

## COMENTARIO

## Observaciones sobre los mecanismos de defensa de los insectos

Medina Pereyra, Pilar; Francisco M. Fernández

Instituto de Fisiología Animal, Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina. licpilarmedina@hotmail.com

► **Resumen** — Los insectos constituyen un grupo muy diversificado cuya subsistencia y éxito en una gran variedad de nichos ecológicos involucra un eficiente sistema de defensa. En este trabajo se pretende brindar una sinopsis de la información general existente sobre los mecanismos de defensa de los insectos haciendo especial énfasis en los componentes celulares y humorales de la respuesta inmune. El primero se refiere a las respuestas inmunes mediadas por los hemocitos: fagocitosis, nodulación y encapsulación. Por su parte, la defensa humoral incluye la producción de péptidos antimicrobianos y las complejas cascadas enzimáticas que regulan la coagulación de la hemolinfa y la melanización. Asimismo, se incluye información sobre mecanismos de inmunidad adaptativa. Si bien la investigación en el campo de los mecanismos de defensa de los insectos es extensa, dada la gran variabilidad intraespecífica e interespecífica que éstos presentan, queda mucho por conocer. Ampliar los estudios sobre las distintas facetas que aún permanecen desconocidas reviste interés y aplicabilidad en estrategias de manejo de plagas como así también en lo concerniente a los insectos vectores de enfermedades para el hombre y animales de interés comercial.

**Palabras clave:** Insectos, mecanismos de defensa, inmunidad.

► **Abstract** — 'Comments on insect defense mechanisms'. Insects constitute a very diverse group whose survival and success in a great variety of ecological niches involves an efficient defense system. This paper aims to provide an overview of existing general information on defense mechanisms of insects with special emphasis on cellular and humoral components of innate immunity. The first is concerned with mediated immune responses by hemocytes: phagocytosis, nodulation and encapsulation. As for humoral defense, it includes production of antimicrobial peptides and the complex enzyme cascades which regulate coagulation of the hemolymph and melanization. Moreover, information on mechanisms of adaptive immunity is included. While research in the field of defense mechanisms of insects is extensive, given the intraspecific and interspecific variability they present, much remains unknown. To increase studies on the various aspects that still remain unknown is of interest and applicability in pest management strategies as well as with respect to insect vectors of diseases in humans and in animals of commercial interest.

**Keywords:** Insects, defense mechanisms, immunity.

### INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de defensa de los animales contra organismos y sustancias patógenas constituyen una disciplina fascinante, sumamente amplia y compleja, ya que abarca una gran diversidad en lo que respecta a estructuras orgánicas, histológicas, citológicas, moleculares y a modalidades funcionales.

Los vertebrados poseen dos maneras distintas, pero no independientes, de llevar a cabo la defensa contra organismos patóge-

nos: la inmunidad innata y la adaptativa. En los invertebrados la respuesta frente a estas noxas corresponde a la inmunidad innata, a la que también se denomina inespecífica, término que evitaremos por razones que más adelante se exponen.

La inmunidad innata de los invertebrados está a cargo de un conjunto de funciones que corresponden a dos categorías generales. En primer lugar, están las que son bastante invariables en su expresión y dependen de la actividad de enzimas, receptores de antígenos, actividades citolíticas y mecanismos de activación que son constitutivos y dependen

de genes que se expresan en forma continua, o que se activan en una manera única frente a la presencia o actividad de una noxa o elemento extraño. Como ejemplo podemos mencionar la actividad de las enzimas bacteriolíticas o bacteriostáticas y la síntesis de la mayor parte de las proteínas antimicrobianas. En segundo lugar, se encuentran aquellas funciones que tienen la característica de mostrar un cierto grado de variabilidad en su capacidad de responder al ataque microbiano, pero presentando la particularidad que esta elasticidad depende de una mecánica distinta a la conocida y propia de la inmunidad adaptativa de los vertebrados. A ellas denominaremos mecanismos de especificidad variable. Como ejemplo mencionaremos la defensa antiviral mediante el RNA interferente en los insectos (Vodovar y Saleh, 2012).

Los insectos constituyen el grupo más diversificado de la naturaleza y ampliamente distribuido en una gran diversidad de hábitats, ocupando prácticamente todo el planeta. En esa enorme variedad de nichos ecológicos se enfrentan a depredadores, endoparásitos, ectoparásitos y numerosos microorganismos patógenos. Una de las claves de su éxito, en este rico contexto ambiental, consistió en la habilidad para erigir una defensa eficiente y superar las amenazas a la vez que mantenían su rica y variadamente especializada biología.

El objetivo de este trabajo es ofrecer una sinopsis de la información general existente, dentro de la cual la mayor parte corresponde a los mecanismos de defensa de los insectos holometábolos. Ello es debido a que la información de los últimos años se basa mayormente en logros de la biología molecular que se han llevado sobre este grupo de insectos. En el campo de las investigaciones sobre hemimetábolos se debe mencionar que se está trabajando sobre ortópteros, hemípteros en áfidos y sus simbioses (Park y Lee, 2012).

En forma amplia y atendiendo a la complejidad de los mecanismos de defensa de los insectos se distinguen: el mecanismo inmune epitelial que incluye las barreras físico-quími-

cas, y el mecanismo de la inmunidad sistémica innata. Dentro de ambas hay funciones constitutivas y respuestas inmunes inducidas, a la vez que estrategias especiales de defensa.

En la primera, las barreras físico-químicas, membranas y cutículas que las integran, evitan el ingreso del 99,9 % de los microorganismos y otras noxas. En los mecanismos inmunes sistémicos, Hoffmann (1999) tiene en cuenta las funciones efectoras fisiológicas y entre ellas distingue los mecanismos innatos propiamente dichos y los de especificidad variable. Entre los primeros se encuentran: a) fagocitosis de microorganismos por células de la hemolinfa, b) cascadas proteolíticas destinadas a localizar y limitar el sitio de ataque: coagulación de la hemolinfa, melanización de las formas invasoras y su opsonización, c) síntesis transitoria de péptidos antimicrobianos. Entre los de especificidad variable se encuentra el mecanismo antiviral del RNA interferente. Asimismo, en los mecanismos inducidos hay que mencionar el mecanismo antiviral de la generación de la proteína *vago* que posee una manera de funcionar similar a la del interferón de los vertebrados según se mostrará más adelante.

Las estrategias especiales dan cuenta de una serie, siempre creciente en la literatura, de sistemas muy diversos y especializados que son utilizados por algunas especies en nichos ecológicos singulares o situaciones atípicas. Por ejemplo, las interacciones entre parásito y hospedador en el ataque por microhimenópteros, avispas parasitoides, implican un complejo juego evolutivo de ataques y defensas en el cual un grupo grande de hospedadores logran evitar, o sortear, el ataque y otros no lo consiguen. Algunos autores en el tema han denominado «carrera armamentista» a esta situación evolutiva.

