

Universidad De Panamá

Facultad De Ciencias Naturales, Exactas Y Tecnología

Escuela de Biología

“Respuesta Inmune Inducida en Insectos, un Metaanálisis”

Estudiante:

Adolfo A. Alba P.

Trabajo de Graduación presentado
a la Escuela De Biología, como
requisito parcial para optar por el
Título de Licenciatura en Biología
con Orientación en Fisiología y
Comportamiento Animal.

2023

Panamá, República de Panamá

DEDICATORIA

“Siempre dicen que el tiempo cambia las cosas, pero en realidad tienes que cambiarlas tú mismo”

-Andy Warhol

Quiero dedicarle este trabajo a mi madre:

Triana del Carmen Polanco

a mi padre:

Adolfo Alonso Alba Ortega

y a mi abuela:

Carmen Edith Sandoval

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis asesores Dumas Gálvez, Yostin Añino y Armando Castillo por su paciencia, apoyo y ayuda en la realización de este proyecto.

Agradezco a mi padre y madre por haberme dado todo lo que pude haber necesitado, también por su paciencia en este proceso.

A mi Tío Igor por facilitarme de gran manera el transporte durante la carrera.

A Yaneilys Ospino y Jessika Apolayo por sus oportunas palabras de apoyo y aliento.

Muchas gracias a todos.

Contenido

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN.....	1
III. MARCO TEÓRICO	6
A. La respuesta Inmune	6
1. La respuesta inmune en insectos	6
2. El cebado inmune en insectos	7
3. Estado actual de la inmunidad en insectos	7
B. El metaanálisis	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
A. Búsqueda y selección de la literatura.....	8
B. Extracción de Datos y Metadatos.....	10
C. Análisis estadístico.....	11
V. RESULTADOS.....	12
VI. DISCUSIÓN	19
A. Diferencias entre taxas.....	20
B. Inducción inmune de eusociales vs solitarios	21
C. Especificidad	22
D. Tiempo entre reto e inducción.....	23
E. Alimentación y flora bacteriana	24
VII. CONCLUSIÓN	26
VIII. RECOMENDACIONES.....	27
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

Figuras y Tablas

Figura 1 10

Figura 2 15

Figura 3 16

Figura 4 16

Figura 5 17

Figura 6 17

Tabla 1 18

I. RESUMEN

La inmunidad en insectos suele ser considerada solamente innata e inespecífica, debido a que el gasto energético para mantener un sistema inmune, que a su vez reconozca patógenos es una limitante en animales con esperanza de vida corta, aun así, la evidencias sugieren que estos tienen un nivel de especificidad y respuesta inmune mejorada. Utilizando un metaanálisis, se usaron datos extraídos de experimentos de supervivencia en insectos sobre inmunidad, en donde se indujo al insecto con un patógeno inactivado o en una dosis baja del mismo y luego se retó al insecto con una dosis letal, comparándolo con un grupo de control que no fue expuesto inicialmente al patógeno. Esto reveló que los insectos poseen una habilidad de una mejor respuesta inmune en supervivencia al ser inducidos previamente contra el mismo u otro patógeno, y esta respuesta es más fuerte, es decir presenta mayor supervivencia entre menos tiempo transcurra entre el reto e inducción.

II. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune innato de los insectos se ha visto convencionalmente como un grupo de moléculas y procesos que defienden a las células y organismo contra patógenos. Los sistemas inmunes innatos usan agentes químicos, bioquímicos o barreras mecánicas

para prevenir ataques de patógenos. Estos sistemas tradicionalmente no confieren protección específica o duradera (memoria) a los organismos, contra patógenos que los han atacado en el pasado, indicando que no tienen memoria inmunológica (Criscitiello & Figueiredo, 2013). Estos sistemas innatos se basan en respuestas humorales o celulares que actúan sobre un amplio rango de patógenos que han sido identificados mediante selección natural, por lo tanto, son respuestas generales (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012; Tsakas & Marmaras, 2010). Debido a la falta de células inmune en insectos con función homologa a las células T y B del sistema inmune de los mamíferos (Müller et al, 2013), es de esperarse que el sistema inmune de los insectos funcione de manera inespecífica, atacando a todos lo que no sea reconocido como propio del animal o siendo activado cada vez que un agente patógeno es percibido.

No es necesario que un patógeno cause daño para ser reconocido por el individuo, debido a que su reconocimiento no depende del daño que este causando, si no de la estructura de su pared celular (Moret & Siva-Jothy, 2003; Christofi & Apidianakis, 2013; Khan et al, 2016; Rosengaus et al, 2013). En algunos casos, el único daño hecho al individuo ha sido el daño mecánico por el método de inoculación por inyección, la cual se ha probado no provoca diferencias al ser comparado con un grupo control no inyectado (Medina-Gómez et al. 2018a, b).

Otro factor por lo que los insectos no deberían tener un sistema inmune con memoria, es que generalmente los insectos tienen periodos de vida cortos (Garnier et al, 2013), esto

apunta a que estos no necesiten un sistema inmune con memoria, ya que este sería un gasto prohibitivo, el cual solo tendría sentido en animales de vida larga, mientras que, en animales con periodos de vida cortos, esta energía sería mejor invertida en reproducción o búsqueda de alimento.

A pesar de que todo debería apuntar a que los insectos no tengan un sistema inmune desarrollado, muchos experimentos han demostrado que el sistema inmune de insectos tiene capacidades de una respuesta inmunidad inducida (Eleftherianos et al, 2006; Medina Gomez et al, 2018; Miyashita et al, 2015; Taszłow et al, 2017).

La respuesta inmune inducida es una respuesta inmune aumentada generada por un insulto inmunológico, es decir, una inducción inmune: un ataque patogénico no letal o sustancias identificadoras de un patógeno (Wu et al, 2015) o en algunos casos; un evento estresor (Le Bourg et al, 2008; Browne et al, 2014).

Las respuestas inmunes inducidas pueden mantenerse por un cierto periodo de tiempo, llevando a una protección mejorada del animal contra otro reto posterior (Kurtz, 2005), estas respuestas pueden ser específicas; que es la capacidad de defenderse contra la misma especie o cepa de patógeno más efectivamente (Bolte et al, 2013; Fisher & Hajek, 2015), o no específica, al actuar contra patógenos diferentes y de manera generalizada (Moret & Siva-Jothy, 2003).

Metodológicamente la inducción inmune puede provocarse por medio de inoculaciones de las moléculas identificadoras de patógenos (Wu et al, 2015), ingestión oral de

patógenos (Greenwood et al, 2017; Milutinović et al, 2014; Milutinović et al, 2013), factores no biológicos (Krams et al, 2013), introducción de ADN viral (Tidbury et al, 2011) y hasta por factores físicos estresores (Browne et al, 2014; Le Bourg et al, 2008). Estas inoculaciones pueden ser inyectadas (Wu et al, 2015), ingeridas oralmente (Greenwood et al, 2017; Milutinović et al, 2014; Milutinović et al, 2013) o aplicadas directamente sobre la cutícula del insecto en el caso de los hongos (Reber & Chapuisat, 2012).

En condiciones naturales, las bacterias entrarían al insecto por medio de la vía oral, que sería la más común y por ende debería ser la mejor preparada para responder a patógenos, como se evidencia en Boulanger et al, (2001) y Lehane et al. (1997). La vía oral, y por ende la gástrica, puede contener receptores diferentes a los encontrados en otras cavidades del animal, por lo que es posible que el mismo animal responda de manera diferente a un patógeno inoculado vía inyección y vía oral. Mientras que los hongos pueden entrar por el hemocele, esta puede tener mecanismos de detección diferentes al sistema gástrico, además de que al momento de penetrar la cutícula el hongo puede tener un tamaño considerable, y causar daño más rápidamente que una infección bacteriana de vía oral. Se conoce que el sistema gástrico de los insectos no es un lugar estéril, este es una amalgama de bacterias que en su mayoría no son patogénicas para el insecto, y en el caso de algunos insectos como las termitas, son necesarios para su supervivencia (Rosengaus et al, 2011), por lo que es necesario para el insecto identificar no solamente lo interno de lo externo, lo propio de lo impropio, si no también lo benéfico de lo perjudicial. Por lo que un sistema inmune que pueda reconocer, y tener especificidad

parece ser benéfico y hasta necesario para algunos insectos como las termitas, que consumen materia orgánica en descomposición.

