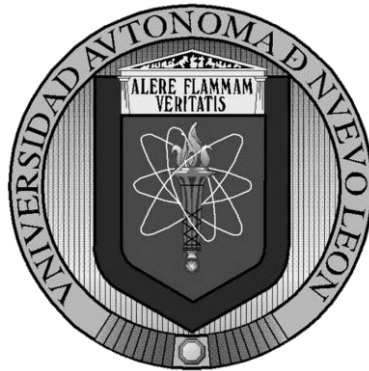


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA INMUNE DE  
*Trichoplusia ni* A BAJAS CONCENTRACIONES DE *AcMNPV*

Por

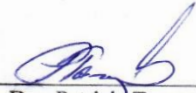
ALONSO ALBERTO OROZCO FLORES

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Agosto, 2019

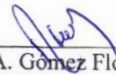
EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA INMUNE DE  
*Trichoplusia ni* A BAJAS CONCENTRACIONES DE AcMNPV

Comité de Tesis



---

Dra. Patricia Tamez Guerra  
Director




---

Dr. Ricardo A. Gómez Flores  
Secretario



---

Dra. María Julissa Ek Ramos  
Vocal



---

Dra. Diana Elia Caballero Hernández  
Vocal



---

Dr. José Alberto Valadéz Lira  
Vocal



---

Dr. Trevor Williams  
Director Externo

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a mis padres: Andrés Arturo Orozco González y Martha Alicia Flores Rocha, que siempre me han apoyado, tanto en el ámbito personal como profesional; además siempre me han enseñado mucho, siendo un ejemplo moral, de trabajo y de vida. Así mismo, hacer un reconocimiento al resto de mi familia con la que siempre he contado.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra, por su constante apoyo e invaluable enseñanzas que hicieron posible la realización de esta tesis, siempre de manera objetiva, siempre un modelo a seguir.

Agradesco también mi comité de tesis Doc. Ricardo Gómez Flores, Dr. José Alberto Valadez Lira, Dra. Diana Caballero Hernández, Dra. Julisa Ek Ramos, por sus enseñanzas y amistad, También, especialmente agradezco al Doc. Trevor Williams por su puntual y objetiva revisión del proyecto.

Por otra parte agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

También un personal agradecimiento por el apoyo brindado por mis compañeros de laboratorio, así como los alumnos que me asistieron en diversas etapas del desarrollo de este proyecto.

Finalmente y no menos importante, agradezco a mis amigos nuevos y viejos por todas esas horas de sana recreación.

## **DEDICATORIAS**

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES .....	3
1.1 El efecto del cambio climático en insectos .....	3
1.2 Inmunidad en insectos .....	3
1.3 Inmunidad y temperatura.....	4
1.3. <i>Trichoplusia ni</i> .....	6
1.4 Los baculovirus .....	7
1.5 Respuesta inmune a baculovirus .....	9
1.6 Baculovirus y temperatura.....	9
2. JUSTIFICACIÓN .....	11
3. HIPÓTESIS .....	12
4. OBJETIVOS DEL TRABAJO .....	12
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
5.1 Cría de insectos .....	13
5.2 Selección de concentración de <i>AcMNPV</i> .....	13
5.3 Efecto de la temperatura en la respuesta inmune a <i>AcMNPV</i> .....	14
5.4 Efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional a <i>AcMNPV</i> .....	17
5.5 Análisis estadísticos .....	19
6. RESULTADOS .....	20
6.1 Detección de NPVs de la cría de <i>T. ni</i> .....	20
6.2 Selección de concentración de inóculo de <i>AcMNPV</i> .....	20

6.3 Efecto de la temperatura en la respuesta inmune a <i>AcMNPV</i> .....	20
6.4 Efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional a <i>AcMNPV</i> .....	26
7. DISCUSIÓN .....	31
8. CONCLUSIONES .....	40
10. BIBLIOGRAFÍA .....	42
10 ANEXOS .....	51
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos de péptidos antimicrobiales de <i>Trichoplusia ni</i> en sentido 5' a 3' en orden en sentido delantero, sonda y reverso.....	16
Tabla 2. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de los cambios de la temperatura en respuesta inmune de <i>Trichoplusia ni</i> a AcMNPV .....	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efecto de la temperatura en la actividad fenol oxidasa inducida por <i>AcMNPV</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> Efecto de la temperatura en el número de hemocitos totales en infecciones con <i>AcMNPV</i> .....	22
<b>Figura 3.</b> Efecto de la temperatura en el número de los diferentes tipos de hemocitos en infecciones con <i>AcMNPV</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Efecto del aumento de temperatura a 37°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune, en comparación a 27°C. ....	24
<b>Figura 5.</b> Efecto de la infección con <i>AcMNPV</i> a 27°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune en comparación a larvas sanas.....	24
<b>Figura 6.</b> Efecto de la infección con <i>AcMNPV</i> a 37°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune, en comparación a larvas infectadas a 27°C.....	25
<b>Figura 7.</b> Efecto de la infección con <i>AcMNPV</i> a 37°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune en comparación a larvas sanas incubadas a 37°C ...	26
<b>Figura 8.</b> Efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional a <i>AcMNPV</i> .....	27
<b>Figura 9.</b> Susceptibilidad transgeneracional a <i>AcMNPV</i> en las diferentes temperaturas evaluadas.....	27
<b>Figura 10.</b> Efecto de la temperatura en la actividad fenol oxidasa transgeneracional a <i>AcMNPV</i> .....	28
<b>Figura 11.</b> Actividad fenol oxidasa transgeneracional en respuesta a <i>AcMNPV</i> en las diferentes temperaturas evaluadas.....	29
<b>Figura 12.</b> Efecto de los cambios de temperatura en la actividad fenol oxidasa.. ....	30



## RESUMEN

Uno de los factores que controlan las poblaciones de insectos es la relación huésped-patógeno, al ser organismos poiquiloterms los cambios de temperatura son determinantes en la defensa a patógenos. Las variaciones en la respuesta inmune de insectos se han vuelto doblemente importantes al verse afectada por el cambio climático. Es poco lo que se sabe sobre cómo la temperatura perturba la respuesta inmune de insectos a las infecciones por los nucleopoliedrovirus (NPVs); por lo cual, se evaluó la respuesta inmune de *Trichoplusia ni* en estado larvario a concentraciones bajas de *AcMNPV* a 27°C que presentan una mortalidad del 24%, comparado con temperaturas de 32-37°C con mortalidades de 41-48%, respectivamente. Este aumento de mortalidad concuerda con la disminución de la inmunocompetencia, al tener un menor número de hemocitos oenocitoides y por ende la actividad fenol oxidasa. A pesar de que a temperaturas por encima de 27°C aumento la expresión del péptido antivírico *gloverina* de (334 veces), dicha expresión génica disminuyó 70% en larvas inoculadas con *AcMNPV* a 37°C. De manera transgeneracional, las larvas F2 expuestas al virus (descendencia de la F1 inoculadas a la CL<sub>25</sub>) tuvieron una mortalidad casi nula a 27°C, comparado con 33% a 37°C. Con base en los resultados, se observó una mayor efectividad de los NPVs como agentes de control biológico al aumentar la temperatura; sin embargo, este efecto puede ser perjudicial en especies que no representan un riesgo agrícola, por las implicaciones ecológicas resultantes.

## ABSTRACT

One of the control insect population factors is represented by the host-pathogen relationship, since the temperature changes in poikilothermic organisms are determinants in their pathogens' defense. Insect' immune response variations have become critical, since it may be affected by climate changes. There is scarce information on how temperature alters insects immune response after nucleopolyhedrovirus (NPVs) infections; therefore, the immune response of *Trichoplusia ni* larvae was evaluated after being exposed to low concentrations of AcMNPV at 27°C, which resulted in 24% mortality, compared with temperatures of 32-37°C, which caused 41-48% mortality, respectively. This mortality increase was associated with decreasing immunocompetence, represented by lower oocytoid hemocytes number, which is related to phenol oxidase activity reduction. Although at temperatures above 27°C, an increase of 334 times of the antiviral peptide *gloverin* expression was detected, this gene expression decreased 70% in larvae exposed to AcMNPV kept at 37°C. Transgenerational study showed that F2 larvae (F1 offspring exposed to CL<sub>25</sub>) exposed to the virus at 27°C, had almost no mortality, compared with 33% mortality at 37°C. Based on these results, it was concluded that NPVs are more effective as biological control agents at temperatures higher than 27°C. However, this effect can be harmful among species that do not represent a crops risk, where the lasting ecological implications are unknown.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los cambios en temperatura son determinantes en la evasión de patógenos por parte del hospedero (Silva y Elliot, 2016; Wojda, 2017); sin embargo, en contraste con los mamíferos que mantienen una temperatura constante (organismos homeotermos), los insectos carecen de dicha regulación de temperatura (organismos poiquilotermos), por lo cual puede oscilar en cada momento (Catalán *et al.*, 2012; Mandrioli, 2012; Murdock *et al.*, 2012). Recientemente se ha prestado interés al efecto de la temperatura en la inmunidad de insectos, al considerarse uno de los factores afectados en los seres vivos por el cambio climático que se está desarrollando en las últimas décadas (Ferguson *et al.*, 2016; Gherlenda *et al.*, 2016; Silva y Elliot, 2016; Ferguson *et al.*, 2018; Mastore *et al.*, 2019).

La importancia ecológica de los insectos es inconmensurable desde el punto de vista ambiental, así como en el desarrollo de las actividades humanas. Diferentes clases de insectos tienen papeles ecológicos vitales, como por ejemplo la polinización y por ende la fertilización de plantas, al igual que el mantener distintas poblaciones al ser parte fundamental de las cadenas tróficas. Sin embargo, algunas especies ocasionan daños a la salud humana al ser vectores de enfermedades, o generan pérdidas en la producción agrícola y de granos almacenados por insectos considerados plaga, además de daños y deterioro de materiales como madera y celulosa entre otros, cuando los insectos se establecen y/o se alimentan.

Dentro de los factores que controlan dichas poblaciones (insectos vectores de agentes infecciosos o insectos plaga), está la relación huésped-patógeno, que puede darse de manera natural o de forma inducida al emplearse entomopatógenos como bioinsecticidas (Senthil-Nathan, 2015). Hablando específicamente de lepidópteros plaga, las fluctuaciones entre sus poblaciones se asocian con epizootias de enfermedades virales durante periodos de alta densidad poblacional (Kukan y Myers, 1999).

Uno de los principales entomopatógenos de lepidópteros que se encuentran en la naturaleza son los baculovirus; su ciclo inicia cuando la larva se alimenta de material contaminado con cuerpos de oclusión (CO), estructuras proteicas que contienen a las partículas virales. Posteriormente, las proteasas y el pH alcalino del intestino degradan los CO, liberando las partículas virales, las cuales pasan a través de la membrana

peritrófica del intestino. Los viriones se fusionan con la membrana plasmática de las células cilíndricas del intestino medio, después el ADN contenido en la cápside se dirige hacia el núcleo de la célula infectada para iniciar la replicación. En lepidópteros, la infección se esparce hacia otros tejidos, los cuales se convertirán en millones de CO, mismos que al morir la larva, serán liberados en el ambiente para continuar con otro ciclo infectivo (Cory y Myers, 2003; Clem y Passarelli, 2013).

La respuesta inmune (RI) de los insectos a los baculovirus produce un costo fisiológico a expensas del desarrollo. En adultos, dicho costo reduce su tamaño, fertilidad, viabilidad de los huevecillos y vigor (Cory y Myers, 2003).

Por otro lado, el aumento de la temperatura resulta en mayores tasas de alimentación (incluyendo mayor consumo del virus al estar en su alimento) y disminución de los tiempos de desarrollo (Elder y Reilly 2014). Este acortamiento del ciclo de vida puede generar un incremento en su resistencia a patógenos, por lo que se incrementarían las poblaciones de insectos plaga, así como la de insectos vectores de enfermedades de humanos y animales (Suwanchaichinda y Paskewitz, 1998; Schwartz y Koella, 2004).

Si bien es cierto que la mayoría de los baculovirus son altamente específicos a un hospedero, existen algunas excepciones; por ejemplo, el nucleopolihedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) puede infectar a 39 especies de larvas de lepidópteros, pertenecientes a 13 familias; por lo mismo se ha estudiado extensivamente su potencial como agente de biocontrol de plagas agrícolas (Harrison, 2009).

*Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), comúnmente conocido como gusano falso medidor, es un insecto plaga cosmopolita, afectando cultivos de hortalizas y cucurbitáceas, resaltando como plaga principal de la col-repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), pero puede causar daños a 119 especies de plantas de 29 diferentes familias (Janmaat y Myers, 2005). Presenta características de estrategia poblacional “*r*”, es decir, muestra altas tasas de reproducción, tiempos de generación cortos y capacidad de alimentarse de una gran variedad de plantas hospederas (Ehler y Miller, 1978).

Por esto, este estudio se enfocó en evaluar el efecto de diferentes temperaturas en la respuesta inmune humoral y celular de larvas de *T. ni*, en su interacción virus-hospedero, ya que este insecto se ha usado como modelo de infección de AcMNPV tanto a nivel orgánico como celular, por su alta permisibilidad (Chen *et al.*, 2014).

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 El efecto del cambio climático en insectos

Las predicciones del efecto biológico del calentamiento global que se ha experimentado durante las últimas décadas, se pueden separar en cuatro partes: efectos fisiológicos, distribución de especies, cambios fenológicos y efectos adaptativos (Mattson y Haack, 1987; Hughes, 2000; Lauber y Darvas, 2009). Para organismos poiquiloterms como los insectos, la temperatura ambiental afecta marcadamente el potencial de las reacciones bioquímicas importantes para su fisiología. Al tener un ciclo de vida tan corto, inclusive el efecto de un solo cambio prolongado de temperatura, puede tener un impacto considerable en dichas poblaciones (Adamo y Lovett, 2011). Dentro los límites fisiológicos de las temperaturas cardinales, a mayor temperatura se produce una mayor actividad metabólica, mayor tasa de crecimiento y mayor capacidad reproductiva (Frazier *et al.*, 2006). Aun así, la temperatura que genera el mayor número de ciclos de vida (temperatura óptima), es mayor a la temperatura en la que se distribuyen los insectos (Deutsch *et al.*, 2008).

Entre los efectos de un aumento de la temperatura, se podría incluir un incremento en la densidad poblacional de insectos, lo que conllevaría a una mayor incidencia de enfermedades transmitidas por insectos y mayores pérdidas agrícolas por insectos plaga (Adamo y Lovett, 2011). No obstante, también se sabe que inclusive en las mejores condiciones, los procesos reproductivos suceden a expensas del sistema inmune (Lawniczak *et al.*, 2007).

## 1.2 Inmunidad en insectos

Las distinciones entre la RI en insectos y mamíferos son considerables, ya que los insectos carecen de un sistema adaptativo, no tienen anticuerpos ni células T, como ocurren en los vertebrados (Schmidt *et al.*, 2008); pero se sabe que las generaciones sobrevivientes a las infecciones de patógenos pueden mejorar su respuesta a una

segunda infección o transferir su estimulación inmunológica a la siguiente generación (*immune priming*) (Contreras- Garduño *et al.*, 2016).

La primera barrera para la entrada de microorganismos y agentes externos (que causen lesiones por penetración física o daño del integumento), son las características físicas y químicas de la cutícula, que evitan la entrada de microorganismos; seguido de una respuesta del sistema inmune que está constituido por proteínas receptoras, las cuales reconocen patrones moleculares de todo tipo de invasor ajeno.

Además de la respuesta humoral, constituida por la expresión de péptidos antimicrobianos (PAMs) en el cuerpo gordo y células del intestino, en *T. ni* los PAMs más importantes que se han reportado y determinado su función en la defensa contra patógenos son: atacina (antibacteriano y antiviral), cecropina (antibacteriano, antiviral), defensina (antibacteriano), gloverina (antibacteriano, antiviral), gallerimicina (antifúngico), lebocina (antifúngico), y lisozima (antibacteriano) (Freitag *et al.*, 2007), así como cascadas enzimáticas de coagulación o melanización de la hemolinfa mediante la activación de la fenol oxidasa (PO por sus siglas en inglés); y una respuesta celular mediada por diferentes clases de hemocitos encargados de la fagocitosis, nodulación o encapsulación de los agentes invasores (Tsakas y Marmaras, 2010).

Entre los lepidópteros, los hemocitos adhesivos más abundantes son los granulocitos, los cuales se distinguen por su morfología granular, se esparcen de manera simétrica, tienen capacidad de fagocitosis, reconocen y se adhieren a superficies extrañas. Entre ellos, los plasmotocitos son alargados, asimétricos y se adhieren a superficies extrañas, por lo cual se les considera hemocitos formadores de cápsula. Entre los hemocitos no adhesivos están los oenocitoides, quienes contienen todos los componentes de la cascada enzimática de coagulación y melanización; y los esferocitos que son una fuente de transporte de componentes cuticulares (Strand, 2008).

### **1.3 Inmunidad y temperatura**

El efecto biológico del calentamiento global ha generado interés en el estudio de la respuesta inmune de insectos. El aumento en la inmunidad de vectores de enfermedades

y plagas agrícolas por la temperatura representa un desafío al control biológico (Catalán *et al.*, 2012; Mandrioli, 2012). Dichos efectos varían entre los diferentes órdenes de insectos. En el díptero *Anopheles stephensi* (Liston), vector de malaria, Murdock *et al.* (2012) observaron un aumento en los transcritos de la *óxido nítrico sintetasa* a 30°C, y una disminución de *cecropina* y *defensina*; mientras que en ortópteros, Adamo y Lovett (2011) reportaron un aumento en la actividad PO y en la expresión de lisozima en *Gryllus texensis* (Cade & Otte), a 5°C por encima de la temperatura ambiental, lo que generó un aumento en la resistencia a bacterias Gram negativas, mas no a Gram positivas.