#### EL MECANISMO EPITELIAL Y LAS BARRERAS FÍSICO-QUÍMICAS

Desde el punto de vista de la localización de los mecanismos de defensa es necesario distinguir entre el mecanismo sistémico por una parte, que involucra a la hemolinfa y a la mayor parte de los tejidos, y por otra al

mecanismo de defensa propio de los epitelios que poseen características particulares. Este mecanismo constituye la primera línea de defensa y mantiene factores que son constitutivos (péptidos y proteínas antimicrobianas), como así también es capaz de montar una respuesta inducida por la presencia de patógenos.

Los mecanismos basados en las barreras fisicoquímicas constituyen un campo en creciente desarrollo cuya complejidad estructural y funcional, si bien reconocida desde hace varias décadas, se ha intensificado con las nuevas tecnologías de los estudios estructurales a nivel molecular y tisular. Externamente la defensa comienza con el integumento o exoesqueleto, cuya capa más externa, la cutícula, se invagina revistiendo al epitelio intestinal y al epitelio respiratorio de las tráqueas. La misma constituye no solamente una barrera mecánica debido a uno de sus principales componentes, la quitina, sino que además, contiene proteasas, peptidasas antifúngicas e inhibidores de proteasas fúngicas en su parte más externa o epicutícula. Además, contiene ácidos grasos de cadena corta y lípidos de acción antifúngica que inhiben la germinación de las esporas de los hongos. Entre las termitas se ha identificado la enzima antifúngica beta-1,3-glucanasa (Hamilton *et al.*, 2011). Es interesante que durante las mudas, en las cuales se desprende esta barrera y se empieza a sintetizar una nueva, el organismo lleva a cabo un aumento de la síntesis de péptidos antibacterianos circulantes. En *Drosophila melanogaster* Meigen (1830), este aumento está claramente influenciado por la hormona bursión, que determina la síntesis de los elementos integrantes de la cutícula del insecto (An *et al.*, 2012). Es significativo el hecho que las sustancias antimicrobianas se encuentran también en la epidermis, las tráqueas y el intestino de esta especie (Davis y Engstron, 2012). Entre las abejas del género *Apis* y otros himenópteros se ha observado que el denominado *veneno* de estas especies se encuentra también en la cutícula representando una forma de inmunidad social (Baracchi *et al.*, 2011; 2012).

Otra barrera de protección es la membrana peritrófica, también denominada matriz peritrófica, que recubre la porción media del intestino de los insectos. Esta barrera se comporta como una membrana selectivamente permeable a nutrientes y enzimas, y una de sus funciones principales es la de proveer protección contra microorganismos. Esta necesidad se explica en razón del contacto permanente con una gran variedad de bacterias, a las cuales, de otra forma, el tracto digestivo sería muy vulnerable. Existe una gran dependencia del insecto respecto a las actividades antimicrobianas presentes en su intestino. Debido a ello, parte de las estrategias que han desarrollado en la evolución algunos organismos contra los insectos fitófagos, predadores o micropredadores, aprovechan la debilidad del insecto resultante de una labilidad provocada por el organismo atacado por éste. Por ejemplo, se ha observado que entre las plantas atacadas por larvas de algunos lepidópteros, el maíz tiene resistencia natural que es debida a la presencia de una proteasa de bajo peso molecular (Pechan *et al.*, 2002). Esta proteasa debilita la membrana peritrófica del insecto parásito, circunstancia que es aprovechada por los microbios para destruir o disminuir la viabilidad del insecto. Otros ejemplos similares se encuentran en los mecanismos de ataque de virus que producen una metaloproteasa, la *enhancina* que degrada las mucinas intestinales en lepidópteros, debilitando la matriz peritrófica y aumentando la virulencia (Wang y Granados, citados por Hegedus *et al.*, 2009).

Un aspecto importante de la inmunidad de los epitelios está constituido por el descubrimiento de un mecanismo novedoso asociado a esta primera línea de defensa. Se trata de la actividad en estos tejidos de la N-β-alanoildopamina (NBAD) sintetasa. Esta enzima no solamente interviene en la síntesis de NBAD, sustancia que constituye un neurotransmisor central, sino que también es precursora en los mecanismos de melanización y esclerotización (Nappi y Christensen, 2005; Schachter *et al.* 2007; Pérez *et al.*, 2010), los cuales están claramente vincula-

dos a la protección inmune de los epitelios. Asimismo, Lemaitre y Hoffmann (2007) citando a Ritsick *et al.* (2004) y Ha *et al.*, (2005) señalan que en las células epiteliales del intestino de *Drosophila* se generan, como respuesta a infecciones bacterianas, especies reactivas del oxígeno (ROS) por acción de las proteínas *Duox*, insertas en la cara luminal de la membrana celular. Estas moléculas son muy activas, sobre todo por su transformación en HClO, altamente bactericida. El exceso de peróxido de hidrógeno (una de las principales ROS) es degradado por una catalasa inmunoactivada (IRC) que ejerce un papel regulador antioxidante.

Otra forma de la respuesta inmune local que poseen los epitelios se manifiesta en la síntesis de péptidos antimicrobianos (PAMs) en la epidermis, el tracto respiratorio, el sistema reproductivo y el tracto digestivo. Allí las células epiteliales sintetizan, a través de la vía inducible *Imd*, péptidos (*attacina*, *dip-tericina*) que son secretados, en el caso del sistema digestivo, a la luz intestinal. En algunos casos, como la *drosomicina* en las glándulas salivales y en la espermateca, estos péptidos son producidos en forma constitutiva. Como se verá luego, numerosos PAMs son producidos a partir de un ataque microbiano. En todos los casos de respuesta inmune local, la vía de respuesta inducible se ejerce a través de *Imd* y no del sistema *Toll* (Lemaitre y Hoffmann, 2007).

#### SISTEMAS DE LA INMUNIDAD INNATA SISTÉMICA

Si los microorganismos logran traspasar estas primeras barreras de protección se activan o ponen de manifiesto funciones de un segundo sistema de mecanismos de defensa, más complejos que las anteriores, que es el sistema inmune sistémico. Este consiste en la presencia o formación de sustancias antimicrobianas, principalmente péptidos, pero también enzimas bacteriolíticas. Formando parte de este sistema, o asociados a él, se encuentran además de la síntesis de péptidos antimicrobianos, dos mecanismos que pueden ser descriptos en forma separada: 1) el

sistema de la profenoloxidasas que lleva a cabo sus efectos a través de la melanización y consecuente inactivación de los agentes agresores; y 2) el mecanismo de la coagulación de la hemolinfa que produce la inmovilización de los elementos nocivos en la zona de invasión o ataque. Cabe aclarar que estos dos mecanismos también operan en la inmunidad epitelial. A estos dos sistemas de defensa nos referiremos más adelante. Asimismo se destaca la actividad celular antimicrobiana que tiene varias manifestaciones que se mencionarán, de las cuales la fagocitosis es la primera en la línea de defensa.