Sumado a que las bacterias introducidas vía oral pueden llegar rápidamente al hemocoele del animal (Klowden & Greenberg, 1977), es de suma importancia para el insecto tener una mayor eficacia al detectar bacterias que podrían hacerle algún daño al ingresar por vía oral. Al parecer esta identificación de bacterias posiblemente dañinas es una en la que la identificación de un patógeno es específica, ya que reconoce los patógenos no propios del insecto. Lo mismo puede pasar en las inoculaciones inyectadas en el hemocoele, aunque la cual no es totalmente estéril (Blow & Douglas, 2019), la proliferación de un patógeno en la hemolinfa puede llevar rápidamente a la muerte del animal, la capacidad de reconocimiento y acción inmune en la hemolinfa debe ser una característica seleccionada naturalmente. Por estas razones es probable que una inducción oral cause una respuesta más efectiva que una inducción inyectada.

Otro factor que puede afectar la activación inmune es el sexo del animal (Moreno-García et al, 2014; Zuk et al, 2004; Schwarzenbach et al, 2004; Steiger et al, 2012), y este puede ser dependiente de los factores extrínsecos como la alimentación (Steiger et al, 2012) también se puede presentar una diferencia a favor del macho (Zuk et al, 2004) o la hembra (Schwarzenbach et al, 2004).

Debido a la cantidad de factores mencionados que pueden causar a una activación inmune en insectos, y la variedad de procedimientos, técnicas, y taxones estudiados, se espera

una gran variación entre los experimentos, por lo que un metaanálisis podría ayudar a identificar qué factores son más variables entre pruebas, que taxones son más vulnerables, la efectividad de la especificidad y eficacia del cebado de los mismos.

III. MARCO TEÓRICO

A. La respuesta Inmune

La respuesta inmune es la defensa del organismo antes los agentes infecciosos y otras sustancias extrañas, que se compone de dos tipos: La innata que es rápida, general y no específica; y la adaptativa que es lenta, específica y con memoria. El objetivo de esta reacción o respuesta es la de neutralizar, eliminar o expulsar al agente patógeno del sistema del organismo afectado. La respuesta inmune se ha estudiado ampliamente en vertebrados por lo que se conocen muchos de los mecanismos, formas de detección y respuesta que hay en los mamíferos al momento de detectar patógenos.

1. La respuesta inmune en insectos

Los mecanismos de respuesta inmune en invertebrados son diferentes a los vertebrados, tradicionalmente se ha creído que la compleja red de reacción y respuestas en mamíferos está ausente en los invertebrados y por ende los insectos, por lo que los insectos no tienen memoria inmune tradicional, esto se debe principalmente a la falta de linfocitos B y T en invertebrados, que son células que se encargan de reconocimiento de

los patógenos y su futuro reconocimiento y su origen es en la médula ósea de los vertebrados.

2. El cebado inmune en insectos

El cebado Inmune es el contacto de un patógeno con un organismo en donde el patógeno está en baja dosis o debilitado en alguna forma para que el organismo pueda reconocer al patógeno y estar mejor preparado para que el verdadero reto inmune; que es con un patógeno igual o diferente sin ninguna debilitación y usualmente en cantidades suficientes para matar al organismo. En mamíferos se conoce el mecanismo de acción, y bajo estos principios es que las vacunas tradicionales operan en humanos.

Los insectos poseen esta habilidad de memoria inmune que poseen los vertebrados pese a no tener los mismos mecanismos de los mamíferos, por lo que se pueden hacer experimentos de cebado inmune en estos; estos experimentos permiten explorar el sistema inmune de los insectos y así poder determinar los efectos fenomenológicos del cebado inmune en insectos para luego elucidar los mecanismos específicos de como esto sucede.

3. Estado actual de la inmunidad en insectos

Actualmente existe gran variedad de experimentos en donde se hace un cebado inmune de los insectos, se ha encontrado eficacia del cebado inmune y también se ha encontrado insectos que al parecer no la presentan, sumado a que no hay un estándar específico y delimitado sobre cómo hacer estas pruebas, existe una gran diversidad de

metodologías, muchas de ellas siguen el principio básico de cebado inmune, tiempo de espera, reto inmune y medición del tiempo de supervivencia del animal o medición de los componentes inmunes del animal en el momento de su muerte natural o provocada .

B. El metaanálisis

Un metaanálisis es un análisis estadístico que combina el resultado de muchos estudios científicos que intentan responder la misma pregunta, su objetivo es usar la estadística para llegar al resultado común de los experimentos usados en su base de datos y así tener una respuesta más cercana a la verdad según los datos obtenidos.

Debido a la cantidad de condiciones que hay que tomar en cuenta para medir la efectividad del cebado inmune en insectos, es de esperarse que algunos estudios tengan resultados positivos y otros negativos, un metaanálisis sería útil al poder unir el resultado de los estudios y elucidar las variables que afectan su detección experimental.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un metaanálisis, que es una herramienta estadística para estimar el promedio y varianza del efecto en una población de estudios que tienen una muy parecida o similar pregunta de investigación (Field & Gillett, 2010). Siendo en este caso, la población conformada por insectos y la pregunta de investigación ¿Existe la inducción inmune en insectos que genere beneficios en términos de supervivencia?

A. Búsqueda y selección de la literatura

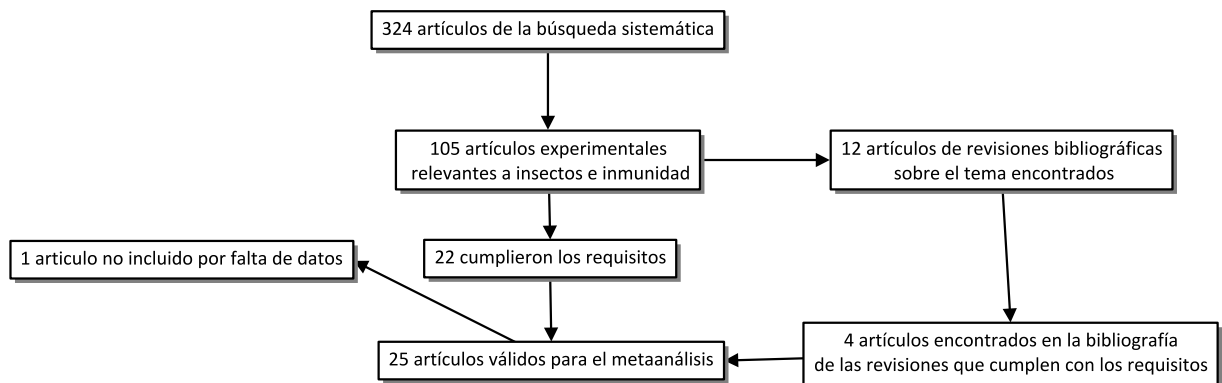
En Web of Science, se buscó el término "immune priming" y se refinó la búsqueda con el término "insects", con publicaciones fechadas entre 2010 a 2019 de todas las bases de datos (WOS, KJD, SCIELO y ZOOREC), a las cuales se accedió mediante la red del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI).

Los artículos obtenidos fueron 324, de los cuales se descartaron todos los que cumpliesen con los siguientes requisitos:

- Artículos experimentales sobre inducción inmune y/o inducción inmune
- Población experimental conformada por insectos
- Al menos un grupo de control negativo y otro experimental, en el que el grupo experimental consista en una inducción y un reto inmune posterior, ambos no dependientes de la dosis del patógeno.
- Patógeno utilizado para la inducción o reto debe ser una bacteria, hongo, virus o protozoo.
- Agente inductor y agente cebador no deben contener más de un patógeno a la vez.
- Solo se usaron artículos únicos, de repetirse se usó el más reciente.
- Experimento dentro de una sola generación, no transgeneracional.

Las revisiones de literatura no experimentales (Armitage et al, 2015; Chambers & Schneider, 2012; Contreras-Garduño et al, 2016; Cooper & Eleftherianos, 2017; Masri & Cremer, 2014; Milutinović et al, 2016; Tate & Rudolf, 2012) encontrados en la búsqueda original que trataban sobre inmunidad en insectos se revisaron y su bibliografía se pasó por los puntos ya mencionados, de estos, los artículos que cumplieren con los puntos fueron añadidos. Este proceso se expresa en la Figura 1.

