

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA

ESTIMULACIÓN INMUNITARIA CONTRA HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
EN *Rhodnius pallescens*

Por:
MILEXI YANIL MOLINAR OJO

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

**ESTIMULACIÓN INMUNITARIA CONTRA HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
EN *Rhodnius pallescens***

TESIS

Sometida para optar al título de Magíster en Ciencias con especialización en Entomología

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

Permiso para su publicación y reproducción total o parcial debe ser sometido en la
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado.

APROBADO:

_____ ASESOR

_____ JURADO

_____ JURADO

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi madre Graciela Ojo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Doctor Dumas Gálvez, asesor de tesis por su disposición y tiempo al asesorarme durante mi formación académica.

A los co-asesores, Dr. Jose R. Loaiza y Dr. Armando Castillo por el tiempo dedicado y las recomendaciones brindadas.

A el Doctor Azael Saldaña y la Doctora Indira Espino, por brindar materiales y asesoramiento para la tesis.

A Cecilio Montero, mi madre y hermanos por su ayuda en diferentes etapas de la elaboración del proyecto de tesis.

A La Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (SENACYT), Universidad de Panamá, Programa Centroamericano de Maestría en Entomología (PCMENT), Centro de Investigaciones Parasitarias de la Universidad de Panamá (CIDEP), Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), por brindarme apoyo financiero y facilidades para la realización de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
1.1. La estimulación inmunitaria	7
1.2. Hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i>	9
1.3. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Chinchas de laboratorio	15
3.2 Colecta de chinchas en campo	16
3.3 Obtención de hongo entomopatógeno	18
3.4 Inoculación de chinchas con <i>Beauveria bassiana</i>	19
3.4.1 Pruebas de resistencia	19
3.4.2 Pruebas de estimulación inmunitaria	20
3.5 Estimación de los niveles de fenoloxidasa total (fenoloxidasa más profenoloxidasa)	23
3.6 Análisis estadísticos	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Experimento 1: Prueba de resistencia contra <i>B. bassiana</i> y efecto del sexo	26
4.2 Experimento 2: Estimulación inmunitaria contra <i>B. bassiana</i> y efecto del sexo	28
4.3 Experimento 3: Estimulación inmunitaria medida con los niveles de fenoloxidasa total (fenoloxidasa más profenoloxidasa)	29
5. DISCUSIÓN	31
5.1 Experimento 1: Prueba de resistencia de <i>R. pallescens</i> contra <i>B. bassiana</i> y efecto del sexo	31
5.2 Experimento 2: Estimulación inmunitaria contra <i>B. bassiana</i> y efecto del sexo	32
5.3 Experimento 3: Estimación de los niveles de fenoloxidasa total (fenoloxidasa más profenoloxidasa)	33
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
6.1 Conclusiones	37
6.2 Recomendaciones	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Tratamientos utilizados para evaluar la tasa de resistencia individual de <i>Rhodnius pallescens</i> contra el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .	21
Cuadro 2. Tratamientos utilizados para la prueba de estimulación inmunitaria individual de <i>Rhodnius pallescens</i> contra el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .	22

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	<i>Rhodnius pallescens</i> chinche vector de mal de chagas	7
Figura 2.	Células conidiógenas globosas de <i>Beauveria bassiana</i>	10
Figura 3.	Ciclo de vida de un hongo entomopatógeno	13
Figura 4a.	<i>Rhodnius pallescens</i> en el laboratorio. Frasco de vidrio con chinches.	15
Figura 4b.	Chinches alimentándose de sangre de gallinas (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	15
Figura 5.	Área de estudio: Distrito de Capira, Corregimiento de Trinidad de las Minas, Provincia de Panamá Oeste	17
Figura 6a.	Palma real (<i>Attalea butyracea</i>)	17
Figura 6b.	Ratones blancos utilizados como cebos (<i>Mus musculus</i>)	17
Figura 7a,	Detalles de las trampas para colectar los chinches. Trampas	18
b.	listas para la colocación en las palmas con vara extensible	
Figura 7c,	Chinches colectados en las trampas	18
d.		
Figura 8a.	Hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> en medio de cultivo PDA	19
Figura 8b.	Cadáver de chinche inoculado con el hongo	19
Figura 9a.	Cuantificación de conidios con el uso de una cámara de Neubauer	20
Figura 9b.	Detalle de los conidios de <i>B. bassiana</i>	21
Figura 10.	Inoculación del hongo <i>B. bassiana</i>	23
Figura 11.	Chinches en recipientes plásticos	23
Figura 12.	Maceración de chinches en Cacodilato de sodio 0.2 M	25
Figura 13.	Supervivencia de <i>R. pallescens</i> a dos inoculaciones con la solución control (Control-Control, n = 95), una primera inoculación con el hongo y luego el control (Hongo-Control, n = 72) o doble inoculación con el hongo (Hongo-Hongo, n = 45).	27
Figura 14.	Supervivencia de <i>R. pallescens</i> a diferentes inoculaciones (Control-Control, Hongo-Control y Hongo-Hongo) evaluado con la variable sexo.	27
Figura 15.	Supervivencia de <i>R. pallescens</i> a dos inoculaciones con la solución control (Control-Control), una primera inoculación con el control y luego dosis alta del hongo (Control - Hongo); una primera inoculación con una dosis baja del hongo y luego el control (Hongo-Control) y doble inoculación con el hongo; primero baja y luego alta (Hongo-Hongo).	28
Figura 16.	Estimulación inmunitaria de <i>R. pallescens</i> y el efecto general del sexo (tratamientos combinados).	29
Figura 17.	Niveles de fenoloxidasa total (medido como velocidad máxima Vmax) en muestras de chinches inoculados con una dosis baja	30

del hongo entomopatógeno (9×10^2 conidios/ml, n= 22) y con la solución control (n= 22).

RESUMEN

Se ha asumido durante mucho tiempo que el sistema inmune de los invertebrados carece de memoria y especificidad. Este punto de vista ha cambiado con el tiempo, ya que un número de estudios recientes indican que una exposición primaria del hospedero a un patógeno aumenta su resistencia a un desafío patogénico posterior, un fenómeno conocido como "inmune priming" o estimulación inmunitaria. Un grupo de insectos en donde se ha investigado poco la estimulación inmunitaria son los chinches hematófagos de la subfamilia Triatominae. El objetivo de este estudio fue poner a prueba experimentalmente la capacidad del chinche *Rhodnius pallescens*, vector primario de *Tripanosoma cruzi* en Panamá, para resistir hongos entomopatógenos. Se utilizaron cohortes de *R. pallescens* criadas en el laboratorio y provenientes de campo para investigar la estimulación inmunitaria y la resistencia al hongo patógeno *Beauveria bassiana*. Se prepararon soluciones conidiales del hongo *B. bassiana* para evaluar la estimulación inmunitaria y la tasa de supervivencia de los chinches. Los chinches que fueron expuestos a una dosis baja de *B. bassiana* no mostraron mayor resistencia al ser expuestos a una segunda inoculación con el mismo hongo, en comparación con los chinches del control, también inoculados una segunda vez con el mismo tratamiento. Por tanto, no se encontró evidencias de "inmune priming" o estimulación inmunitaria. Adicionalmente, se hicieron pruebas para estimar los niveles de fenoloxidasa total, una enzima involucrada en la respuesta inmune, obteniendo que los chinches inoculados con una dosis baja de *B. bassiana* presentaron niveles más altos de fenoloxidasa total que los chinches del control. Esto sugiere que a pesar de que, el hongo activa el sistema inmune del chinche, posiblemente existan otras variables que interactúen sobre su supervivencia ante la infección con el hongo. Este trabajo es uno de los pocos estudios que ha investigado la interacción hongo entomopatógeno – hospedero en un insecto hematófago de importancia en salud pública. Para futuros estudios se recomienda utilizar otras especies de hongos entomopatógenos, estudiar el efecto de la interacción hongo – *Wolbachia* – *T. cruzi* y considerar factores como la edad y la dieta de los chinches como covariables influyentes para combatir el hongo.

SUMMARY

It has long been assumed that the invertebrate immune system lacks memory and specificity. This view has changed over time, as a number of recent studies indicate that a primary exposure of the host to a pathogen increases its resistance to a subsequent pathogenic challenge, a phenomenon known as "immune priming" or immune stimulation. One group of insects in which immune priming has been little investigated is the hematophagous bugs of the subfamily Triatominae. The objective of this study was to experimentally test the ability of the bedbug *Rhodnius pallescens*, primary vector of *Trypanosoma cruzi* in Panama, to resist entomopathogenic fungi. Laboratory-reared and field-reared cohorts of *R. pallescens* were used to investigate immune stimulation and resistance to the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Conidial solutions of the fungus *B. bassiana* were prepared to evaluate immune stimulation and survival rate of bedbugs. Bedbugs that were exposed to a low dose of *B. bassiana* did not show increased resistance when exposed to a second inoculation with the same fungus, compared to control bedbugs, also inoculated a second time with the same treatment. Therefore, no evidence of immune priming or immune stimulation was found. In addition, we tested for levels of total phenoloxidase, an enzyme involved in the immune response, and found that bugs inoculated with a low dose of *B. bassiana* had higher levels of total phenoloxidase than the control bugs. This suggests that although the fungus activates the immune system of the bedbug, there may be other variables that interact on its survival in the face of infection with the fungus. This work is one of the few studies that have investigated the entomopathogenic fungus-host interaction in a hematophagous insect of public health importance. For future studies it is recommended to use other species of entomopathogenic fungi, to study the effect of the fungus - *Wolbachia* - *T. cruzi* interaction and to consider factors such as age and diet of the bedbugs as influential covariates to combat the fungus.

INTRODUCCION

Se ha asumido durante mucho tiempo que el sistema inmune de los invertebrados carece de memoria y especificidad. Este punto de vista ha cambiado con el tiempo, ya que un número de estudios recientes han documentado que una exposición primaria del hospedero a un patógeno aumenta su resistencia a un desafío patogénico posterior, un fenómeno conocido como "inmune priming" o estimulación inmunitaria (Kurtz & Franz, 2003; Schmid-Hempel, 2005; Rowley & Powell, 2007). La protección podría ser a largo plazo contra patógenos específicos, por lo que sería funcionalmente similar a la inmunidad adquirida por los animales vertebrados (Little et al., 2005; Rowley & Powell, 2007). Sin embargo, la generalidad, el significado adaptativo y la base mecánica de la preparación inmunológica siguen sin estar claros en animales invertebrados (Hauton & Smith, 2007). En los últimos tiempos se ha considerado que la memoria inmunológica está ampliamente distribuida en los animales (Lanz Mendoza & Contreras-Garduño, 2021). Los datos sobre la estimulación inmunitaria aún son escasos, por lo que es difícil evaluar si la ocurrencia es universal o si está restringida a combinaciones específicas de huéspedes, patógenos y condiciones experimentales (Rowley & Powell, 2007). La estimulación inmunitaria se ha documentado en varias especies de insectos expuestos a bacterias o moléculas bacterianas LPS (Rosengaus et al., 1999; Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Roth et al., 2009), protozoos (Rodrigues, 2010) y virus (Tidbury et al., 2011).

