatógenos que pueden causar mortalidad muy altas contra una amplia gama de insectos pero causan un mortalidad <20% para *P. americana* son considerados no buenas hospedantes. Nuestros resultados mostraron un porcentaje de mortalidad >20%. Por lo que la cepa BbPTG4 de *B. bassiana* es un buen candidato para el control de *P. americana*.

Los rasgos inmunológicos que se miden comúnmente incluyen la supervivencia de infecciones patógenas, recuento o actividad de hemocitos circulantes, actividad antimicrobiana, encapsulación y actividad fenoloxidasa (Giglio et al. 2017). En nuestro trabajo los rasgos inmunológicos que se midieron fueron el recuento total de hemocitos circulantes y actividad fenoloxidasa después de los siete días de la inoculación de la cepa BbPTG4 de *B. bassiana*.

El sistema inmune es activado cuando algún agente patógeno ataca al hospedero. El sistema inmune de tipo celular, está compuesto de células sanguíneas circulantes de los insectos llamadas hemocitos, estos se adhieren y forman cápsulas multicelulares alrededor de objetos extraños que entran en el hemocele. El grosor de la cápsula depende no solo de la especie del insecto sino también de la naturaleza del objeto encapsulado. Los hemocitos normalmente circulan libremente dentro de la cavidad corporal del insecto.

La hemolinfa, así como las proteínas presentes en el plasma de la hemolinfa, tiene múltiples funciones, que van desde funciones fisiológicas, como el almacenamiento de nutrientes o la regulación hormonal, así como procesos inmunes que median la respuesta a patógenos potenciales.

En nuestro trabajo se realizó el conteo total de hemocitos en el cual se observa una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) en el conteo total de hemocitos en machos comparado con las cucarachas hembras. Gunnarsson y Lackie et al. (1985) realizaron un estudio sobre la encapsulación hemocítica en la langosta *Schistocerca gregaria* y la cucaracha *P. americana*; ellos observaron que el número de hemocitos total de la

cucaracha macho adulta tenía tres veces más plasmotocitos disponibles para encapsular un objeto implantado que la langosta macho adulta.

Se han investigado el sistema inmune celular innato en insectos informando que hay un aumento en el número de hemocitos durante el desarrollo de larvas de la especie de *Harmonia axyridis* y una disminución en el número de hemocitos durante la edad adulta (Řeřicha et al. 2017). Las reacciones de defensa en invertebrados frecuentemente se observa la melanización. La enzima involucrada en la síntesis del pigmento de melanina es la fenoloxidasa, la cual es capaz de oxidar los fenoles a quinonas, que posteriormente polimerizan en forma no enzimática a melanina. La melanina junto con sus intermediarios, tienen propiedades fúngicas. En la hemolinfa de los artrópodos se ha detectado una proenzima inactiva llamada profenoloxidasa (proPO). Este es activado durante el reconocimiento de agentes extraños. Una vez activado proPO genera algunos factores que estimulan a los hemocitos para la eliminación del material extraño (Vargas y Ortega 1994).

Los hemocitos son células inmunes que circulan en la hemolinfa y participan en el reconocimiento y la encapsulación de patógenos. Por el contrario, la fenoloxidasa media principalmente la melanización de objetos extraños y funciona a través de la activación de la cascada de pro-fenoloxidasa, su precursor inactivo se almacena típicamente en la hemolinfa y los hemocitos (Vogelweith et al. 2017).

El conteo celular de las hembras es menor comparado con el de los machos, por lo que probablemente los hemocitos no reconocen al agente extraño y la PO se encarga de la eliminación del patógeno por medio de la melanización. Mastore et al. 2015 modularon la respuesta inmune de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) inducido por el nematodo *Steinernema carpocapsae* y observaron que los hemocitos de *R. ferrugineus* participaban activamente en la formación de cápsulas contra objetos abióticos.

Se ha mencionado que la proporción de hemocitos varía dependiendo si la cucaracha fue anestesiada con CO<sub>2</sub> o simplemente enfriada a la inmovilidad, ya que no todos los hemocitos estarán circulando en un momento dado y es posible que en insectos inmóviles y refrigerados algunos hemocitos no salgan de la suspensión. Por lo contrario de utilizar solución salina o anticoagulante y el uso de CO<sub>2</sub>, que estimulan la actividad muscular causando que muchos de los hemocitos no circulantes entren a la circulación (Gunnarsson y Lackie 1985).