En el chapulín *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt), el aumento de la temperatura bajó la infección de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Metarhizium acridum* (anteriormente denominada como *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) (Metchnikoff) Sorokin. Este fenómeno se adjudicó principalmente a la sensibilidad del patógeno a la temperatura, más que a un efecto indirecto de la respuesta inmune del huésped (Springate y Matthew, 2005).

En coleópteros, Catalán *et al.* (2012) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y la tasa metabólica con respecto a la RI de *Tenebrio molitor* L. En 2014, Browne *et al.* reportaron resultados contrastantes, ya que a temperaturas de 37°C en larvas de *Galleria mellonella* L., se incrementó la inmunidad celular al aumentar la densidad de los hemocitos, pero mediante geles de doble dimensión, reportaron una sobreexpresión de apoliporina, actividad PO, PAMs y otras proteínas relacionadas con la inmunidad. Dicho efecto se mantuvo después de 24 horas del aumento de temperatura. En 2016, Kryukov *et al.* encontraron que, a 34°C, *G. mellonella* requirió una dosis 10 veces mayor de conidios de *Metarhizium robertsii* (J.F. Bisch.) para alcanzar una mortalidad equivalente a la observada a 24°C. Sin embargo, en la mariposa tropical *Bicyclus anynana* (Butler), el calor aumentó la grasa corporal y el peso, mientras que la RI disminuyó, con una menor actividad PO y un conteo inferior de hemocitos (Karl *et al.*, 2011).

En 2016, Garrad *et al.* reportaron que a temperaturas subóptimas, se requieren mayores recursos alimenticios durante el desarrollo, y que el aumento de las temperaturas ambientales que se pronostican en las próximas décadas podrían potenciar

la fecundidad de *Plutella xylostella* L., lo que aumenta la probabilidad de supervivencia en el invierno y conduce a una expansión más flexible de sus poblaciones. Alternativamente, los huéspedes pueden usar la temperatura para su ventaja, empleando termorregulación conductual para inducir una fiebre que restringe el crecimiento de patógenos (Elliot *et al.*, 2002).

### 1.3. *Trichoplusia ni*

*T. ni*, conocido comúnmente como gusano falso medidor, se distribuye en casi todo el mundo afectando cultivos de hortalizas y cucurbitáceas, se considera la plaga principal del repollo. Los huevos son de color perlado o blanco verdoso, tienen un diámetro de unos 0.6 mm y eclosionan de 2 a 3 días a 29°C, son puestos de forma aislada en pequeños grupos. El desarrollo larvario es de 18 a 25 días a temperaturas entre 21 y 32°C, no tolera temporadas prolongadas de frío; tiene normalmente cinco estadios, en los primeros tres suele estar en el envés de las hojas, dejando el haz intacto; en el cuarto y quinto estadio defolia las hojas, generando grandes agujeros, consumen hasta tres veces su masa corporal de alimento al día.

Durante su última fase larval, la oruga teje en el envés de las hojas o en los residuos vegetales, un capullo frágil de hilos blancos que protegerán la crisálida de un color verde amarillento que se torna castaño cuando envejece, la pupa demora de 4 a 7 días, aunque es capaz de permanecer tiempos considerablemente más largos en esta forma. El adulto mide aproximadamente 2 cm de largo y tienen un rango de vuelo de unos 200 km, llega a vivir de 10 a 12 días, período en el cual las hembras ponen de 300 a 500 huevos, así que al menos una generación por mes puede ser completada exitosamente bajo condiciones climáticas favorables; en campo, dependiendo del clima puede tener de 2 a 7 de ciclos de vida al año (Toba *et al.*, 1973). Al ser un insecto susceptible a diferentes entomopatógenos se ha utilizado como modelo para entender la resistencia de lepidópteros a la actividad insecticida de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Tiewsiri y Wang, 2011), al igual que para entender del ciclo infectivo de los baculovirus (Chen *et al.*, 2018; Koczka *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018). En 1973, Toba *et al.* reportaron el efecto de la temperatura en el ciclo de vida de *T. ni*,



considerando como temperatura óptima la de 26.7°C, ya que a 32.2°C el desarrollo fue similar, pero se documentó un menor número de eventos de apareamiento y fecundidad en los adultos; a partir de los 35°C hubo poco desarrollo y los pocos insectos que alcanzaron el estado adulto presentaron deformidades.

#### **1.4 Los baculovirus**

La familia Baculoviridae es una familia grande y diversa de virus ocluidos de ADN de doble cadena, los cuales infectan a más de 600 hospederos, principalmente lepidópteros, himenópteros y dípteros. Los virus del género *Alphabaculovirus* forman CO poliédricos que contienen muchos viriones de forma bacilar, por su tamaño (1-15 µm), los CO son fácilmente visibles en el microscopio óptico, lo que permite que se usen como unidad de virulencia (Eberle *et al.*, 2012; Jehle *et al.*, 2006). Los NPVs pueden considerarse como simples (SNPV) o múltiples (MNPV), dependiendo del número de nucleocápsides contenidas en una sola envoltura. Las nucleocápsides tienen un tamaño variable de 30 a 60 nm de ancho y 250–300 nm de longitud. La mayoría de los baculovirus forman dos tipos de partículas virales infecciosas, virus de brotación (VB) y virus derivados de la oclusión (VDO). En el intestino de los lepidópteros, los cuerpos de oclusión se disuelven por el pH alcalino y se liberan los VDO, los cuales atraviesan la membrana peritrófica del intestino la cual protege el intestino medio (Williams *et al.*, 2017). Varias proteínas víricas son requeridas para la infección vía oral, los factores de infectividad *per os*, están compuestos por las proteínas PIF0, PIF1, PIF2, PIF3, PIF4, PIF5 y PIF6 componentes de la envoltura de los VDO, están involucrados en la unión a receptores, en cierto grado muchas de estas proteínas son las que le dan la especificidad al hospedero (Song *et al.*, 2016). Una vez dentro, la nucleocápside se transporta a poros nucleares, se desprenden de la cápside y comienza la transcripción de los genes víricos, así como la generación de nueva progenie viral y la producción de alteraciones de las funciones fisiológicas del insecto para facilitar el desarrollo de la infección en el hospedero (Javed *et al.*, 2017; Jakubowska *et al.*, 2013; Salem *et al.*, 2011).

Las nucleocápsides formadas son transportadas hasta la membrana celular, de donde brotan adquiriendo una envoltura de dicha membrana para formar los viriones brotados.

Estos circulan a través de la hemolinfa diseminando la infección a los demás tejidos y órganos susceptibles como los hemocitos, el cuerpo graso y la tráquea, entre otros, proceso conocido como infección secundaria (Rohrmann, 2013a).

En el núcleo de estas células se lleva a cabo la replicación y transcripción viral y se ensamblan las nuevas nucleocápsides. En los estados más tardíos de la infección, las nucleocápsides son ocluidas en la matriz proteica de poliedrina o granulina, para formar los CO y ocasionar la muerte de la larva. Los CO pueden ser liberados al ambiente por la licuefacción de la larva infectada para comenzar un nuevo ciclo de infección (Slavicek, 2012).

Los insectos que sobreviven a dichas infecciones pueden presentar del 15 al 100% de una infección subletal en adultos, la cual puede mantenerse al menos durante 5 generaciones en *Spodoptera exigua* (Hübner) afectando su capacidad reproductiva y de desarrollo, así como aumentando la susceptibilidad a aislados del mismo NPV (Sparks *et al.*, 2008; Cabodevilla *et al.*, 2011).

#### 1.4.1 Nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica*

El nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) fue descrito en 1970, del lepidóptero *A. californica* (Speyer) (Vail *et al.*, 1971). Puede infectar a 39 especies de larvas de lepidópteros, pertenecientes a 13 familias y replicarse en sus líneas celulares derivadas (Harrison, 2009). Tiene un genoma circular de 133.9 kb y contiene 156 marcos abiertos de lectura (Rohrmann, 2013c).

AcMNPV es el baculovirus más estudiado, la publicación de la secuencia del genoma de AcMNPV proporcionó la base para comprender la diversidad de baculovirus (Ayres *et al.*, 1994). Se han realizado estudios de eliminación o mutación de genes para dilucidar su función, y se ha utilizado como vector de expresión en múltiples sistemas, AcMNPV es capaz de ingresar en células de mamífero, pero no replicarse en ellas, lo que confirma la seguridad de este baculovirus para ser utilizados como vector viral (Liang *et al.*, 2004), bioplaguicida (Haase *et al.*, 2015) e incluso como vector para terapia génica somática (Kwang *et al.*, 2016).

Como ya se mencionó, los promotores de las proteínas no esenciales poliedrina y P10 se aprovechan de estos nucleopoliedrovirus para regular la expresión del gen de interés (Hu, 2008). Varias líneas establecidas de células de insecto son susceptibles a la infección por AcMNPV. Entre ellas están las provenientes de *Spodoptera frugiperda* (Walker) y *T. ni*. Las líneas más utilizadas son Sf9 y Sf21, ambas obtenidas a partir de tejidos de ovario de *S. frugiperda* (Rohrman, 2013b).

### **1.5 Respuesta inmune a baculovirus**

En la transmisión horizontal, los virus ingresan al insecto por la ingesta de alimento, entran a las células por el epitelio intestinal, y en el caso de los baculovirus se replican en técnicamente todos sus tejidos. La protección de los insectos a la infección por baculovirus se lleva a cabo por barreras físicas y fisiológicas, como el pH, proteasas y lipasas en el intestino del insecto. Además de una respuesta inmune que puede ser de dos tipos: a) celular, mediante el reconocimiento y encapsulación de tejidos infectados, o b) humoral, mediada por diferentes vías de señalización que activan a la actividad de la PO, la expresión de péptidos antivirales como gloverina, cecropina y proteínas paralizantes de unión a péptido o una inhibición subcelular, mediante ARN de interferencia o la inducción de apoptosis de células infectadas (Cory y Myers, 2003; Sparks *et al.*, 2008). Se ha reportado que la apoptosis puede ser bloqueada por genes virales inhibidores como *p35*, *p25*, *p49* y *IAPs*, los cuales se unen e inhiben la actividad de las caspasas (Clem y Passarelli, 2013).

### **1.6 Baculovirus y temperatura**

Los efectos de la temperatura en la infección con NPV son notables a temperaturas mayores a los 30°C. Mohamed *et al.* (1985) reportaron que de 30 a 35°C se indujo una infección latente de NPV en larvas del himenóptero *Neodiprion sertifer* (Geoffroy), pero no a temperaturas intermedias de 25°C. En el lepidóptero *Diatraea saccheralis* (F.) se reportó mortalidad por NPVs en larvas al aumentar la temperatura de 17 a 37°C (Ribeiro y Pavan, 1994). En *Bombyx mori* L., el desarrollo de la infección en

pupas fue inhibido a temperaturas de 35°C (Kobayashi *et al.*, 1981). En *Malacosoma californicum pluviale* (Dyar) Frid y Myers (2002) encontraron que no existe un efecto significativo de la temperatura en la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del NPV, aunque sí acortó el tiempo letal de la infección en el insecto conforme se aumentaba la temperatura, principalmente de 30-35°C.

Estudios *in vitro* en la línea celular *sf9* de *S. frugiperda*, indican que la temperatura óptima de infección se encuentra entre 24-28°C, siendo 28°C la óptima para dicha línea (Shao-Hua *et al.*, 1998), pero esta temperatura es con fines de producción del virus en líneas celulares y esta difiere de la temperatura corporal observada para este tipo de insectos en campo (Adamo y Lovett, 2011). A nivel laboratorio, Elder y Reilly (2014) encontraron que al aumentar la temperatura aumenta la ingesta y baja el tiempo de desarrollo, a medida que el huésped consume el virus junto con el tejido de la hoja en el que reside, es probable que el aumento de la velocidad de alimentación aumente la probabilidad de que un individuo consuma tejido de la hoja junto con los CO.

Por lo anterior expuesto, se hipotetizó que la relación entre las infecciones con baculovirus y la temperatura durante el ciclo de desarrollo de *T. ni* se verá reflejada en la expresión de genes relacionados con su respuesta inmune, además de la actividad PO y la proliferación y diferenciación de hemocitos, lo cual afectara su susceptibilidad al baculovirus AcMNPV.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático que se ha registrado en las últimas décadas, podría ampliar el área de distribución de insectos vectores de enfermedades y acelerar el metabolismo y el número de ciclos de vida de insectos plaga, generando más pérdidas agrícolas.

Actualmente, se está prestando mucha atención al efecto de la temperatura en la RI de insectos, ya sea de manera basal o bajo la exposición a patógenos como hongos y bacterias. Sin embargo, es poco lo que se sabe de este efecto en infecciones con baculovirus, los cuales pueden afectar la dinámica poblacional de sus huéspedes. Si este fenómeno se viese modificado aumentando la RI, se esperaría un aumento en la densidad poblacional de plagas agrícolas, generando fuertes pérdidas económicas. En cambio, si se viese disminuida, se podrían bajar dichas poblaciones, incluyendo a especies migratorias y endémicas.

Para clarificarlo, se evaluaron dichos efectos en las infecciones con baculovirus a nivel transcripcional en genes relacionados con la inmunidad celular, midiendo la actividad PO en el lepidóptero *Trichoplusia ni*, el cual se seleccionó como modelo de insecto plaga.

### **3. HIPÓTESIS**

Los cambios de temperatura modifican la respuesta inmune celular y/o humoral de larvas de *T. ni* infectadas con bajas concentraciones de AcMNPV.

### **4. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

#### **Objetivo General**

Determinar el efecto de la temperatura en la respuesta inmune humoral y celular de larvas de *Trichoplusia ni*, inoculadas con AcMNPV.

#### **Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la temperatura en el número de hemocitos de larvas de *T. ni* bajo diferentes condiciones de temperatura e infección por virus.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la actividad fenol oxidasa de larvas de *T. ni* bajo diferentes condiciones de temperatura-infección-virus.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la expresión de genes de importancia en la inmunidad de *T. ni* sometida a NPV.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional de larvas de *T. ni* a AcMNPV.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cría de insectos

El lepidóptero que se empleó como modelo biológico para medir el efecto de la temperatura en la respuesta inmune fue una cepa de laboratorio de *T. ni*. Las larvas se mantuvieron en dieta artificial, a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa del  $75\% \pm 10\%$  (Tamez-Guerra *et al.*, 2006), en la Unidad de Formulación de Biológicos del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Para verificar que las larvas de *T. ni* criadas en el laboratorio estuvieran libres de nucleopoliedrovirus que afectaran en los resultados experimentales, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos para el gen de la poliedrina mediante las condiciones reportadas por Woo (2001), y el gen *lef-8* (Herniou *et al.*, 2004) y así asegurar que las larvas estuvieran libres de NPVs.

### 5.2 Selección de concentración de AcMNPV

Para determinar la mejor concentración y método de exposición del insecto al entomopatógeno que se adecuara a los experimentos, se evaluaron tres métodos de inoculación para bioensayos concentración-mortalidad, esto con el fin de estimar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y la  $CL_{25}$  en CO/ $\mu\text{L}$  en gota teñida, CO/mL de dieta, CO/ $\text{cm}^2$ , en larvas del 3er estadio. Dichas concentraciones se estimaron mediante un análisis Logit usando el paquete estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* versión 17.0 (SPSS, 2008).

Los CO de AcMNPV usados en los diferentes ensayos se replicaron en larvas de *T. ni* expuestas a una concentración de  $1 \times 10^5$  CO/mL de dieta artificial. A los 5 días se colectaron las larvas muertas con las características de infección con NPV, se tamizaron para descartar fragmentos cuticulares, los CO se purificaron mediante gradientes de sacarosa (Carbonell y Miller, 1987), y se re-suspendieron en buffer de fosfatos salinos (PBS por sus siglas en inglés; NaCl a 137 mM, KCl a 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1.8 mM, pH = 7.4).

### 5.2.1 Bioensayo de gota teñida

Se evaluaron seis diluciones seriadas 1:5, partiendo de  $3 \times 10^6$  CO/ $\mu$ L en una solución de azúcar al 10% con 1% de colorante rojo grado alimenticio. Se utilizaron 40 larvas de 3er estadio por tres repeticiones. Las larvas se mantuvieron sin alimento durante 30 min, posteriormente se colocaron gotas de la suspensión con las diluciones del virus, al ingerir la suspensión con colorante las larvas exteriorizan una coloración roja, lo cual nos asegura que consumieron la suspensión, estas larvas se transfirieron a la dieta artificial (Tamez-Guerra *et al.*, 2000). La ventaja de este tipo de inoculación, es que se pueden seleccionar sólo las larvas que consumieron al entomopatógeno; sin embargo, el inóculo sólo es consumido por una ocasión y es difícil determinar con exactitud la cantidad de CO consumidos.

### 5.2.2 Bioensayo de inoculación a la dieta

Para este ensayo se probaron siete concentraciones de CO/mL, realizando diluciones seriadas de 1:5 para tener de  $5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^3$  CO/mL. Se agregaron las diferentes diluciones a la dieta antes de que gelificara, a una temperatura aproximada de 40°C, para evitar la pérdida de la viabilidad, Se evaluaron 60 larvas del 3er estadio para cada dilución por tres repeticiones (Tamez-Guerra *et al.*, 1998).

### 5.2.3 Bioensayo de aplicación superficial a la dieta

Las concentraciones que se utilizaron fueron siete diluciones seriadas 1:5, partiendo de  $1 \times 10^5$  cuerpos de oclusión (CO) por  $\text{cm}^2$  de la dieta artificial, cubriendo una superficie total de  $16.6 \text{ cm}^2$  en vasos de plástico. Se evaluaron 60 larvas del 3er estadio para cada dilución por tres repeticiones (Tamez-Guerra *et al.*, 2006).

## **5.3 Efecto de la temperatura en la respuesta inmune a AcMNPV**

Para evaluar el efecto de la temperatura en la respuesta inmune a los baculovirus, se utilizaron larvas del 3er estadio. Los criterios de selección fueron: peso de larvas ( $125 \pm 25$  mg), presentar coloración característica y ausencia de fragmentos de exuvia en la cutícula.