Hasta ahora, la evidencia de la estimulación inmunitaria individual en respuesta a hongos entomopatógenos es limitada, con un caso en termitas expuestas a *Metarhizium anisopliae* (Rosengaus et al., 1999), otra en moscas de la fruta expuestas a *Beauveria bassiana* (Pham

et al., 2007) y reinas de hormigas *Lasius niger* (Gálvez & Chapuisat, 2014). En general, se necesitan más estudios empíricos para dibujar una imagen precisa de la ocurrencia, duración y especificidad de la estimulación inmunitaria entre invertebrados y sus patógenos (Rowley & Powell, 2007; Hauton & Smith, 2007). Algunas clases de patógenos, como los hongos entomopatógenos, han sido poco estudiados, son un grupo de microorganismos heterótrofos, eucariotas o unicelulares, filogenéticamente diversos que se reproducen por esporas sexuales, asexuales o ambas y se agrupan en cuatro subórdenes: Deuteromycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Inglis et al., 2001). Estos patógenos varían en sus vías de infección, en los componentes del sistema inmune que desencadenan, así como también en su capacidad para evadir la respuesta inmune de sus huéspedes (Schmid-Hempel, 2005; Rowley & Powell, 2007; Sadd & Schmid-Hempel, 2009; Schmid-Hempel, 2009). Además, la ecología, el comportamiento y la historia de vida de los huéspedes también pueden afectar su respuesta inmune y la sensibilidad a los patógenos (Sadd & Schmid-Hempel, 2009; Boughton et al., 2011). Uno de los hongos entomopatógenos utilizados para estudiar la interacción hospedero-patógeno es *B. bassiana* que infecta insectos a través de la unión y la descomposición enzimática de la cutícula, seguido por la penetración cutánea y proliferación dentro del hemocele (Leger et al., 1986).

Evidencia reciente del genoma secuenciado de *B. bassiana* indica que también puede ser capaz de infectar oralmente ya que posee genes que se asemejan a los genes que codifican para la producción de toxina en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Xiao et al., 2012). Estudios anteriores han demostrado que la infección por *B. bassiana* provoca respuestas inmunitarias tanto a nivel de células (Hung & Boucias, 1992), como a nivel de defensas humorales (Wojda et al., 2009) del sistema inmune de insectos, incluida la cascada de

fenoloxidasa (Dubovskiy et al., 2013; Yassine et al., 2012). Por ejemplo, en los escarabajos *Tribolium castaneum*, la defensa inmune está regulada por la infección de *B. bassiana* (Pedrini et al., 2010), en consecuencia, es probable que la presión de selección de *B. bassiana* y otros hongos conduzca a un cambio evolutivo en múltiples brazos del sistema inmune de los insectos, presentando un desafío evolutivo potencial para el huésped. La interacción entre el parásito y el huésped es una herramienta para estudiar la posible coevolución de los mecanismos de defensa y la resistencia del huésped, y los factores de virulencia del patógeno (Schulte et al., 2010; Masri et al., 2015). Factores como el tamaño de la población y las infecciones con otros patógenos no detectadas podrían influir en el resultado de la coevolución huésped-hongo-entomopatógeno (Papkou & col., 2016; Bose et al., 2016), así como también en la tolerancia del huésped (Kutzer & Armitage, 2016). Comprender el impacto de estos factores en la interacción insecto-patógeno serían de gran ayuda para combatir las enfermedades, desarrollo de nuevos fármacos y evitar la aparición de poblaciones resistentes a parásitos, patógenos y plagas (Ortiz-Urquiza et al., 2015).

En la cutícula de los insectos existen enzimas que activan el proceso de melanización o formación de melanina como mecanismo inmune primario contra infecciones por patógenos; estas sustancias están involucradas en la encapsulación física de cuerpos extraños. Además, las reacciones intermedias en la vía de la melanina participan en el proceso de curación de la herida por medio de la formación de enlaces covalentes en tejidos dañados que resultan en la esclerotización. Evidencia científica reciente indica que la cascada de melanización activa el sistema de la profenoloxidasa, la cual está íntimamente asociada con la aparición de factores que ayudan a la estimulación de la defensa celular promoviendo la fagocitosis. Algunos estudios han demostrado la importancia de la

reacción de melanización para varios encuentros patógeno-huésped, incluyendo infecciones bacterianas y fúngicas (Cerenius et al., 2008). Estudios recientes han demostrado que hay factores importantes en la reproducción, supervivencia e infección exitosa de hongos entomopatógenos en condiciones ambientales adecuadas y un hospedador susceptible (Waqar et al., 2021). Un grupo de insectos en donde se ha investigado poco la estimulación inmunitaria son los chinches hematófagos de la subfamilia Triatominae.

Para esta investigación se utilizó como huésped a la especie de chinche triatomino *Rhodnius pallescens* (Fig. 1), el cual tiene un ciclo de vida hemimetábolo, que va desde el estado de huevo hasta completar cinco estadios ninfales y el adulto (Junberg & Rangel, 1984). Este chinche es considerado desde hace muchos años como el principal vector de *Trypanosoma cruzi* en Panamá y el único triatomino trasmisor de *Trypanosoma rangeli* en el país (Barber, 1932). En Panamá se considera que la transmisión de *T. cruzi* y *T. rangeli* al ser humano se debe principalmente a la dispersión activa de los adultos infectados desde su ecotopo natural en las coronas de las “palmas reales” (*Attalea butyracea*) hacia las viviendas rurales (Calzada et al, 2006; Whitlaw & Chaniotis, 1978). *Rhodnius pallescens* ha sido reportado en Belice, Colombia, Costa Rica, México, Nicaragua, Panamá y Venezuela (Pizarro & Romaña, 1998). Entre sus hábitats naturales incluyen madrigueras de armadillo, huecos de árboles que sirven como refugios para pequeños mamíferos y nidos de loros. *Rhodnius pallescens* también se ha encontrado en hábitats peridomésticos como gallineros y palomares, y en viviendas humanas ocasionalmente atraídos por las luces (Carcavallo et al., 1998). Entre los animales selváticos más conocidos de los cuales se

alimenta *R. pallescens* están armadillos y zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*, *Caluromys derbianus*) entre otros (Sousa, 1972; Moreno & Jaramillo, 1996).



Fig. 1. *Rhodnius pallescens*, chinche vector de Mal de Chagas.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 La estimulación inmunitaria

Los insectos pueden tener una respuesta inmune más eficiente cuando se exponen a un patógeno por segunda vez, ya que el contacto inicial origina una estimulación inmunitaria o “inmune priming”, aunque esto varía en su nivel de especificidad (Zanchi et al., 2011). La estimulación inmunitaria ha sido documentada en varias especies de insectos expuestos a hongos (Rosengaus et al., 1999), bacterias (Sadd & Schmid - Hempel, 2006; Pham et al., 2007; Rosengaus et al., 2013), protozoarios (Rodrigues et al., 2010) y virus (Tidbury et al., 2011).

Estudios inmunológicos y pruebas de estimulación inmunitaria realizados con artrópodos hematófagos surgen de estudios hechos con arácnidos como las garrapatas por su importancia médica, con evidencias de regulación (Nakajima et al., 2001; Matsuo et al., 2004); mayor supervivencia tras la exposición a un patógeno, controlado por vías moleculares que aparentemente son exclusivas de las garrapatas (Shaw & Col, 2017). Trabajos evaluando la estimulación inmunitaria en insectos hematófagos son menos comunes. Carmona-Peña et al., (2021) resaltan la necesidad de estudiar si la memoria inmune ocurre en triatominos, particularmente contra el protozoo *Trypanosoma cruzi* de diferentes cepas. Sin embargo, otro elemento fundamental sería si los triatominos muestran algún tipo de memoria contra patógenos como los hongos entomopatógenos. Dada la importancia médica de los triatominos, este trabajo ofrece un inicio en una línea de investigación que podría proveer información valiosa para desarrollar herramientas para el control de sus poblaciones. El objetivo de este estudio es poner a prueba experimentalmente la capacidad del chinche hematófago *R. pallescens* para desarrollar un tipo de inmunidad adquirida contra hongos patógenos (estimulación inmunitaria), definido como: la exposición a una dosis baja del patógeno vivo o muerto aumenta la resistencia del hospedero contra una dosis más alta del mismo patógeno en una segunda exposición. Además, el presente estudio intenta medir la resistencia del chinche ante la exposición a una dosis alta del hongo *B. bassiana* (resistencia).

1.2 Hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, pertenece a la Clase Deuteromicetes, de acuerdo a la morfología de la estructura reproductora conidial (Alcazar et al., 1990) y comúnmente se encuentra infectando un alto número de especies de insectos. *Beauveria bassiana* se caracteriza por presentar células conidiógenas globosas a sub-globosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) con un cuello muy corto. Las estructuras conidiógenas forman grandes grupos de conidióforos apiñados creando sinnemas o grupos de conidióforos muy juntos, las conidias son hialinas y lisas, globosas elipsoidales, raquis en zíg-zag y el desarrollo en medio de cultivo es levantado de color blanco, tomando coloraciones amarillentas en el reverso de la placa cuando tiene mucho tiempo (Alcazar et al., 1990; Fig. 2).

Este hongo es uno de los patógenos más importantes en insectos. Es común encontrarlo en restos de insectos o bien en insectos que quedan adheridos a las hojas de plantas. Es un parásito facultativo, esto quiere decir que puede crecer tanto en su hospedante como sobre medios artificiales (Alves, 1986). La penetración de la cutícula del insecto por el hongo es la ruta directa de infección más común, aunque puede ocurrir por cualquier parte del insecto, incluyendo el ano o la boca (Brady, 1979). Luego de la germinación de las conidias en la cutícula del insecto, los tubos germinativos penetran el integumento, por acción mecánica y efectos enzimáticos, pasando a la hemolinfa donde ataca los tejidos internos (Bustillo, 1991). En condiciones favorables para el hongo entomopatógeno, se desarrolla micelio, conidióforos y conidias sobre la cutícula del insecto, proporcionando otra fuente de inóculo para afectar a otros individuos (Ferron, 1981). *Beauveria bassiana* es asociado generalmente con el término muscardina blanca, ya que el micelio y los conidios cubren el

cuerpo y los espacios articulares del hospedero con una capa de material polvoriento de color blanco (Glare, 1992).