Una vez que el microbio invade el interior del organismo se originan una serie de reacciones. Estas constituyen un eficiente y complejo mecanismo contra patógenos y parásitos, que es innato en los insectos, siendo homólogo al sistema de la inmunidad innata de los vertebrados.

Por lo que se sabe, gran parte de estos mecanismos son constitutivos, aunque numerosos son inducidos por la invasión del patógeno, y los genes que dirigen la síntesis de péptidos y proteínas que integran estos mecanismos se encuentran en el genoma. Es necesario destacar esto por el hecho que, en el caso de la inmunidad adaptativa de los vertebrados, cuya base funcional la constituyen los anticuerpos y los receptores específicos de antígenos presentes en algunas células inmunocompetentes, no todas las estructuras proteicas representan la expresión génica de la línea germinal del genoma. De hecho la diversidad de los anticuerpos se genera somáticamente a través de un proceso que se lleva a cabo en los linfocitos B que incluye mecanismos tales como hipermutación somática y recombinación. A partir de estos procesos se generan decenas de miles de especificidades distintas de anticuerpos, número que excede en mucho la cantidad de genes contenida en el genoma de los mamíferos.

En el caso de la inmunidad innata, la reacción contra el agresor no tiene memoria en el sentido que le es reconocida a la memoria de la respuesta inmune de los vertebrados, en la cual un segundo ataque por el

mismo agresor despierta una defensa más intensa y más específica. No obstante, en los insectos se han detectado procesos en los cuales una segunda agresión de la misma naturaleza produce una respuesta de mayor intensidad, como son los casos de la síntesis de péptidos antimicrobianos o enzimas bacteriolíticas (por ejemplo, lisozima). Otra característica consiste en que gran parte de las respuestas de la inmunidad innata se desarrollan o activan en segundos o en pocos minutos, como es el caso de la coagulación y la melanización; o casi instantáneamente como el caso de la lisozima y de otras enzimas bacteriolíticas. Ello ocurre dentro de un corto período puesto que los elementos responsables de estas respuestas ya se encuentran en los tejidos o la hemolinfa del animal. No obstante, algunas de las respuestas que incluyen la síntesis de nuevas proteínas pueden ser inducidas, y en estos casos la reacción se desarrolla en algunas horas. La puesta en funcionamiento consiste en una serie de pasos que se inician en el reconocimiento del elemento extraño mediante proteínas extracelulares especiales. El proceso termina su fase preparatoria en la síntesis de macromoléculas y culmina con la destrucción del microorganismo o el aislamiento del elemento extraño.

Aunque a veces es difícil distinguir en la práctica, la mayor parte de estos sistemas tienen dos componentes: el humoral y el celular. El componente humoral comprende la mayoría de las fases, sobre todo las finales, de las reacciones de melanización, coagulación de la hemolinfa y de presencia y actividad de péptidos antimicrobianos.

La epidermis constituye la primera línea de defensa y sintetiza péptidos antimicrobianos tanto en forma constitutiva, como en forma inducida por el patógeno. El componente celular está basado en la actividad de distintas células de la hemolinfa que intervienen en reacciones de fagocitosis, nodulación y encapsulación. Merece una mención la actividad de los genes comprometidos en la respuesta inmune en los insectos.

Los genes del lepidóptero *Bombyx mori* Linnaeus (1758) han sido analizados por Liu

*et al.* (2009), mediante micro arreglo de oligonucleótidos de RNA, en caso de infección microbiana, descubriendo que de unos 23.000 genes analizados, 465 muestran cambios en la expresión de RNA, 306 fueron inducidos y 159 fueron reprimidos. La respuesta inmune correspondía a la provocada por la introducción de bacterias Gram(+), bacterias Gram(-) o por hongos. Muchos de estos genes fueron específicamente atribuidos a funciones de defensa: reconocimiento, señalización, melanización, coagulación, y síntesis de proteínas antimicrobianas. También en las abejas solitarias ha sido estudiado el conjunto de genes de la respuesta inmune (Xu y James, 2009), llegando a conclusiones similares.

Existe una marcada variabilidad y ubicuidad entre especies de insectos en lo referente a las proteínas involucradas en la respuesta inmune (Schmidt *et al.*, 2010). Por ejemplo, las proteínas de reconocimiento *peroxinectina*, *remolina*, *hemomucina*, pueden encontrarse en varias especies, aunque pueden estar ausentes en especies muy relacionadas. Lo anterior pone en evidencia la heterogeneidad en la expresión y variación cuantitativa de proteínas relacionadas con estos mecanismos. No obstante es interesante la óptica de autores que las aplican en forma comparativa para señalar las similitudes entre taxones mayores en este campo (Theopold *et al.*, 2002; Tzou *et al.*, 2002).

#### LOS COMPONENTES HUMORALES DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA

Probablemente el antecedente más importante de los trabajos anteriormente citados lo constituyó un estudio sobre la expresión de las proteínas de *Drosophila* comprometidas en la defensa inmune. Éste fue efectuado por De Gregorio *et al.* (2001) mediante el análisis de los genes que se expresan como respuesta contra la infección microbiana. A partir de aquel trabajo se supo que en esta emergencia se induce la expresión de 239 genes y se reprimen 170, muchos de ellos no conocidos anteriormente. Esta información se obtuvo mediante el estudio de micro arre-

glos de oligonucleótidos llevado a cabo sobre un total de 13.197 genes. La mayor parte de los genes comprometidos pudieron ser asignados a aspectos específicos de las funciones de defensa, entre ellas reconocimiento de moléculas extrañas, fagocitosis, coagulación, melanización, activación de factores de transcripción de la vía NF- $\kappa$ B, síntesis de péptidos antimicrobianos, producción de especies reactivas del oxígeno y regulación del metabolismo del hierro.

El componente humoral utiliza proteínas antimicrobianas y otras moléculas efectoras, que circulan en el hemocele o que han migrado a algunos tejidos, con la finalidad de inactivar los agentes patógenos que accedan, o se encuentren en vías de alcanzar el interior del insecto. Comprende asimismo dos importantes reacciones en cascada que a su vez, están muy relacionadas: melanización y coagulación (Bidla *et al.*, 2005).

#### MELANIZACIÓN

Este proceso fue estudiado desde hace más de dos décadas en varias especies de insectos (Nappi y Seymour, 1991). Consiste en la formación del pigmento oscuro, la melanina, de la cual existen dos variedades, la feomelanina, de color pardo, que es propia de los vertebrados, y la eumelanina (negra) que se encuentra en los insectos. En este caso se trata de un polímero de indol-quinonas. Este compuesto proviene de la oxidación de la fenilalanina y/o la tirosina (Nappi y Christensen, 2005), e incluso de catecolaminas (Czapla *et al.*, 1990) y otros sustratos (Kim *et al.*, 2000). La finalidad de este pigmento que tiene una estructura altamente polimerizada consiste en rodear e infiltrar las células extrañas impidiéndole desarrollar sus funciones vitales. Este proceso se puede llevar a cabo acompañando la encapsulación del parásito (Li *et al.*, 1992), otro de los mecanismos de defensa.