Para mantener la temperatura de los tratamientos se utilizó una mini incubadora (Labnet International Inc, Woodbridge NJ), cuya puerta es de vidrio y permite el paso de la luz, las temperaturas evaluadas fueron; 27°C que se tomó como temperatura óptima de crecimiento (Toba *et al.*, 1973), 32 y 37°C con y sin la CL<sub>25</sub> mediante la incorporación a la dieta artificial; todos los ensayos se hicieron con 50 larvas por tratamiento por tres repeticiones. Pasadas las 48 h, para cada tratamiento y repetición se colectaron 6 larvas para cada tipo de muestra, extracción de ARN, hemolinfa para la observación inmediata de hemocitos, y hemolinfa para la separación del plasma y la cuantificación de la actividad PO. Las muestras se procesaron como se describe a continuación.

### 5.3.1 Conteo de hemocitos

Inmediatamente después de las 48 h del experimento descrito anteriormente se colectó la hemolinfa de las larvas haciendo una pequeña incisión en la segunda pata falsa teniendo cuidado de no perforar los intestinos. La gota de la hemolinfa que brota después de la punción fue colectada en un microtubo de 0.6 mL. Partiendo de la hemolinfa de larvas de los diferentes tratamientos, se realizaron diluciones 1:10 en PBS para estimar el número de los diferentes tipos de hemocitos, se colocaron 10 µL de la dilución en un hemocitómetro y se visualizaron en un microscopio óptico con un aumento de 400X, calculando el número de células de esferocitos, pro-hemocitos, plasmacitos y oenocitoides, con base en la descripción de Strand (2008).

### 5.3.2 Actividad fenol-oxidasas (PO)

La actividad PO se determinó en placas de 96 pozos con 5 µL del plasma de hemolinfa que contiene la enzima activa o inactiva (sobrenadante obtenido por centrifugación en frío a 4°C a 5,000 gravedades por 5 min para eliminar las células, las cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso), y 195 µL de 10 mM L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) en buffer salino de fosfatos (PBS) como sustrato de la enzima. Después de una incubación de 30 min a 27°C se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Bio-Tek Instruments Highland Park Winooski, VT, EE. UU). La lectura se realizó por triplicado para cada repetición; los resultados de actividad enzimática se expresaron en unidades enzimáticas, donde una unidad de PO se define

como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.001 de absorbancia en un minuto (Valadez-Lira *et al.*, 2017).

### 5.5.5 Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune

Se estimó la expresión relativa de los principales genes de la respuesta inmune de *T. ni* utilizando las condiciones y sondas TaqMan empleadas por Valadez-Lira *et al.* (2017) con eficiencia validada Tabla 1. La cuantificación se realizó por el método comparativo CT ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) utilizando como control endógeno el gen de la proteína ribosomal PRS5.

**Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos de péptidos antimicrobiales de *Trichoplusia ni* en sentido 5' a 3' en orden en sentido delantero, sonda y reverso**

GEN	Secuencias (Oligonucleótidos en sentido 5' a 3', sonda y reverso)
<i>PRS5</i>	TGT TGA GGC GCT TGA CAA ACT CT ACG TCC GTG CAT CAT C
<i>Atacina</i>	GCC ATA AGT TTC TTG CCG TTG TT CGG CTT GTC CGT AAT GAA GGA CTG TCG CCG AAG CCA TGC CAG CTC CCG TCA G
<i>Cecropina</i>	TGT TCG CTT GTC TGG TCT TCA C CAG GGA CCG CCG TCA CA
<i>Defensina</i>	TGT TCT GTC CAA CCT TTT CAA TTT TCT TG GAT GAA AGT GTT GTG CCA ATA AGC A TTG CTG CCA AGG CTT C
<i>Gallerimicina</i>	TGA TTT CTC CAA TTT TGT GGT ATC CTC TT TTC CTG GCG CAG TAG AAT CTG ATG TCC CCA TTT TGC C
<i>Gloverina</i>	TCG GCC CTT GGA TAG TTA CCT T CGA CTA TGG TGG CAG CAG TAT A CTT GGT GGC AAA CTA G GCT CTT GCG TTG TCG TTA GAC
<i>Lebocina</i>	CAT CAT GGT GAG AGG GTT GAG A TCG GCG TCC CAA GAC T GGC CGG CTG CTA CCA
<i>Lisozima</i>	GCG CCA AGA AGA TCT ACA AAC G ACG CCT GGA ACT TGT AGT TCC CTG GCA GTG GTT AC
<i>PGRP</i>	GCC CTG AGA GCA TTG CTT AGA T CTC CGC TCC ACA CCA C GGT AGT TGG CGG TGA GAT GA

El método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  se basa en la relación entre la expresión del gen de interés normalizado con un gen endógeno de la muestra de interés (tratamiento) y la muestra

calibradora (control), Este método es una forma conveniente de calcular los niveles relativos de expresión génica entre diferentes muestras, ya que utiliza los ciclos de umbral (CT) generados por la qPCR para el cálculo.

Se estimaron los cambios de expresión en:

- I. El aumento de temperatura (27°C contra 37°C).
- II. La infección con virus (larvas sanas contra larvas infectadas a 27°C).
- III. El efecto de la infección con virus entre larvas infectadas a 27°C en comparación a las infectadas a 37°C.
- IV. El efecto de la infección con *AcMNPV* a 37°C (comparación entre las larvas sanas e infectadas, ambas incubadas a 37°C).

El ARN se purificó usando el reactivo Tri-Reagent (Ambion, Inc, Austin, TX, USA) a partir del homogenizado de los intestinos de seis larvas, para visualizar el contraste en expresión generada por la temperatura solo se usaron los tratamientos de 27 y 37°C. La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 2 µg de ARN con el kit *Applied Biosystems High Capacity cDNA RT kit*; una vez sintetizado se diluyó 1:10 para utilizar 5 µL por reacción lo que corresponde a 50 ng de ADNc.

La qPCR se hizo con sondas TaqMan con fluorescencia FAM, mediante las condiciones y reactivos de *TaqMan Universal PCR master mix* de Applied Biosystems que usa como referencia pasiva la fluorescencia de ROX (Foster City, CA, EE. UU.), las reacciones se corrieron en el equipo PCR System Thermocycler 7500 (Applied Biosystems). Las condiciones de temperaturas y tiempos recomendadas por el fabricante fueron de 50°C durante 2 min, una desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min.

#### **5.4 Efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional a *AcMNPV***

Primeramente, se realizó un bioensayo para ver el efecto de la CL<sub>25</sub> estimada en larvas incubadas a temperaturas de 27, 32 y 37°C: Como control se mantuvieron larvas sin la exposición a *AcMNPV* a las temperaturas mencionadas, Se utilizaron 30 larvas de 3er estadio por cada tratamiento por tres repeticiones. La mortalidad se leyó a los 4 días.

A partir de las larvas sobrevivientes, se tomaron muestras de hemolinfa para analizar la actividad PO bajo las condiciones evaluadas. Las larvas restantes (F1), se cruzaron entre sí y se mantuvieron en cría, Las larvas obtenidas de la siguiente generación (F2) se expusieron bajo los mismos parámetros para comparar la mortalidad y la actividad PO entre la F1 y F2.

### 5.5 Efecto de los cambios de temperatura en la actividad PO.

Para evaluar cómo afectan los cambios de temperatura en la respuesta inmune de *T. ni* a AcMNPV, se realizaron bioensayos con cambios de temperatura de exposición al NPV, considerándose las siguientes combinaciones de eventos de 0 a 12 h (A) y 12 a 24 h (B); Durante este tiempo se mantuvieron las larvas a 27°C ó a 37°C, con o sin virus (Tabla 2). Después de las 24 h de exposición, se extrajo la hemolinfa de los insectos para evaluar la actividad PO (Tabla 2).

Este experimento se realizó para saber qué efecto tendría en el insecto la inoculación del NPV después de estar expuesto a una temperatura por arriba de la óptima.

**Tabla 2. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de los cambios de la temperatura en respuesta inmune de *Trichoplusia ni* a AcMNPV**

Prueba	A	B	Resultado esperado
1	37°C + Virus	27°C	Recuperación de la RI de insecto a la temperatura óptima después de verse afectado por el virus a temperatura alta
2	37°C	27°C	Recuperación de la RI después de estar a los 37°C
3	27°C + Virus	27°C	Efecto de la dosificación no continua
4	27°C	27°C	Control
5	37°C	27°C+ Virus	RI a la infección con AcMNPV después de un evento de temperatura alta
6	27°C + Virus	37°C	RI posterior a un evento de temperatura alta de larvas infectadas a la temperatura optima

---

7	27°C	37°C	Control
---	------	------	---------

---

## 5.5 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el software *Statistical Package for the Social Sciences* versión 17.0 (SPSS, 2008). Las CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub> se calcularon mediante un análisis Logit. Para determinar diferencias entre el efecto de las diferentes temperaturas y la infección con virus (variables independientes), se efectuó un análisis de varianza de una, dos o tres vías dependiendo de los factores, utilizando como variables dependientes la actividad PO (U/ $\mu$ L), el número de hemocitos (hem/ $\mu$ L), número de insectos muertos, evaluando la hipótesis a una  $p \leq 0.05$ , utilizando la corrección de Bonferroni para contrarrestar el problema de las comparaciones múltiples. Al detectar diferencias significativas, se procedió a efectuar el test de comparaciones múltiples Tukey para determinar las diferencias mínimas significativas; en las comparaciones de mortalidad y PO transgeneracional se utilizó una prueba  $t$  pareada ( $p \leq 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Detección de NPVs de la cría de *T. ni*.

Para validar que la cría de *T. ni* estuviera libre de cualquier infección latente de NPVs. En ninguno de los 4 lotes de *T. ni* evaluados se detectó la presencia de ADN de los genes *poliedrina* y *lf-8* (anexos 1 y 2), para asegurar que la extracción de ADN tenía la calidad para la PCR se amplificó el gen 18 S ARNr en todas las muestras (anexo 3).

### 6.2 Selección de concentración de inóculo de *AcMNPV*

Para estandarizar la concentración, el tiempo y las condiciones para realizar los bioensayos, se estimó la  $CL_{25}$  y la  $CL_{50}$ , evaluando diferentes protocolos de inoculación en larvas del 3er estadio.

Los bioensayos de gota teñida arrojaron una  $CL_{50}$  de  $3 \times 10^6$  CO/ $\mu$ L con un intervalo de confianza de 95% ( $IC_{95\%}$ ) entre  $1.8 \times 10^6$  hasta  $6.5 \times 10^6$ , y una  $CL_{25}$  no estimable ( $CL_{25}$  negativa), este es un método efectivo para calcular la CL; sin embargo, en larvas de 3er estadio es complicado, ya que, al no estar en la dieta, las larvas tienden a ser agresivas entre ellas y es difícil tener un número de individuos suficientes que consumieran el virus.

En cuanto al método de inoculación de los CO diluidos en la dieta, se calculó una  $CL_{50}$   $3.0 \times 10^6$  CO/mL y un  $IC_{95\%}$  entre  $1.8 \times 10^6$  y  $6.5 \times 10^6$ , en cuanto a la  $CL_{25}$  tampoco fue estimable. La validación de la  $CL_{50}$  resultó en una mortalidad del  $60\% \pm 5.7\%$ .

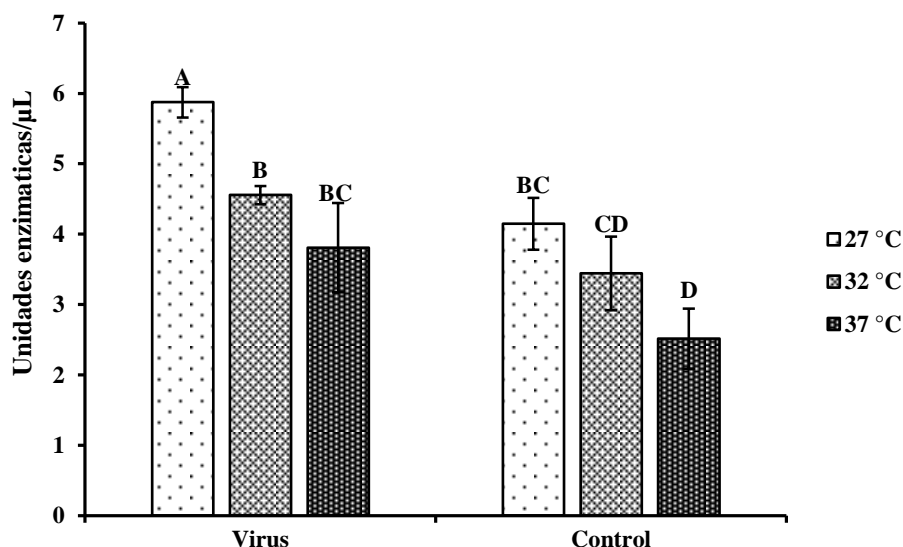
La aplicación de CO a la dieta de manera superficial dio como resultado una  $CL_{50}$  de  $1.5 \times 10^5$  con un  $IC_{95\%}$  de  $1.0 \times 10^5$  hasta  $4.1 \times 10^5$ , al repetir el bioensayo utilizando esta concentración (validación) se obtuvo una mortalidad de  $53.3 \pm 5.7\%$ . La  $CL_{25}$  fue de  $9.5 \times 10^4$  con un  $IC_{95\%}$  de  $6.3 \times 10^4$  hasta  $2.3 \times 10^5$ , con una validación de mortalidad de  $25.5\% \pm 5.0\%$ . Por estas validaciones y al poder estimar una  $CL_{25}$  factible, este fue el método de inoculación seleccionado.

### 6.3 Efecto de la temperatura en la respuesta inmune a *AcMNPV*

#### 6.3.1 Actividad fenol-oxidasa (PO)

El efecto de la temperatura en la actividad PO como respuesta inmune humoral se puede apreciar en la Fig. 1. Por encima de los 27°C, la actividad de esta enzima se ve significativamente disminuida en larvas expuesta a la CL<sub>25</sub> de AcMNPV (Virus  $F_{1,12}=48.591$ ;  $p<0.01$ ; Temperatura  $F_{2,12}=29.272$ ;  $p<0.01$ ; Virus/temperatura  $F_{2,12}=0.840$ ;  $p>0.05$ ), no hay diferencias significativas en la interacción virus/temperatura), ni entre los 32 y 37°C no hay diferencias significativas.

Al incrementar la temperatura, la enzima era menos activa; esta tendencia también se observó en el control (larvas no expuestas al virus); a pesar de que no se observaron diferencias significativas, la actividad de la enzima PO tuvo una tendencia de disminuir conforme la temperatura aumentaba (Fig. 1). Las larvas infectadas a 27°C fueron las que presentaron mayor actividad.

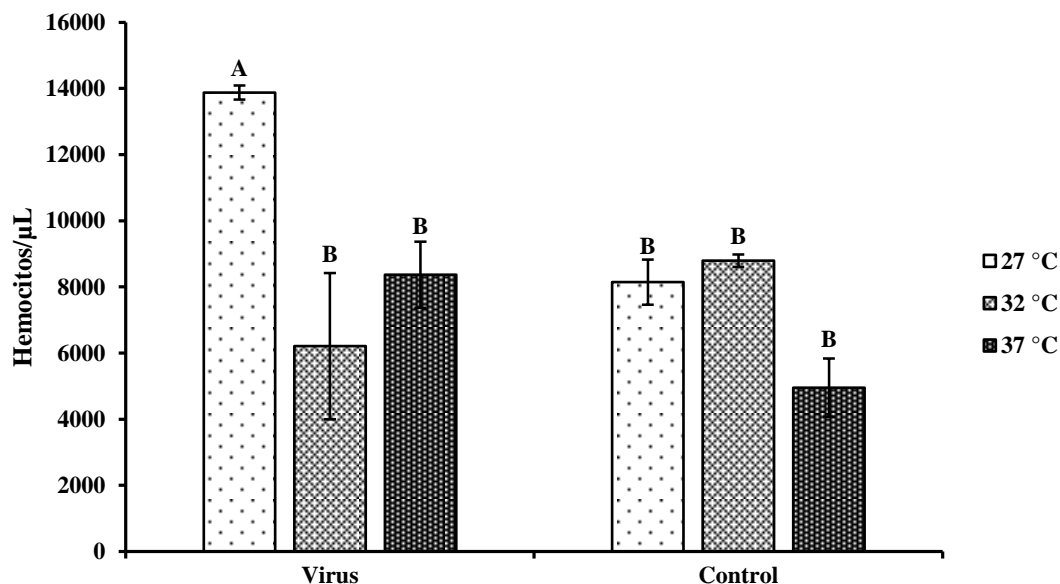


**Figura 1.** Efecto de la temperatura en la actividad fenol oxidasa inducida por AcMNPV. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican valores significativamente diferentes (Tukey HSD,  $\alpha=0.05$ ).