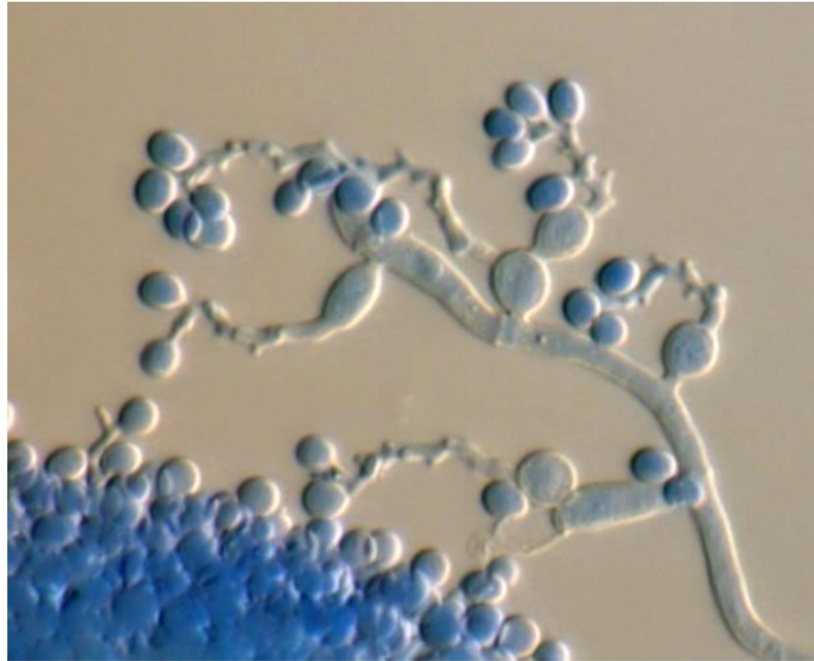


Fig. 2. Células conidiógenas globosas de *Beauveria bassiana*.

Fuente: <https://inspirabiotech.com/2018/03/09/biopesticidas-el-parasito-de-nuestro-parasito-es-nuestro-amigo/beauveria-bassiana/>

1.3 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos inician su proceso infeccioso cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del integumento de los insectos hospederos, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedero (Jones, 1994) y formar los túbulos germinales, y a veces el apresorio, lo que facilitará aún más la invasión del hongo (Hajek, 1997; Deshpande, 1999; Milner, 2000; Asaff et al., 2002; Barranco et al., 2002). La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la

misma, lo que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto (Hegedus & Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996). La hidratación de la espora es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto. Después del hinchamiento de la espora, se da la formación del tubo germinativo mediante el proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, que estimula la síntesis de la pared celular. Los iones H^+ y Ca^{2+} entran en la punta de la hifa a través de un mecanismo de transporte pasivo y son expulsados por mecanismos dependientes de energía. Este flujo transcelular permanece constante y mantiene el desarrollo del tubo germinativo y la formación del apresorio, una estructura especializada formada en el tubo germinativo (Riquelme et al., 1998; Harold, 1999; Wessels, 1999). El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Wessels, 1999). El apresorio sirve para el anclaje de la espora y ejerce una presión hacia el interior del insecto. Paralelamente, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionando nutrientes al hongo (Monzón, 2001).

Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundarios, que se ramifican en la procutícula conformada principalmente de fibrillas lameladas de quitina embebidas en una matriz proteínica que actúa como cubierta física protectora ante las secreciones extracelulares del patógeno. Posteriormente, los cuerpos hifales se encuentran

con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele (Deshpande, 1999). De esta manera, los cuerpos hifales invaden diversas estructuras internas como tejidos musculares, cuerpos grasos, hemocitos, tubos de Malpighi, y organelos celulares como las mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar invadiendo todos los órganos de su hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de esporas cuando la humedad relativa es adecuada (Gillespie & Claydon, 1989). Durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrientes, pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St. Leger & Roberts, 1997; Fig. 3).

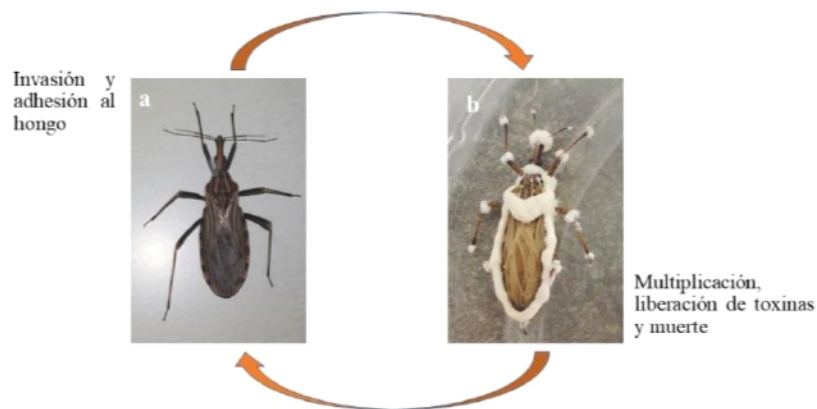


Fig. 3. Ciclo de vida de un hongo entomopatógeno. a. Los conidios se adhieren al cuerpo de los insectos y se produce la germinación de las esporas, comienza la degradación de la cutícula del insecto. b. Una vez dentro de hospedero, los hongos producen toxinas que atacan al sistema nervioso del insecto provocando su muerte y volviendo a generar conidios.

2. OBJETIVOS

2.1 General

- Investigar la ocurrencia del fenómeno de estimulación inmunitaria en *Rhodnius pallescens* ante la infección del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

2.2 Específicos

- Estimar la inmuno-competencia (supervivencia) del chinche *R. pallescens* ante la exposición a dosis bajas y altas de *B. bassiana*.
- Medir los niveles de fenoloxidasa y profenoloxidasa en *R. pallescens* expuesto a *B. bassiana*.
- Evaluar el efecto del sexo de *R. pallescens* en su respuesta inmune ante la infección por *B. bassiana*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Chinchas de laboratorio

En este trabajo se utilizaron individuos de *Rhodnius pallescens* de colonias de laboratorio proporcionados por la profesora Indira Espino del Centro de Investigaciones Parasitarias de la Universidad de Panamá (CIDEP) y por el Doctor Azael Saldaña del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), los cuales estaban libres de infección por *T. cruzi* y la bacteria *Wolbachia*. Los chinchas reposaban en frascos de vidrio con acordeones de papel periódico en su interior y cubiertos con una malla tul, eran alimentados con sangre de gallina (*Gallus gallus domesticus*) las cuales también fueron proporcionadas por el CIDEP siguiendo los protocolos de uso de animales en laboratorios. Fueron alimentados por lapsos de 10 minutos, cada frasco con 20 chinchas cada 21 días (Fig. 4a, b). Estos chinchas fueron utilizados para las pruebas de resistencia y supervivencia (experimentos #1 y #2) con el hongo *B. bassiana*.

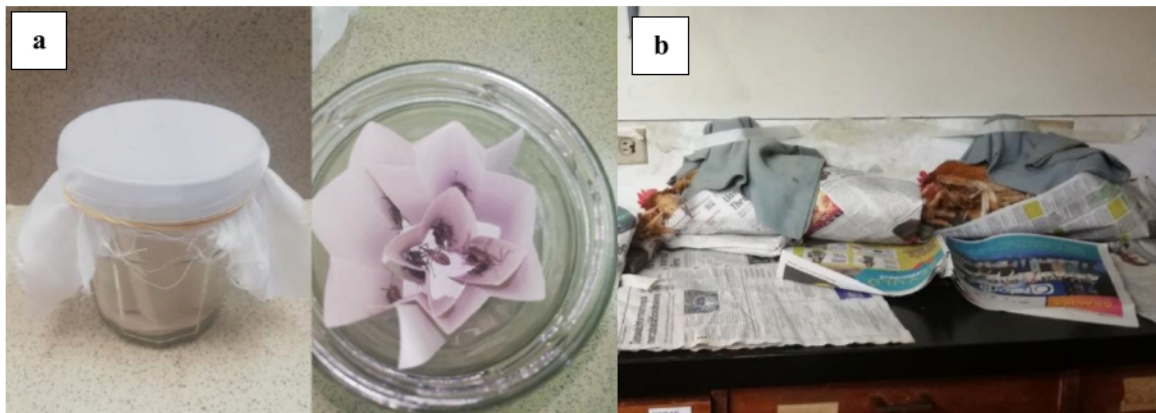


Fig. 4. *Rhodnius pallescens* en el laboratorio. Frasco de vidrio con chinchas (4a). Chinchas alimentándose de sangre de gallinas *Gallus gallus domesticus* (4b).

3.2 Colecta de chinches en campo

Los chinches de campo fueron colectados en la provincia de Panamá Oeste, distrito de Capira, corregimiento de Trinidad de las Minas, ente julio y agosto de 2019 (Fig. 5). Se colocaron 16 trampas cebadas con ratones blancos (*Mus musculus*), los cuales fueron criados en el bioterio del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) y utilizados para este tipo de muestreos siguiendo los estándares de uso de animales en laboratorios aplicados por el ICGES. Las trampas fueron colocadas en palmas reales *Attalea butyracea* (Abad-Franch et. al., 2005), a razón de dos trampas por palma (Fig. 6a, b) abarcando un total de ocho (8) palmas por noche. Cada una de las trampas contenía una pequeña cantidad de alimento de ratón con el objetivo de proteger al animal de las bajas temperaturas nocturnas y evitar la muerte por inanición (Abad-Franch et al., 2005). Las trampas fueron colocadas en la parte interna de la corona de las palmas desde las 6:00 pm hasta las 6:00 am con la ayuda de una vara extensible. Las trampas fueron revestidas con cinta adhesiva de doble contacto para inmovilizar a los chinches, para luego retirarlos utilizando pinzas entomológicas (Fig. 7a, b). Los chinches fueron identificados utilizando claves taxonómicas para el estado adulto; para la distinción por sexos se utilizaron caracteres discriminativos como el número de segmentos abdominales visibles en la hembra que consta de nueve y el macho de diez. Otro carácter distintivo en los machos es el ápice abdominal redondeado mientras que en las hembras es truncado o puntiagudo (Méndez et al., 1997). Los chinches colectados en campo fueron almacenados en frascos de vidrio con acordeones de papel periódico en su interior y como tapa un pedazo de malla tul y fueron alimentados con el protocolo descrito anteriormente. Posteriormente, estos

chinchas fueron utilizados para las pruebas de estimación de los niveles de fenoloxidas total en el experimento #3.