La formación de la melanina en la hemolinfa es catalizada en una primera fase por la enzima fenoloxidasas (PO). De hecho hay más de una enzima con actividad de PO. Esta enzima proviene de su forma inactiva, la proenzima profenoloxidasas (PPO) que es

sintetizada en las células cristal y la que por acción de una cascada de serín proteasas es convertida en la forma activa. Este mecanismo que lleva a la constitución de la enzima activa se caracteriza por la presencia de una cantidad de pasos controlados (Banerjee *et al.*, 1991; Brehelin *et al.*, 1991; Wang y Jiang, 2004) los cuales regulan la aparición de la actividad y la mantienen dentro de límites precisos. Se entiende que tales controles impiden que se produzca una activación incontrolada de la enzima que conlleve una generalizada melanización de las regiones no comprometidas por la invasión del parásito o cuerpo extraño. En el mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) se ha comprobado que existen dos vías de melanización según la causa que dispara el mecanismo de la PO (Zou *et al.*, 2010).

De acuerdo a la especie de insecto, la PO puede encontrarse en la hemolinfa o puede ser liberada por ruptura celular. Se deposita alrededor de heridas o de parásitos, sean encapsulados o no, inhibiéndolos a partir de generación de sus productos. Cabe mencionar que esta enzima puede ser transportada a la cutícula, y de hecho ello ocurre en la mayor parte de estos animales y sobre amplias áreas cuticulares, donde éstas son convertidas a una forma mecánicamente más resistente y opaca a la luz.

La profeniloxidasas es una enzima bastante conocida ya que ha sido purificada y aislada de un amplio rango de especies de insectos. La masa molecular de esta enzima en los insectos varía entre 78 a 80 kDa (Uniprot: Prophenoloxidasas-Insecta, 2012). Su estructura contiene una secuencia que muestra una gran similitud a la región tiol-éster de las proteínas C3 y C4 del Complemento de vertebrados. El camino que conduce desde la oxidación inicial de los sustratos endógenos, fenilalanina y tirosina, por parte de la PO, transcurre hasta la formación de dopacromo (Nappi y Christensen, 2005) a través de pasos intermedios catalizados o espontáneos; luego éste polimeriza a melanina, mediante intermediarios cuya conversión puede (también) ser catalizada o no. Todo parece indicar que una vez que se ha

activado la fenoloxidasa, los pasos subsiguientes se llevan a cabo de una forma tal que las transformaciones intermedias no parecen estar sujetas a regulación. La melanina es un polímero que, desde unos pocos monómeros forma oligómeros y sigue creciendo hasta polímero.

Hemos podido observar (Medina Pereyra *et al.*, 2011a) que el curso de la melanización se acompaña de cambios en el espectro de absorción que consisten en un desplazamiento de los picos de absorbancia desde longitudes de onda mayores en el rojo, hacia el UV. Hemos verificado que este proceso se efectúa en el orden de minutos, de manera que un cambio de un 10 % de los valores de absorbancia desde rojo al azul ocurre en unos 20 minutos. Lo mencionado corresponde a ensayos realizados con hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* (Smith) sin el agregado de ningún sustrato externo para la enzima. A partir de ello se puede deducir que lo observado corresponde a los tiempos reales en que se produce la melanización en una zona circumscripita del insecto.

Como se ha afirmado anteriormente, todos los mecanismos de defensa conocidos están relacionados funcionalmente. Ello ocurriría en todas las especies de insectos, ya sea en mayor grado por la naturaleza del mecanismo o, en grado menor por variabilidad entre especies. En lo que sigue, se verán varios ejemplos de este tipo que involucran a la coagulación con la melanización y con otros mecanismos.

#### COAGULACIÓN DE LA HEMOLINFA

En insectos existen, por lo menos, dos tipos de mecanismos de coagulación identificados. En el primero está la polimerización de las proteínas coagulantes, de las cuales la más importante es la *hemolectina*, aunque hay que incluir también a las *lipoforinas* y *vitelogeninas*, que es catalizada por una transglutaminasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  liberada desde los plasmotocitos. Conviene mencionar que este tipo de hemocito es el más abundante en la hemolinfa de los insectos. El otro tipo de coagulación fue bien estudia-

do en el molusco *Lymulus polyphemus* Linnaeus (1758) pero se sugirió la existencia de este mismo sistema en *Drosophila* donde la coagulación mediada por (1-3)- $\beta$ -D-glucano o LPS, es activada por una cascada de serín proteasas de tres pasos.

Se ha señalado (Haine *et al.*, 2007) que la homología estructural entre las enzimas de coagulación de la hemolinfa, el sistema del complemento y la coagulación de la sangre de mamíferos indicaría la posibilidad de un origen común para las cascadas proteolíticas de estos tres sistemas. Se entiende que el origen común al que se refieren estos autores corresponde principalmente a aspectos estructurales (los dominios de las proteínas que integran estas cascadas proteolíticas), y no a los mecanismos de funcionamientos propios o asociados.

Existen varias funciones que forman parte del esquema general de la coagulación, la mayor parte de ellas han sido observadas, ya sea, en una sola especie o en varias especies, a veces del mismo Género, de la misma Familia o del mismo Orden. De manera que, a partir de estos datos, solamente se puede tener una idea general de su distribución entre los insectos. No obstante, si se investigan y descubren las características de una novel función, es posible conjeturar sobre su importancia biológica general y por lo tanto de la eventual distribución en los taxones superiores.

Para justificar la necesidad de extrapolaciones cuidadosas Dushay (2009) ha señalado el hecho que la estructura del coágulo todavía es imperfectamente conocida y que existe una baja similitud en los mecanismos de la coagulación entre distintas especies de insectos.

La presencia de ácidos nucleicos propios en la hemolinfa del lepidóptero *Galleria mellonella* Linnaeus (1756) es uno de los principales inductores de su respuesta inmune (Altincicek *et al.*, 2008). Dentro de ésta, la coagulación de la hemolinfa es la primera en evidenciarse, con una respuesta similar a la producida por los lipopolisacáridos de los microorganismos. Además, este solo estímulo desata también la síntesis de péptidos antimicrobianos.