### 6.3.2 Conteo de hemocitos

En cuanto a la respuesta inmune celular (Fig. 2), el número de hemocitos totales fue significativamente inferior en las temperaturas de 32 y 37°C ( $6.2 \times 10^3$  y  $8.3 \times 10^3$ ) en comparación a  $1 \times 10^4$  hem/mL de la temperatura normal de crecimiento (27°C) en las larvas expuestas al NPV (Virus  $F_{1,11}=9.32$ ;  $p<0.01$ ; Temperatura  $F_{2,11}=13.83$ ;  $p<0.01$ ;  $F_{2,11}=11.95$ ;  $p<0.01$ ), entre el control y las temperaturas de 32° y 37°C no hubo

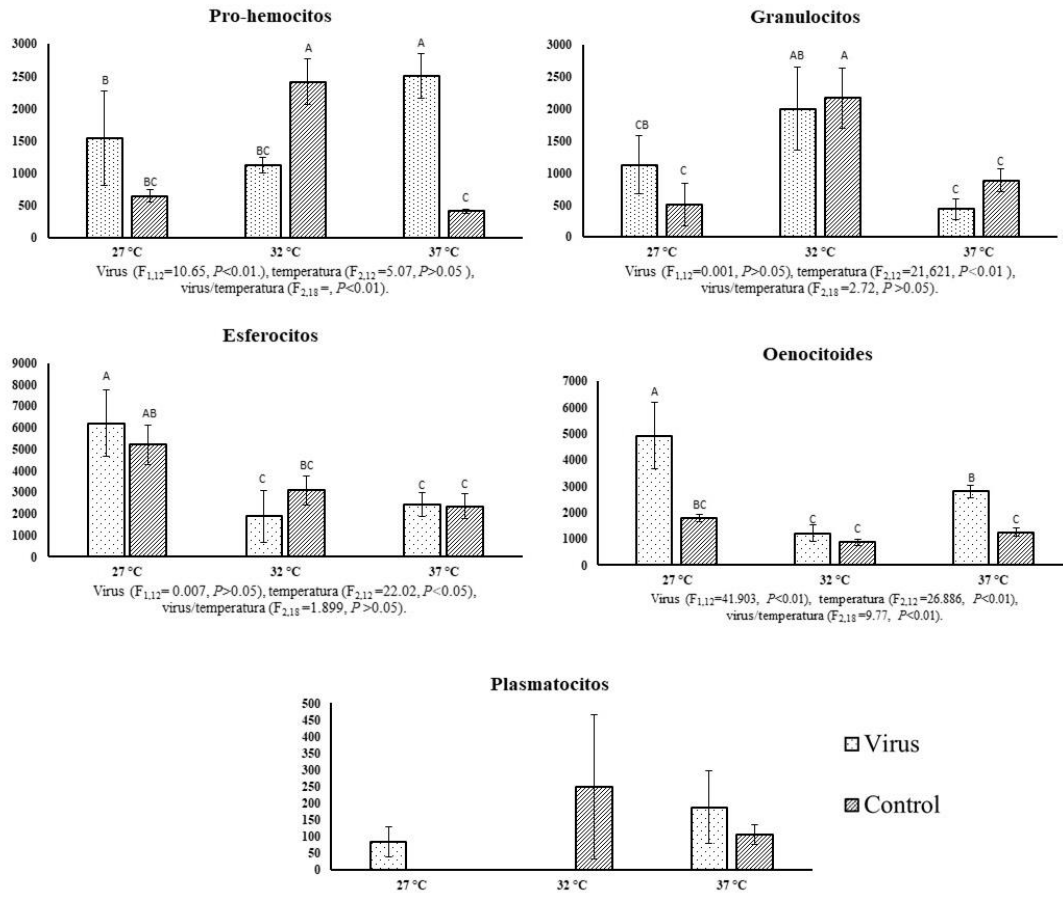
diferencias, presentando proliferación de hemocitos en respuesta al virus solo a los 27°C, siendo la interacción virus/temperatura significativa.



**Figura 2.** Efecto de la temperatura en el número de hemocitos totales en larvas infectadas con AcMNPV. Las barras de las comunas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indica valores significativamente diferentes (Tukey HSD,  $\alpha=0.05$ ).

El número de hemocitos totales es indicador de la inmunocompetencia del insecto, como resultado de la proliferación y la diferenciación de pro-hemocitos en células más especializadas, siendo los esferocitos y los oenocitoides los que presentaron una disminución más marcada (Estadísticos en la Fig. 3), principalmente en las larvas expuestas a NPV, presentando 69.8 y 60.8% menos esferocitos a 32° y 37°C, respectivamente, y 75.4-50.5%, menor número de oenocitoides/ $\mu\text{L}$ , en comparación con las larvas incubadas a 27°C, como se visualiza en la Fig. 3. Se observó un 73% mayor número de pro-hemocitos y 76.9% más de granulocitos a 32°C en las larvas libres de NPV, en comparación a la temperatura óptima (27°C). En el caso de los esferocitos, en las larvas no expuestas al NPV, el número células disminuyó a las temperaturas por encima de la temperatura óptima (40.8 y 54.9% fue menor a 32° y 37°C, respectivamente). Los plasmatotocitos no se visualizaron en todas las muestras por lo cual no se realizó análisis estadístico.

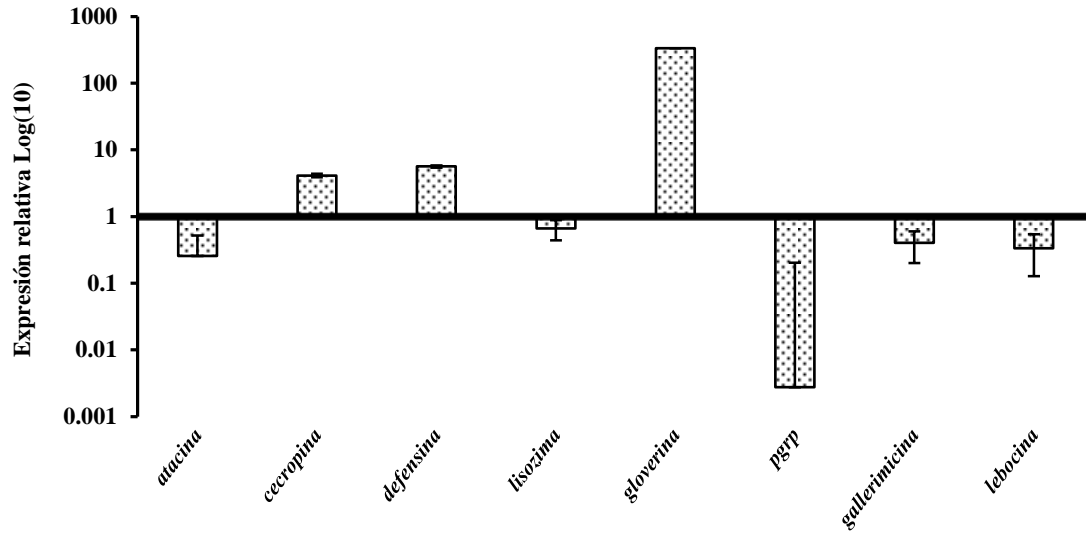




**Figura 3.** Efecto de la temperatura en el número de los diferentes tipos de hemocitos en infecciones con AcMNPV. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indica valores significativamente diferentes entre cada tipo de hemocito (Tukey HSD,  $\alpha=0.05$ ).

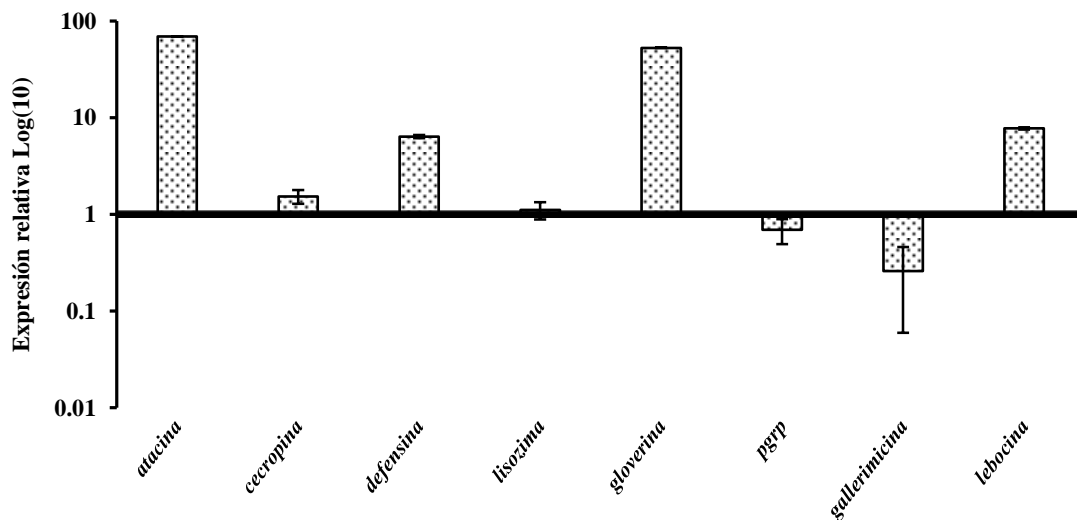
### 6.3.3 Expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune

Los niveles basales de expresión de los principales péptidos antimicrobianos de larvas sanas de *T. ni* fueron afectados por el aumento de temperatura (Fig. 4), siendo la *gloverina* quien presentó un aumento de la expresión de 334 veces en comparación con la temperatura de 27°C (representada en la barra horizontal con valor de uno). También se detectó una baja en la expresión de la proteína de reconocimiento a péptidoglicano (*pgrp*) con una represión (0.0027) y de la *lebocina* (0.25) en comparación al control. La expresión de *cecropina* y *defensina* tuvieron un aumento de 4 y 5 veces; mientras que la disminución de la expresión de *atacina*, *lisozima*, *gallerimicina* y *lebocina* no fue tan notoria (0.25, 0.6, 0.4, y 0.3, respectivamente).



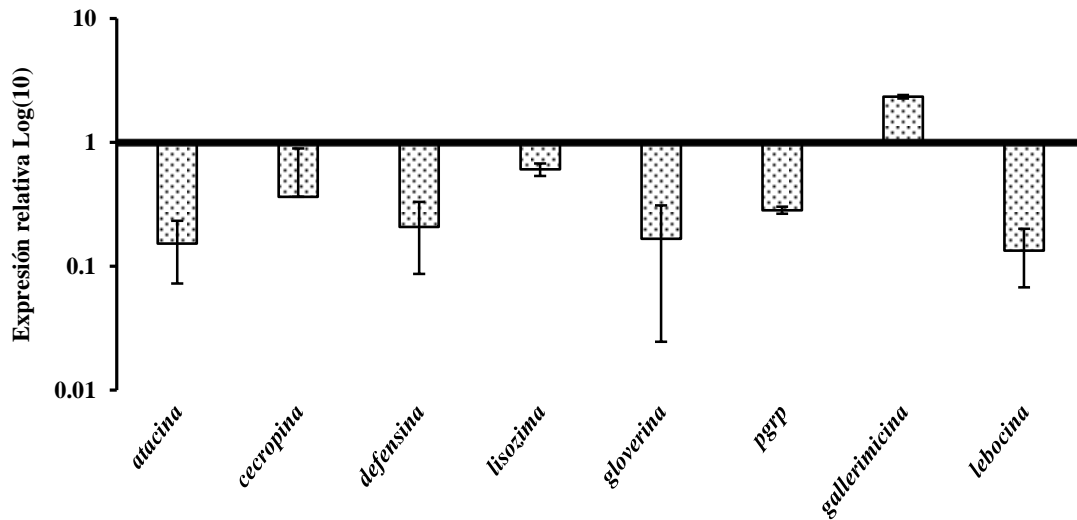
**Figura 4.** Efecto del aumento de temperatura en larvas sanas (a 37°C) en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune, en comparación a 27°C (representada por la barra horizontal con valor a 1.0). Las barras de las columnas representan la desviación estándar.

Tras las infecciones con AcMNPV bajo condiciones de temperatura de 27°C, la expresión de los genes *atacina*, *defensina*, *gloverina* y *lebocina* se vio aumentada 68.9, 6.3, 52.6 y 7.7 veces, respectivamente; mientras que los cambios de expresión de la *cecropina*, *lisozima*, *pgrp* y *gallerimicina* fueron mínimos (Fig. 5).



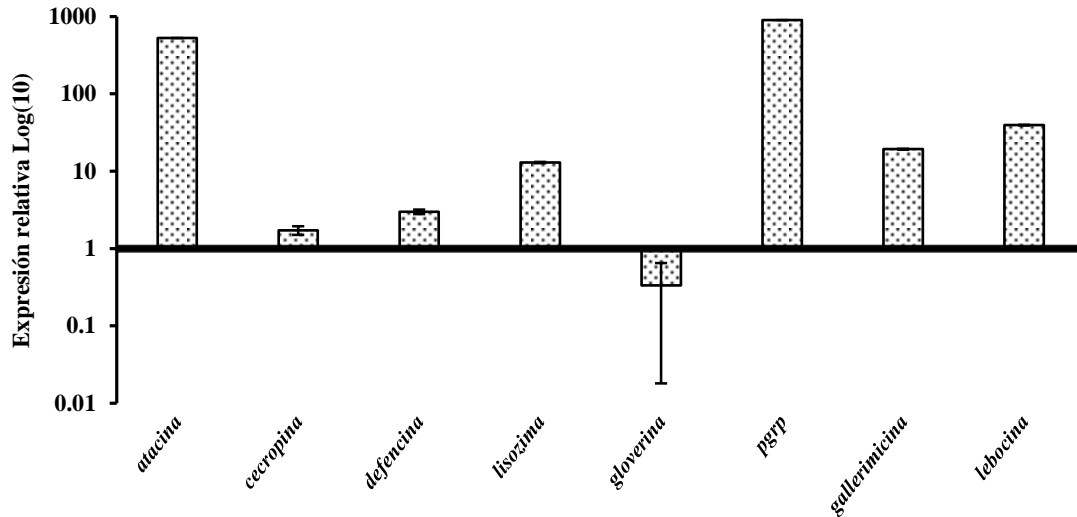
**Figura 5.** Efecto de la infección con AcMNPV a 27°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune en comparación a larvas sanas (representada por la barra horizontal con valor a 1.0). Las barras de las columnas representan la desviación estándar.

En los niveles de expresión entre larvas infectadas e incubadas a 37°C, en comparación a las infectadas e incubadas a 27°C, se observó que, con excepción de la *galleromicina*, todos los genes tuvieron en promedio una disminución no menor al 10% (0.1 veces) como se visualiza en la Fig. 6.



**Figura 6.** Efecto de la infección con AcMNPV a 37°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune, en comparación a larvas infectadas a 27°C (representada por la barra horizontal con valor a 1.0). Las barras de las columnas representan la desviación estándar

El efecto de la infección vírica de larvas incubadas a 37°C, en comparación a las larvas sanas incubadas a la misma temperatura (Fig. 7), resultó en un aumento de la expresión de los genes *atacina* y *pgrp* de 552 y 900 veces respectivamente, y en menor proporción la expresión de *lisozima*, *gallerimicina* y *lebocina*, con valores de 12.8, 19.2 y 39.4 veces, respectivamente.



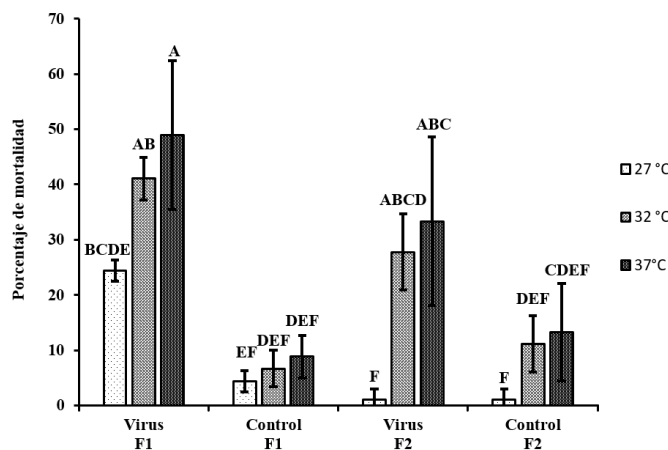
**Figura 7.** Efecto de la infección con *AcMNPV* a 37°C en la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune en comparación a larvas sanas incubadas a 37°C (representada por la barra horizontal con valor a 1.0). Las barras de las columnas representan la desviación estándar

#### 6.4 Efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional a *AcMNPV*

Las larvas F1, expuestas a la  $CL_{25}$  tuvieron una mortalidad de  $24.4 \pm 2\%$  (Fig. 8), la mortalidad se elevó hasta un 41% a los 32°C y un 48.8% a 37°C, en el caso de los controles la mortalidad aumentó ligeramente al incrementarse la temperatura, pasando de 4.4% a 27°C al 6.6 y 8.8% de mortalidad a los 32° y 37°C, respectivamente.

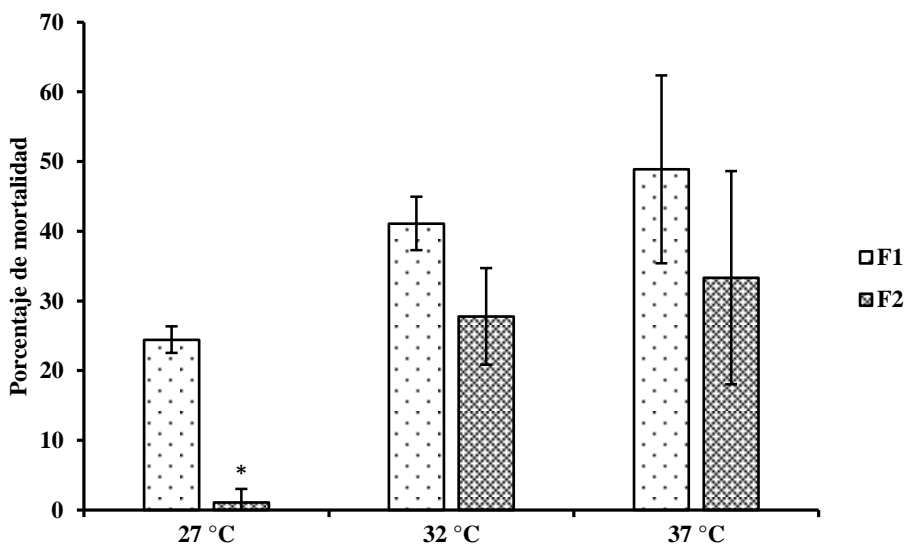
La mortalidad en la siguiente generación F2 (a partir de las larvas sobrevivientes F1 expuestas al NPV), fue significativamente menor ( $F_{1,35} = 5.85$ ;  $p=0.02$ ), a la  $CL_{25}$  solo se obtuvo un 1.1% de mortalidad a 27°C; sin embargo, la temperatura no incrementó significativamente la mortalidad, alcanzando un 11 y 13% a los 32 y 37°C en larvas no expuestas. Comparado con la mortalidad en las larvas F2 incubadas a 32 y 37°C, la mortalidad solo fue mayor comparada con larvas inoculadas con virus a 27°C ( $p < 0.05$ ), con un 27.7 y 33.3%, respectivamente ( $F_{2,35} = 11.4$ ;  $p < 0.01$ ).