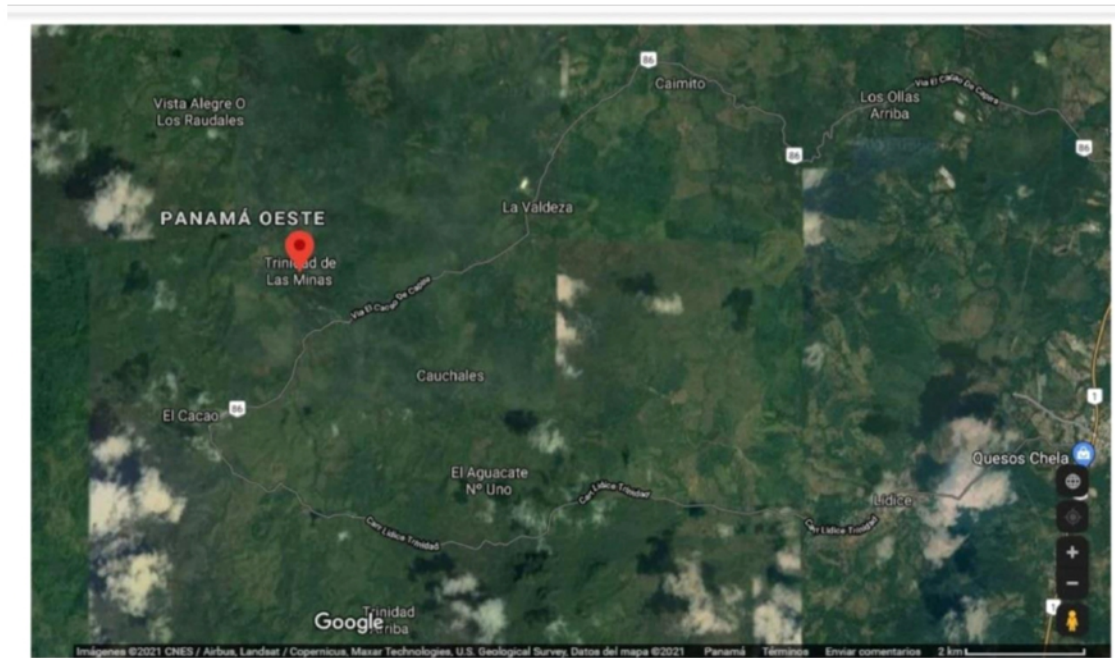


Fig. 5. Área de estudio: Distrito de Capira, Corregimiento de Trinidad de las Minas, Provincia de Panamá Oeste. Fuente: Imágenes©2021Landsat/googlemaps.



Fig. 6. Palma real (*Attalea butyracea*, a) y ratones blancos utilizados como cebos (*Mus musculus*, b).



Fig. 7. Detalles de las trampas para coleccionar los chinches. Trampas listas para la colocación en las palmas con vara extensible (a, b). Chinches colectados en las trampas (c, d).

3.3 Obtención de hongo entomopatógeno

La cepa del hongo *Beauveria bassiana* utilizada fue donada por el Doctor Luis Ramírez del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT-AIP), la cual había sido aislada de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), en la provincia de Chiriquí, distrito de Boquete en los frutos de café de la variedad Geisha. Esta cepa fue replicada en agar papa dextrosa (PDA) (Cañedo & Ames, 2004), incubada a temperatura ambiente (25-27°C) en el laboratorio de fisiología de insectos del

Programa Centroamericano de Maestría en Entomología de la Universidad de Panamá (PCMENT; Fig. 8a, b).

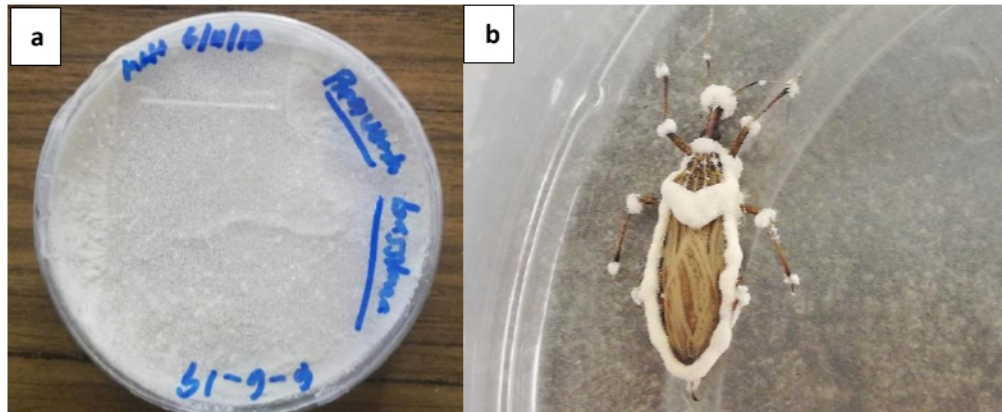


Fig. 8. Hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en medio de cultivo PDA (a). Cadáver de chinche esporulando después de infección con el hongo (b).

3.4 Inoculación de chinches con *Beauveria bassiana*

Se prepararon soluciones conidiales del hongo *B. bassiana* por raspado con asa bacteriológica estéril de la superficie del cultivo y 2 mililitros (ml) de solución acuosa estéril tween 80 (0,01 %). La concentración del hongo fue determinada mediante el conteo de conidios con una cámara de Neubauer (Cañedo & Ames, 2004; Fig. 9a, b).

3.4.1 Pruebas de resistencia

Para evaluar la resistencia de los chinches medida como tasas de supervivencia, se aplicaron tres tratamientos: Control-Control, Hongo-Control y Hongo-Hongo (Cuadro 1), separándolos en réplicas de solo machos o solo hembras. La mitad de los chinches de cada tratamiento fueron expuestos a dosis bajas del patógeno (1×10^2 conidios/ml, 9×10^2 conidios/ml), colocando 2 μ l de solución sobre el tórax de cada chinche y la otra mitad fue tratada con 2 μ l de la solución tween 80 (0,01 %) o control (Fig. 10). Siete días después

cada uno de estos grupos de tratamientos se inocularon la mitad de los chinches con dosis altas (Hongo-Hongo) y la otra mitad con la solución tween 80 (0,01 %) o control (Control-Control, Hongo-Control) (se repite tres veces: 1×10^4 conidios/ml, 9×10^4 conidios/ml, 9×10^5 conidios/ml). Luego cada chinche fue colocado en recipientes plásticos de 460 ml (o 16 onzas) con tapa, con un trozo de algodón húmedo en el interior del recipiente y se mantuvieron en oscuridad en una cámara de ambientación. Se monitoreó diariamente la supervivencia de los chinches durante un periodo de 94 días (Fig. 11). Este monitoreo permitió determinar si el hongo podía permanecer activo, es decir infectivo por un largo periodo de tiempo.

3.4.2 Pruebas de estimulación inmunitaria

Para evaluar la “inmunización” y la tasa de supervivencia de los chinches, se aplicaron cuatro tratamientos: Control-Control, Hongo-Control, Control-Hongo y Hongo-Hongo (Cuadro 2), separándolos entre machos y hembras. La mitad de los chinches fueron expuestos a una dosis baja del patógeno (9×10^2 conidios/ml, Hongo), colocando 2 μ l de solución sobre el tórax de cada chinche y la otra mitad fue tratada con la solución control (Fig. 10). Luego de siete días después cada uno de estos grupos se inocularon la mitad con una dosis alta (9×10^7 conidios/ml; Hongo - Hongo, Control - Hongo) y la otra mitad nuevamente con la solución control (Control-Control, Hongo-Control). Luego cada chinche fue colocado en recipientes plásticos, con un trozo de algodón húmedo en el interior del recipiente y se mantuvieron en oscuridad en una cámara de ambientación, se monitorearon diariamente la supervivencia de los chinches durante un periodo de 40 días (Fig. 11).

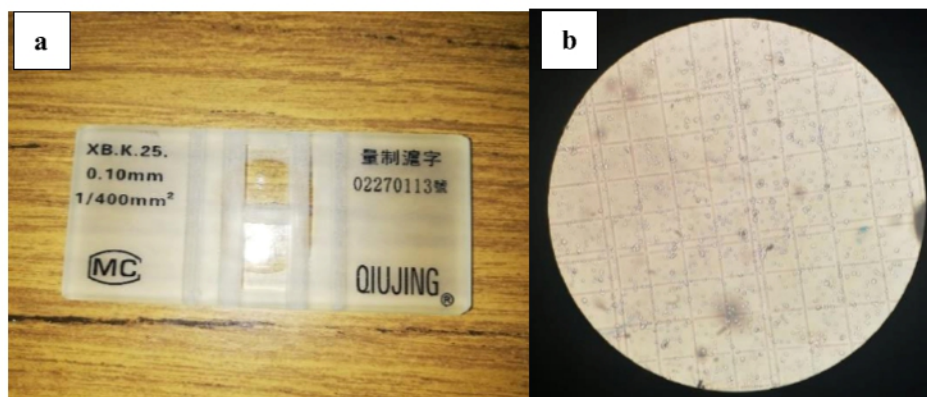


Fig. 9. Cuantificación de conidios con el uso de una cámara de Neubauer (a) Detalle de los conidios de *B. bassiana* (b)

CUADRO 1. Tratamientos utilizados para evaluar la tasa de resistencia individual de *Rhodnius pallescens* contra el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Experimento	Tratamientos	# de réplicas	Descripción	Tiempo de duración del experimento (días)
1	Control-Control	95	Ambas exposiciones fueron con la solución control	94
	Hongo-Control	72	Exposición inicial a una dosis baja del hongo y segunda exposición a solución control	
	Hongo-Hongo	45	Exposición inicial a una dosis baja del hongo y segunda exposición a dosis alta del hongo	

CUADRO 2. Tratamientos utilizados para la prueba de estimulación inmunitaria individual de *Rhodnius pallescens* contra el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Experimento	Tratamientos	# de réplicas	Descripción	Tiempo de duración del experimento (días)
2	Control-Control	38	Ambas exposiciones fueron con la solución control	40
	Hongo-Control	38	Exposición inicial a una dosis baja del hongo y segunda exposición a solución control	
	Control-Hongo	38	Exposición inicial con solución control y segunda exposición a dosis alta del hongo	
	Hongo-Hongo	40	Exposición inicial a una dosis baja del hongo y segunda exposición a dosis alta del hongo	



Fig. 10. Inoculación del hongo *B. bassiana*.