De la misma forma, se ha determinado que la PO cambia las propiedades físicas del coágulo en *Drosophila* y en *Galleria* (Bidla *et al.*, 2005), lo cual efectúa mediante la creación de uniones covalentes entre el polímero de la melanina y la malla del coágulo. Asimismo existen observaciones (Bidla *et al.*, 2009) que relacionan la iniciación de la activación de la PO en el díptero con señales internas del propio insecto y no con los factores desencadenantes propios de la estructura del microorganismo invasor. La melanización del coágulo depende de señales derivadas de células apoptóticas y de la presencia de fosfatidilserina, fosfolípido que se encuentra en su casi totalidad en la cara citoplasmática de las células del hospedador. En el caso del lepidóptero, la melanización puede ser inducida por los peptidoglicanos del invasor. Los casos de diferencias en la puesta en marcha de las respuestas inmunes y su ubicuidad en los invertebrados han sido destacados por Cerenius *et al.* (2010). En menor grado esto parece ser cierto también para los insectos.

La *hemoclectina* juega un papel importante en la coagulación en *Drosophila*, dado que los mutantes del gen correspondiente tienen problemas de coagulación (Lesch *et al.*, 2007). No obstante, se ha observado que aún con este *handicap*, las larvas pueden sobrevivir. Ello fue confirmado por Chang *et al.* (2012), quienes observaron que las larvas más jóvenes (que tienen menor cantidad de plasmotocitos en la hemolinfa), no resisten y que las más desarrolladas sobreviven a los ataques gracias a la mayor cantidad de estos hemocitos.

Debido a que la coagulación es una función crítica para el mantenimiento de la homeostasia y la limitación de la pérdida de líquidos, se ha destacado el hecho que la PO crea uniones covalente dentro de la trama del coágulo (Eleftherianos y Revenis, 2011). Ello aumenta la dureza y la melanización del coágulo, aun cuando el mecanismo exacto es insuficientemente conocido desde el punto de vista molecular. Estos autores señalan asimismo que el proceso varía entre distintas especies de insectos. Cabe mencionar

que las principales células responsables de las funciones de la coagulación y la fagocitosis son los plasmotocitos, y que en el caso de la melanización, las portadoras y liberadoras de las enzimas comprometidas son las denominadas células cristal (Lamaitre y Hoffmann, 2007). Adelantamos que en el caso del mecanismo de encapsulación las células efectoras son los lamelocitos.

Las serín proteasas juegan un papel central en los sistemas defensivos puesto que intervienen en los tres principales mecanismos que los componen: coagulación, melanización y síntesis de péptidos antibacterianos. En la hemolinfa de *Anopheles gambiae* Giles se han identificado cinco de estas enzimas que cumplen funciones inmunes en los hemocitos, el cuerpo graso y el intestino medio (Gorman y Paskewitz, 2001). Las serín proteasas son reguladas por una familia de proteínas denominadas *serpinas*, pero no se conoce en profundidad la forma en que se asocian con cada una de aquellas enzimas. No obstante, se sabe con cierto detalle lo que ocurre en *Tenebrio molitor* Linnaeus (1758) (Jiang *et al.*, 2009), donde se encuentran integrando el mecanismo de la síntesis de melanina y el de la cascada proteolítica que termina activando la vía Toll.

Se han descrito los tipos de reguladores de las enzimas proteolíticas serín proteasas en los artrópodos (Kanost, 1999). Ellos se agrupan en *Serpinas*, Kazal, Kunitz, y alfa-macroglobulinas, las cuales se encuentran en los hemocitos o en la hemolinfa. A éstas hay que agregar dos familias de péptidos que también inhiben aquellas proteasas: una del gusano de seda *Bombyx mori* y otra en las langostas, las cuales pueden inhibir las proteasas de hongos y parásitos invasores, como así también regular la coagulación de la hemolinfa.

Un detallado análisis de las proteínas que integran el coágulo de la hemolinfa de la mosca de la fruta, el cual incluye los sustratos para la transglutaminasa, ha sido llevado a cabo por Karlsson *et al.* (2004). Las proteínas que disminuyen su concentración en la hemolinfa después de la coagulación (o sea que son parte del coágulo) son: la

proteína mucínica CG8502, (de características idénticas a una proteína de la cutícula de 37,1 kDa); la CG11313 (una serín proteasa de 40,5 kDa) similar a la proteína activadora de la PO, dos PO, la *lipoforina* (proteína de la hemolinfa de unos 370 kDa transportadora de lípidos y que interviene en la coagulación), la *gelsolina* secretoria (88,4 kDa) que promueve la fagocitosis, y la CG15825 denominada *Fondue* (de unos 56,6 kDa con función en la coagulación y en la metamorfosis). Las que aumentan su concentración en la hemolinfa son: una subunidad de la ferritina y dos proteínas miembros de la familia de la Igs.

Korayem *et al.* (2004) han identificado una mucina que se encuentra en los hemocitos, en la membrana peritrófica y en las glándulas salivales, la cual también forma parte del coágulo y participa en la inmovilización de las bacterias atacantes. Por otra parte, las proteínas inhibidoras de proteasas presentes en la seda de los lepidópteros han demostrado estar también presentes en el coágulo (Korayem *et al.*, 2007).

La interacción entre el sistema de la PO y el de la coagulación ha sido analizado en *Galleria mellonella* y en *Drosophila* de lo que se dedujo que ambos sistemas demuestran participar en la formación del coágulo (Li *et al.*, 2002; Lindgren *et al.*, 2008), siendo la actividad de transglutaminasa la más importante en esta tarea. Este último punto ha sido enfatizado por Wang *et al.* (2010).

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo determinaciones y análisis de las proteínas durante el proceso de formación del coágulo en la hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda*. Nuestras observaciones (Medina Pereyra *et al.*, 2011b) basadas en el estudio de los patrones electroforéticos de la hemolinfa (sin coagulación), del coágulo y del sobrenadante del coágulo (hemolinfa después de la coagulación) demostraron una notoria actividad proteolítica que alcanzaba no solamente a las proteínas mayores de la hemolinfa, sino a proteínas de masa molecular media y pequeña. El aumento de bandas detectadas se debe a la actividad de enzimas proteolíticas. Para el caso

de las nuevas bandas observadas, cuyos pesos moleculares fueron mayores a 60 kDa, la explicación más simple consiste en suponer que las enzimas actuaron sobre una(s) proteína(s) de gran masa molecular separando numerosos péptidos menores de diferentes masas y produciendo una decena de (nuevas) proteínas de entre 60 y 200 kDa, que es lo que se observa en las electroforesis. Los resultados muestran que: a) las proteasas activadas atacan un gran número de proteínas de la hemolinfa, b) la actividad enzimática de las proteasas activadas en la coagulación no se ejercería sobre sitios específicos de las proteínas atacadas, c) las proteínas de más de 100 kDa disminuyen en cantidad absoluta, según lo evidencian la disminución de sus bandas en las electroforesis, pero aumentan en número, es decir se forman nuevas moléculas de distintos pesos pero en menor concentración.

#### PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS. MOLÉCULAS DE RECONOCIMIENTO Y FUNCIONES

Una tercera reacción humoral a la infección (y la más conspicua desde el punto de vista inmunológico) es la síntesis rápida y la liberación de una batería de péptidos antimicrobianos. El sitio principal de síntesis, como se dijo, es el cuerpo graso, que puede estar ubicado contra la matriz extracelular de la superficie interna de la epidermis y que se encuentra distribuido en todos los segmentos del insecto. Se ha comprobado que también los hemocitos, las células epiteliales del tegumento, el intestino, las glándulas salivales y el tracto reproductivo son capaces de producir factores antimicrobianos de naturaleza proteica. Aunque todos los péptidos son diversos en estructura, se observa que al activarse son anfipáticos, moléculas básicas que actúan sobre las membranas de la célula invasora a la cual destruye, generalmente por lisis. En respuesta a la infección los insectos pueden sintetizar una combinación de sus péptidos antibacterianos que actúan mediante el ataque sobre diferentes componentes de la envoltura bacteriana. La respuesta se produce a través de un proceso de duración va-

riable que es dependiente de la especie estudiada y que se desarrolla en varios pasos.

En primer lugar, se produce el reconocimiento de la célula extraña. Ello ocurre mediante la unión de factores de reconocimiento que circulan en la hemolinfa, o que están unidos a la membrana de las células del cuerpo graso. En *Drosophila melanogaster* se reconocen dos vías de señalización para la respuesta inmune: la vía *Toll* y la vía *Imd*. La primera es la principal inductora de reacciones contra bacterias Gram(+), levaduras y hongos, mientras que la vía *Imd* lo hace contra bacterias Gram(-) (Fig. 1).

Para el caso del sistema *Toll* este reconocimiento sigue los siguientes pasos. Los péptido-glicanos de las bacterias Gram(+) son reconocidos por moléculas específicas que se encuentran en la hemolinfa como PGRPs (proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos) y las GNBPs (llamadas proteínas de unión a bacterias gram negativas por creer este hecho cuando fueron descubiertas) que activan a serín proteasas, la última de las cuales (SPE) a su vez actúa sobre una proteína específica (proSpätzle) escindiendo un péptido, de manera que la proteína resultante (Spätzle) adquiere la capacidad de unirse al receptor de membrana *Toll* activándolo. Ello produce la activación celular, la cual se continúa a través de las vías de señalización intracelular. Estas vías de señalización involucra en los últimos pasos a la proteína *Cactus* que retiene a péptidos del tipo NF- $\kappa$ B, para el caso los péptidos Dorsal y DIF, en el citoplasma. Cuando se produce la activación de la vía *Cactus* se fosforila, y libera a los péptidos Dorsal y DIF que se translocan al núcleo y actúan de hecho como factores de transcripción, lo cual conduce a la síntesis de moléculas efectoras: los péptidos antimicrobianos, que se liberan a la hemolinfa. Cabe mencionar que este es un proceso más lento que el correspondiente a la melanización o a la coagulación, que se producen en pocos minutos.

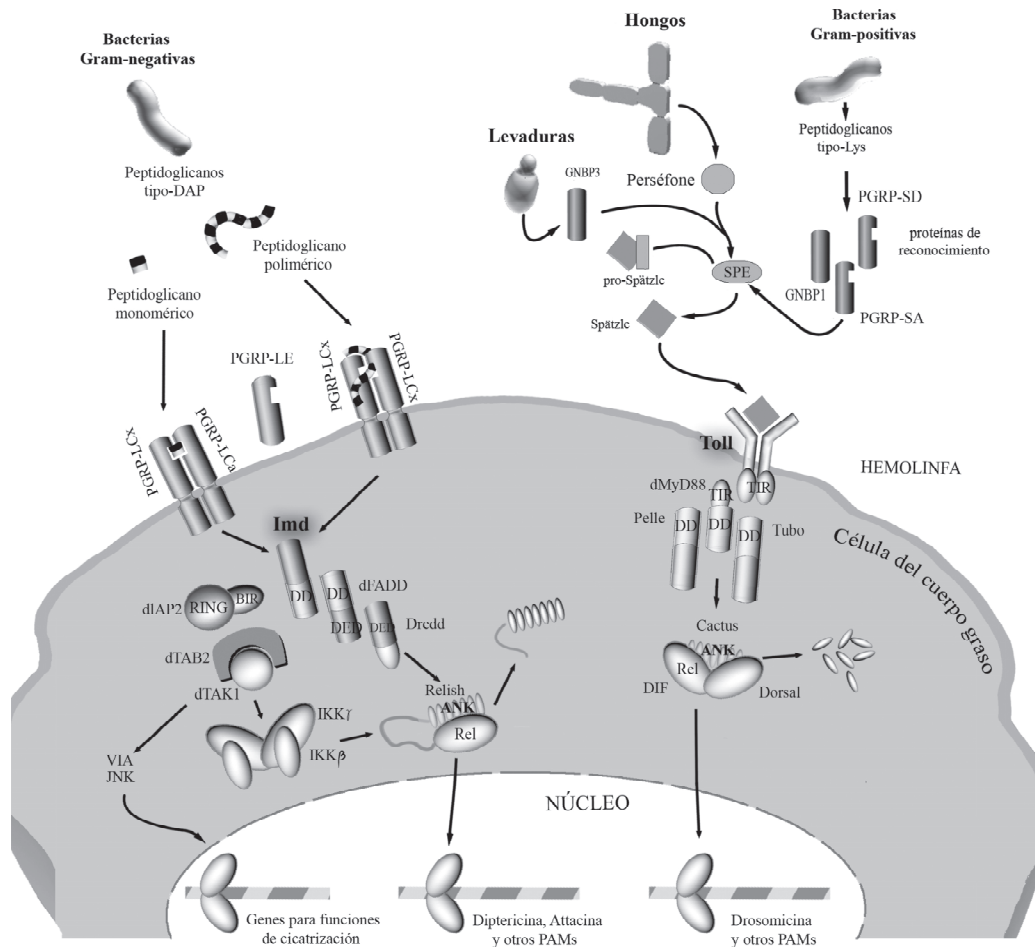
Es importante tener en cuenta una cierta diferenciación en las funciones de reconocimiento de las clases de microbios por parte de los sistemas inmunes de los insectos. En

este sentido cabe señalar que existen dos tipos básicos (dos patrones) de peptidoglicanos que forman parte de las paredes celulares bacterianas. Estos producen una identificación diferencial por parte de los receptores de reconocimiento del patrón (RRP) del insecto, que reconocen y se unen a distintas estructuras microbianas. Como ya se ha mencionado, los RRP capaces de reconocer peptidoglicanos se denominan proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PRPG) y pueden diferenciar una bacteria Gram(-) que contiene peptidoglicanos tipo-DAP (ácido diaminopimélico) de una bacteria Gram(+) que contiene una cantidad significativa de lisina (Lys).