Figura 1. Diagrama de flujo de la obtención de los artículos extraídos.



B. Extracción de Datos y Metadatos

Metadatos extraídos: Título del artículo, nombre del primer autor del artículo, año de publicación y país.

Datos extraídos : Especie experimentada, recolectado en campo o criado en laboratorio, sexo de la especie experimentada, patógeno del cebado, patógeno del reto inmune, estadio de desarrollo en la que el animal fue cebado y retado, tipo de anestesia si aplica,

tipo de inoculación, tipo de inactivación del patógeno cebado, tiempo entre cebado y reto, tiempo desde el reto hasta la última muerte registrada, cebado y reto homogéneo (mismo patógeno) o heterogéneo (diferentes patógenos), se identificaron bacterias como gram negativa o positiva, tamaño de muestra en el grupo control y experimental.

Se calculó con la información extraída para cada ensayo el coeficiente de riesgo (CR), la ponderación del estudio, la desviación estándar y el logaritmo natural del coeficiente de riesgo; estos fueron calculados utilizando la herramienta proporcionada por Tierney et al. (2007).

El CR (del inglés Hazard Ratio) en un análisis de supervivencia, es la medición de que un evento ocurra en dos grupos, siendo el evento en este caso la muerte del animal y los grupos el control y el experimental, la relación de ocurrencia del evento entre estos grupos nos da el CR. Cuando el CR es cercano a 1, el evento ocurrió con la misma frecuencia en ambos grupos, cuando este es menor a 1 indica una ocurrencia mayor en el grupo control y cuando es mayor a 1 indica una ocurrencia mayor en el grupo experimental. En este caso cuando el CR es mayor a 1, indica un éxito en el cebado inmune ya que menos individuos murieron al ser cebados comparados con el grupo de control, mientras que cuando el CR es menor a 1, indica que el cebado inmune fue perjudicial para los individuos, ya que más murieron en el grupo de tratamiento que en el control.

C. Análisis estadístico

Se utilizó la función `rma.mv` en el paquete `metafor` de R (R Core Team 2022) para realizar el metaanálisis. Con dicha función, se hizo un análisis sin variables explicativas para evaluar el tamaño de efecto promedio entre ensayos junto con una prueba de heterogeneidad, al haber mucha heterogeneidad entre ensayos se usaron variables explicativas en el modelo (orden, combinación de patógenos, tipo de patógenos y tiempo entre retos). Dado que algunos estudios incluían más de un ensayo experimental, se incluyó el ID de cada estudio como un efecto aleatorio. Se realizó una simplificación del modelo completo en términos del Akaike Information Criteria (AIC).

Las figuras para ilustrar los tamaños de efecto del coeficiente de riesgo se construyeron con la función `forest` en donde el logaritmo del Coeficiente de Riesgo (CR) negativo representa un mayor efecto (mayor supervivencia) en el grupo experimental que, en el control, un log del CR positivo representa un mayor efecto en el grupo control y cercano a uno representa similitud entre ambos grupos.

V. RESULTADOS

La búsqueda inicial identificó 324 artículos, 105 tenían títulos relacionados a insectos e inmunidad, de estos, 22 cumplieron los requisitos. Se encontraron 12 revisiones bibliográficas entre los 105 artículos, la bibliografía de estas se pasó por los requisitos y dio 4 artículos más, para un total de 26 artículos, uno de ellos no admitido por falta de información, lo que dio un total de 25 artículos, con un total de 135 ensayos para el metaanálisis.

El log CR promedio de todos los ensayos fue de -0.42 (-0.51, -0.34) indicando que si fue eficaz la inducción inmune para mejorar la supervivencia del grupo que fue expuesto al patógeno inicialmente (Figura 2).

En el análisis estadístico hubo mucha heterogeneidad ($Q (df = 134) = 624.1005$, $p\text{-val} < .0001$) esto indica que los factores que pueden influenciar los datos no son consistentes; dicho de otro modo, difieren mucho uno de otro. El modelo con variables explicativas redujo la heterogeneidad ($QE (df = 122) = 470.7890$, $p\text{-val} < .0001$), en donde una Q mayor significa mayor heterogeneidad

Los órdenes Blattodea (-0.55 [-0.66, -0.44], $n=45$, $p<0.001$), Coleoptera (-0.44 [-0.64, -0.23], $n=33$, $p<0.001$) y Lepidoptera (-0.68 [-0.94, -0.42], $n=25$, $p<0.001$) mostraron evidencia que la inducción inmune fue eficaz entre estos grupos, en Hymenoptera (0.12 [-0.26, 0.50], $n=5$, $p= 0.5301$) y Diptera (-0.13 [-0.32, 0.06], $n=25$, $p> 0.1912$), la inducción inmune no mostró eficacia en mejorar la supervivencia (Figura 3).

La eficiencia de la inducción inmune disminuye con el tiempo entre la inducción y el reto inmune (0.0008 [0.0004, 0.0011] $z=3.8066$, $p=0.0001$, Figura 4).

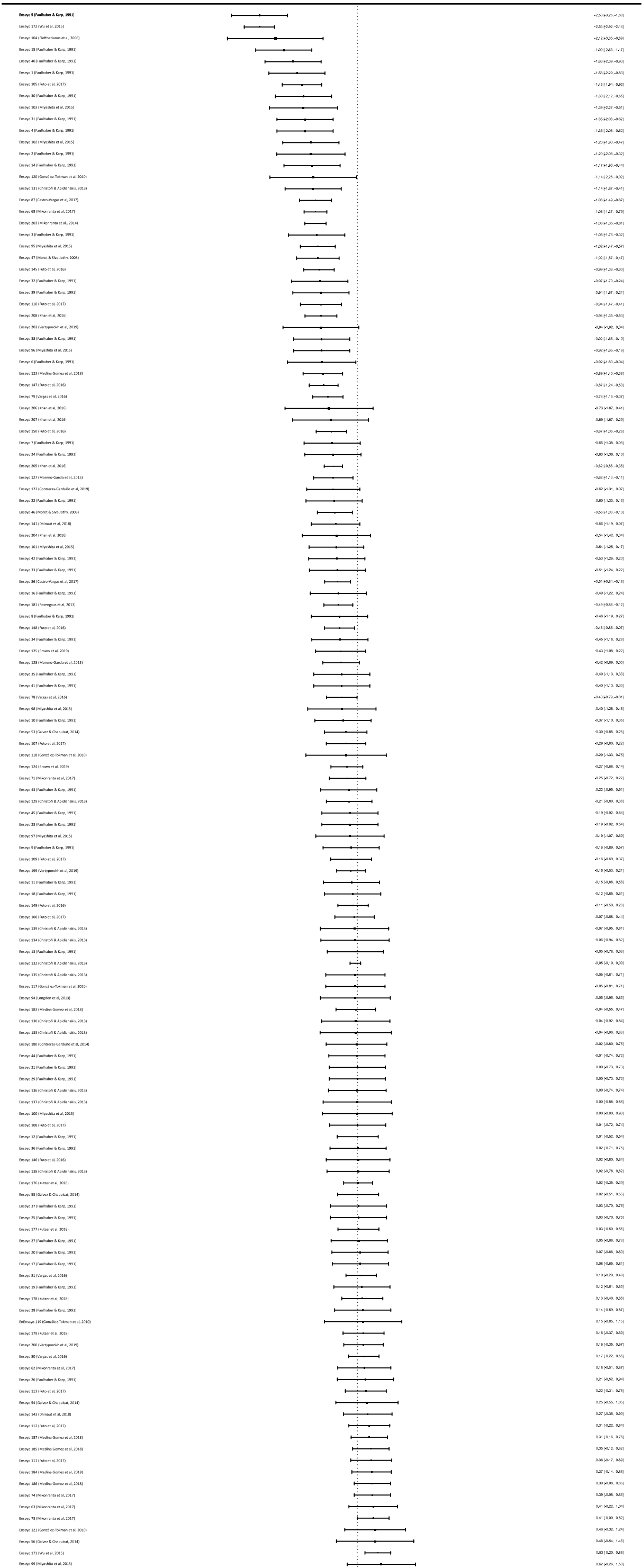
Los tratamientos que tenían como inductor a bacterias tuvieron una mayor eficacia en la inducción inmune bacteria-bacteria (-0.47 [-0.56, -0.38] $n=120$, $P <.0001$) y bacteria-hongo (-0.80 [-1.12, -0.48] $n=2$, $p> 0.001$), mientras que los tratamientos que tenían como inductor hongos no hubo eficacia en la inducción inmune que son hongo-bacteria (-0.15 [-0.70, 0.39] $n=3$, $p=0.5891$) y hongo-hongo (0.18 [-0.16, 0.51] $n=8$, $p=0.2899$) Cabe

destacar la poca cantidad de ensayos con hongos (13) y de estos, cuatro fueron con hormigas (Figura 5).