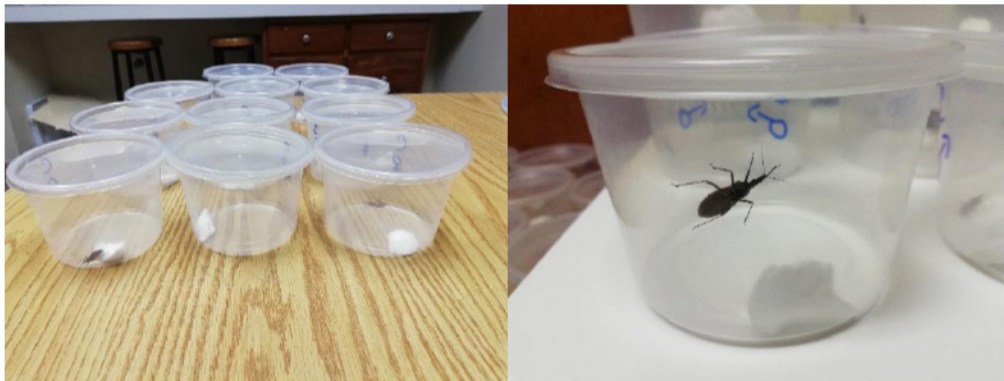


Fig. 11. Chinchas en recipientes plásticos.

3.5 Estimación de los niveles de fenoloxidasa total (fenoloxidasa más profenoloxidasa)

La fenoloxidasa es una enzima crítica implicada en múltiples procesos fisiológicos incluyendo la inmunidad innata de los insectos y crustáceos (Ashida & Brey, 1997). En este estudio la expectativa es que esta enzima sea la estrategia más importante de los triatominos para combatir los hongos entomopatógenos (Flores-Villegas et al., 2015). Para estimar los niveles de fenoloxidasa total o fenoloxidasa más profenoloxidasa, se utilizaron los chinches de campo, a los cuales se les eliminó la cabeza y los tres últimos segmentos

del abdomen. El tórax y el resto del abdomen fueron colocados y macerados en envases con 60 μl de cacodilato de sodio 0.2 M (Fig. 12), luego se sometió la muestra a vortex por 1 minuto y se procedió a centrifugar por 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Luego se recogió 15 μl del sobrenadante para ser congelado a una temperatura de -20 °C hasta su uso posterior. Luego se utilizaron 4 μl del sobrenadante el cual fue mezclado con 10 μl de PBS (Buffer Fosfato Salino), y a esta mezcla se agregaron 50 μl de tripsina en pocillos de microplacas y se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 10 μl de L-DOPA, finalmente se procedió hacer la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 492 nm y una temperatura de 30 °C cada 10 segundos durante 50 minutos. Para estimar niveles de fenoloxidasa activa se utilizaron 4 μl de solución del homogenizado y se mezclaron con 60 μl de PBS (Buffer Fosfato Salino) y 10 μl de L-DOPA para luego hacer la lectura en espectrofotómetro a una absorbancia de 492 nm a una temperatura de 30 °C cada 10 segundos durante 50 minutos (modificado de Castella et al., 2008 y Castella, Christe & Chapuisat, 2010).

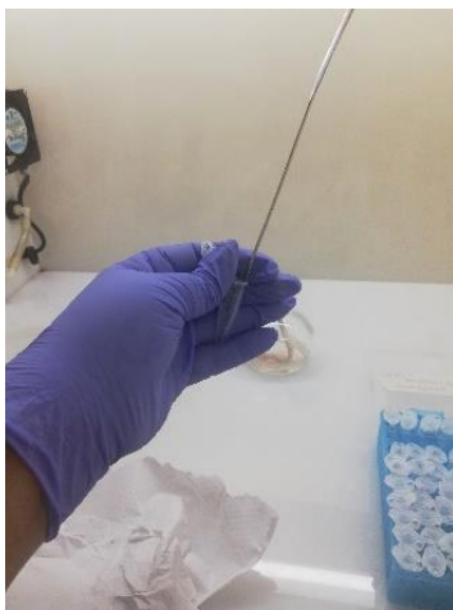


Fig. 12. Maceración de chinches en Cacodilato de sodio 0.2 M.

3.6 Análisis estadísticos

Para evaluar la supervivencia de los chinches ante la inoculación del hongo *B. bassiana* se analizaron los datos con el paquete de supervivencia survival y la función survreg en el cual se compararon los diferentes tratamientos (R Core Team, 2020). Para la comparación pareadas de tasas de supervivencias de tratamientos se usó la función pairwise_survdiff, utilizando una corrección Bonferoni - Holm. Para determinar los niveles de fenoloxidasa total se realizaron curvas de la cinética de la reacción química (pendiente: velocidad máxima). Los resultados se analizaron utilizando una transformación logarítmica debido a la falta de normalidad en los datos, y se usó una regresión lineal que incluyó como factores la inoculación inicial (hongo vs control), el sexo del chinche, y la interacción de estas variables.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Prueba de resistencia de *R. pallescens* contra *B. bassiana* y efecto del sexo

Los individuos de *R. pallescens* que fueron expuestos exclusivamente a la solución control sobrevivieron los 94 días que duro todo el experimento (Control – Control) (Fig. 13; Cuadro 1) mientras que los chinches que fueron sometidos solo a una dosis baja durante la primera exposición y posteriormente a la solución control mostraron una supervivencia menor, y esta diferencia fue estadísticamente significativa (Hongo-Control vs Control-Control, $p < 0.0001$). Por otro lado, los individuos de *R. pallescens* que fueron expuestos a una dosis inicial baja y luego a una dosis alta de *B. bassiana* (doble exposición) mostraron una supervivencia más baja que aquellos de los controles (Hongo-Hongo vs Control – Control, $p < 0.0001$) y que los chinches expuestos una sola vez a dosis bajas del hongo (Hongo – Control, $p = 0.003$) (Fig. 13), siendo estas diferencias estadísticamente significativa para los individuos doblemente expuestos y no significativa para los controles y los chinches expuestos una sola vez a dosis bajas. Ambos controles machos y hembras sobrevivieron a todo el experimento sin diferencias significativas entre sexos ($X^2 = 0.47$, $p = 0.50$). Tampoco hubo una interacción entre el sexo del chinche y el tipo de tratamiento ($X^2 = 0.60$, $p = 0.75$), indicando que ambos sexos respondieron de forma similar a todos los tratamientos (Fig. 14). En cuanto al crecimiento del hongo en los cadáveres de los chinches, del total de inoculados con dosis bajas y altas un 51.42% mostraron crecimiento del hongo.

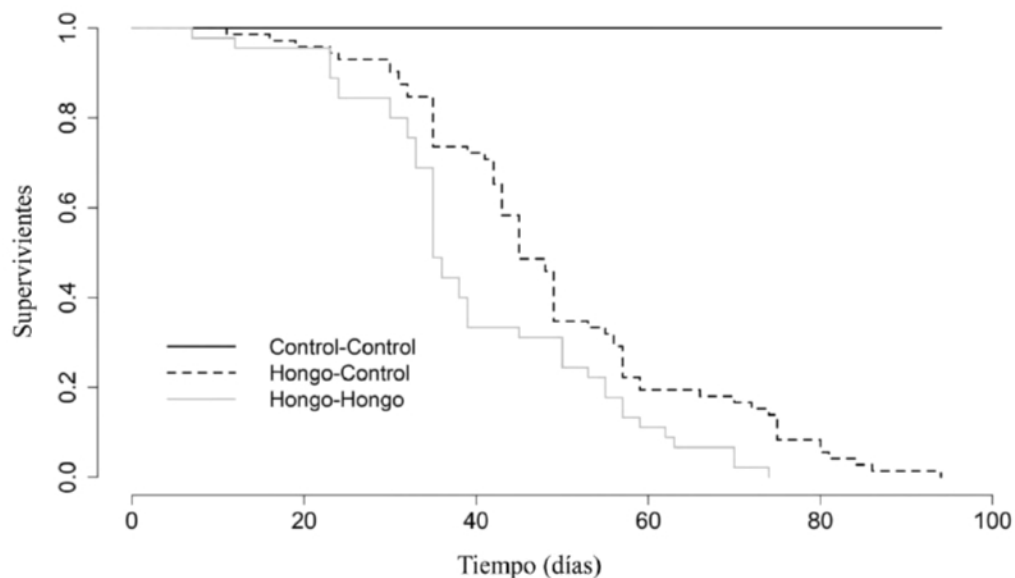


Fig. 13. Supervivencia de *R. pallescens* a dos inoculaciones con la solución control (Control-Control, n = 95), una primera inoculación con el hongo y luego el control (Hongo-Control, n = 72) o doble inoculación con el hongo (Hongo-Hongo, n = 45).

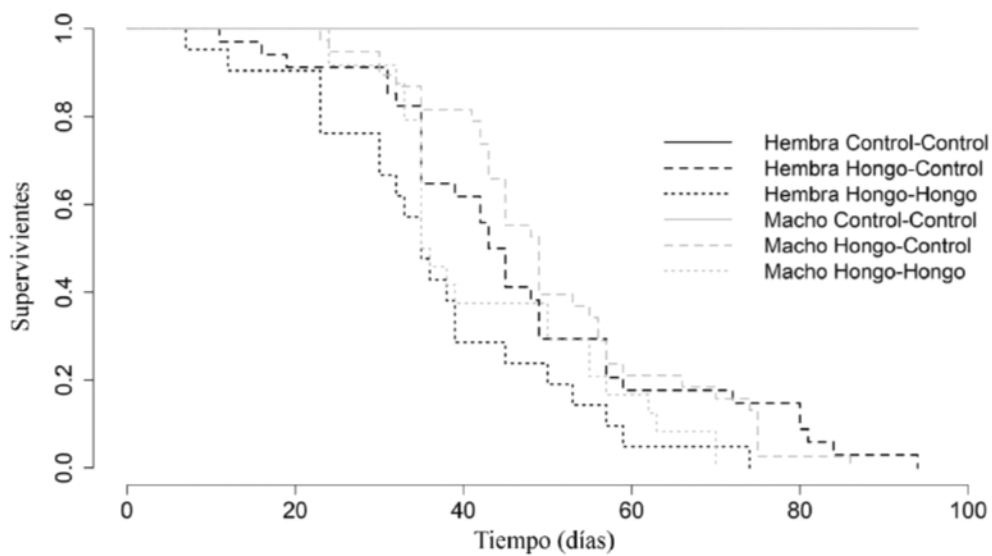


Fig. 14. Supervivencia de *R. pallescens* a diferentes inoculaciones (Control-Control, Hongo-Control y Hongo-Hongo) evaluado con la variable sexo.