Por otra parte, en la vía *Imd* los PRPG están ubicados en la membrana celular (PRPG-LC), aunque también existe un PRPG-LE que reconoce el peptidoglicano tipo-DAP. La unión de los peptidoglicanos a las proteínas de reconocimiento permite que estas interactúen con la proteína *Imd* intracelular, produciendo un cambio de conformación de ésta y desencadenando una cascada de señalización que mediante dFADD activa el factor de transcripción Rel, el cual finalmente, induce la síntesis de efectores antimicrobianos, fundamentalmente contra bacterias Gram(-) (Lemaitre y Hoffmann, 2007; Feldhaar y Gross, 2008) (Fig. 1).

#### LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Si bien se han identificado más de 250 péptidos antimicrobianos (PAMs) en los insectos, haremos referencia a los más conocidos en lo que respecta a su función. Como ya se ha señalado anteriormente estas proteínas pueden ser constitutivas por su presencia en la hemolinfa, o pueden ser inducibles, cuando se expresan en respuesta a la presencia de hongos o bacterias. Las proteínas antimicrobianas de insectos están agrupadas en familias, las cuales se establecen en base a las similitudes estructurales y de secuencia, como así también al *target* propuesto en la pared celular bacteriana. Se distinguen tres categorías de PAMs (Park y Lee, 2012) la primera agrupa a los péptidos antimicrobianos que



**Figura 1.** Principales vías de respuesta inmune contra bacterias, levaduras y hongos en *Drosophila melanogaster*. La vía Imd comienza con el reconocimiento de los péptidoglicanos tipo DAP monomérico y polimérico, por parte de los receptores PGRP-LC o PGRP-LE. Los dominios de éstos receptores interactúan con la proteína Imd citoplasmática que a su vez activa una cascada de señalización por medio de la molécula dFADD. Ésta activa a la caspasa Dredd, la cual escinde a Relish fosforilado, resultando en los péptidos ankyrina (ANK) que permanece en el citosol y Rel que se transloca al núcleo induciendo la transcripción de genes inmunocompetentes. La fosforilación de Relish es mediada por el complejo inhibidor IKK. La activación de dTAK1 es inducida por dTAB2 y dIAP2. La vía JNK (c-Jun N-terminal kinase) actúa independientemente de Relish pero en conexión con Imd. Por su parte, la vía Toll se activa por receptores de reconocimiento extracelulares: a) PGRP-SD, PGRP-SA y GNBP1 para bacterias gram-positivas; b) GNBP3 reconoce los  $\alpha$ -1,3-glucanos, componentes de la pared celular de hongos y c) por la serín proteasa Perséfone en el caso de infecciones fúngicas en general. En todos los casos se desencadena una cascada de amplificación de la señal llevada a cabo por serín proteasas. La forma inactiva de Spätzle (pro-Spätzle) es activada por SPE. Spätzle activa al receptor de transmembrana Toll, activándose un set de moléculas en cascada. El receptor TIR y/o las moléculas dMyD88 y Tube conducen a la activación de la kinasa Pelle. Esta última induce la degradación del inhibidor Cactus, que mantiene a DIF y Dorsal en el citoplasma. La translocación de estos factores de transcripción inducen la transcripción de genes que codifican los respectivos PAMs (figura modificada de Lemaitre y Hoffmann, 2007).

poseen uniones disulfuro intramoleculares formando alfa-hélices, láminas beta, láminas beta tipo *hairpin* o estructuras mixtas. El segundo grupo está constituido por péptidos lineales formando alfa-hélices anfipáticas. El tercer grupo contiene péptidos ricos en glicina o prolina. En lo que sigue se tomarán como referencia a los PAMs de *Drosophila*. Como se verá, hay similitud entre los PAMs de este díptero y los de otros insectos.

El mecanismo de acción más generalizado de las proteínas antimicrobianas se inicia con la unión de éstas a los lipopolisacáridos de las membranas microbianas. La interacción electrostática producida por la carga positiva de los aminoácidos básicos y la cabeza de fosfolípidos con carga negativa hace que los péptidos tomen una posición paralela a la membrana. Cuando la concentración local relativa del péptido con respecto al componente lipídico se incrementa, los péptidos tienden a tomar una posición perpendicular a la membrana y se inserta en ella formando microtúbulos (Fig. 2). Esta inserción de los péptidos altera la permeabilidad de la membrana, lo que produce la paralización del metabolismo bacteriano; así también puede ocurrir la lisis celular porque las características físicas de los poros facilitan la entrada de agua (Montaño Pérez y Vargas Albores, 2002).

Basándose en el tipo de microorganismo al que atacan los PAMs se pueden clasificar (Park y Lee, 2012) en: a) los que como la defensina, atacan las bacterias Gram(+); b) los que dirigen su actividad contra bacterias Gram(-), como la cecropina, drosocina, attacina, y MPAC (*matured prodomain of attacin C*), y c) los que atacan a los hongos patógenos, como la drosomicina y la metchnikowina. Se describen sucintamente las más conocidas de estas proteínas.

**Attacinas.**— Estas proteínas son activas solamente contra organismos Gram(-), afectando los mecanismos de división celular mediante la inhibición de la síntesis de porinas, proteínas de membrana de las bacterias. Si bien la masa molecular de gran parte de los integrantes de la familia tiene ge-

neralmente unos 20 a 22 kDa, también existen péptidos que alcanzan a 28 kDa, no contienen cisteína y son ricos en glicina. La MPAC constituye una forma precursora de mayor peso molecular. Estas proteínas tienen cerca de un 37 % de homología con las sarcotoxina y diptericina de los dípteros y con las dipterocinas de lepidópteros. La MPAC muestra similitud estructural con la drosocina y con la cecropina, pero solamente es parecida a esta última en su actividad antibacteriana.

**Cecropinas.**— Constituyen una familia de péptidos fuertemente básicos, con masas moleculares de alrededor de 4 kDa. El nombre se debe a que fueron descritas por primera vez en la polilla *Hyalophora cecropia* Linnaeus (1758), no obstante, también se detectaron actividades similares atribuibles a estos péptidos en otros insectos. En *Drosophila* se han encontrado tres cecropinas, se las ha clonado e incluso se las ha producido sintéticamente comprobándose su actividad antibacteriana Gram(-) a concentraciones micromolares. Las formas naturales tienen una potente actividad antibacteriana contra Gram(+) y Gram(-). Son antibióticos activos que interactúan con lípidos de membranas formando canales. Las cecropinas no contienen cisteína, y exhiben una estructura de dos  $\alpha$ -hélices unidas por una región bisagra de articulación. Se identificaron cecropinas en mamíferos, en intestino de cerdo y glándulas adrenales de bovinos, lo cual implica que este grupo podría estar ampliamente difundido en el reino animal (Gillespie y Kanost, 1997).

*Bacillus thuringiensis* Berliner (1915) utilizado para el control biológico de insectos es totalmente resistente a todas las cecropinas. Sin embargo, los protoplastos de esta bacteria son sensibles a estos péptidos, lo que indica que la pared celular juega un papel importante en la resistencia a las cecropinas (Vargas Albores y Ortega Rubio, 1994).