Tanto en combinaciones heterólogas (-0.52 [-0.65, -0.39] n=58, $p<0.0001$) como en homologas (-0.34 [-0.46, -0.23] n=77, $p<0.0001$) hubo eficacia de la inducción inmune (Figura 6).

Figura 2 (página siguiente). Diagrama de bosque mostrando tamaño de efectos, expresado como log (CR) de ensayos experimentales que investigaron el cebado inmune medido como incremento en supervivencia. El eje Y izquierdo son los identificadores de los ensayos utilizados en el metaanálisis, el eje Y derecho es el log de CR de cada ensayo y el intervalo de confianza. El eje X indica el log (CR). Entre más negativo es el valor, mayor supervivencia hubo en el grupo experimental comparado con el grupo control, mientras que valores positivos indican una mayor supervivencia en el grupo control. Si el límite de confianza traslapa el cero, entonces el resultado se considera no significativo. El diamante negro representa el tamaño de efecto promedio de todos los ensayos (-0.42 [-0.51, -0.34]).

Tamaño del Efecto



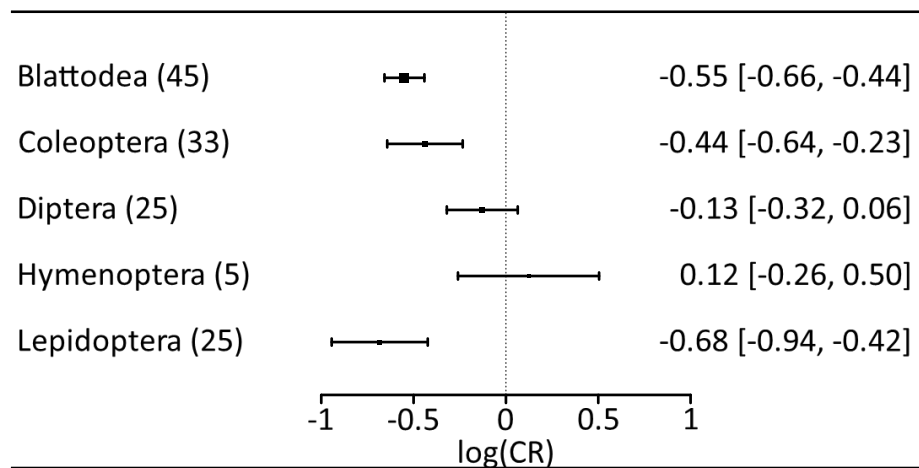


Figura 3. Diagrama de bosque mostrando tamaño de efectos, expresado como log (CR) de ensayos experimentales que investigaron el cebado inmune medido como incremento en supervivencia y resumido para cada Orden de insectos estudiado. El número en paréntesis es el número de ensayos, el eje Y derecho muestra el logaritmo natural de CR de los grupos y su intervalo de confianza. Para detalles sobre los tamaños de efecto, consulte la figura 2.

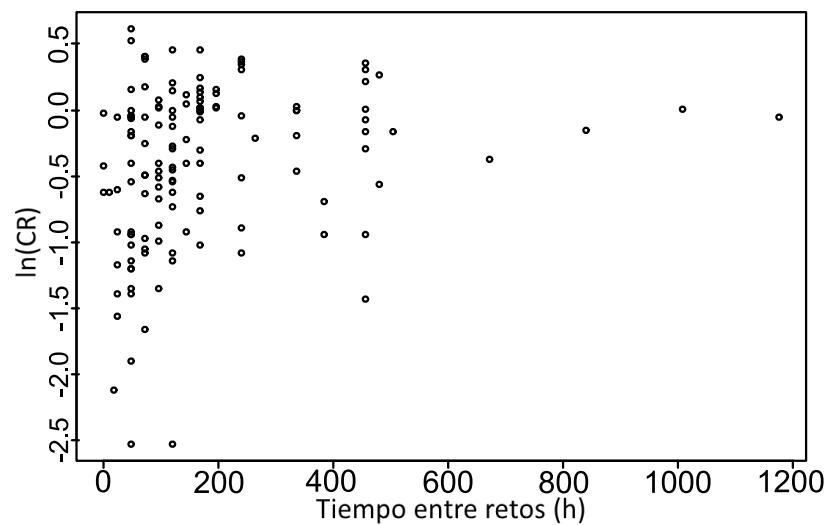


Figura 4. Relación entre el tiempo transcurrido entre la inducción y el reto inmune, junto al tamaño del efecto (log CR). Si el ln de CR es negativo, indica una mayor supervivencia en el grupo experimental comparado con el control. Si el ln de CR es cercano a cero indica que no hubo diferencias entre los grupos.

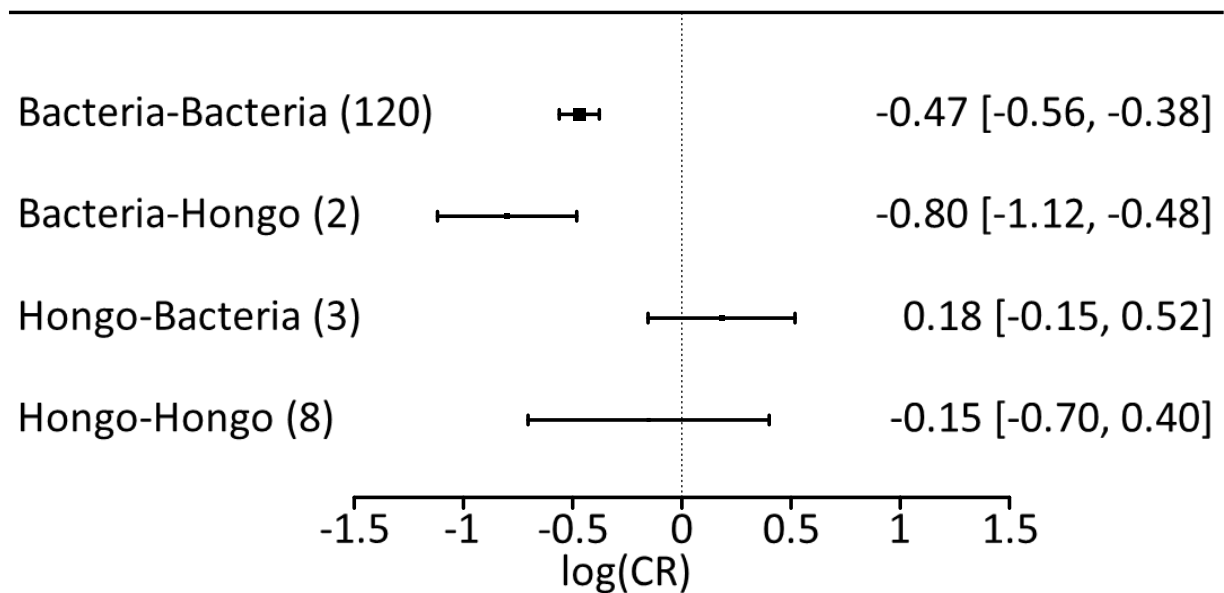


Figura 5. Diagrama de bosque mostrando tamaño de efectos, expresado como log (CR) de ensayos experimentales que investigaron el cebado inmune medido como incremento en supervivencia resumido para cada combinación de bacteria y hongo investigado. En el eje Y izquierdo están las combinaciones entre bacteria y hongo encontradas y el número en paréntesis es el número de ensayos en cada combinación, en el eje Y derecho están el logaritmo natural de CR y sus intervalos de confianza. Para detalles sobre los tamaños de efecto, consulte la figura 2.