4.2 Experimento 2: Estimulación inmunitaria contra *B. bassiana* y efecto del sexo

La inoculación con el hongo no redujo la supervivencia de los chinches inoculados inicialmente con el control (Control – Control vs Control – Hongo; $p = 0.4$) o de los chinches inoculados inicialmente con una dosis baja de *B. bassiana* (Hongo – Control vs Hongo – Hongo; $p = 0.5$). Los chinches expuestos dos veces al hongo mostraron menor supervivencia, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa luego de aplicar la corrección de Bonferoni – Holm (Control – Hongo vs Hongo – Hongo; $p = 0.06$ con Bonferoni – Holm y Control – Hongo vs Hongo – Hongo; $p = 0.01$ sin Bonferoni – Holm). Los machos murieron más rápido que las hembras, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($X^2 = 3.6$, $p = 0.06$; Fig. 15). El 64.28% de los cadáveres del total de los chinches inoculados con dosis bajas y altas mostraron crecimiento del hongo.

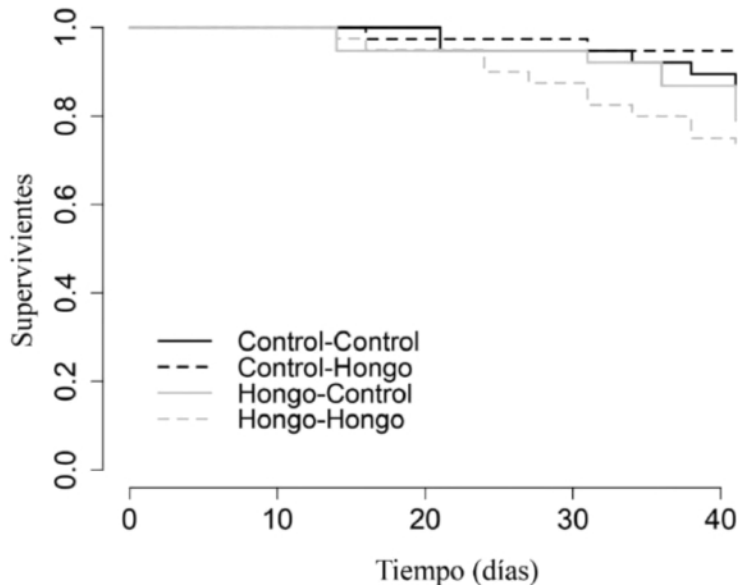


Fig. 15. Supervivencia de *R. pallescens* a dos inoculaciones con la solución control (Control-Control), una primera inoculación con el control y luego dosis alta del hongo

(Control - Hongo); una primera inoculación con una dosis baja del hongo y luego el control (Hongo-Control) y doble inoculación con el hongo; primero baja y luego alta (Hongo-Hongo).

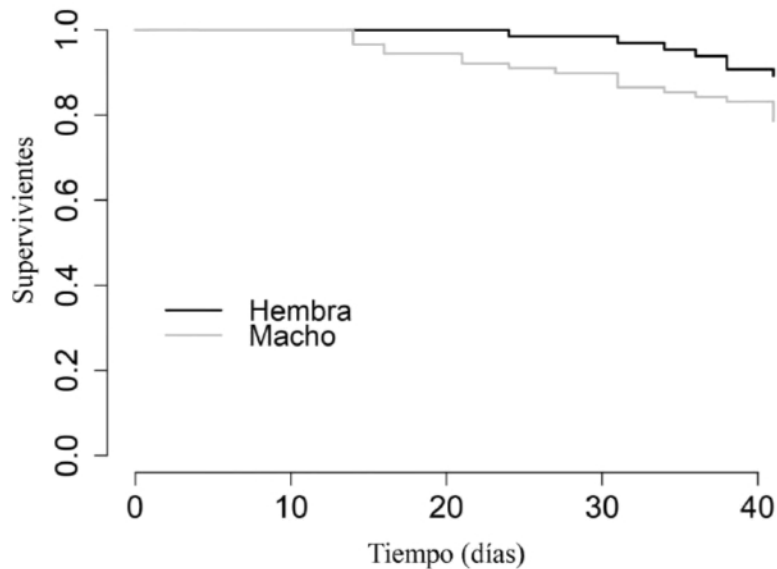


Fig. 16. Estimulación inmunitaria de *R. pallenscens* y el efecto general del sexo (tratamientos combinados).

4.3 Experimento 3: Estimación de los niveles de fenoloxidasa total (fenoloxidasa más profenoloxidasa).

Los chinches inoculados con una dosis baja de *B. bassiana* presentaron niveles significativamente más altos de fenoloxidasa total que aquellos inoculados con la solución control ($t = 2.1$, $P = 0.04$, Fig. 17). No hubo diferencias estadísticas significativas en los niveles de fenoloxidasa obtenidos de hembras y machos ($t = 0.8$, $P = 0.41$). Tampoco hubo una interacción entre el sexo del chinche y la dosis del hongo ($t = -1.3$, $P = 0.19$), indicando que la activación de la cadena de producción de fenoloxidasa bajo exposición a un patógeno fúngico no varía entre sexos.

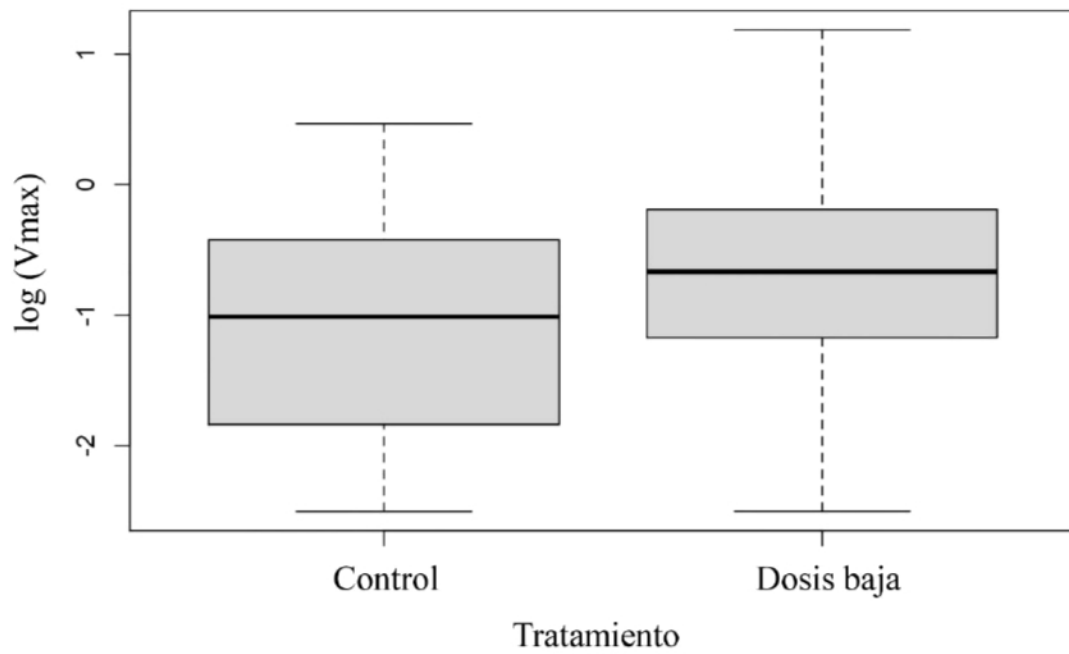


Fig. 17. Niveles de fenoloxidasa total (medido como velocidad máxima V_{max}) en muestras de chinches inoculados con una dosis baja del hongo entomopatígeno (9×10^2 conidios/ml, $n = 22$) y con la solución control, $n = 22$.

5. DISCUSIÓN

5.1 Experimento 1: Prueba de resistencia de *R. pallescens* contra *B. bassiana* y efecto del sexo

En el experimento 1 los individuos de *R. pallescens* que fueron expuestos exclusivamente a la solución control sobrevivieron los 94 días que duró todo el experimento mientras que los chinches que fueron sometidos solo a una dosis baja durante la primera exposición y posteriormente a la solución control mostraron una supervivencia menor, y esta diferencia fue estadísticamente significativa. En el experimento 2 la inoculación con el hongo no redujo la supervivencia de los chinches inoculados inicialmente con el control o de los chinches inoculados inicialmente con una dosis baja de *B. bassiana*. Esta elevada mortalidad de los chinches en los experimentos 1 y 2, sugiere que la inoculación inicial con la dosis baja de *B. bassiana* representa un daño fisiológico sustancial y es perjudicial para *R. pallescens*; sin evidencias de que la estimulación inmunitaria este ocurriendo. Estos resultados también demuestran la capacidad del hongo para infectar mucho tiempo después de ser inoculado, esto podría ser debido a que *B. bassiana* desarrolla una serie de respuestas que les permiten evitar las defensas de los insectos, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmuno-modulatorias o toxinas fúngicas (Khachatourians, 1991). Alternativamente, las esporas se mantuvieron sobre el cuerpo de los chinches o sobre la pared de los envases, hasta que las condiciones de germinación mejoraron (p.ej. después de humedecer el algodón). Además, esto indica que las conidias pueden permanecer vivas por largos periodos de tiempo en ambientes semi-naturales sin perder actividad enzimática para atacar la cutícula del insecto. Por ejemplo, Blanford et al. (2012)

encontró que las conidias de *B. bassiana* almacenadas en condiciones ideales de bajo contenido de humedad y baja temperatura sobrevivieron sin pérdida de viabilidad durante más de dos años, una vez que se retiraron de estas condiciones, la viabilidad de las esporas disminuyó de una manera dependiente de la temperatura que dieron como resultado una tasa de mortalidad más rápida que las temperaturas más frías.

Futuros trabajos deberían considerar la capacidad de las conidias para sobrevivir por largos periodos de tiempo en ambientes naturales y particularmente sobre su potencial como controladores biológicos de *R. pallescens* en condiciones naturales, similar a trabajos en otros triatomíneos en otras áreas del Neotrópico (Pedrini, 2009; Forlani et al., 2011).