La melanización, es una respuesta inmunitaria prominente en artrópodos incluyendo insectos, desempeñando un papel importante en la cicatrización de heridas y el secuestro de patógenos en varias especies como por ejemplo en *Drosophila melanogaster* Meigen. Se han realizado estudios acerca del comportamiento inmunológico de muchos insectos, esto con el fin de ver cuáles son sus mecanismos ante la presencia de patógenos y las diferencias que se presentan de acuerdo al sexo, estadio, reproductividad de los insectos. Volgelweith et al. (2017) realizaron un estudio en *Forficula auricularia* L. en diferentes estadios, donde descubrieron que la exposición temprana a los patógenos generalmente aumentaba la concentración de hemocitos, pero no la actividad total fenoloxidasa. Pero en el estadio adulto observaron que la actividad PO era más alta en las hembras adulto en comparación con los machos adultos, aumentando la supervivencia en el estadio adulto. Los resultados de Volgelweith et al. (2017) concuerdan con los resultados que presentamos donde se observa una diferencia significativa en la actividad PO en hembras que en machos en estadio adulto.

La lisozima juega un papel importante en la defensa de insectos, ya que tienen la capacidad genética para producir lisozimas múltiples de diferentes tipos contra microorganismos, y varios de estos genes han sido identificados por análisis de expresión génica global después de la exposición microbiana (Kong et al. 2016; Callewaert y Michiels 2010). La mayoría de las lisozimas exhiben actividades antibacterianas ejerciendo actividad de muramidasa.

Como se menciona anteriormente, el gen de *lyzC1* se expresan constitutivamente en todas las etapas del desarrollo desde el huevo hasta el adulto. Además, el genes *lyzC2* se encuentran en todas las etapas, pero con niveles relativamente más altos en adultos, además de tener una expresión más restringida, como lo menciona Li et al. (2005). Beckert et al. (2016) produjeron lisozima I en el escarabajo arlequín mariquita invasor *Harmonia axyridis* Pallas ante la presencia de la levadura *Pichia pastoris*, donde la lisozima se producía en el cuerpo graso.

Se ha observado que la expresión del gen *lyzC2* se incrementa significativamente entre 6 y 12 h después de ser expuesto a bacterias. La actividad de la lisozima inducible (tipo C) en la hemolinfa se ha demostrado para muchos órdenes de insectos, incluidos los dípteros, lepidópteros, ortóptera y coleópteros. Algunas lisozimas de tipo C tienen actividad contra bacterias grampositivas y contra bacterias gramnegativas, demostrando que las lisozimas de tipo C juegan un papel

importante en la defensa del insecto contra las bacterias (Callewaert y Michiels 2010).

Las cucarachas expuestas a la cepa de PTG4 de *B. bassiana* el gen de *lisozima I* jugó un papel importante en la defensa de la cucaracha ante la invasión del hongo, observando una expresión más alta en hembras que en machos.

En muchos de los casos las lisozimas de tipo I y C se encuentran localizadas en el tracto digestivo y son capaces de digerir bacterias (Fujita 2004). Por lo que creemos que lisozima de tipo I puede tener un rol importante en la función digestiva contra el hongo de *B. bassiana* tanto en hembras como en machos activando el sistema inmunológico innato. Hay muy poca información acerca de la expresión de lisozimas en cucarachas ante la presencia de microorganismos patógenos, sin embargo se sabe que las lisozimas juegan un rol importante en la inmunidad de los insectos, atacando microorganismos patógenos. Por esto, los resultados obtenidos de este proyecto de investigación pueden ayudar a entender mejor los mecanismos de resistencia de las cucarachas no solo a insecticidas químicos, sino también a biológicos.

## CONCLUSIONES

- La cepa PTG4 de *Beauveria bassiana* es un buen candidato para el biocontrol de adultos de la cucaracha *P. americana*.
- El sistema inmunológico (celular y humoral) de adultos de *P. americana* se activa ante la infección por la cepa PTG4 de *B. bassiana*.
- La expresión de *lyz I* y *lyzC2* es significativamente menor en el intestino de cucarachas machos infectados con la cepa PTG4 de *B. bassiana*.
- La expresión de *lyz I* es significativamente mayor en el intestino de cucarachas hembras infectadas con la cepa PTG4 de *B. bassiana*.

## PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar la expresión de lisozimas y péptidos antimicrobianos en los estadios de ninfas juveniles y tardías de la cucaracha urbana después de exponerlos a los conidios de la cepa PTG4 de *B. bassiana*.
- ❖ Observar las diferencias del sistema inmune de la cucaracha urbana en los diferentes estadios de ninfas y ninfas juveniles de la cucaracha urbana a diferentes horas después de haber sido expuestos a los conidios de la cepa PTG4 de *B. bassiana*
- ❖ Determinar la expresión de lisozimas y péptidos antimicrobianos en diferentes zonas del cuerpo de la cucaracha urbana (cuerpo graso, hemolinfa, intestino medios, intestino final).
- ❖ Analizar el papel de la lisozima de tipo I ante la presencia de la cepa PTG4 de *B. bassiana*
- ❖ Evaluar el péptido *periplanetasin* de la cucaracha urbana ante la exposición de la cepa PTG4 de *B. bassiana*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altunar-López, J.C. (2016). Cucarachas de importancia urbana, biología, hábitos y control. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7982>.
- Ambethgar, V. (2009). Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. *Journal of Biopesticides*, 2(2), 177-193.
- Arango Gutiérrez, G. P., & Agudelo Betancur, L. M. (2004). Valor biológico de las cucarachas en el compost. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1), 96-98.  
<http://hdl.handle.net/10567/198>
- Araújo, J. P., y Hughes, D. P. (2016). Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body?. In *Advances in genetics*. 94, 1-39. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>
- Barbara, K. A. (2008). American Cockroach, *Periplaneta americana* (Linnaeus) (Insecta: Blattodea: Blattidae). University of Florida. EENY141.  
<http://edis.ifas.ufl.edu/in298> (accesado el 25 de agosto del 2018).
- Basseri, H. R., Dadi-Khoeni, A., Bakhtiari, R., Abolhassani, M., y Hajihosseini-Baghdadabadi, R. 2016. Isolation and purification of an antibacterial protein from immune induced haemolymph of American cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10(4), 519. <http://jad.tums.ac.ir>
- Baumholtz, M. A., Parish, L. C., Witkowski, J. A. y Nutting, W. B. (1997). The medical importance of cockroaches. *International Journal of Dermatology*, 36, 90-96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.1997.00077.x>
- Beckage, N. E. (Ed.). (2011). *Insect immunology*. Chapter 2. Academic press. pp 25-30.
- Beckert, A., Wiesner, J., Baumann, A., Pöppel, A. K., Vogel, H., y Vilcinskas, A. (2015). Two c-type lysozymes boost the innate immune system of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 49(2), 303-312. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.020>
- Beckert, A., Wiesner, J., Schmidtberg, H., Lehmann, R., Baumann, A., Vogel, H., y Vilcinskas, A. (2016). Expression and characterization of a recombinant I-type

- lysozyme from the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Insect molecular biology*, 25(3), 202-215. <https://doi.org/10.1111/imb.12213>
- Bell, W. J., y Adiyodi, K. G. (Eds.). (1982). The american cockroach. Springer Science & Business Media.
- Bertino-Grimaldi, D., Medeiros, M. N., Vieira, R. P., Cardoso, A. M., Turque, A. S., Silveira, C. B., Martins, O. B., y Manchado, M. A. (2013). Bacterial community composition shifts in the gut of *Periplaneta americana* fed on different lignocellulosic materials. *SpringerPlus*, 2(1), 609. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-609>.
- Cameron, E. (1961). The cockroach (*Periplaneta americana*, L.): an introduction to entomology for students of science and medicine. Butterworth-Heinemann. Medical Books, Ltd., London. 108 p.
- Callewaert, L., y Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences*, 35(1), 127-160. DOI 10.1007/s12038-010-0015-5
- Cueto-Medina, S. M., Castillo-Martínez, A., Hernández-Rodríguez, S., Gallegos-Robles, M. Á. Sánchez-Ramos, F.J., y Ortega-Morales A. I. (2015). Presencia de *Salmonella* sp. en cucaracha americana *Periplaneta americana* L. (Blattodea: Blattidae) en Torreón, Coahuila, México. *Entomología Mexicana*. 2: 762-766.
- Damas Buenrostro, G. (2012). Aislamientos y efectividad de *Beauveria bassiana* Villemin para el control biológico de la cucaracha urbana *Periplaneta americana* L. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. México.
- Domínguez, R. R. (1994). Taxonomía I, protura a homóptera, claves y diagnosis. UACH Parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp. 138-143.
- Dubovskiy, I. M., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., y Ratcliffe, N. A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 13. <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ428.pdf>
- Dunn, P. E. (1986). Biochemical aspects of insect immunology. *Annual review of entomology*, 31, 321-339. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.31.010186.001541>.
- Ebrahimi, L., Shiri, M., y Dunphy, G. B. (2018). Effect of entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, on survival and plasma phenoloxidase activity of *Helicoverpa armigera* (Hb) (Lepidoptera: Noctuidae) in laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1). DOI [10.1186/s41938-017-0016-x](https://doi.org/10.1186/s41938-017-0016-x)