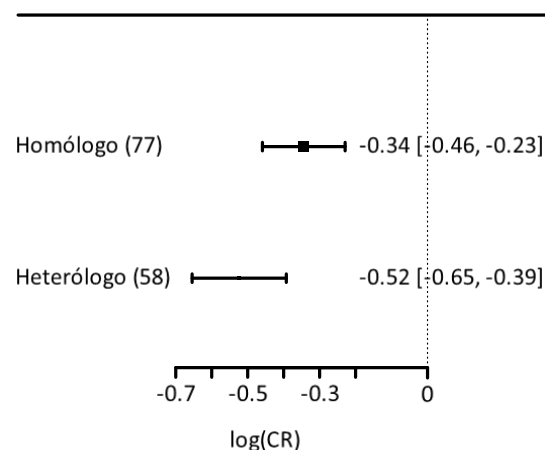


Figura 6. Diagrama de bosque mostrando tamaño de efectos, expresado como log (CR) de ensayos experimentales que investigaron el cebado inmune medido como incremento en supervivencia resumido para combinaciones de patógenos homólogos y heterólogos. En el eje Y izquierdo muestra tratamientos homólogos en los que el patógeno inductor es el mismo del reto inmune y tratamientos heterólogos donde el patógeno de la inducción no es el mismo que el del reto inmune. Los números en paréntesis son la cantidad de ensayos. Para detalles sobre los tamaños de efecto, consulte la Figura 2.

Tabla 1: Valores del coeficiente error estándar (se), valor del estadístico Z, valores de p y los intervalos de confianza superior e inferior del modelo completo con todas las variables (rma.mv(lnhr,se^2, W=weight,mods =~sex+gram+collected+stagefirst_inoculation+anesthesia_method+stagesecond_inoculation+pathogen_in activation+first_method_inoculation+second_method_inoculation+exp_duration, random = list(~ 1 | id), data=data, method="FE"))).

Niveles de significancia: 0 '***', 0.001 '**', 0.01 '*', 0.05 '.', 0.1 '.', 1

Coeficiente	Estimado	Error estándar	Valor Z	Valor P	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior	Significancia
Intercepto	0.063	0.7676	0.0821	0.9345	-1.4414	1.5675	
Macho	-0.0975	0.3523	-0.2768	0.7819	-0.7879	0.5929	
Sexo Mezclado	1.0052	0.5083	1.9776	0.048	0.009	2.0015	*
Sexo no especificado	1.1415	0.4706	2.4255	0.0153	0.2191	2.064	*
Gram negativa-positiva	0.5226	0.1193	4.3803	<0.0001	0.2888	0.7564	***
Cebados sin Bacteria gram positiva o negativa	0.2149	0.2517	0.8538	0.3932	-0.2784	0.7083	
Combinación de Bacterias Gram positiva-negativa	-0.4311	0.3162	-1.3634	0.1728	-1.0508	0.1886	
Combinación de Bacteria Gram positiva-positiva	0.1988	0.2398	0.829	0.4071	-0.2713	0.6689	
Colectados en Laboratorio	-0.86	0.5178	-1.6609	0.0967	-1.8748	0.1548	.
Sin especificar donde se colectaron	-0.3952	0.5554	-0.7115	0.4768	-1.4838	0.6935	
Cebado en larva reto en larva	-0.0892	0.3855	-0.2314	0.817	-0.8447	0.6663	
Método de anestesia	-1.0505	0.6318	-1.6628	0.0963	-2.2888	0.1877	.
Sin método de anestesia	-0.4816	0.5162	-0.933	0.3508	-1.4933	0.5301	
Reto en larva	-1.1077	0.5884	-1.8825	0.0598	-2.261	0.0456	.
Cebado por baja dosis del patógeno	0.0859	0.1874	0.4585	0.6466	-0.2814	0.4533	
Cebado con LPS	-0.2343	0.3354	-0.6987	0.4847	-0.8917	0.423	
Sin inactivación de patógeno	-0.0883	0.332	-0.2658	0.7904	-0.7389	0.5624	
Cebado con peptidoglucano	-0.5903	0.3551	-1.6625	0.0964	-1.2863	0.1056	.
Cebado con toxina producida por el patógeno	1.742	0.3772	4.6177	<0.0001	1.0026	2.4814	***
Cebado con inoculación oral	1.0616	0.3069	3.4592	0.0005	0.4601	1.6632	***
Cebado con inoculación tópica	0.2915	0.3354	0.8692	0.3848	-0.3659	0.949	

Reto con inoculación oral	-0.6962	0.3128	- 2.2256	0.026	-1.3093	-0.0831	*
Reto con inoculación tópica	-0.5794	0.4407	- 1.3148	0.1886	-1.4432	0.2843	
Duración del experimento	0.0015	0.0006	2.7114	0.0067	0.0004	0.0026	**

VI. DISCUSIÓN

En el grupo de insectos estudiados, en donde en un primer reto inmune se inoculó con una versión atenuada de un patógeno, y que posteriormente se inoculó en un segundo reto inmune con una dosis más alta o viva del patógeno, se encontró una mejora general en la supervivencia al ser comparado con el grupo control (en donde el primer reto no se efectuó), sugiriendo que el fenómeno conocido como inducción inmune se encuentra presente de forma generalizada en insectos, al ser medido a través de la supervivencia. Este hallazgo corrobora trabajos experimentales sobre la presencia del fenómeno de la inducción inmune en insectos (Cooper & Eleftherianos, 2017; Milutinović et al, 2016; Contreras-Garduño et al, 2016; Miyashita et al, 2015). Aun así, hubo ensayos en donde no hubo presencia de inducción inmune en términos de supervivencia (Wu et al, 2015; Vargas et al, 2016; Taszłow et al, 2017; Longdon et al, 2013; Medina Gomez et al, 2018). Hay que tener en cuenta que hay otros métodos para comprobar la reacción inmune que no usen supervivencia; como la cuantificación de la actividad antibacteriano de fenoloxidasa extraída (Moret & Siva-Jothy, 2003; Mikonranta et al, 2017) o el crecimiento bacteriano

de la hemolinfa (Mikonranta et al, 2017), y otros parámetros (Brown et al, 2019; Taszłow et al, 2017; Mikonranta et al, 2017). Por lo que la detección del cebado inmune podría cambiar al usar estos métodos.

A. Diferencias entre taxas

Debido a que muchas larvas y adultos insectos se alimentan de material orgánico en descomposición, como las larvas de dípteros, coleópteros y lepidópteros, que ingieren grandes cargas bacterianas al alimentarse, hace que una respuesta inmune generalizada sea inefectiva, ya que estaría activándose cada vez que el animal se alimente, gastando valiosa energía, por lo que una respuesta inmune específica que diferencie entre organismos potencialmente patógenos sería lo más eficiente en este caso. En el caso de Diptera, era de esperarse también un efecto pronunciado en la inducción inmune, entre este grupo (25 ensayos), hubo 4 ensayos que tuvieron inducción inmune entre estadios (larva a adulto), estos fueron efectuados en mosquitos, mientras que en moscas todos fueron en el mismo estadio (adulto), esto deja la interrogante de que tanto puede afectar la metamorfosis en la respuesta inmune en moscas (González-Serrano et al, 2020; Majumder et al, 2020), ya que estas se alimentan de material en descomposición en su gran mayoría, y se esperaría que su respuesta inmune sea diferente entre estadios por su cambio de alimentación en algunos casos. También teniendo en cuenta que los mosquitos macho no son hematófagos durante la adultez (Foster & Takken, 2004) podría haber

diferencia entre sexos, pero analizar esto se complica por el hecho de que la mayoría de los estudios no registró el sexo de los individuos en las pruebas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre moscas y mosquitos y tampoco entre estadios.