5.2 Experimento 2: Estimulación inmunitaria contra *B. bassiana* y efecto del sexo

En el experimento 2 hubo una leve diferencia en la sobrevivencia o respuesta inmune entre sexos de *R. pallescens*, los machos murieron más rápido que las hembras. Hay pocos estudios en insectos que investiguen la respuesta a la infección por hongos de las hembras y machos, uno de estos estudios fue realizado en *Drosophila melanogaster* ya que exhibe patología y supervivencia en respuesta a infecciones bacterianas, virales y fúngicas (Belmonte et al., 2020). *Drosophila* exhibe una supervivencia sesgada cuando son desafiadas mediante la inoculación de esporas de *B. bassiana*, ya que las hembras fueron más susceptibles a la infección que los machos, el dimorfismo parece ser, en parte, atribuible a la función de la vía Toll (Shahrestani et al., 2018). Estudios con *Gryllobates sigillatus* sugieren que los machos son menos inmuno-competentes que las hembras (Zuk & Mckean, 1996; Zuk, 1990; Rolff, 2002), mientras que otros trabajos sugieren que la

respuesta inmune es dinámica y depende de la dieta del insecto (Zuk et al., 2004; Mckean & Nunney, 2005). Por tanto, parecen existir variables influyentes sobre mis resultados que no se midieron. Por ejemplo, es complicado medir que tanto se alimentó cada hembra o macho de *R. pallescens* durante el experimento o si pequeñas variaciones en el tamaño (p.ej. grosor de la cutícula) o coloración fueron influyentes (p.ej. Dubovskiy et al., 2013). En el caso de los chinches utilizados de campo se desconoce la edad a la que estuvieron expuestos previamente.

5.3 Experimento 3: Estimación de los niveles de fenoloxidasa total (fenoloxidasa más profenoloxidasa)

Los resultados demuestran que los niveles de fenoloxidasa no correlacionan con la capacidad de supervivencia de *R. pallescens* ante la exposición con *B. bassiana*, ya que esta enzima también participa en funciones distintas a la inmunidad, y no se comprenden las interacciones, regulación de la fenoloxidasa, sus metabolitos y sustratos (Ratcliffe, 1991; Ashida & Brey, 1997). Estos niveles de fenoloxidasa no correlacionaron con la supervivencia contra el hongo en estos chinches, como sucede de una manera similar a otros insectos contra otros patógenos (Adamo, 2004). Además, en algunos casos, la actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa disminuye en triatominos infectados en laboratorio con *Trypanosoma cruzi*, en comparación con grupos control de laboratorio como es el caso de *Meccus pallidipennis* (Favila-Ruiz et al., 2018). Una comparación intrigante es el hecho de que inoculaciones de chinches en el laboratorio libres de *Wolbachia* y sin *T. cruzi* mostraron una alta mortalidad con una dosis letal relativamente baja (10^5). Por otro lado, los chinches del campo, probablemente infectados con

Wolbachia y *T. cruzi* mostraron mortalidades más bajas, aun utilizando dosis más altas del hongo (10^7), contrario a la expectativa que la presencia de patógenos o parásitos reduce la capacidad inmune del chinche (Favila-Ruiz et al., 2018).

La evidencia de la estimulación inmunitaria en insectos contra hongos es limitada, algunos casos de ellos son con *Drosophila melanogaster* inyectadas con esporas muertas por calor de *B. bassiana* (Pham et al., 2007). En el caso de *D. melanogaster*, la detección de la estimulación inmunitaria depende del patógeno que se utilice (Pham et al., 2007). También se ha detectado en pequeños grupos de termitas inoculadas con una solución extremadamente diluida de esporas de *Metarhizium anisopliae*, lo que sugiere que la estimulación inmunitaria fue provocada por una sustancia soluble y no por las esporas mismas (Rosengaus et al., 1999). Otros estudios en *Drosophila* examinaron la respuesta a patógenos fúngicos o bacterianos y revelaron que los insectos pueden modular su respuesta inmune a varias clases de microorganismos con la inducción de genes de péptidos antimicrobianos seleccionados (Lemaitre et al., 1997). Bergin et al. (2006) indicaron que la administración de componentes de la pared celular fúngica en larvas de *Galleria mellonella* conduce a una respuesta inmune mejorada y una resistencia elevada a la infección con la levadura *Candida albicans*. Moret & Siva-Jothy (2003) demostraron que la respuesta inmune luego de un pre-desafío con LPS en larvas de *Tenebrio molitor* proporciona resistencia contra posteriores estímulos ya que mostraron mejor supervivencia a la infección por hongos de 4 o 7 días después del desafío. Esta resistencia hacia la infección con hongos se correlacionó con niveles elevados de antimicrobianos y actividad en la hemolinfa de larvas tratadas con LPS para el período de las inoculaciones fúngicas.

En algunos estudios se han encontrado casos en donde la inmunización con hongos genera una estimulación inmunitaria contra bacterias. Adultos de *Tenebrio molitor* exhibían mejor estimulación inmunitaria contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas después de haber sido sometido a desafíos inmunitarios con el hongo *M. anisopliae* y esto podría explicarse por el hecho de que en el caso particular de *T. molitor* la estimulación puede haber evolucionado en respuesta a los patógenos más peligrosos como *B. thuringiensis* (Dhinaut, Chogne & Moret, 2017). Sin embargo, algunos estudios no encontraron evidencia de estimulación inmunitaria con hongos como es el caso de los desafíos inmunológicos realizados con implantes de nylon o tratamientos con hongos en *Tenebrio molitor* machos donde disminuyó significativamente la vida útil de estos y se encontró que la exposición a hongos aumentaba las tasas de mortalidad significativamente más que una implantación repetida mediante la inserción de monofilamentos de nylon (Krams et al., 2013).

Los hongos podrían ser menos efectivos para generar la estimulación inmunitaria que las bacterias; tal vez, el daño mecánico que genera el crecimiento de las hifas dentro del hospedero es demasiado destructivo para la mayoría de los insectos. En general, esto sugiere que las condiciones de los experimentos (p. ej. dosis, especie, temperatura, taxa del hospedero) determinan la probabilidad de detectar el fenómeno. Este trabajo provee un primer paso para entender la interacción de *R. pallens* con hongos entomopatógenos. Particularmente ofrece el potencial de desarrollar herramientas para controlar las poblaciones del chinche con un agente biológico nativo; sin recurrir a métodos invasivos (p. ej. insecticidas) o exóticos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- *Beauveria bassiana* causó elevada mortalidad en adultos de *R. pallenscens*, presentando conidiación visible en los cadáveres.
- No hubo correlación entre la sobrevivencia de *R. pallenscens* inoculado con *B. bassiana* y los niveles de fenoloxidasa en el insecto.
- Hubo una leve diferencia entre sexos en la respuesta inmune de *R. pallenscens* ya que los machos murieron más rápido que las hembras.

6.2 Recomendaciones

- Utilizar otras especies de hongos entomopatógenos como por ejemplo *Metarhizium brunneum* para comparar su acción sobre el sistema inmune del chinche.
- Considerar la edad de las colonias de chinches como una variable influyente.
- Considerar el efecto de la dieta sobre la capacidad del chinche para combatir el hongo.
- Estudiar la supervivencia de las conidias de *Beauveria bassiana* en la naturaleza.
- Estudiar el efecto de la interacción hongo – *Wolbachia* – *T. cruzi* sobre la capacidad inmune del chinche (p.ej. supervivencia y niveles de fenoloxidasa).

6. BIBLIOGRAFÍA

Adamo SA. 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*, *Journal of Insect Physiology*, Volume 50, Issues 2–3, Pages 209-216, ISSN 0022-1910.

Asaff T., Reyes V., López L. & De la Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva (México)* 21: 291-295.

Ashida M., Brey P. 1997. Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey PT, Hultmark D, editors. *Molecular Mechanisms of Immune Response in Insects*. London: Chapman & Hall; p. 135–72.

Barber H., 1932. A new species of *Rhodnius* from Panamá. *J. Washington Acad. Sci.* 22: 514- 517.

Barranco F., Alatorre R., Gutiérrez R., Viniegra G. & Saucedo C. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enz. Microb. Technol.* 30: 910-915.

Belmonte, R. L., Corbally, M. K., Duneau, D. F., & Regan, J. C. 2020. Sexual Dimorphisms in Innate Immunity and Responses to Infection in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in immunology*, 10, 3075. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03075>.

Ben-Ami F, Ebert D, Regoes RR. 2010. Pathogen dose infectivity curves as a method to analyze the distribution of host susceptibility: A quantitative assessment of maternal effects after food stress and pathogen exposure. *Am Nat* 175: 106–115.

Bergin, D., Murphy L., Keenan, J., Clynes, M., Kavanagh, K. 2006. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microb. Infect.* 8 2105e2112.

Blanford S., Jenkins N., Christian R., HK Chan B., Nardini L., Osaé M., Koekemoer L., Coetzee M., Read A., and Thomas M. 2012. Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for use against adult malaria vectors. *Malaria Journal* 2012 11:354.

Boughton R., Joop G. & Armitage S. 2011. Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. *Funct Ecol* 25: 81–100.

Calzada J., Pineda V., Montalvo E., Álvarez D., Santamaría A. & Samudio F. 2006. Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 74:762-5.

Cañedo, V. & Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP). Pág. 62.

Carcavallo R., Rodríguez M., Salvatella R., Curto De Casas S., Sherlock I., Galvao C., Rocha D., Galindez-Giron I., Arocha M., Martínez A., Da Rosa J., Canale D., Farr T. & Barata J. 1998. Habitat's and related Fauna. In: Atlas of Chagas' disease vectors in America, Vo/. 11(R.U. Carcavallo, I. Galindez-Giron, J. Jurberg & H. Lent edit.), Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil: 561-578.

Carmona-Peña SP., J. Contreras-Garduño, DP. Castro & J. Manjarrez & J.C. Vázquez-Chagoyán. 2021. The innate immune response of triatomines against *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* with an unresolved question: Do triatomines have immune memory? Acta Tropica. 10.1016/j. acta tropica.2021.

Castella, G., Christe, P. & Chapuisat, M. 2010. Covariation between colony social structure and immune defences of workers in the ant *Formica selysi*. Insect. Soc. 57, 233–238.

Castella, G., Chapuisat, M., Moret, Y., & Christe, P. 2008. The presence of conifer resin decreases the use of the immune system in wood ants. Ecological Entomology 33, 408–412.

Cerenius L., Lee B. & Söderhäll K. 2008. The pro PO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology Vol.29 No.6 Pag. 263-271.

Deshpande M. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. Crit. Rev. Microbiol. 25: 229-243.

Dhinaut, J., Chogne, M., & Moret, Y. 2017. Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect *J. Anim Ecol.*

Dubovskiy I., Whitten M., Kryukov V., Yaroslavtseva O., Grizanova E., Greig C., Mukherjee K., Vilcinskas A., Mitkovets P., Glupov V., Butt T. 2013. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc. R. Soc. B* 280, 20130584.