- Fakoorziba, M. R., Eghbal, F., Hassanzadeh, J., y Moemenbellah-Fard, M. D. (2010). Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential vectors of the pathogenic bacteria found in nosocomial infections. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 104(6), 521-528. <https://doi.org/10.1179/136485910X12786389891326>
- Fathpour, H., Emtiazi, G., y Ghasemi, E. (2003). Cockroaches as reservoirs and vectors of drug resistant *Salmonella* spp. *Iranian Biomedical Journal*, 7(1), 35-38.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., y Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3-34. DOI: [10.1080/09583159409355309](https://doi.org/10.1080/09583159409355309)
- Fisher, C. W., y Brady, U. E. (1983). Activation, properties and collection of haemolymph phenoloxidase of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 75(1), 111-114. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(83\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0742-8413(83)90018-X)
- Fujita, A. I. (2004). Lysozymes in insects: what role do they play in nitrogen metabolism?. *Physiological Entomology*, 29(4), 305-310. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00393.x>
- García, F., Notario, M. J., Cabanás, J. M., Jordano, R., y Medina, L. M. (2012). Incidence of bacteria of public health interest carried by cockroaches in different food-related environments. *Journal of Medical Entomology*, 49(3), 1481-1484. <https://doi.org/10.1603/ME12007>
- Giglio, A., Brandmayr, P., Giulianini, P. G., Cavaliere, F., Trapani, M. R., Parisi, M. G., y Cammarata, M. (2017). Gender-related variations in hemolymph parameters of *Carabus lefebvrei* (Coleoptera: Carabidae): HPLC analysis and phenoloxidase activity. *Invertebrate Survival Journal*, 14, 165-173.
- Gunnarsson, S. G. S., y Lackie, A. M. (1985). Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 46(3), 312-319. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(85\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90074-6)
- Grandcolas, P. (1996). The phylogeny of cockroach families: a cladistic appraisal of morpho-anatomical data. *Canadian Journal of Zoology*, 74(3), 508-527. <https://doi.org/10.1139/z96-059>

- Harris, M. (1776). An exposition of English insects: with curious observations and remarks, wherein each insect is particularly described; its parts and properties considered; the different sexes distinguished, and the natural history faithfully related. Robson Dilly, London. (pp. 1-40).
- Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 102-118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Hubner-Campos, R. F., Leles, R. N., Rodrigues, J., y Luz, C. (2013). Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. *Parasitology International*, 62(6), 517-521. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.07.013>
- Hung, S. Y., & Boucias, D. G. (1992). Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(2), 152-158. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90089-M](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90089-M)
- Hung, S. Y., y Boucias, D. G. (1996). Phenoloxidase activity in hemolymph of naive and *Beauveria bassiana*-infected *Spodoptera exigua* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(1), 35-40. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0006>
- Imler, J. L., y Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. In *Mechanisms of epithelial defense* (Vol. 86, pp. 1-21). Karger Publishers. <https://doi.org/10.1159/000086648>.
- Kim, I. W., Lee, J. H., Subramaniam, S., Yun, E. Y., Kim, I., Park, J., & Hwang, J. S. (2016). De novo transcriptome analysis and detection of antimicrobial peptides of the American cockroach *Periplaneta americana* (Linnaeus). *PloS One*, 11(5), e0155304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155304>
- Kong, H., Lv, M., Mao, N., Wang, C., Cheng, Y., Zhang, L., Jiang, X. y Luo, L. (2016). Molecular characterization of a lysozyme gene and its altered expression profile in crowded beet webworm (*Loxostege sticticalis*). *PloS One*, 11(8), e0161384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161384>
- Khosravi, R., Sendi, J. J., Brayner, F. A., Alves, L. C., y Feitosa, A. P. S. (2016). Hemocytes of the rose sawfly *Arge ochropus* (Gmelin) (Hymenoptera: Argidae). *Neotropical Entomology*, 45, 58-65. DOI 10.1007/s13744-015-0339-9.
- Lackie, A. M., Takle, G., y Tetley, L. (1985). Haemocytic encapsulation in the locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) and in the cockroach *Periplaneta americana* (Dictyoptera). *Cell and Tissue Research*, 240(2), 343-351.