B. Inducción inmune de eusociales vs solitarios

Debido al amplio rango de comportamientos grupales que se ven en animales eusociales referentes a la inmunidad (Hamilton et al, 2011; Hughes et al, 2002; Rosengaus & Coates, 1998; Traniello et al, 2002; Ugelvig & Cremer, 2007) como son el aislamiento de miembros infectados (Ugelvig & Cremer, 2007), el traspaso de elementos que aumenten la respuesta inmune mediante trofilaxis (Hamilton et al, 2011) y la limpieza cuticular mutua (Hamilton et al, 2011; Ugelvig & Cremer, 2007), era de interés evaluar si insectos eusociales y solitarios diferían en la expresión de la respuesta inmune, ya que los insectos solitarios dependen de ellos mismos para su inmunidad, por lo que su respuesta inmune debería ser mayor a la de los insectos sociales que en parte dependen de la colonia para mantenerse sanos. Pero debido a la baja cantidad de estudios encontrados con Hymenoptera, no se pueden hacer conclusiones acerca de este grupo en este estudio. Entre los estudios encontrados de Hymenoptera que no calificaron para este estudio, la mayoría tenía agrupaciones de individuos, por lo que la comparación con los insectos solitarios sería más complicada, ya que es posible que al comparar en grupos tanto insectos eusociales y solitarios, los solitarios presenten menor supervivencia por no presentar comportamientos eusociales como los ya mencionados, por lo tanto, para poder

comparar animales sociales y eusociales se deben tomar factores como lo es el estado inmune individual de los eusociales previamente a agruparlos, y usar estos grupos al ser comparados con insectos solitarios individuales, ya que una comparación individuo-individuo no es una situación natural. Otro aspecto es la diferencia entre animales gregarios y eusociales, ya que también se ha encontrado que los animales gregarios tienen comportamientos inmunes grupales como sería la coprofagia (Onchuru et al, 2018), ofreciendo otra posibilidad de comparación con las actividades inmunes de los grupos eusociales.

C. Especificidad

Se encontró una respuesta inmune mejorada en términos de supervivencia tanto en tratamientos homólogos (77) como en heterólogos (58), lo que sugiere que la respuesta inmune es específica, contrariando la corriente general que dice que esta respuesta no tiene especificidad en insectos (Cooper & Eleftherianos, 2017; Milutinović et al, 2016; Pham et al, 2007; Sadd & Schmid-Hempel, 2006). Sin embargo, los tratamientos donde se indujo con bacterias (120), tuvieron mayor supervivencia comparada con los inducidos con hongos (8), en línea con la idea de especificidad del grupo de moléculas EsDscam que se encuentran en insectos y tienen gran afinidad con bacterias (Li et al, 2018).

Aunque tanto bacterias como hongos pueden infectar por vía oral (Dillon & Charnley, 1986; Schabel, 1976), los hongos tienen la particularidad de infectar también por medio de la penetración de la cutícula (Pedrini, 2018), para llegar al hemocelo. Esta forma de

infección podría llegar a ser más agresiva que una bacteriana debido a el tamaño de las hifas al momento de ingresar al hemocelo, la creación de una herida en donde otros patógenos pueden ingresar al animal y la secreción de metabolitos secundarios por parte de los hongos que disminuyan la respuesta inmune en insectos (Pedrini, 2018). Por estas razones, tal vez las bacterias inactivadas o en dosis bajas pueden generar menos daños mecánicos comparado con hongos y así el hospedero es capaz de generar una respuesta más efectiva.

Hay que tener en cuenta el bajo número de ensayos que incluyeron hongos (13), comparado con los de bacteria-bacteria (120). De estos 13, el número de inducciones bacteria-hongo fueron dos, ocho para ensayos hongo-hongo y tres para hongo-bacteria, por lo que se requiere cautela para interpretar estos resultados, indicando claramente la necesidad de más experimentos.

D. Tiempo entre reto e inducción

Hay una disminución de la efectividad del cebado conforme se aumenta el tiempo entre el cebado y el reto inmune, lo que indica el efecto de la respuesta inmune disminuye con el tiempo al no enfrentarse a un patógeno, que indica ser un menor número de componentes inmunes conforme avanza el tiempo, por lo que los beneficios de la inducción inmune se vuelven menos efectivos con el tiempo, lo cual es esperado debido a que mantener una respuesta inmune es costoso metabólicamente para el individuo o su descendencia (Contreras-Garduño et al, 2014, Contreras-Garduño et al, 2019). También

hay que destacar que estos ensayos solo toman en cuenta una infección por un tipo de patógeno a la vez, que no emula lo que se espera que se vea en la naturaleza, en donde al haber alguna herida, habrá una pluralidad de especies o cepas diferentes de patógenos que entrarían al insecto a la vez.

Esto puede indicar también un efecto por parte de la edad de los animales, debido al periodo de vida generalmente corto de los insectos, el efecto pueda deberse no solo al tiempo entre inducción y reto, sino también a cambios de la respuesta inmune en el insecto que pudiesen cambiar con la edad (Armitage & Boomsma, 2010; Negroni et al, 2019). Esto hace complicado hacer experimentos en insectos sobre inducción inmune, memoria inmune y el efecto de la edad debido a su periodo de vida relativamente cortos.

En mamíferos, la longevidad de la especie puede predecir la vida media de los anticuerpos (Garnier et al, 2013), se esperaría que esta tendencia se mantiene en grupos de insectos con esperanzas de vida largas.

E. Alimentación y flora bacteriana

La mayoría de los insectos en estas pruebas tenían alimento *ad libitum*; alimento que se les provee libremente sin restricciones, situación que no se da en la naturaleza y puede afectar el verdadero resultado de los ensayos inmunes como se menciona en Contreras-Garduño et al, (2016), debido a que montar una respuesta inmune es una inversión energética (Contreras-Garduño et al, 2019), que en situaciones donde escasee la comida podría llevar a la muerte del organismo por destinar energía a combatir la

infección, podría causar letargo y ser devorado por un depredador o no tener la energía suficiente para reproducirse. Sumado a esto, en los ensayos donde la inoculación no es oral, el alimento era usualmente estéril, lo cual también podría afectar la respuesta inmune dependiendo de que microorganismos se encuentren naturalmente en este (Vogel et al, 2018), por lo que es posible que la respuesta inmune usando alimentos con microorganismos naturalmente presentes cause una inducción inmune por vía oral que proteja al animal y mejore su respuesta ante los microorganismos patógenos. Estos efectos pueden ser más pronunciado en los insectos que tienen dietas compuesta de materia orgánica descompuesta, como son los Ordenes Coleoptera, Blattodea, Lepidoptera, y moscas en Diptera, que estaría en parte en línea con mis resultados, que muestran evidencia de inducción inmune.

Otro factor para considerar en trabajos de inducción inmune y relacionado a la dieta es la presencia o ausencia (Hammer et al, 2017) de la diversidad de la flora bacteriana en el tracto digestivo y hemolinfa, los cuales varían entre especies y cambia entre dietas (Yun et al, 2014; Blow & Douglas, 2019), debido a que el microbioma bacteriano en insectos tiene efectos sobre su fisiología (Ferguson et al, 2018; Raymann & Moran, 2018). Es importante tener en cuenta como está la salud del microbioma de los insectos al momento de hacer pruebas y ensayos inmunes. Junto con la transformación que hay en la metamorfosis la cual puede llevar a cambios drásticos en el microbioma (González-Serrano et al, 2020; Majumder et al, 2020) que a su vez podría traducirse en cambios en la respuesta inmune en algunas especies.

VII. CONCLUSIÓN

La respuesta inmune inducida, al ser medida como supervivencia, está presente en los insectos, y su eficacia disminuye entre más tiempo transcurre entre la inducción y el reto inmune real. La inducciones y retos en donde se presentaron bacterias tuvieron una mejor supervivencia que las que solo participaron hongos. Este trabajo ofrece detalles sobre la universalidad del fenómeno en insectos e igualmente llama para investigar otros factores que afecten la expresión y eficacia de este.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Creación y mantenimiento de una base de datos de acceso público y editable sobre experimentos en cebado inmune.
2. Estandarización de los métodos de cebado y reto inmune y ampliación los datos recolectados en subcategorías para reducir heterogeneidad entre estudios.
3. Hacer pruebas experimentales en poblaciones de laboratorio y compararlas con poblaciones de la misma especie en el campo.
4. Al hacer un experimento de cebado inmune, reportar todo lo posible, y hacerlo accesible y disponible.
5. Incrementar el número de estudios analizados en el metaanálisis para una base de datos más robusta y categorizada.
6. Ampliar la red de estudios disponibles usando otros idiomas y palabras clave.
7. Experimentar fuertemente con cebado inmune entre animales eusociales, gregarios y solitarios.
8. Extender análisis como este al resto de los animales invertebrados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias con un “*” son los artículos utilizados en el análisis.