Favila-Ruiz, G., Jiménez-Cortés, J. G., Córdoba-Aguilar, A., Salazar-Schettino, P. M., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Pérez-Torres, A., De Fuentes-Vicente, J. A., Vences-Blanco, M. O., Bucio-Torres, M. I., Flores-Villegas, A. L., & Cabrera-Bravo, M. 2018. Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasites & vectors*, 11(1), 434.

Forlani L, Pedrini N, Juárez MP. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. 2011. *Res Rep Trop Med*. Sep. 29; 2:135-140.

Gálvez D., Chapuisat M. 2014. Immune Priming and pathogen resistance in ant queens. *Ecol Evol* 4:1761-1767.

Gillespie A., Claydon N. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Sci.* 27: 203-215.

Hauton C., Smith V. 2007. Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. *Bioessays* 29: 1138–1146.

Hajek A. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol.* 15: 193-249.

Harold F. 1999. In pursuit of the whole hypha. *Fungal Genet. Biol.* 27: 128-133.

Hegedus D., Khachatourians G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.* 13: 455-490.

Hung S., Boucias D., 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60, 152–158.

Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: Butt, T.M., Jackson, C.W. y Magan, N. (eds.) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potencial*. CABI Internacional, Wallingford, U.K. pp. 23-69.

Jones R. 1994. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference. Weeds. Vol. 3. Brighton, RU. pp. 1275-1282.

Junberg J. & Rangel F. 1984. Ciclo biológico de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en Laboratorio. Memoria's do Instituto Oswaldo Cruz; 79: 303-308.

Khachatourians G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En Howard DH, Miller JD (Eds.) The Mycota VI. Human and animal relationship. Springer. Berlin, Alemania. pp 331-364.

Khachatourians, G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora, D. K.; Ajello, L.; Mukerji, K. G. (Eds.). Handbook of applied mycology. Nueva York: Dakker. p. 613-661. vol. II: humans, animals and insects.

Krams, I., Daukste, J., Kivleniece, I., Krama, T., and Rantala, M. J. 2013. Previous encapsulation response enhances within individual protection against fungal parasite in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. Insect Science 20, 771–777.

Kutzer, M.A.M., Armitage, S.A.O., 2016. Maximising fitness in the face of parasites: areview of host tolerance. Zoology 119, 281–289.

Kurtz J., Franz K. 2003. Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425: 37–38.

Lanz-Mendoza H, Contreras-Garduño J. 2021. Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms. *Dev Comp Immunol.* 6; 127:104285. doi: 10.1016/j.dci.2021.104285. Epub ahead of print. PMID: 34626688.

Lemaitre, B. Reichhart, J.M. Hoffmann, J.A. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 14614e14619.

Little T., Hultmark D., Read A. 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol* 6: 651–654.

Lu HL, St. Leger RJ. 2016. Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi. *Adv Genet.* 94:251-85.

Masri, L., Branca, A., Sheppard, AE, Papkou, A., Laehnemann, D., Guenther, PS, Prah, S., Saebelfeld, M., Hollensteiner, J., Liesegang, H., Brzuszkiewicz, E., Daniel, R., Michiels, NK, Schulte, RD, Kurtz, J., Rosenstiel, P., Telschow, A., Bornberg-Bauer, E., Schulenburg, H. 2015. Coevolución huésped-patógeno: la ventaja selectiva de bacilo turingiense virulencia y sus genes de toxina cry. *PLoS Biol.* 13, e1002169.

Matsuo T, Okoda Y, Badgar B, Inoue N, Xuan X, Taylor DM, Fujisaki K. 2004. Fate of GFP-expressing *Escherichia coli* in the midgut and response to ingestion in a tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Experimental Parasitology* 108:67-73.

Méndez E., Sousa O.E. & Turner A.Y. 1997. Caracterización, biología y ecología de los triatomos panameños (Hemiptera: Reduviidae). *Scientia, Sistemática y Morfología (Panamá)*. 12:7-66.

Meyling N., & Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological control* 43, 145–155.

Milner J. 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News Inf.* 20: 47-50.

McKean K. A., Nunney L. 2005. “Bateman’s principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences,” *Evolution*, vol. 59, no. 7, pp. 1510–1517.

Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas. (CATIE, Costa Rica)* 63: 95-103.

Moreno I. & Jaramillo N. 1996. Estudios epidemiológicos sobre la enfermedad de Chagas en los departamentos de Antioquia, Sucre y Tolima, Colombia. In: Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador (Cl. Schofield, I. Jurberg & I.P. Dujardin, edit.), Edit. Indre, Mexico City: 27.

Moret, Y., & Siva-Jothy, M. T. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proceedings. Biological sciences, 270(1532), 2475–2480. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511>.

Nakajima Y, Van Naters-Yasui AVDG, Taylor D, Yamakawa M. 2001. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 31:747-751.

Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., Keyhani, N.O., 2015. Improving mycoinsecticides for insectbiological control. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 1057–1068.

Papkou, A., Gokhale, C.S., Traulsen, A., Schulenburg, H., 2016. Host–parasite coevolution: why changing population size matters. Zoology 119, 330–338.

Pham L., Dionne M., Shirasu-Hiza M., Schneider D. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. Plos Pathog 3.

Pedrini N., Villaverde M., Fuse C., Bello G., Juárez, M.P. 2010. *Beauveria bassiana* Infection Alters Colony Development and Defensive Secretions of the Beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 103, 1094–1099.

Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM. 2009. Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLoS Negl Trop Dis* 3(5): e434. doi: 10.1371/journal.pntd.0000434.

Pizarro J. & Romaña C. 1998. Variación estacional de una población silvestre de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Heteroptera: Triatominae) en la Costa Caribe Colombiana. *Bulletin de l'Institut Francais d'Etudes Andines*, 27: 309-325.

R Core Team. 2020. R: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ratcliffe, N.A., 1991. The prophenoloxidase system and its role in arthropod immunity. In: Warr, G.W., Cohen, N. (Eds.), *Phylogenesis of Immune Functions*. CRC Press, Boca Raton, pp.45–71.

Riquelme M., Reynaga P., Gires G, Bartnicki G. 1998. What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Genet. Biol.* 24: 101-109.

Rodrigues J. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 330: 448–448.

Rolff J., Reynolds S. 2009. Insect infection and immunity: evolution, ecology and mechanisms. Oxford University Press: Oxford.

Rolff J. 2002. “Bateman’s principle and immunity,” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 269, no. 1493, pp. 867– 872.

Rosengaus R., Traniello J., Chen T., Brown J., Karp R. 1999. Immunity in a social insect. *Naturwissenschaften* 86: 588–591.

Roth O., Sadd B., Schmid-Hempel P., Kurtz J. 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proc R Soc B* 276: 145–151.

Rowley A., Powell A. 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol* 179: 7209–7214.

Sadd B., Schmid-Hempel P. 2009. Principles of ecological immunology. *Evol Appl* 2: 113–121.

Sadd B., Schmid-Hempel P. 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol* 16: 1206–1210.

Schmid-Hempel P. 2009. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for ‘macroscopic phenomena’ such as virulence. *PhilTrans R Soc B* 364: 85–98.

Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu Rev Entomol* 50: 529–551.

Schmid-Hempel P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc R Soc B* 270: 357–366.

Schulte, RD, Makus, C., Hasert, B., Michiels, NK, Schulenburg, H. 2010. Múltiple adaptaciones recíprocas y cambio genético rápido en la coevolución experimental de un huésped animal y su parásito microbiano. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 7359–7364.

Shahrestani P.; Chambers M.; Vandenberg J.; García K.; Malaret G.; Chowdhury P.; Estrella Y.; Zhu M.; Lazzaro B. 2018. Sexual dimorphism in *Drosophila melanogaster* survival of *Beauveria bassiana* infection depends on core immune signaling. *Sci Rep.* 8:12501. doi: 10.1038/s41598-018-30527-1.

Shaw DK, Wang X, Brown LJ, Chávez ASO, Reif KE, Smith AA, Scott AJ, McClure EE, Boradia VM, Hammond HL, Sundberg EJ, Snyder GA, Liu L, Deponete K, Villar

M, Ueti MW, De la Fuente J, Ernst RK, Pal U, Fikrig E, Pedra JHF. 2017. Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. *Nature Communications* 8:14401.

Sousa O. 1972. Anotaciones sobre la enfermedad de Chagas en Panamá. Frecuencia y distribución de *T. cruzi* y *T. rangeli*. *Revista de Biología Tropical*, 20: 167-179.

St. Leger R., Roberts D. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* 15: 83-87.

St. Leger R., Bidochka M. 1996. Insect-fungal interactions. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta GR, editors. *New directions in invertebrate immunology*. Fair Haven, NY: SOS Publications, p 443–479.

Tidbury H., Pedersen A., Boots M. 2011. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proc R Soc B* 278: 871–876.

Waqar islam, Muhammad Adnan, Asad Shabbir, Hassan Naveed, Yakubu Saddeeq Abubakar, Muhammad Qasim, Muhammad Tayyab, Ali Noman, Muhammad Shahid Nisar, Khalid Ali Khan, Habib Ali. (2021). Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests, *Microbial Pathogenesis*, Volume 159, 105122, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>.

Wessels J. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genet. Biol.* 27: 134-145.

Whitlaw J., Chaniotis B. 1978. Palm trees and Chagas' disease in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 27:873-81.

Wojda I., Kowalski P., Jakubowicz T. 2009. Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *Journal of Insect Physiology* 55, 525–531.

Xiao G., Ying S.-H., Zheng P., Wang Z., Zhang S., Xie X., Shang Y., St. Leger R., Zhao G., Wang C., Feng M. 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*.

Yassine H., Kamareddine L., Osta M. 2012. The Mosquito Melanization Response Is Implicated in Defense against the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathog.* 8, e1003029.

Zanchi C, Troussard JP, Martinaud G, Moreau J, Moret Y. (2011). Differential expression and costs between maternally and paternally derived immune priming for offspring in an insect. *J Anim Ecol*; 80:1174-83; PMID:21644979.

Zuk, M., Simmons, L. W., Rotenberry, J. T., & Stoehr, A. M. 2004. Sex differences in immunity in two species of field crickets. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 627– 634.

Zuk M. & McKean K. A. 1996. "Sex differences in parasite infections: patterns and processes," *International Journal for Parasitology*, vol. 26, no. 10, pp. 1009–1024.

Zuk. M, 1990. "Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint," *Parasitology Today*, vol. 6, no. 7, pp. 231–233.