En los controles, el aumento de la temperatura incrementó la mortalidad, alcanzando un 11 y 13% a los 32 y 37°C en la F2. El porcentaje de mortalidad entre las larvas expuestas al virus a 27°C de la F2 no mostró diferencias significativas con respecto a ninguno de los controles.



**Figura 8.** Efecto de la temperatura en la susceptibilidad transgeneracional a AcMNPV. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indica valores significativamente diferentes (Tukey HSD,  $\alpha=0.05$ ).

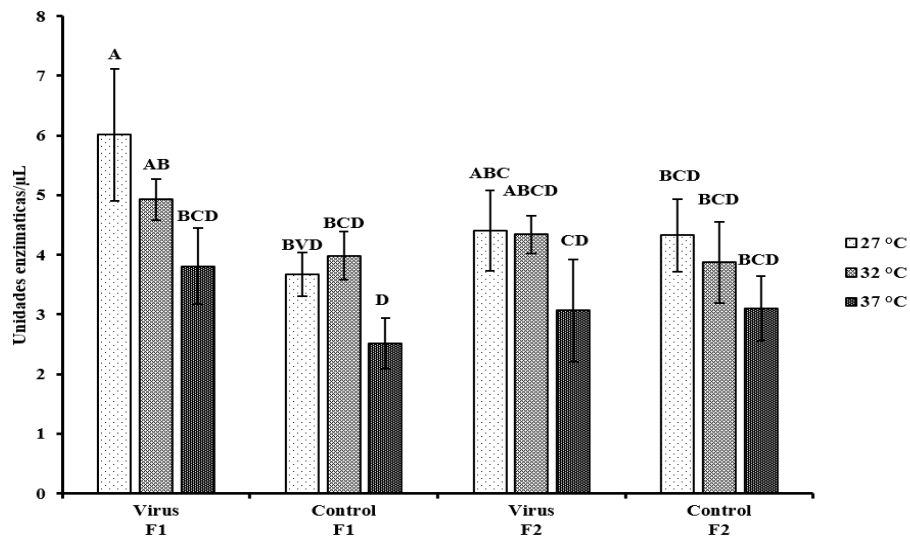
Al comparar la mortalidad transgeneracional a las diferentes temperaturas entre las larvas F1 y F2, solo se encontró una diferencia significativa a 27°C, de un 24.4% en la F1 a un 1% en la F2 (Fig. 9) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9.** Susceptibilidad transgeneracional a AcMNPV en las diferentes temperaturas evaluadas. Las barras de las columnas representan la desviación estándar (\*  $p < 0.001$ ) (*t* student).

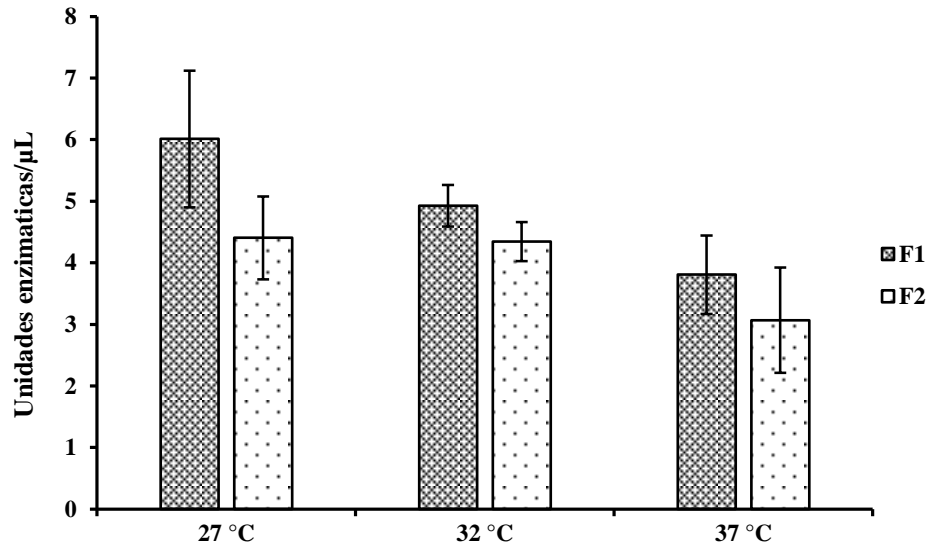
## 6.5 Efecto de la temperatura en la actividad PO transgeneracional a AcMNPV

En cuanto a la respuesta inmune humoral (Fig. 10), la actividad PO fue mayor en los tratamientos de larvas expuestas a NPV a los 27 y 32°C en comparación a los controles ( $F_{1,35} = 12.06$ ;  $p < 0.01$ ), y entre las inoculadas con virus a 27°C en comparación a la temperatura de 37°C ( $F_{1,35} = 14.57$ ;  $p < 0.01$ ), en larvas F1. No se observaron diferencias entre las larvas F1 y F2 ( $F_{1,35} = 12.06$ ;  $p = 0.21$ ).



**Figura 10.** Efecto de la temperatura en la actividad fenol oxidasa transgeneracional en respuesta a AcMNPV. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indica valores significativamente diferentes (Tukey HSD,  $\alpha = 0.05$ ).

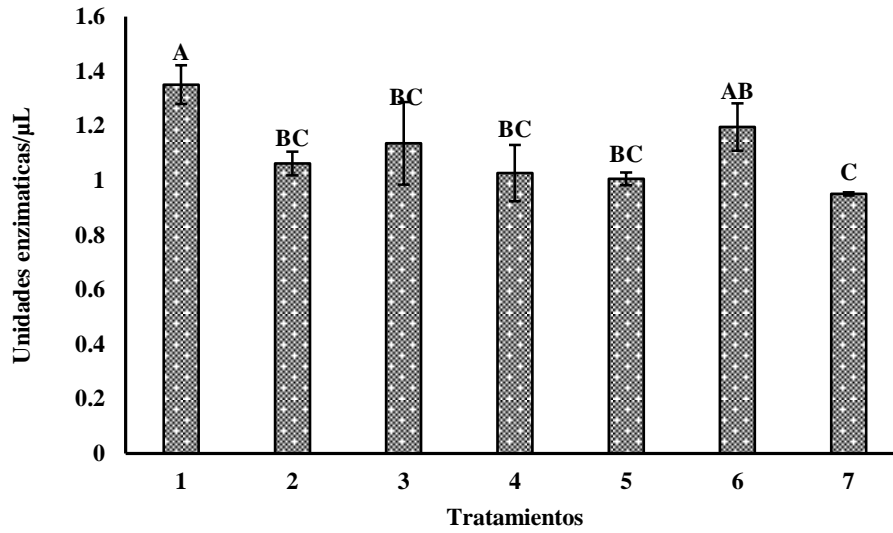
Al comparar la actividad PO entre las larvas F1 y F2, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$  *t student*) en ninguna de las temperaturas, pero fue ligeramente menor la actividad en las larvas F2 pero no fue significativa (Fig. 11).



**Figura 11.** Actividad fenol oxidasa transgeneracional en respuesta a *AcMNPV* en las diferentes temperaturas evaluadas. Las barras de las columnas representan la desviación estándar.

### 6.6 Efecto de los cambios de temperatura en la actividad PO.

El cambio de temperatura que generó mayor actividad PO comparado con el control fueron los tratamiento 1 y 6 (Fig. 12), en donde las larvas expuestas tuvieron un cambio de temperatura, se expusieron al virus durante 12 h a una temperatura de 37°C, posteriormente se pasaron a dieta sin virus y a una temperatura de 27°C (tratamiento 1); y larvas que se expusieron al virus durante 12 h a una temperatura de 27°C, posteriormente se pasaron a dieta sin virus a una temperatura de 37°C (tratamiento 6). Este tratamiento fue significativamente mayor que en las larvas en donde se expusieron al virus bajo las mismas condiciones, pero manteniendo la temperatura de 27°C (tratamiento 3); sin embargo, en el tratamiento 5 no se apreció este aumento de la actividad PO, en donde la exposición al virus ocurrió a 27°C, después de haber estado a 37°C por 12 h. en los tratamientos 2, 4, 5, no hubo un cambio significativo con respecto al control (tratamiento 3).



**Figura 12.** Efecto de los cambios de temperatura en la actividad fenol oxidasa. Las barras de las columnas representan desviación estándar (Tukey HSD,  $\alpha=0.05$ ). en donde **1)** Larvas expuestas al virus a 37°C y después mantenidas a 27°C; **2)** Larvas mantenidas a 37°C y después a 27°C; **3)** Larvas expuestas al virus a 27°C y después mantenidas a la misma temperatura sin virus; **4)** Control, larvas mantenidas a 27°C sin virus; **5)** Larvas expuestas al virus a 27°C después de estar a 37°C; **6)** Larvas expuestas al virus a 27°C y posteriormente mantenidas a 37°C; **7)** Larvas mantenidas a 27°C y después pasadas a 37°C.



## 7. DISCUSIÓN

Existen muchos datos que demuestran que hay una causa-efecto por cambio el climático en la distribución, fenología y ciclo de vida de los insectos fitófagos (Altermatt, 2011; Bauerfeind y Fischer, 2014b; Garrad *et al.*, 2016); este tipo de estudios son importantes pues muchas plagas están apareciendo en zonas donde anteriormente no representaban un problema, de igual manera la distribución de algunas enfermedades transmitidas por insectos como vectores se ha expandido (Elliot *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2011; Alto y Bettinardi, 2013; Renault *et al.*, 2018). Esto sucede porque, la distribución de su nicho térmico se está expandiendo, muchos insectos se están moviendo a lugares donde anteriormente no se presentaban. Además de la expansión del hábitat de muchas especies, se espera que el cambio climático también afectará las interacciones de los insectos con sus enemigos naturales, ya sea como parte de la cadena trófica, o siendo hospederos de microorganismos, incluyendo los virus (Silva y Elliot, 2016; Samuel *et al.*, 2017; Laughton *et al.*, 2018). Estas interacciones son de suma importancia puesto que son las que mantienen a dichas poblaciones bajo control. Específicamente, se podrían ver afectadas las condiciones óptimas infectivas de los virus entomopatógenos, los cuales representan una herramienta fundamental en el control de plagas, al ser ambientalmente amigable debido a su alta especificidad de hospedero. También es posible que se viera afectada la respuesta de los insectos a estos patógenos, lo cual es el objeto de estudio de este trabajo, específicamente el efecto en la interacción del lepidóptero *T. ni* con el baculovirus *AcMNPV*.

Dentro de los efectos de los cambios de la temperatura se incluyen los cambios en la fisiología de los organismos, que, para el caso de los artrópodos, la respuesta más rápida del sistema inmune es la actividad PO. Esta puede estar presentarse en dos formas, como pro fenol-oxidasa (proPO), y como su forma PO activa, ya que es sintetizada principalmente por los oenositoides, y su activación ocurre inmediatamente después de la invasión de microorganismos o agentes externos a la hemolinfa del insecto (Kanost y Gorman, 2008). De hecho, a esta enzima se le correlaciona como responsable de la resistencia de insectos a una gran variedad de patógenos.

Es importante tomar en cuenta que, si la medición de la actividad PO se realiza a temperatura ambiente, solo se detectará la cantidad de enzima activa, y no se evaluarán

los puntos óptimos de actividad enzimática en función a la temperatura. La proPO se activa como parte de una cascada de proteasas, estimulada por el reconocimiento de la infección microbiana; donde la cascada de activación de proPO está regulada por los inhibidores de la serin-proteasa plasmática. Una vez activa, la PO se puede inhibir directamente por factores proteicos (Kanost y Gorman, 2008). De hecho, la concentración de PO activa en insectos es un indicador de la competencia comparativa del sistema inmunológico en insectos (Cai *et al.*, 2001).

En este estudio se observó que mientras las larvas de *T. ni* estén a mayor temperatura, se reduce su actividad PO, como se visualiza en la Fig. 1. En el tratamiento con la temperatura óptima de 27°C, las larvas infectadas resultaron con una mayor actividad PO. Se sabe poco del efecto de la actividad PO para combatir infecciones víricas; de hecho, los resultados en diferentes especies son variables. En 1998, Reeson *et al.* detectaron niveles más altos de supervivencia al NPV en larvas de *Spodoptera exempta* (Walker) con altos niveles de actividad PO; después, Trudeau *et al.* (2001) demostraron que la encapsulación junto con la melanización de tejidos infectados por AcMNPV representaba la base de la resistencia de *Helicoverpa zea* (Boddie) a AcMNPV; Shelby y Popham en el 2006 encontraron que la fenol oxidasa activa en el plasma de la hemolinfa de *H. zea* es el mayor inactivador vírico del HzSNPV *in vitro*. Saejeng *et al.* (2010) no detectaron actividad significativa en la plaga de granos almacenados *Plodia interpunctella* Hübner hasta después de seis días de la inoculación con el granulovirus PiGV; mientras que con *P. interpunctella*, Laughton *et al.* (2017) determinaron que al pasar de temperaturas de 20 a 24°C había un aumento en la actividad PO, estabilizándose de 24° a 30°C; sin embargo, no evaluaron temperaturas superiores. En el camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone), artrópodo no insecto, infectado con el virus del síndrome de la mancha blanca, Ai *et al.* (2008) reportaron una disminución de la concentración de la ProPO. Pese a lo que se conoce sobre la actividad PO en las infecciones víricas, la PO es un buen indicador de la inmunocompetencia general en insectos Mucklow, *et al.*, 2004). Esto es dividido a que la PO se activa por la entrada de un agente externo, y no necesariamente porque la PO sea el factor que evitara que la infección se desarrolle; que como se mencionó, puede inactivar al virus in-vitro, pero este efecto solo se daría en el insecto cuando la infección secundaria se ha

desarrollado y los viriones brotados se diseminan en la hemolinfa, o cuando se da el proceso de encapsulación y melanización de los tejidos ya infectados.

En cuanto al efecto de la temperatura en esta respuesta a la infección, las larvas expuestas al virus a las temperaturas de 32° y 37°C, tuvieron significativamente menos actividad como respuesta a la infección, comparado con la temperatura óptima (27°C); de igual forma en los controles, donde a mayor temperatura se detectó una menor actividad PO. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Karl *et al.* (2011), quienes usaron como modelo al lepidóptero diurno *B. anynana*, y después de evaluarlo a temperaturas de 10°, 27° y 35°C, determinaron que la masa y grasa corporal estaban inversamente relacionadas con la temperatura del insecto: a mayor temperatura, mayor masa, menor actividad PO; Si esta mayor masa está dada por la cantidad de líquidos que tiene el insecto es posible que la PO este mas diluida, y más importante aún, los hemocitos, sobretodo oenositodes los encargados de la producion y activación de la PO. Usando como modelo a *G. mellonella* en estado larvario y evaluando el efecto fisiológico de temperaturas de 15° a 37°C durante 24 h, Browne *et al.* (2014) detectaron una gran cantidad de proPO, pero esta concentración bajó a las 72 h; sin embargo, entre temperaturas de 10° a 30°C, Mastore *et al.* (2019) encontraron una mayor actividad a los 30°C, lo que podría deberse a una mayor expresión de la misma, como lo reportaron Seehausen *et al.* (2016) evaluando a *Choristoneura fumiferana* (Clemens). Bauerfeind y Fischer (2014a), reportaron una disminución en la actividad PO al evaluar el incremento de la temperatura de 15° a 25°C en *Pieris napi* L., una mariposa de zonas templadas. Aparentemente la temperatura disminuye la activación general de esta enzima lo cual facilitaría infecciones bacterianas.

En el caso de los hemocitos, vemos que las altas temperaturas tienden a disminuir el número de hem/ $\mu$ L, principalmente a 37°C (Fig. 2). De igual manera que la actividad PO, Karl *et al.* (2011) reportaron una disminución en el número total de hemocitos por el aumento de la temperatura, contrario a Browne *et al.* (2014), que detectaron un mayor número de hemocitos totales en *G. mellonella* después de evaluar el efecto de temperaturas de 15° a 37°C, siendo *G. mellonella* adaptada a los 37°C al vivir en colmenas. Esta disminución en el número de hemocitos también fue observada en larvas de *P. napi* a temperaturas de 15° a 25°C (Bauerfeind y Fischer, 2014a). Se detectó una tendencia similar cuando se evaluaron larvas incubadas a 37°C, donde se

cuantificó un número de hemocitos inferior que a temperaturas más bajas, las larvas infectadas con el NPVs a la temperatura óptima tuvieron mayor número de hemocitos totales como respuesta a la infección; sin embargo, esta respuesta no fue tan marcada a 32° y 37°C.

Este aumento en el número de células fue general para todas las células del perfil hemocitario, siendo los esferocitos y los oenocitoides los que resultaron en un mayor número como efecto de la infección con el NPV (Fig. 3). Cabe recordar que los esferocitos son los encargados del transporte cuticular, los oenocitoides son los encargados del metabolismo preliminar de fenoles para esclerotización de la cutícula, incluyendo la expresión y la activación de PO (Jiang *et al.*, 1997). Sin embargo, la cantidad de oenocitoides fue significativamente menor en las larvas infectadas incubadas a 32° y 37°C (75.4-50.5%) de manera similar a los niveles de la actividad PO en los mismos tratamientos (23.8 y 35.6% menos a 32° y 37°C respectivamente con respecto a la actividad a 27°C), esto significa una menor inmuno-competencia a estas temperaturas, tanto para la actividad PO como para el número de hemocitos. Una disminución similar de hemocitos junto con la actividad de PO se reportó en *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) a temperaturas de 22° a 28°C (Iltis *et al.*, 2018). Esta disminución del número de hemocitos, específicamente de los oenocitoides en larvas sanas, explica la menor actividad fenol oxidasa detectada, que como se mencionó, a mayor temperatura, mayor masa, es posible que esto genere que los oenocitoides se encuentren a menor concentración.