Armitage, S. A. O, & Boomsma, J. J. (2010). The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. *Journal of Insect Physiology*, 56(7), 780-787.
10.1016/j.jinsphys.2010.01.009

Armitage, S. A. O, Peuß, R, & Kurtz, J. (2015). Dscam and pancrustacean immune memory – A review of the evidence. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 315-323.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.004>

Blow, F, & Douglas, A. E. (2019). The hemolymph microbiome of insects. *Journal of Insect Physiology*, 115, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.04.002>

Bolte, S, Roth, O, Philipp, E. E. R, Saphörster, J, Rosenstiel, P, & Reusch, T. B. H. (2013). Specific immune priming in the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Biology Letters*, 9(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0864>

Boulanger, N, ECRet-Sabatier, L, Brun, R, Zachary, D, Bulet, P, & Imler, J.-L. (2001). Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagellate parasite *Crithidia* spp. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(2), 129-137.
[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00096-5)

*Brown, L. D, Shapiro, L. L. M, Thompson, G. A, Estévez-Lao, T. Y, & Hillyer, J. F. (2019).

Transstadial immune activation in a mosquito: Adults that emerge from infected larvae have stronger antibacterial activity in their hemocoel yet increased susceptibility to malaria infection. *Ecology and Evolution*, 9(10), 6082-6095.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5192>

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>

*Castro-Vargas, C., Linares-López, C., López-Torres, A., Wrobel, K., Torres-Guzmán, J. C., Hernández, G. A. G., Wrobel, K., Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduño, J. (2017). Methylation on RNA: A Potential Mechanism Related to Immune Priming within But Not across Generations. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00473>

Chambers, M. C, & Schneider, D. S. (2012). Pioneering immunology: Insect style. *Current Opinion in Immunology*, 24(1), 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.11.003>

*Christofi, T, & Apidianakis, Y. (2013). *Drosophila* immune priming against *Pseudomonas aeruginosa* is short-lasting and depends on cellular and humoral immunity. *F1000Research*, 2, 76. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-76.v1>

Contreras-Garduño, J, Lanz-Mendoza, H, Franco, B, Nava, A, Pedraza-Reyes, M, & Canales-Lazcano, J. (2016). Insect immune priming: Ecology and experimental evidences: Immune priming in invertebrates. *Ecological Entomology*, 41(4), 351-366. <https://doi.org/10.1111/een.12300>

*Contreras-Garduño, J, Méndez-López, T. T, Patiño-Morales, A, González-Hernández, G. A, Torres-Guzmán, J. C, Krams, I, Mendoza-Cuenca, L, & Ruiz-Guzmán, G. (2019). The costs of the immune memory within generations. *The Science of Nature*, 106(11-12), 59. <https://doi.org/10.1007/s00114-019-1657-2>

*Contreras-Garduño, J, Rodríguez, M. C, Rodríguez, M. H, Alvarado-Delgado, A, & Lanz-Mendoza, H. (2014). Cost of immune priming within generations: Trade-off between

infection and reproduction. *Microbes and Infection*, 16(3), 261-267.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.010>

Cooper, D, & Eleftherianos, I. (2017). Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges. *Frontiers in Immunology*, 8, 539.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539>

Criscitiello, M. F, & Figueiredo, P. de. (2013). Fifty Shades of Immune Defense. *PLOS Pathogens*, 9(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003110>

* 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. *Journal of Animal Ecology*, 87(2), 448-463. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661>

Dillon, R. J, & Charnley, A. K. (1986). Invasion of the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* through the guts of germfree desert locusts, *Schistocerca gregaria*. *Mycopathologia*, 96(1), 59-66. <https://doi.org/10.1007/BF00467687>

* Eleftherianos, I, Marokhazi, J, Millichap, P. J, Hodgkinson, A. J, Sriboonlert, A, French-Constant, R. H, & Reynolds, S. E. (2006). Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photobacterium luminescens*: Roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(6), 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.04.001>

* Faulhaber, L. M., & Karp, R. D. (1992). A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunology*, 4.

Ferguson, L. V, Dhakal, P, Lebenzon, J. E, Heinrichs, D. E, Bucking, C, & Sinclair, B. J. (2018). Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold

tolerance and immunity. *Functional Ecology*, 32(10), 2357-2368.

<https://doi.org/10.1111/1365-2435.13153>

Field, A. P., & Gillett, R. (2010). How to do a meta-analysis. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 63(3), 665-694. <https://doi.org/10.1348/000711010X502733>

Fisher, J. J., & Hajek, A. E. (2015). Maternal Exposure of a Beetle to Pathogens Protects Offspring against Fungal Disease. *PLOS ONE*, 10(5), Art. 5.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125197>

Foster, W. A., & Takken, W. (2004). Nectar-related vs. human-related volatiles: Behavioural response and choice by female and male *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) between emergence and first feeding. *Bulletin of Entomological Research*, 94(2), 145-157. <https://doi.org/10.1079/BER2003288>

* Futo, M., Armitage, S. A. O., & Kurtz, J. (2016). Microbiota Plays a Role in Oral Immune Priming in *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Microbiology*, 6.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01383>

* Futo, M., Sell, M. P., Kutzer, M. A. M., & Kurtz, J. (2017). Specificity of oral immune priming in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Biology Letters*, 13(12), 20170632.

<https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0632>

* Gálvez, D., & Chapuisat, M. (2014). Immune priming and pathogen resistance in ant queens.

Ecology and Evolution, 4(10), 1761-1767. <https://doi.org/10.1002/ece3.1070>

Garnier, R, Boulinier, T, & Gandon, S. (2013). Evolution of the temporal persistence of immune protection. *Biology Letters*, 9(3), 20130017. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0017>

González-Santoyo, I, & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: A key component of the insect immune system: Biochemical and evolutionary ecology of PO. *Entomologia*

Experimentalis et Applicata, 142(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>

González-Serrano, F, Pérez-Cobas, A. E, Rosas, T, Baixeras, J, Latorre, A, & Moya, A. (2020). The Gut Microbiota Composition of the Moth *Brithys crini* Reflects Insect Metamorphosis. *Microbial Ecology*, 79(4), 960-970. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01460-1>

*González-Tokman, D. M., González-Santoyo, I., Lanz-Mendoza, H., & Córdoba Aguilar, A. (2010). Territorial damselflies do not show immunological priming in the wild. *Physiological Entomology*, 35(4), 364-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2010.00752.x>

Greenwood, J. M, Milutinović, B, Peuß, R, Behrens, S, Esser, D, Rosenstiel, P, Schulenburg, H, & Kurtz, J. (2017). Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. *BMC Genomics*, 18(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3705-7>

Hamilton, C, Lejeune, B. T, & Rosengaus, R. B. (2011). Trophallaxis and prophylaxis: Social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biology Letters*, 7(1), 89-92. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0466>

Hammer, T. J, Janzen, D. H, Hallwachs, W, Jaffe, S. P, & Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9641-9646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707186114>

Hughes, W. O. H, Eilenberg, J, & Boomsma, J. J. (2002). Trade-offs in group living: Transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1502), 1811-1819. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2113>

- *Khan, I, Prakash, A, & Agashe, D. (2016). Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. *Ecology and Evolution*, 6(21), 7847-7855.
<https://doi.org/10.1002/ece3.2532>
- Klowden, M. J, & Greenberg, B. (1977). Salmonella in the American Cockroach: Outcome of Natural Invasion of the Hemocoel. *Journal of Medical Entomology*, 14(3), 362-366.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/14.3.362>
- Krams, I, Daukste, J, Kivleniece, I, Krama, T, & Rantala, M. J. (2013). Previous encapsulation response enhances within individual protection against fungal parasite in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Insect Science*, 20(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01574.x>
- *Kutzer, M. A. M., Kurtz, J., & Armitage, S. A. O. (2018). A multi-faceted approach testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. *Journal of Animal Ecology*, 88(4), 566-578. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12953>
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, 26(4), 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>
- Le Bourg, É, Massou, I, & Gobert, V. (2008). Cold stress increases resistance to fungal infection throughout life in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 10(5), Art. 5.
<https://doi.org/10.1007/s10522-008-9206-y>
- Lehane, M. J, Wu, D, & Lehane, S. M. (1997). Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11502-11507. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11502>
- Li, X.-J, Yang, L, Li, D, Zhu, Y.-T, Wang, Q, & Li, W.-W. (2018). Pathogen-Specific Binding Soluble Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) Regulates Phagocytosis via Membrane-