- Latifi, M., Alikhani, M. Y., Salehzadeh, A., Nazari, M., Bandani, A. R., y Zahirnia, A. H. (2015). The antibacterial effect of American cockroach hemolymph on the nosocomial pathogenic bacteria. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 2(1). DOI: [10.17795/ajcmi-23017](https://doi.org/10.17795/ajcmi-23017)
- Lavine, M. D., y Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Lee, M. F., Song, P. P., Hwang, G. Y., Lin, S. J., y Chen, Y. H. (2012). Sensitization to Per a 2 of the American cockroach correlates with more clinical severity among airway allergic patients in Taiwan. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 108(4), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.01.014>
- Li, B., Calvo, E., Marinotti, O., James, A. A., y Paskewitz, S. M. (2005). Characterization of the c-type lysozyme gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene*, 360(2), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.001>
- Maketon, M., Hominchan, A., y Hotaka, D. 2010. Control of American cockroach (*Periplaneta americana*) and German cockroach (*Blattella germanica*) by entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomología*, 36, 249-253.
- Mastore, M., Arizza, V., Manachini, B., y Brivio, M. F. (2015). Modulation of immune responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Insecta: Coleoptera) induced by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida). *Insect Science*, 22(6), 748-760. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12141>
- Mudoi, A., Das, P., y Hazarika, L. K. (2018). *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains pathogenic to *Periplaneta americana* (L.). *JEZS* 2018; 6(2), 903-907. <http://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartL/6-1-89-394.pdf>
- Mudoi, A., Das, P., & Hazarika, L. K. (2017). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (KR855715) against *Periplaneta americana* (L.). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 1516-1519.
- Murali-Mohan Ch., Aruna-Lakshmiy K., y K. Uma-Devi. (1999). Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 29-33. <https://doi.org/10.1080/09583159929884>

- Ortiz-Urquiza, A., y Keyhani, N. O. (2016). Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects. In *Advances in Genetics*, 94, 165-249.  
<https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>
- Ogg, C., Ferraro, D., y Jefferson, D. (2007). Manual para el Control de Cucarachas. University of Nebraska–Lincoln Extension in Lancaster County 1444 Cherrycreek Rd, Suite A1 Lincoln, NE, 68528. United States of America.
- Pai, H. H., Chen, W. C., y Peng, C. F. (2005). Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household *cockroaches* (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*). *Acta Tropica*, 93(3), 259-265.
- Pathan, A. A. K., Devi, K. U., Vogel, H., y Reineke, A. (2007). Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. *Fungal Genetics and Biology*, 44(12), 1231-1241.
- Pech, L. L., y Strand, M. R. (2000). Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology*, 46(12), 1565-1573. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00083-4).
- Quesada-Moraga, E., Santos-Quiros, R., Valverde-Garcia, P., y Santiago-Alvarez, C. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(1), 51-58.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.07.002>
- Řeřicha, M., Dobeř, P., Hyršl, P., y Knapp, M. (2018). Ontogeny of protein concentration, haemocyte concentration and antimicrobial activity against *Escherichia coli* in haemolymph of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Physiological Entomology*, 43(1), 51-59.  
<https://doi.org/10.1111/phen.12224>
- Salehzadeh, A., P. Tavacol y H. Mahjub. (2007). Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*. 44:105–110
- Sang, Y., y Blecha, F. (2008). Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, 9(2), 227-235.  
<https://doi.org/10.1017/S1466252308001497>