Al evaluar los pro-hemocitos y granulocitos, éstos se detectaron en mayor abundancia a 32°C (73 y 76.9% más respectivamente con respecto a 27°C); estos hemocitos no diferenciados se cumularon, sobre todo si se compara con la ausencia de células de este tipo en las larvas incubadas a 27°C. Los granulocitos tienen la capacidad de adherirse a las superficies de los agentes externos, además tienen actividad de fagocitosis (Wiegand *et al.*, 2000), y se ha reportado actividad de encapsulación de tejidos infectados por AcMNPV en *H. zea* (Trudeau *et al.*, 2001). La disminución de esferocitos en las larvas a las temperaturas por encima de 27°C (Lavine y Strand, 2002), lo que podría tener un efecto en la distribución de componentes cuticulares y la mayor masa del insecto por la temperatura.

Al evaluar el efecto de la temperatura en la expresión de genes relacionados a la respuesta inmune (Fig. 4) en larvas incubadas a 37°C, observamos que la *gloverina* estaba sobre-expresada 334 veces en comparación al control (larvas sanas a temperatura óptima 27°C). Se ha detectado un aumento de la expresión en las primeras horas de exposición a AcMNPV en *Helicoverpa armigera* (Wang *et al.*, 2010), y en *B. mori* por BmNPV (Bao *et al.*, 2010); así como una baja en la expresión de esta proteína en *S. exigua* expuesta a AcMNPV (Choi *et al.*, 2012). La principal prueba de actividad antivírica de la *gloverina* (específicamente a AcMNPV), se detectó en *T. ni* por Moreno-Habel *et al.* (2012), comprobando su expresión inducida por baculovirus; posteriormente, evaluaron un purificado de la proteína *gloverina*, con lo que disminuyó el número de células *Sf9* infectadas *in vitro*, confirmando así su actividad antivírica. Ellos determinaron que la *gloverina* interactúa con la capa de lípidos que envuelve la nucleocápside viral. Teóricamente esta sobre-expresión a los 37°C representaría una mejor defensa a la infección vírica; sin embargo, en nuestro caso esto no se vio reflejada en la mortalidad (Fig. 8), seguramente por la afección de la inmunocompetencia, como se vislumbró en la actividad PO y en el número de hemocitos totales.

En el caso de la *gloverina* se vio sobre expresada 52.5 veces como respuesta a la infección del NPV en comparación a las larvas sanas a la temperatura óptima (Fig. 5). Sin embargo, a 37°C la respuesta a esta infección solo expresó la *gloverina* 0.16 veces, comparada a la respuesta a los 27°C (Fig. 6). De hecho, la expresión de la *gloverina* entre larvas sanas e infectadas a 37°C varió muy poco (0.33 veces) con una amplia desviación estándar (Fig. 6), lo cual significa que la *gloverina* se está expresando por el aumento de la temperatura y no como una respuesta al NPVs, y esto se reflejó en la mortalidad (Fig. 8).

La baja expresión de PGRP a los 37°C en comparación a los 27°C (0.0027 veces) tendría un efecto muy importante en la respuesta inmune, ya que mediante el reconocimiento es la proteína encargada de la activación de la cascada proPO, activación del receptor Toll, activación de la ruta Imd, y la inducción de la fagocitosis (Kanost y Gorman, 2008). Esto tendría un gran efecto en las infecciones bacterianas, y concuerda con la disminución de la actividad PO.

A pesar de que la atacina es un péptido antimicrobiano que se activa por infecciones de bacterias Gram negativas, ésta se vio sobre-expresada en respuesta a la

infección vírica, 68.9 veces a 27°C y 525 veces a 37°C. La atacina puede inhibir el crecimiento bacteriano, uniéndose a la membrana, aumentando su permeabilidad y evitando la síntesis de proteínas externas de la membrana (Yi *et al.*, 2014).

Se ha visto que la temperatura tiene una tendencia a aumentar la expresión de genes de inmunidad en insectos; Li *et al.* (2017) reportaron un aumento en la expresión de genes de inmunidad a los 40°C. Sin embargo, muchos genes encargados de vías metabólicas como la glucólisis/gluconeogénesis y la biosíntesis de ácidos grasos fueron parcialmente reprimidos, y se aumentó la expresión de genes de las proteínas de choque térmico (HSP). Seehausen *et al.* (2016), estudiaron este efecto de la temperatura en la expresión de genes de *C. fumiferana* y el polidnavirus (Polydnaviridae) que es usado por la avispa *Tranosema rostrale* (Brischke), la cual lo utiliza para suprimir la respuesta inmune del hospedero. Se ha relacionado la expresión de las HSPs con el aumento en la respuesta inmune basal de los insectos. Se sabe que las HSPs están reguladas no sólo después del choque térmico, sino también en otras condiciones estresantes como baja temperatura, estrés osmótico y oxidativo, la hipoxia, el hacinamiento y la infección (Wojda, 2017). Esta activación no es por el estrés oxidativo provocado por infección de los tejidos del huésped por el patógeno invasor, sino que es una parte de la respuesta inmune sistémica, ya que se activa su expresión por la estimulación inmune al inyectar lipopolisacárido en la hemolinfa de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Altincicek *et al.*, 2008). En el caso de las infecciones con baculovirus, Lyupina *et al.* (2011) sugieren que específicamente la HSP90 tiene un papel en la replicación del virus, utilizando un inhibidor selectivo de HSP90, disminuyó la tasa de síntesis de ADN viral en células *Sf9* infectadas con *AcMNPV*, lo que sugiere un papel de HSP en la replicación del virus.

En este caso, teóricamente la activación de las HSPs se podría dar tanto por la infección con el virus como por la temperatura de 37°C, al ser estas proteínas detectadas en *T. ni* en un rango de 37° a 45°C (Schelling y Jones, 1996), lo cual coincide con el aumento de la mortalidad a esta temperatura.

El efecto de la temperatura en la susceptibilidad a la CL<sub>25</sub> fue muy notorio, pasando de una mortalidad del 24% a los 27°C, y de 41-48% a los 32° y 37°C respectivamente, presentándose una mayor mortalidad en el control, pero sin sobrepasar del 10% (Fig. 8). Silva y Elliot (2016) realizaron ensayos para ver el efecto de la temperatura y la densidad de la población de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) expuesta

al nucleopoliedrovirus múltiple de *A. gemmatalis* (AgMNPV), encontrando que la temperatura fue lo que afectó considerablemente el tiempo letal a temperaturas de 32°C con respecto a las temperaturas inferiores de 20 a 28°C; donde reportaron un aumento en la melanización usando filamentos de nailon (como agente externo en la hemolinfa) y en la coloración (por la temperatura alta) y una disminución del número de hemocitos. La densidad de la población no tuvo un efecto en el tiempo letal pero en el porcentaje de mortalidad sí.

Se sabe que las generaciones sobrevivientes a las infecciones de patógenos pueden mejorar su respuesta a una segunda infección o transferir su estimulación inmunológica a la siguiente generación (*immune priming*) (Contreras-Garduño *et al.*, 2016), esta preparación inmunológica se puede dar por infecciones bacterianas (Vargas *et al.*, 2016), por baculovirus (Tidbury *et al.*, 2011; Wilson y Graham, 2015; Shikano *et al.*, 2016), e inclusive por estrés físico, como lesiones y cambios de temperatura (Browne *et al.*, 2014). Este efecto se comprobó al repetir este ensayo con las larvas F2 criadas a partir de las larvas F1 sobrevivientes del primer ensayo. A los 27°C la mortalidad en la F2 en las larvas expuestas a la CL<sub>25</sub> fue igual al control de larvas sanas; sin embargo, esto no ocurrió a los 32° y 37°C, donde se obtuvo una mortalidad del 27 y 33% respectivamente (Fig. 8). Este efecto de *immune priming* posiblemente se podría ver opacado por el efecto de la temperatura en la susceptibilidad que, aunque resultó una menor mortalidad en la F2 en comparación a la F1 a los 32° y 37°C, no fue significativa, contrario a la temperatura óptima en donde no hubo diferencias entre los controles de la F1 y F2 a los 27°C (Fig. 9). Es importante aclarar que hay reportes que indican que las infecciones con baculovirus pueden bloquear parte de la respuesta inmune del insecto (Salem *et al.*, 2011; Jakubowska *et al.*, 2013).

En cuanto a la actividad PO, no hubo diferencia significativa entre las larvas F2 expuestas al virus, sólo las larvas control incubadas a 37°C presentaron menor actividad (Fig. 10); esto fue similar a las demás pruebas de actividad PO realizadas.

Al comparar la actividad PO entre las larvas F1 y F2 expuestas a las diferentes temperaturas, con o sin el NPV, no se detectaron diferencias significativas, pero en general se observó una tendencia de menor actividad entre larvas de la F2. El *immune priming* es un proceso que potencia la respuesta inmune de manera específica, con lo cual el insecto no desperdicia recursos en la respuesta a una infección ya conocida

(Cooper y Eleftherianos, 2017). En este estudio, seguramente la PO no jugó un papel directo en la respuesta a virus, por lo cual no se presentó una activación excesiva de proPO, de esta manera el insecto guarda recursos. Dado estos resultados, al haber un aumento en la temperatura de un solo día, se esperaría una mayor mortalidad residual a la infección con NPVs en las generaciones posteriores.

En cuanto a los cambios de temperatura y su efecto en la actividad PO, en la Fig. 12 se observó que a pesar que los 37°C disminuyen la actividad PO, el cambio de temperatura de 37°C a 27°C mejoró la respuesta inmune a la infección del virus (tratamiento 1), en comparación con el tratamiento 3, en el que la exposición al virus fue similar, pero manteniendo la temperatura de 27°C, no podríamos considerar que este aumento de la actividad PO se debiera a una recuperación de los efectos de los 37°C ya que, no se observó en los tratamientos con los mismos cambios de temperatura pero sin la presencia del virus (tratamientos 2 y 7), ni cuanto la infección se dio después del cambio de temperatura (tratamiento 5); sin embargo, en este último caso podría deberse al poco tiempo que tuvo para que la infección se estableciera, y con ello una respuesta inmune. Una respuesta similar fue reportada por Mowlds y Kavanagh (2008) en donde las larvas de *G. mellonella* preincubadas a 4° y 37°C durante 24 h antes de la infección con *C. albicans* mostraron una mayor respuesta inmune en comparación con los animales pre-tratados a su temperatura óptima (30°C). Por su amplio espectro, este aumento de la actividad PO representaría una ventaja para las infecciones con diferentes tipos de patógenos cuando se presenten eventos de calor en sus ecosistemas. Sin embargo, estos cambios de temperatura pueden ser perjudiciales para los insectos. Realizando una simulación de una onda de calor prolongada, Bauerfeind y Fischer (2014b) encontraron un deterioro importante en la supervivencia, el tamaño corporal y la longevidad en la mariposa *P. napi*, lo que respalda la idea de que los fenómenos meteorológicos extremos serán mucho más importantes para el rendimiento de la especie y la supervivencia en comparación con los aumentos moderados.

Todos estos resultados fortalecen el conocimiento con respecto a la respuesta fisiológica, específicamente el sistema inmune en insectos, al aumento de temperatura que en las últimas décadas ha sido más marcado, con nuestros resultados a nivel de laboratorio podríamos esperar una mayor efectividad de los NPVs como agentes de control biológico al aumentar la temperatura, sin embargo, es de gran importancia



recordar que este efecto benéfico para el control biológico puede ser perjudicial en especies que no representan un riesgo para nuestros cultivos, lo cual conlleva e implicaciones ecológicas no estudiadas.

## 8. CONCLUSIONES

- A mayor temperatura aumenta la susceptibilidad de *T. ni* a *AcMNPV*.
- El aumento de temperatura disminuye el número de hemocitos, específicamente los esferocitos, que son encargados del transporte de elementos cuticulares y oenocitoides encargados del metabolismo preliminar de fenoles, incluyendo la expresión y la activación de fenol oxidasa.
- A mayor temperatura, la actividad fenol oxidasa es menor, ya sea de manera basal o como respuesta a la infección con *AcMNPV*.
- Los genes *atacina* y *gloverina* se sobre-expresan en respuesta a la exposición a *AcMNPV*.
- El aumento de la temperatura de 27° a 37°C disminuye la expresión basal de péptidos antimicrobianos.
- La expresión de genes de péptidos antimicrobianos como respuesta a la exposición a *AcMNPV* no se activa a 37°C, incluyendo el gen de la *gloverina*.
- Las larvas de la F2 mantenidas a los 27°C son menos susceptibles a *AcMNPV*, pero no a 32° y 37°C.
- En las larvas F2 expuestas a *AcMNPV* no hubo una respuesta de la actividad fenol oxidasa.
- Los cambios de temperatura de 12 h pasando de 37° a 27°C pueden potenciar la actividad fenol oxidasa en respuesta a la infección por *AcMNPV*.

## **9. PERSPECTIVAS**

Evaluar el efecto de la temperatura en la respuesta inmune a otros entomopatógenos, principalmente hongos y parasitoides.

Estudiar las relaciones de las proteínas de choque térmico, sobre todo el efecto de su activación por temperatura en la respuesta inmune.

Evaluar expresión diferencial de genes, con lo cual se podrían diseñar métodos de control de plagas a base de ingeniería genética.

Evaluar el efecto de la temperatura y el dióxido de carbono en la respuesta inmune

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adamo SA, Lovett MME. 2011. Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Experimental Biology*, 214(12):1997–2004. DOI: 10.1242/jeb.056531
- Ai HS, Huang YC, Li SD, Weng SP, Yu XQ, He JG. 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is downregulated by white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.002>.
- Altermatt F. 2011. Climatic warming increases voltinism in European butterflies and moths. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 277(1685): 1281–1287 <http://doi.org/10.1098/rspb.2009.1910>.
- Altincicek B, Knorr E, Vilcinskas A. 2008. Beetle immunity: identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental & Comparative Immunology*. 32: 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.005>.
- Alto BW, Bettinardi D. 2013. Temperature and dengue virus infection in mosquitoes: Independent effects on the immature and adult stages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 88(3): 497–505. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0421.
- Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 202(2): 586–605. DOI: [10.1006/viro.1994.1380](https://doi.org/10.1006/viro.1994.1380).
- Bao Y, Lv Z, Liu Z, Xue J, Xu Y, Zhang C. 2010. Comparative analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus responsive genes in fat body and haemocyte of *B. mori* resistant and susceptible strains. *Insect Molecular Biology*. 19: 347-358. DOI:10.1111/j.1365-2583.2010.00993.x.
- Bauerfeind SS, Fischer K. 2014a. Integrating temperature and nutrition-environmental impacts on an insect immune system. *Journal of Insect Physiology*. 64(1): 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.03.003>.
- Bauerfeind SS, Fischer K. 2014b. Simulating climate change: Temperature extremes but not means diminish performance in a widespread butterfly. *Population Ecology*. 56(1):239–250. <https://doi.org/10.1007/s10144-013-0409-y>.
- Browne N, Surlis C, Kavanagh K. 2014. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*. 63: 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.006>.
- Cabodevilla O, Villar E, Virto C, Murillo R, Williams T, Caballero P. 2011. Intra and intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(9): 2954–2960. DOI: 10.1128/AEM.02762-10.
- Cai J, Ye GY, Hu C. 2001. Effect of parasitization by the pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) on humoral immune reactions of *Pieris rapae*

- (Lepidoptera: Pieridae). *Entomologia Sinica*. 8: 335–342.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2001.tb00459.x>
- Carbonell LF, Miller LK. 1987. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(7): 1412-1417.
- Catalán TP, Wozniak A, Niemeyer HM, Kalergis AM, Bozinovic F. 2012. Interplay between thermal and immune ecology: effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*. 58(3): 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.10.001>.
- Chen E, Kolosov D, O'Donnell MJ, Erlandson MA, McNeil JN, Donly C. 2018. The effect of diet on midgut and resulting changes in infectiousness of AcMNPV baculovirus in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Frontiers in Physiology*. 9: 1348.  
DOI: 10.3389/fphys.2018.01348.
- Chen YR, Zhong S, Fei Z, Gao S, Zhang S, Li Z, Wang P, Blissard GW. 2014. Transcriptome responses of the host *Trichoplusia ni* to infection by the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*. 88(23): 13781–13797. DOI: 10.1128/JVI.02243-14;88(23):13781-97.
- Choi JY, Roh JY, Wang Y, Zhen Z, Tao XY, Lee JH, Liu O, Kim JS, Shin SW, Je YO. 2012. Analysis of genes expression of *Spodoptera exigua* larvae upon AcMNPV infection. *PLOS ONE*, 7(7):e42462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042462>
- Clem RJ, Passarelli AL. 2013. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. *PLoS: Pathogens*, 9(11): e1003729. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003729.
- Contreras-Garduño J, Lanz-Mendoza H, Franco B, Nava A, Pedraza-Reyes M, Canales-Lazcano, J. 2016. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecological Entomology*, 41:351-366. DOI: [10.1111/een.12300](https://doi.org/10.1111/een.12300).
- Cooper, D., Eleftherianos, I. 2017. Memory and specificity in the insect immune system: current perspectives and future challenges. *Frontiers in Immunology*, 8(539). DOI: 10.3389/fimmu.2017.00539.
- Cory JS, Myers JH. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34(1): 239–272.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132402>.
- Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, Martin PR. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *PNAS*. 105: 6668–6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>.
- Eberle KE, Wennmann JT, Kleespies RG, Jehle JA. 2012. Basic techniques in insect virology. En: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Ed. L. A. Lacey, Chapter II, Second Ed., Academic Press, Washington, DC. pp. 5-74. ISBN 978-0-12-386899-2.
- Ehler LE, Miller JC. 1978. Biological control in temporary agroecosystems. *Entomophaga*. 23(3): 207-212.
- Elder BD, Reilly JR. 2014. Warmer temperatures increase disease transmission and outbreak intensity in a host-pathogen system. *Journal of Animal Ecology*, 83(4): 838–849. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12180>.