Bound Dscam in Crab. *Frontiers in Immunology*, 9, 801.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00801>

* Longdon, B, Cao, C, Martinez, J, & Jiggins, F. M. (2013). Previous Exposure to an RNA Virus

Does Not Protect against Subsequent Infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 8(9), e73833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073833>

Majumder, R, Sutcliffe, B, Taylor, P. W, & Chapman, T. A. (2020). Microbiome of the Queensland Fruit Fly through Metamorphosis. *Microorganisms*, 8(6), 795.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060795>

Masri, L, & Cremer, S. (2014). Individual and social immunisation in insects. *Trends in*

Immunology, 35(10), 471-482. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.08.005>

Medina Gomez, H, Adame Rivas, G, Hernández-Quintero, A, González Hernández, A, Torres

Guzmán, J. C, Mendoza, H. L, & Contreras-Garduño, J. (2018). The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 361-364. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.063>

* Medina-Gómez, H, Farriols, M, Santos, F, González-Hernández, A, Torres-Guzmán, J. C, Lanz,

H, & Contreras-Garduño, J. (2018). Pathogen-produced catalase affects immune priming: A potential pathogen strategy. *Microbial Pathogenesis*, 125, 93-95.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.012>

* Mikonranta, L, Mappes, J, Kaukoniitty, M, & Freitak, D. (2014). Insect immunity: Oral exposure

to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Frontiers in Zoology*, 11(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-23>

- *Mikonranta, L., Dickel, F., Mappes, J., & Freitak, D. (2017). Lepidopteran species have a variety of defence strategies against bacterial infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 144, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.012>
- Milutinović, B, Fritzlar, S, & Kurtz, J. (2014). Increased Survival in the Red Flour Beetle after Oral Priming with Bacteria-Conditioned Media. *Journal of Innate Immunity*, 6(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1159/000355211>
- Milutinović, B, Peuß, R, Ferro, K, & Kurtz, J. (2016). Immune priming in Arthropods: An update focusing on the red flour beetle. *Zoology*, 119(4), 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.03.006>
- Milutinović, B, Stolpe, C, Peuß, R, Armitage, S. A. O, & Kurtz, J. (2013). The Red Flour Beetle as a Model for Bacterial Oral Infections. *PLOS ONE*, 8(5), Art. 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064638>
- *Miyashita, A, Takahashi, S, Ishii, K, Sekimizu, K, & Kaito, C. (2015). Primed Immune Responses Triggered by Ingested Bacteria Lead to Systemic Infection Tolerance in Silkworms. *PLOS ONE*, 10(6), e0130486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130486>
- *Moreno-García, M, Vargas, V, Ramírez-Bello, I, Hernández-Martínez, G, & Lanz-Mendoza, H. (2015). Bacterial Exposure at the Larval Stage Induced Sexual Immune Dimorphism and Priming in Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLOS ONE*, 10(7), e0133240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133240>
- *Moret, Y, & Siva-Jothy, M. T. (2003). Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1532), Art. 1532. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511>

- Müller, L, Fülöp, T, & Pawelec, G. (2013). Immunosenescence in vertebrates and invertebrates. *Immunity & Ageing*, 10(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-12>
- Negroni, M. A, Foitzik, S, & Feldmeyer, B. (2019). Long-lived *Temnothorax* ant queens switch from investment in immunity to antioxidant production with age. *Scientific Reports*, 9(1), 7270. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43796-1>
- Onchuru, T. O, Javier Martinez, A, Ingham, C. S, & Kaltenpoth, M. (2018). Transmission of mutualistic bacteria in social and gregarious insects. *Current Opinion in Insect Science*, 28, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.002>
- Pedrini, N. (2018). Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biology*, 122(6), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.003>
- Pham, L. N, Dionne, M. S, Shirasu-Hiza, M, & Schneider, D. S. (2007). A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3(3), e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raymann, K, & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>
- Reber, A, & Chapuisat, M. (2012). No Evidence for Immune Priming in Ants Exposed to a Fungal Pathogen. *PLoS ONE*, 7(4), e35372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035372>
- Rosengaus, R. B, & Coates, L. E. (1998). Disease resistance: A benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). 10. <https://doi.org/10.1007/s002650050523>

- *Rosengaus, R. B, Malak, T, & MacKintosh, C. (2013). Immune-priming in ant larvae: Social immunity does not undermine individual immunity. *Biology Letters*, 9(6), 20130563. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0563>
- Rosengaus, R. B, Zecher, C. N, Schultheis, K. F, Brucker, R. M, & Bordenstein, S. R. (2011). Disruption of the Termite Gut Microbiota and Its Prolonged Consequences for Fitness. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4303-4312. <https://doi.org/10.1128/AEM.01886-10>
- Sadd, B. M, & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, 16(12), 1206-1210. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Schabel, H. G. (1976). Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(3), 377-383. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(76\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90100-2)
- Schwarzenbach, G. A, Hosken, D. J, & Ward, P. I. (2004). Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*: Sex and immunity in yellow dung flies. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(2), 455-463. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00820.x>
- Steiger, S, Gershman, S. N, Pettinger, A. M, Eggert, A.-K, & Sakaluk, S. K. (2012). Dominance status and sex influence nutritional state and immunity in burying beetles *Nicrophorus orbicollis*. *Behavioral Ecology*, 23(5), 1126-1132. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars082>
- Taszwlow, P, Vertyporokh, L, & Wojda, I. (2017). Humoral immune response of *Galleria mellonella* after repeated infection with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.008>
- Tate, A. T, & Rudolf, V. H. W. (2012). Impact of life stage specific immune priming on invertebrate disease dynamics. *Oikos*, 121(7), 1083-1092. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19725.x>

Tidbury, H. J, Pedersen, A. B, & Boots, M. (2011). Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), Art. 1707. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1517>

Tierney, J. F, Stewart, L. A, Gherzi, D, Burdett, S, & Sydes, M. R. (2007). Practical methods for incorporating summary time-to-event data into meta-analysis. *Trials*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-8-16>

Traniello, J. F. A, Rosengaus, R. B, & Savoie, K. (2002). The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 6838-6842. <https://doi.org/10.1073/pnas.102176599>

Tsakas, S, & Marmaras, V. (2010). Insect immunity and its signalling: An overview. 7(2). <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/225>

Ugelvig, L. V, & Cremer, S. (2007). Social Prophylaxis: Group Interaction Promotes Collective Immunity in Ant Colonies. *Current Biology*, 17(22), 1967-1971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.029>

*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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00975>

*Vertyporokh, L., Kordaczuk, J., Mak, P., Hułas-Stasiak, M., & Wojda, I. (2019). Host-pathogen interactions upon the first and subsequent infection of *Galleria mellonella* with *Candida albicans*. *Journal of Insect Physiology*, 117, 103903. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103903>

Vogel, H, Müller, A, Heckel, D. G, Gutzeit, H, & Vilcinskas, A. (2018). Nutritional immunology: Diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black

soldier fly *Hermetia illucens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 78, 141-148.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.008>

*Wu, G, Yi, Y, Sun, J, Li, M, & Qiu, L. (2015). No evidence for priming response in *Galleria mellonella* larvae exposed to toxin protein PirA2B2 from *Photobacterium luminescens* TT01: An association with the inhibition of the host cellular immunity. *Vaccine*, 33(46), 6307-6313. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.046>

Yun, J.-H, Roh, S. W, Whon, T. W, Jung, M.-J, Kim, M.-S, Park, D.-S, Yoon, C, Nam, Y.-D, Kim, Y.-J, Choi, J.-H, Kim, J.-Y, Shin, N.-R, Kim, S.-H, Lee, W.-J, & Bae, J.-W. (2014). Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254-5264.

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(4), 627-634.
<https://doi.org/10.1139/z04-032>