- Söderhäll, K., y Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10, 23-28.  
[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)
- Smith, H.E., y C.R. Whitman. (1992). Cockroaches. NPCA Field Guide to Structural Pest. National pest control association inc. Guardians of your environment. 890 p.
- Stanilova, S. (2017). ¿Qué es la hemolinfa? Composición y funciones de la hemolinfa. Caracolchanning. <https://es.carolchanning.net/obrazovanie/81435-cto-takoe-gemolimfa-sostav-i-funkcii-gemolimfy.html>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-1  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Tamez-Guerra, P., Valadez-Lira, J. A., Alcocer-González, J. M., Oppert, B., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., y Rodríguez-Padilla, C. (2008). Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusiani* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2): 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.008>
- Triplehorn, C. A., y Johnson, N. F. (2005). Borror and delong's introduction to the study of insects. Brooks. *Cole, Belmont, California, USA*.
- Valadez-Lira, J.A., Alcocer-Gonzalez, J.M., Damas, G., Nuñez-Mejía, G., Oppert, B., Rodríguez-Padilla, C., y Tamez-Guerra, P. 2012. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of insect science*, 12(1), 80.  
<https://doi.org/10.1673/031.012.8001>
- Valero-Jiménez, C. A., Faino, L., Spring, D., Smit, S., Zwaan, B. J., y van Kan, J. A. (2016). Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes. *BMC Genomics*, 17(1), 986.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3339-1>
- Vargas-Albores, F., y Ortega-Rubio, A. (1994). El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y Posgrado*, 4, 21-28.
- Vogelweith, F., Körner, M., Foitzik, S., y Meunier, J. (2017). Age, pathogen exposure, but not maternal care shape offspring immunity in an insect with facultative family life. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 69.  
<https://doi.org/10.1186/s12862-017-0926-y>
- Wang, D., Wang, Y., Zhang, X., Liu, H., y Xin, Z. (2016). Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* bait against two cockroach species

- (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) in Jinan City, East China. *Biocontrol Science and Technology*, 26(12), 1683-1690.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1234030>
- Wang, Z. Z., Zhan, L. Q., y Chen, X. X. (2018). Two types of lysozymes from the whitefly *Bemisia tabaci*: Molecular characterization and functional diversification. *Developmental & Comparative Immunology*, 81, 252-261.  
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.012>
- Waterhouse, R.M., Kriventseva, E.V., Meister, S., Xi, Z., Alvarez, K.S., et al. (2007) Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316, 1738–1743. DOI: 10.1126/science.1139862
- Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., ... y Feng, M. G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2, 483. DOI: 10.1038/srep00483
- Yun, J., Hwang, J. S., y Lee, D. G. (2017). The antifungal activity of the peptide, periplanetasin-2, derived from American cockroach *Periplaneta americana*. *Biochemical Journal*, 474(17), 3027-3043. DOI: 10.1042/BCJ20170461
- Zhang, J. H., Zhang, S., Yang, Y. X., Zhang, Y. X., y Liu, Z. W. (2017). The new insight into foregut functions of xenobiotic detoxification in the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12486>
- Zhang, X., Feng, Y., Ding, W. F., Li, X., y Xie, S. C. (2018). Establishment of an embryonic cell line from the American cockroach *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) and a preliminary study of telomerase activity changes during the culturing process. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 54(2), 129-135. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0223-5>.
- Zarchi, A. A. K. y H. Vatani. (2008). A survey on species and prevalence rate of bacterial agents isolated from cockroaches in three hospitals. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9,197-200. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0230>.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. na. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553-596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>
- Zukowski, K. y C. Bajan. (1997). Laboratory determination of the activity of insecticidal fungus *Paecilomyces farinosus* in reducing the numbers of cockroaches *Blattella germanica* L. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 48(2), 133-138. (PMID:9381075).

## **RESUMEN BIBLIOGRÁFICO**

**Patricia Maria Calleja Garcia**

**Candidato para el Grado de**

**Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología**

**Tesis: EFECTO DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VILLEMIN SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS DE LA CUCARACHA *Periplaneta americana* L.**

**Campo de estudio: Ciencias Biológicas**

**Datos Personales: Nacida en Navojoa, Sonora el 19 de Diciembre de 1991, hija de Jesús Rodolfo Calleja Zavala y Blanca Andrea Garcia Vallejo.**

**Educación: Egresada de la Universidad de Sonora, grado obtenido Químico Biólogo Clínico desde 2015.**

**Experiencia profesional: Becaria del laboratorio de Microbiología e Inmunología con el proyecto “Detección de virus entéricos causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años” en el período 2014-2015**

**Presentación en Congreso: Calleja-Garcia, P.M., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Barrón, González, P., Villarreal-Treviño, L., Valadez-Lira, J. A., y González-Ochoa, G. 2018. Efecto de *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin sobre parámetros inmunológicos de la cucaracha *Periplaneta americana* L. VII Simposio Nacional de Biomedicina y Salud. Universidad de Sonora. 24-26 Oct., Navojoa, Sonora.**