- Elliot SL, Blanford S, Thomas MB. 2002. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proceedings. Biological sciences.* 269(1500): 1599–1607. DOI:10.1098/rspb.2002.2067.
- Ferguson LV, Heinrichs DE, Sinclair BJ. 2016. Paradoxical acclimation responses in the thermal performance of insect immunity. *Oecologia*, 181(1): 77–85. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3529-6>.
- Ferguson LV, Kortet R, Sinclair BJ. 2018 Eco-immunology in the cold: the role of immunity in shaping the overwintering survival of ectotherms, *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb163873. DOI: 10.1242/jeb.163873.
- Frazier M, Huey R, Berrigan D. 2006. Thermodynamics constrains the evolution of insect population growth rates: “Warmer is better”. *American Naturalist*. 168: 512–520. <https://doi.org/10.1086/506977>.
- Freitag D, Wheat CW, Heckel DG, Vogel H. 2007. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. *BMC Biology*. 5:56. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-56>.
- Frid L, Myers JH. 2002. Thermal ecology of western tent caterpillars *Malacosoma californicum pluviale* and infection by nucleopolyhedrovirus. *Ecological Entomology*, 27: 665–673. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2311.2002.00460.x>
- Garrad R, Booth DT, Furlong MJ. 2016. The effect of rearing temperature on development, body size, energetics and fecundity of the diamondback moth. *Bulletin of Entomological Research*, 106(2): 175-181. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/toc/?report=reader>.
- Gherlenda AN, Haigh AM, Moore BD, Johnson SN, Riegler M. 2016. Climate change, nutrition and immunity: Effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on the immune function of an insect herbivore. *Journal of Insect Physiology*. 85: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.002>.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. 2015. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*. 7(5): 2230-2267. DOI:10.3390/v7052230.
- Harrison RL. 2009. Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101(3): 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.012>.
- Herniou EA, Olszewski JA, O'Reilly DR, Cory JS. 2004. Ancient Coevolution of Baculoviruses and Their Insect Hosts. *Journal of Virology*, 78(7):3244-3251; <https://10.1128/JVI.78.7.3244-3251.2004>
- Hughes L. 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution*. 15(2): 56–61. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01764-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01764-4).
- Hu YC. 2008. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Current Gene Therapy*. 8: 54-65. <https://doi.org/10.2174/156652308783688509>.
- Iltis C, Martel G, Thiéry D, Moreau J, Louâpre. 2018. When warmer means weaker: high temperatures reduce behavioural and immune defences of the larvae of a major

- grapevine pest. *Journal of Pest Science*. 91(4): 1315–1326.  
<https://doi.org/10.1007/s10340-018-0992-y>.
- Janmaat AF, Myers JH. 2005. The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1567): 1031-1038.
- Jakubowska AK, Vogel H, Herrero S. 2013. Increase in gut microbiota after immune suppression in baculovirus-infected larvae. *PLoS Pathogens*. 9. e1003379.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003379>.
- Javed MA, Biswas S, Willis LG, Harris S, Pritchard C, van Oers MM, Donly BC, Erlandson MA, Hegedus DD, Theilmann DA. 2017. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus AC83 is a *per os* infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes. *Journal of Virology*. 91:e02115-16.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02115-16>.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlaskin JM. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*. 151: 1257–1266.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>.
- Jiang H, Wang Y, Ma C, Kanost MR, 1997. Subunit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO–P1. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 27: 835–850. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00066-0).
- Kanost MR, Gorman MJ, 2008. Phenoloxidases in insect immunity. In: *Insect immunology*. Ed. N. Beckage. Academic Press, USA. pp 69–96.
- Karl I, Stoks R, De Block M, Janowitz SA, Fischer K. 2011. Temperature extremes and butterfly fitness: conflicting evidence from life history and immune function. *Global Change Biology*. 17(2): 676–687. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02277.x>
- Kobayashi M, Inagaki S, Kawase S, 1981. Effects of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 38(3):386-394. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90106-3).
- Koczka K, Peters P, Ernst W, Himmelbauer H, Nika L, Grabherr R. 2018. Comparative transcriptome analysis of a *Trichoplusia ni* cell line reveals distinct host responses to intracellular and secreted protein products expressed by recombinant baculoviruses. *Journal of Biotechnology*, 270:61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.001>.
- Kryukov VY, Yaroslavtseva ON, Whitten MM, Tyurin MV, Ficken KJ, Greig C, Melo NR, Glupov, VV, Dubovskiy IM, Butt TM. 2016. Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Insect Science*. 25(3): 454–466. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12426>.
- Kukan B, Myers JH. 1999. Dynamics of viral disease and population fluctuations in western tent caterpillars (Lepidoptera: Lasiocampidae) in southwestern British Columbia, Canada. *Environmental Entomology*. 28(1): 44–52. <https://doi.org/10.1093/ee/28.1.44>.

- Kwang TW, Zeng X, Wang S. 2016. Manufacturing of AcMNPV baculovirus vectors to enable gene therapy trials. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 3: 15050. DOI: 10.1038/mtm.2015.50.
- Lavine MD, Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1237-1242. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9).
- Lauber É, Darvas, B. 2009. Increased mortality of isolated first instar larvae of *Inachis io* (Lepidoptera). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 44(1): 111-117. <https://doi.org/10.1556/APhyt.44.2009.1.11>.
- Laughton AM, O'Connor CO, Knell RJ. 2017. Responses to a warming world: Integrating life history, immune investment, and pathogen resistance in a model insect species. *Ecology and Evolution*. 7(22): 9699-9710. DOI:10.1002/ece3.3506.
- Lawniczak MKN, Barnes AI, Linlater JR, Boone JM, Eigby S, Chapman T. 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*. 22(1): 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.012>.
- Liang CY, Wang HZ, Li TX, Hu ZH, Chen XW. 2004. High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. *Archives of Virology*, 149(1): 51–60. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0197-3>.
- Li R, Liu Y, Xu Y, Su H, Li X, Dai X, Zhou Y, Wang H. 2017. Comparative transcriptome analysis of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) reveals novel insights into heat stress tolerance in insects. *BMC Genomics*, 18(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4355-5>.
- Lyupina YV, Zatsepina OG, Timokhova AV, Orlova OV, Kostyuchenko MV, Beljelarskaya SN, Evgen'ev MB, Mikhailov VS. 2011. New insights into the induction of the heat shock proteins in baculovirus infected insect cells. *Virology*. 421: 34–41. DOI: 10.1016/j.virol.2011.09.010.
- Mandrioli M. 2012. Someone like it hot ? Effects of global warming on insect immunity and microbiota. *Invertebrate Survival Journal*. 9: 58–63. <http://www.isj.unimo.it/index.php/ISJ/article/view/259>.
- Mastore M, Quadroni S, Toscano A, Mottadelli N, Brivio MF. 2019. Susceptibility to entomopathogens and modulation of basal immunity in two insect models at different temperatures. *Journal of Thermal Biology*. 791: 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.006>.
- Mattson WJ, Haack RA. 1987. Role of drought in outbreaks of plant-eating insects. *BioScience*. 37: 110-118. DOI: 10.2307/1310365.
- McVean RI, Sait SM, Thompson DJ, Begon M. 2002. Effects of resource quality on the population dynamics of the Indian meal moth *Plodia interpunctella* and its granulovirus. *Oecologia*. 131(1): 71-78. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0862-8>.
- Mohamed MA, Coppel HC, Podgwaite JD. 1985. Temperature and crowding effects on virus manifestation in *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae) larvae. *Great Lakes Entomologist*. 18: 115-118. <https://scholar.valpo.edu/tgle/vol18/iss3/4>.
- Moreno-Habel DA, Biglang-Awa IM, Dulce A, DeeLuu D, Garcia P, Weers M, Haas-Stapleton EJ. 2012. Inactivation of the budded virus of *Autographa californica* M



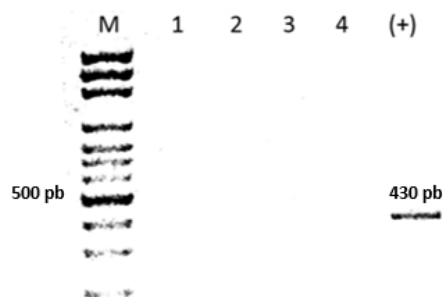
- nucleopolyhedrovirus by gloverin. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(1): 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.007>.
- Mowlds P, Kavanagh K, 2008. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 165(1): 5–12. DOI: 10.1007/s11046-007-9069-9.
- Mucklow PT, Vizoso DB, Jensen KH, Refardt D, Ebert D. 2004. Variation in phenoloxidase activity and its relation to parasite resistance within and between populations of *Daphnia magna*. *Proceedings. Biological Sciences*, 271 (1544): 1175–1183. DOI: 10.1098/rspb.2004.2707.
- Murdock CC, Paaijmans KP, Bell AS, King JG, Hillyer JF, Read AF, Thomas MB. 2012. Complex effects of temperature on mosquito immune function. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 279(1741): 3357–3366. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0638>.
- Reeson AF, Wilson K, Gunn A, Hails RS, Goulson D. 1998. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 265(1407): 1787–1791. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0503>.
- Renault D, McCauley SJ, Laparie M. 2018. Environmental adaptations, ecological filtering and dispersal central to insect invasions. *Annual Review of Entomology*. 63: 345–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043315>.
- Ribeiro HCT, Pavan OHO. 1994. Effect of temperature on the development of baculoviruses. *Journal of Applied Entomology*. 118: 316–320. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1994.tb00806.x>.
- Rohrmann GF. 2013a. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. En: baculovirus Molecular Biology. 3rd edition. Chapter 3. Bethesda, MD. National Center for Biotechnology Information, USA.
- Rohrmann GF. 2013b. Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution. En: Baculovirus Molecular Biology. 3rd edition. Chapter 1. Bethesda, MD. National Center for Biotechnology Information, USA.
- Rohrmann GF. 2013c. Selected baculovirus genes without orthologs in the AcMNPV genome: Conservation and function. En: Baculovirus Molecular Biology. 3rd edition. Chapter 13. Bethesda, MD. National Center for Biotechnology Information, USA.
- Saejeng A, Tidbury H, Siva-Jothy MT, Boots M. 2010. Examining the relationship between hemolymph phenol oxidase and resistance to a DNA virus, *Plodia interpunctella* granulosis virus (PiGV). *Journal of Insect Physiology*. 56: 1232–1236. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1994.tb00806.x>.
- Samuel GH, Adelman ZN, Myles KM. 2017. Temperature-dependent effects on the replication and transmission of arthropod-borne viruses in their insect hosts. *Current Opinion in Insect Science*. 16: 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.06.005>.
- Schelling D, Jones D. 1996. Analysis of induction of hsc70, hsp82 and juvenile hormone esterase genes by heat shock in *Trichoplusia ni*. *Journal of Insect Physiology*. (42)4: 295–30. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00094-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00094-1).

- Schmidt O, Theopold U, Beckage NE. 2008. Insect and vertebrate immunity: key similarities versus differences. En: *Insect Immunology*. Ed. N. E. Beckage. Elsevier: San Diego, CA, USA. pp. 1-24.
- Schwartz A, Koella JC. 2004. The cost of immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* depends on immune activation. *Journal of Evolutionary Biology*. 17(4): 834-840. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00720.x>
- Seehausen ML, Cusson M, Régnière J, Bory M, Stewart D, Djoumad A, Smith SM, Martel V 2016. High temperature induces downregulation of polydnavirus gene transcription in lepidopteran host and enhances accumulation of host immunity gene transcripts. *Journal of Insect Physiology*. 98: 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.12.008>.
- Senthil-Nathan S. 2015. A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. In: Thangavel P., Sridevi G. (eds) *Environmental Sustainability*. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5_3)
- Silva FW, Elliot SL. 2016. Temperature and population density: Interactional effects of environmental factors on phenotypic plasticity, immune defenses, and disease resistance in an insect pest. *Ecology and Evolution*. 6(11): 3672–3683. <https://doi.org/10.1002/ece3.2158>.
- Slavicek JM. 2012. Baculovirus enhancins and their role in viral pathogenicity. En: *Molecular Virology*. Ed. M. P. Adoga. InTech, Rijeka, Croatia. pp. 147-168.
- Shao-Hua C, Hong-Liang S, Zuo-Hu L, Zuo-Hu LI. 1998. Effect of temperature oscillation on insect cell growth and baculovirus replication. *Applied and Environmental Microbiology*. 6(6): 2237-2239.
- Shelby KS, Popham HJR. 2006. Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal, *Journal of Insect Science*, 6(1). [https://doi.org/10.1673/2006\\_06\\_13.1](https://doi.org/10.1673/2006_06_13.1).
- Shikano I, Hua KN, Cory JS. 2016. Baculovirus-challenge and poor nutrition inflict within-generation fitness costs without triggering transgenerational immune priming. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136:35-42. DOI: 10.1016/j.jip.2016.03.001.
- Shrestha A, Bao K, Chen Y, Chen W, Wang P, Fei Z, Blissard GW. 2018. Global analysis of baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus gene expression in the midgut of the lepidopteran host *Trichoplusia ni*. *Journal of Virology*. 92(23): e01277-18. DOI: 10.1128/JVI.01277-18.
- Song J, Wang X, Hou D, Huang H, Liu X, Deng F, Wang H, Arif BM, Hu Z, Wang M. 2016. The host specificities of baculovirus *per os* infectivity factors. *PLoS ONE*. 11(7): e0159862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159862>.
- Sparks WO, Bartholomay LC, BC, Bonning. 2008. Insect immunity to viruses. En: *Insect Immunology*. Ed. N. E. Beckage. Elsevier, San Diego, CA, USA. pp. 209-242.
- Springate S, Matthew BT. 2005. Thermal biology of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*, and the implications for resistance to disease. *Ecological Entomology*. 30: 724–732. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2005.00743.x>.
- SPSS. 2008. Version 17.0. SPSS Inc., an IBM Company. Chicago, Illinois.

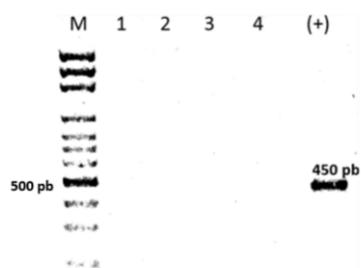
- Strand MR. 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. En: Insect immunology. Ed. N. E. Beckage. Elsevier, San Diego, CA, USA. pp. 25–49.
- Suwanchaichinda C, Paskewitz SM. 1998. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to melanize Sephadex beads. *Journal of Medical Entomology*. 35(2): 157-161. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.2.157>.
- Tamez-Guerra P, Damas G, Iracheta MM, Oppert B, Gomez-Flores R, Rodríguez-Padilla C. 2006. Differences in susceptibility and physiological fitness of Mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 99(3): 937-945. <https://doi.org/10.1093/jee/99.3.937>.
- Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Hamm JJ, Sumner HR, Shasha BS. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 93(2): 210-218. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.210>.
- Tamez-Guerra P, Castro-Franco R, Medrano-Roldán H, McGuire MR, Galán-Wong LJ, Luna-Olvera HA. 1998. Laboratory and field comparisons of serovars of *Bacillus thuringiensis* for activity against lepidopteran larvae using granular formulations. *Journal of Economic Entomology*. 91: 86-93. <https://doi.org/10.1093/jee/91.1.86>.
- Tiewsiriri K, Wang P. 2011. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *PNAS*. 108(34): 14037-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102555108>.
- Tidbury HJ, Pedersen AB, Boots M. 2011 Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 278(1707):871–876. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1517>.
- Toba HH, Kishaba AN, Pangaldan R, Vail PV. 1973. Temperature and the development of the cabbage looper. *Annals of the Entomological Society of America*. 66(15): 965-974. <https://doi.org/10.1093/aesa/66.5.965>.
- Trudeau D, Washburn JE, Volkman LE. 2001. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *Journal of Virology*. 75(2): 996-1003. DOI: 10.1128/JVI.75.2.996-1003.2001.
- Tsakas S, Marmaras VJ. 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 228–238. <http://www.isj.unimo.it/index.php/ISJ/article/view/225>.
- Vail PV, Sutter G, Jay DL, Gough G. 1971. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *Journal of Invertebrate Pathology*. 17(3): 383–388. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90013-9).
- Valadez-Lira JA, Medina-Chavez NO, Orozco-Flores AA, Antonio J, Fuente AO, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra R, Tamez-Guerra P. 2017. Physiological ecology alterations of immune parameters on *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Environmental Entomology*. 46(2): 376-382. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx037>.

- Vargas V, Moreno-García M, Duarte-Elguea E, Lanz-Mendoza H. 2016. Limited specificity in the injury and infection priming against bacteria in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Frontiers in Microbiology*, 7(975). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00975.
- Wang Q, Liu Y, He HJ, Zhao XF, Wang JX. 2010. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. *BMC Immunology*. 11(1): 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-9>.
- Wiegand C, Levin D, Gillespie JP, Willott E, Kanost MR, Trenczek T. 2000. Monoclonal antibody M13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 45: 95–108. [https://doi.org/10.1002/1520-6327\(200011\)45:3<95::AID-ARCHI>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1520-6327(200011)45:3<95::AID-ARCHI>3.0.CO;2-0).
- Williams T, Bergoin M, Monique M, Van Oers. 2017. Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*. 147: 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.001>.
- Wilson K, Graham RI. 2015 Transgenerational effects modulate density dependent prophylactic resistance to viral infection in a lepidopteran pest. *Biology Letters*, 11(3): 20150012. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0012>.
- Wojda I. 2017. Temperature stress and insect immunity. *Journal of Thermal Biology*. 68: 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.12.002>.
- Woo SD. 2001. Rapid detection of multiple nucleopolyhedroviruses using polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 11(3): 334–340.
- Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(13): 5807–5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>.

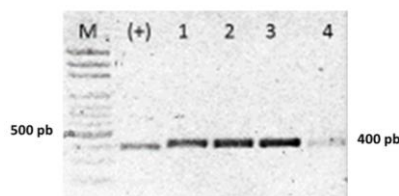
## 10 ANEXOS



**Anexo 1.** Amplificación por PCR de fragmento del gen de la poliedrina; M= Marcador de peso molecular, carriles 1-4= larvas diferentes lotes de la cría de *T. ni*, (+) =control positivo (ADN de larvas de *Spodoptera exigua* infectadas con *SeNPV*).



**Anexo 2.** Amplificación por PCR de fragmento del gen *lef-8*; M= Marcador de peso molecular, carriles 1-4= larvas diferentes lotes de la cría de *T. ni*, (+) =control positivo (ADN de larvas de *Spodoptera exigua* infectadas con *SeNPV*).



**Anexo 3.** Amplificación por PCR de fragmento del gen *18 S ARNr* como control de extracción de ADN; M= Marcador de peso molecular, (+) =control positivo (ADN de larvas de *Spodoptera exigua* infectadas con *SeNPV*), carriles 1-4= larvas diferentes lotes de la cría de *T. ni*.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Alonso Alberto Orozco Flores

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA INMUNE DE  
*Trichoplusia ni* A BAJAS CONCENTRACIONES DE *AcMNPV*

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacido en Durango Dgo. El 5 de Enero de 1988, hijo de Martha  
Alicia Flores Rocha y Andrés Arturo Orozco Gonzales.

Educación: Egresado del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana en el 2011 con el grado de Licenciado en Biología con mención honorífica. Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2013 con el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

Experiencia Profesional. Maestro por horas de las materias de Diagnóstico Molecular, Microbiología Ambiental, Biotecnología Ambiental y Biología Molecular en la UANL, Personal Profesional no Docente de la UANL desde 2017. Asesor de 11 alumnos de licenciatura titulados, en proceso de titulación dos alumnos de Maestría y cuatro Alumnos de licenciatura.

Autor de cinco Artículos Científicos con Factor de Impacto



Physiological Ecology

**Alterations of Immune Parameters on *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Exposed to Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields**

Jose A. Valadez-Lira,<sup>1</sup> Nahui O. Medina-Chavez,<sup>1</sup> Alonso A. Orozco-Flores,<sup>1</sup> J. Antonio Heredia-Rojas,<sup>2</sup> Abraham O. Rodriguez-de la Fuente,<sup>2</sup> Ricardo Gomez-Flores,<sup>1</sup> Juan M. Alcocer-Gonzalez,<sup>1</sup> and Patricia Tamez-Guerra<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, 66455 (jalvalir@hotmail.com; nahuimedina@hotmail.com; lacxelo@gmail.com; rgomez60@hotmail.com; juan.alcocer@uanl.edu.mx; patricia.tamez@uanl.edu.mx), <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, 66455 (jose.heredia@uanl.edu.mx; abraham.rodriguez@uanl.edu.mx), and <sup>3</sup>Corresponding author, e-mail: patricia.tamez@uanl.edu.mx

Subject Editor: Kelly Johnson

Received 12 August 2016; Editorial decision 5 January 2017

**Abstract**

Worldwide mobile telephone and microwave use have resulted in an increasing presence of extremely low-frequency electromagnetic field radiations (ELF-EMFs) in ecosystems. ELF-EMFs have been associated with altered physiological processes that can adversely affect exposed organisms. In this study, *Trichoplusia ni* Hübner larvae were exposed for 24, 48, or 72 h to ELF-EMFs (60 Hz and 2.0 mT) to assess effects on immune response parameters and fertility. *Trichoplusia ni* life cycle and fertility were not affected by 24-h exposure. However, the number of apoptotic-like cells and cellular immune response significantly increased ( $P < 0.01$ ) after 72-h exposure (2- and 1.1-fold, respectively), whereas hemolymph total protein and hemocyte cells were reduced ( $P < 0.01$ ; 16 and 50%, respectively) after 48-h exposure. Hemocyte cell type analysis resulted in significantly ( $P < 0.01$ ) higher granulocytes number in the unexposed (2-fold increase) and oenocytoids in the 72-h-exposed larvae (28.6-fold increase). Quantitative retrotranscription (RT-qPCR) showed that after 72-h ELF-EMF exposure, the antimicrobial peptides *cecropin*, *lysozyme*, *gallerimycin*, and *pgrp* were downregulated by 24,866.0, 2.69-, 119.1-, and 1.45-fold, respectively, whereas *attacin* and *defensin* were upregulated by 1.59- and 1.85-fold, respectively. The effect of ELF-EMFs on the *T. ni* larvae immune response and their potential impact on its physiology and susceptibility to pathogens are discussed. This information may provide new insight of ELF-EMFs on other pest species, as well as for the preservation of ecologically important species.

**Key words:** Lepidopteran antimicrobial peptide, hemocyte, apoptosis, hemolymph, immunomodulation

Insects are essential components of ecosystems because of their high abundance and species diversity, and their key roles in the food chain. Insects have the capacity to orient and navigate by receiving electromagnetic fields (EMFs) from a variety of sources. Nowadays, the presence of extremely low-frequency electromagnetic radiation fields (ELF-EMFs) has exponentially increased in ecosystems, because of the electricity grid extension (Cucurachi et al. 2013) and increased use of mobile phone technology. ELF-EMFs have become part of the abiotic environment that can potentially affect physiological processes of exposed organisms. Insects are useful as research tools to evaluate the potential biological adverse effects of EMFs, due to their small size, short life cycles, and ease of detecting metabolic, physiological, and morphological changes.

Negative EMF effects on insects include chromosomal aberrations, higher mortality rate, lower oviposition rate, and morphological abnormalities, among others (Di Carlo et al. 1999, Ramirez et al. 1983, McCann et al. 1998). Nevertheless, only few studies of these effects on Lepidoptera have been reported to date. In one of these studies, exposure of *Manduca sexta* L. larvae to 2,695 MHz resulted in 50% lower larval growth, increased mortality, and lower adult reproduction rates, compared with untreated controls (Schwartz et al. 1985). Ryu et al. (2009) evaluated behavioral changes in *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae). After exposing third-instar larvae to 60 Hz of ELF-EMF for up to three times for 1-h periods under sham conditions, larvae reduced their locomotion compared with the unexposed larvae. In contrast, when larvae were under continuous 60 Hz exposure, a significant

©The Authors 2017. Published by Oxford University Press on behalf of Entomological Society of America. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com



## Regulation by gut bacteria of immune response, *Bacillus thuringiensis* susceptibility and hemolin expression in *Plodia interpunctella*



Alonso A. Orozco-Flores<sup>a</sup>, Jose A. Valadez-Lira<sup>a</sup>, Brenda Oppert<sup>b</sup>, Ricardo Gomez-Flores<sup>a</sup>, Reyes Tamez-Guerra<sup>a</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla<sup>a</sup>, Patricia Tamez-Guerra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. 66455, Mexico

<sup>b</sup> USDA, Agricultural Research Service, Center for Grain and Animal Health Research, 1515 College Ave., Manhattan, KS 66502, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 September 2016

Received in revised form 9 January 2017

Accepted 16 January 2017

Available online 3 February 2017

#### Keywords:

Bt-resistance

Gut bacteria

Hemocytes

Phenoloxidase activity

### ABSTRACT

*Plodia interpunctella* (Hübner) is an important stored grain insect pest worldwide, and the first lepidopteran with reported resistance to *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins. Since gut bacteria may affect insecticidal activity, we evaluated whether *P. interpunctella* lacking gut bacteria had differences in immune responses and susceptibility to the Bt formulation, Bactospeine. In order to clear gut bacteria, third instar larvae were reared on artificial diet containing antibiotics, or were obtained from sterilized eggs and reared under sterile conditions, and larvae were fed diets with or without Bt. Mortality was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in bacteria-free larvae treated with Bt, compared with Bt-treated larvae with unaffected gut bacteria. The number of hemocytes was lower in control and Bt-treated larvae, but was significantly higher ( $p < 0.001$ ) in larvae treated with antibiotics and Bt, and larvae from presterilized eggs and reared on sterile diet had the highest number of hemocytes. Phenoloxidase activity was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in Bt-treated larvae from presterilized eggs reared on antibiotics for 24 h or in larvae reared on antibiotic-treated diets prior to Bt introduction compared with those fed control diet. Hemolin gene expression was reduced in larvae fed Bt diets compared with control and was not detected in larvae treated with antibiotics. Larvae from sterilized eggs and fed sterile diet never reached the pupal stage. Therefore, the loss of gut bacteria in *P. interpunctella* larvae affected the host immune response and expression of the hemolin gene, and significantly reduced susceptibility to Bt.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The Indianmeal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Pyralidae), is an insect pest of stored grains and flour, and also attacks garlic bulbs and packaged goods. Every year, millions of dollars are lost worldwide due to *P. interpunctella* (Mohandass et al., 2007). Organic insecticides used to control this pest include the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner.

Some studies have suggested that gut bacteria are important in the insect response to Bt. When gut bacteria were eliminated by antibiotic-supplied diets, susceptibility to Bt was significantly reduced in Lepidoptera species (Broderick et al., 2006, 2010). Their findings were in contrast to those of Frankenhuyzen et al. (2010) and Johnston and Crickmore (2009), who related changes in the susceptibility of insects to Bt that were independent from micro-

biota, but were associated with the effect of antibiotics in the insect. Recently, expression of an immune response gene was decreased by RNAi in *Spodoptera littoralis* Boisduval, which increased susceptibility to Bt and was linked to the proliferation of bacteria in the gut, contributing to septicemia (Caccia et al., 2016). Bt toxicity may depend on direct or indirect interactions between the entomopathogen and the intestinal microbial community, as bacteria are associated with growth and development and may contribute to reproduction, digestion, nutrition, and pheromone production (Dillon and Dillon, 2004).

Receptors of the insects' immune system recognize bacterial peptidoglycans, resulting in signal transduction, which in turn results in induction of the immune response, such as the production of antimicrobial peptides (AMPs) (Kim et al., 2008). The humoral component of the immune response includes increased production of AMPs and induction of phenoloxidase (PO) cascade-mediated melanization, whereas the cellular response involves phagocytosis by circulating hemocytes (Kim et al., 2008; Vizioli and Salzet, 2002), cell aggregation, nodulation, and encapsulation (Lavine and Strand, 2002). In addition, endosymbiotic bac-

\* Corresponding author at: AP 46-F, PCB-UANI, San Nicolás de los Garza, N. L. 66451, Mexico.

E-mail addresses: patricia.tamezgr@uanl.edu.mx, patamez@hotmail.com (P. Tamez-Guerra).





## Prevalence of Proteobacteria and Armatimonadetes phyla in a Photobioreactor under Carbon and Nitrogen-Free Production Process

Patricia Tamez-Guerra<sup>1</sup>, Jesús O. Zuñiga-Sánchez<sup>1</sup>, Alonso A. Orozco-Flores<sup>1</sup>, Jose A. Valadez-Lira<sup>1</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla<sup>1</sup>, Rosa O. Cañizares-Villanueva<sup>2</sup> and Ricardo Gomez-Flores<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Instituto Politécnico Nacional, San Pedro Zacatenco, México

\*Corresponding author: Patricia Tamez-Guerra, Department of Microbiology and Immunology, Autonomous University of Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico; Tel: +0115281-83298-4000; E-mail: patamez@hotmail.com

Received date: March 29, 2017; Accepted date: April 25, 2017; Published date: May 02, 2017

Copyright: © 2017 Guerra P, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

In prokaryotes, the autotrophic population within the bacteria kingdom presents great biotechnological potential. For taxonomic analysis of species, the sequence encoding the small subunit ribosomal RNA gene (16S rRNA) is currently the most reliable technique for phylogenetic bacterial classification. Sequencing can define the population diversity and ecological importance within a habitat. The study of autotrophic bacteria population dynamics in a photobioreactor using a carbon and nitrogen free culture medium could provide information about succession dynamics under controlled conditions. The aim of this study was to identify the bacterial populations present in a photobioreactor by 16S rRNA amplicon sequence comparison from samples taken at 0, 7, and 14 fermentation days. Most of the identified clones were described to the level of genera from the following phyla: Proteobacteria (40%), Armatimonadetes (35%), Firmicutes (17.5%), Actinobacteria (2.5%), and Cyanobacteria/Chloroplast (2.5%). Bacterial strains from those phyla have been reported in aquatic environments and were considered uncultivable; however, sequences indicated the presence of the clones A-123 (ID: HQ860522.1) from time 0, and YHS25 (GU305825.1) after 7 days of culture. Our findings demonstrated the major presence of autotrophic bacterial populations of the Proteobacteria and Armatimonadetes phyla, which grew under artificial culture conditions in a photobioreactor.

**Keywords:** Prokaryotes; Autotroph population; Biotechnology; Bacterial adaptation; Aquatic environments

### Introduction

Among aquatic microorganisms, cyanobacteria are prokaryotic cells with a wide morphological diversity including unicellular, colonial, and filamentous forms. They are distributed in terrestrial, freshwater, and saltwater, and even in extreme environments [1]. Nitrogen and phosphorus are essential nutrients for aquatic microorganism growth. Cyanobacteria grow better than other phytoplankton organisms in limiting nitrogen and/or phosphorus environmental conditions, partly due to their ability to store significant phosphorus amounts (sufficient for two to four cell divisions, increasing their biomass 4 to 32 times), and some species fix atmospheric dinitrogen [2].

Microalgae and cyanobacteria have great biotechnological potential to produce valuable substances for the food, cosmetics, and pharmaceutical industries *via* biotechnological processes. The physicochemical and technological bases for photobioreactors design are the most important prototrophic topics for economic success in biotechnology. For future applications, open ponds systems for large scale production possess lower innovative potential compared with the closed batch system. For high value products, and in spite of the different design approaches, a closed photobioreactor is the most promising technical system [3].

In recent years, there has been a growing interest in the metabolic properties of several enzymes and secondary metabolites produced by

bacteria that have demonstrated their potential use in applied biotechnology. The bacteria kingdom represents a wide diversity of microorganisms with complex metabolism. Among autotrophic bacteria, recent highlights have demonstrated the importance of cyanobacteria due to the great biotechnological potential of their photosynthesis and dinitrogen fixation metabolic properties [4]. Based on their relationship in microbial communities with other bacteria populations, there is a need to define the taxonomy of autotrophic bacteria, using not only taxonomic criteria, but also a phylogenetic approach [5].

Traditionally, cyanobacteria have been classified based on morphological and ecological characters [6]; however, such subjective judgments can lead to errors and misidentification, resulting in an unreliable taxonomic assignment of isolates. Furthermore, the morphological changes induced by culture conditions and phenotypic plasticity of cyanobacteria may also lead to taxonomic identification mistakes. To address these problems, molecular markers such as 16S rRNA have become reliable for strains identification.

In order to phylogenetically identify microbial populations, the use of the 16S rRNA sequence can reveal the diversity and relationship of these organisms under natural and/or artificial conditions, presenting diverse physical, chemical, and nutritional environmental habitats, where these metabolites of industrial importance are produced and released [5,7]. The study of autotrophic bacteria population dynamics in an artificial media, such as a photobioreactor, can provide information on the timing of secondary metabolites production.



# Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria

Maria J. Ek-Ramos<sup>1</sup>, Ricardo Gomez-Flores<sup>1</sup>, Alonso A. Orozco-Flores<sup>1</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla<sup>1</sup>, Guadalupe González-Ochoa<sup>2</sup> and Patricia Tamez-Guerra<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico, <sup>2</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, División de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Sonora, Navojoa, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

José E. Barboza-Corona,  
Universidad de Guanajuato, Mexico

### Reviewed by:

Ashutosh Sharma,  
Tecnologico de Monterrey, Mexico  
Tapan Kumar Adhya,  
KIIT University, India

### \*Correspondence:

Patricia Tamez-Guerra  
patamez@hotmail.com;  
patricia.tamezgr@uanl.edu.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbiotechnology, Ecotoxicology  
and Bioremediation,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 29 October 2018

Accepted: 21 February 2019

Published: 29 March 2019

### Citation:

Ek-Ramos MJ, Gomez-Flores R,  
Orozco-Flores AA,  
Rodríguez-Padilla C,  
González-Ochoa G and  
Tamez-Guerra P (2019) Bioactive  
Products From Plant-Endophytic  
Gram-Positive Bacteria.  
Front. Microbiol. 10:463.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.00463

Endophytes constitute plant-colonizing microorganisms in a mutualistic symbiosis relationship. They are found in most ecosystems reducing plant crops' biotic and abiotic stressors by stimulating immune responses, excluding plant pathogens by niche competition, and participating in antioxidant activities and phenylpropanoid metabolism, whose activation produces plant defense, structural support, and survival molecules. In fact, metabolomic studies have demonstrated that endophyte genes associated to specific metabolites are involved in plant growth promotion (PGP) by stimulating plant hormones production such as auxins and gibberellins or as plant protective agents against microbial pathogens, cancer, and insect pests, but eco-friendly and eco-safe. A number of metabolites of Gram-positive endophytes isolated from agriculture, forest, mangrove, and medicinal plants, mainly related to the Firmicutes phyla, possess distinctive biocontrol and plant growth-promoting activities. In general, Actinobacteria and *Bacillus* endophytes produce aromatic compounds, lipopeptides, plant hormones, polysaccharides, and several enzymes linked to phenylpropanoid metabolism, thus representing high potential for PGP and crop management strategies. Furthermore, Actinobacteria have been shown to produce metabolites with antimicrobial and antitumor activities, useful in agriculture, medicine, and veterinary areas. The great endophytes diversity, their metabolites production, and their adaptation to stress conditions make them a suitable and unlimited source of novel metabolites, whose application could reduce agrochemicals usage in food and drugs production.

**Keywords:** metabolites, amylases, chitinases, endoglucanases, esterases, proteases, plant hormones, toxins

## INTRODUCTION TO ENDOPHYTES

Endophytes are facultative or obligate symbiotic microorganisms, mainly bacterial and fungal species, that live in apparently healthy internal plant tissues, without causing disease (Schulz and Boyle, 2006). The most studied ones are bacterial and fungal species.

The purpose of this minireview is to highlight the importance of previously reported endophytic Gram-positive bacteria bioactive products. The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources estimates that there are about 297,326 species of plants (Monocotyledons, Dicotyledons, Gymnosperms, Ferns and allies and Mosses), but only a few of them have been studied for their endophyte