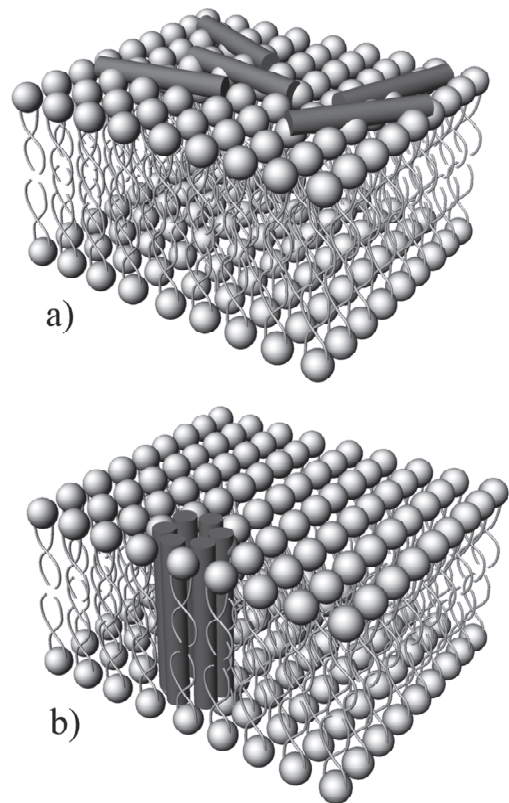
**Defensinas.**— Constituyen un grupo heterogéneo de péptidos, ubicuo y con la mayor

cantidad de especies moleculares de los que se han estudiado en los animales o las plantas. Atacan principalmente bacterias Gram(+) actuando sobre la membrana citoplásmica y lisando las células por la formación de canales de membrana, conduciendo a un rápido escape de  $K^+$  y otros iones. Las defensinas de insectos son péptidos catiónicos (4 kDa) que contienen seis residuos de cisteína conservados, con tres puentes disulfuro. Poseen tres dominios distintos: un *loop* amino terminal, una  $\alpha$ -hélice y una lámina  $\beta$  antiparalela. Las defensinas de los insectos presentan puentes disulfuro que no se encuentran en las de los mamíferos. Este péptido muestra similitud con la *tenecina* del género *Tenebrio* y con la *sapocina* A del género *Sarcophaga*. Aunque numerosas defensinas han sido aisladas de mamíferos y plantas, los análisis realizados revelaron que no son homólogas a las defensinas de insectos (Hoffmann, 1995; Montañó Pérez y Vargas Albores, 2002).

**Drosocina.**— Tiene gran actividad contra bacterias Gram(-), con una masa molecular de 7,2 kDa, y es glucosilada. Si bien es un potente antibacteriano demora algunas horas en ejercer su actividad, la cual se realiza hasta en concentraciones micromolares. La *apidaecina* de la abeja *Apis mellifera* Linnaeus (1758) es homóloga de la drosocina.

**Diptericina.**— Tiene actividad contra bacterias Gram(-), actúa aumentando la permeabilidad de las membranas del microbio. Tiene una masa molecular de unos 9kDa. Lo mismo que la drosocina es un péptido glicosilado. Hay péptidos similares a la diptericina en los géneros *Protophormia*, *Sarcophaga* y *Glossina*.

**Drosomicina.**— Tiene actividad contra los hongos patógenos, reteniéndola aún en presencia de altas concentraciones de sales, a diferencia de lo que ocurre con las defensinas. Con una masa de unos 5 kDa presenta tres uniones disulfuro. Tiene una cierta similitud con las defensinas de las plantas.



**Figura 2.** Esquema general del mecanismo de acción de péptidos antimicrobianos. Los péptidos se ubican de manera paralela a las membranas uniéndose a las mismas por interacciones electrostáticas (A). Cuando la concentración relativa de péptidos aumenta con respecto a la de lípidos, éstos adoptan una posición perpendicular produciéndose la formación de poros (B).

**Metchnikowina.**— Este pequeño péptido tiene una masa molecular cercana a 3 kDa, no presenta uniones disulfuro, es rico en prolina y tiene actividad contra bacterias Gram(+) y hongos. Se la encontró en *Drosophila* y tiene una cierta similitud con la *abaecina* en *Bombus pascuorum* Scopoli (1763), y la *lebocina* en *Bombyx mori*.

**Lectinas.**— Si bien hacemos referencia a este grupo de péptidos, se debe señalar que no parecen ser muy importantes *in vivo* como moléculas bactericidas. En realidad su

papel atañe a la capacidad de reconocimiento de moléculas extrañas. Son proteínas divalentes o multivalentes que pueden aglutinar células u otros materiales que tengan oligosacáridos de la complementariedad apropiada. Por definición, las lectinas se ligan específicamente a carbohidratos a través de uniones no covalentes. Estas proteínas han sido descritas en virus, bacterias, levaduras, plantas, invertebrados y vertebrados. Aunque se ha demostrado la capacidad de las lectinas para aglutinar bacterias y precipitar glicoconjugados, es posible que este mecanismo no sea el más importante de los que actúan *in vivo*. Más bien, su papel sería facilitar su fagocitosis (opsonización). Según Vargas Albores y Ortega Rubio (1994), no se han podido hacer generalizaciones sobre las lectinas de insectos debido a las diferencias y diversidad encontradas entre ellos.

#### LA LISOZIMA Y OTROS PÉPTIDOS INTEGRANTES DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA

La lisozima constituye uno de los factores más importantes de la defensa contra bacterias invasoras. Ello se debe a su presencia constante en la hemolinfa, lo cual implica una defensa de primera línea en relación a la mayoría de los sistemas más complejos y por lo tanto más lentos en ejercer sus efectos. Se debe destacar que es la enzima antibacteriana con mayor distribución en los seres vivos y constituye el primer factor antibacteriano purificado de la hemolinfa de los insectos. Se la encuentra en virus, bacterias, hongos, plantas y animales. En los insectos se la ha encontrado, además de la hemolinfa, en órganos tales como el intestino y los hemocitos. Su actividad consiste en hidrolizar los enlaces  $\beta$ -(1,4)-glicosídicos en los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. La lisozima de insectos es una proteína (14 kDa) cuya secuencia de aminoácidos muestra gran similitud a la lisozima de vertebrados.

No se han encontrado bacterias que sean sensibles a la lisozima y resistentes a las cecropinas. De este modo, es posible que la principal función de la lisozima en los insectos no sea matar a las bacterias, sino remover

el sáculo de mureína, permitiendo la acción de cecropinas y atacinas, lo cual implica la existencia de un eficiente trabajo sinérgico.

Estudios efectuados por nuestro grupo de investigación (Medina Pereyra *et al.*, 2012) en hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* han demostrado la necesidad de sistematizar los protocolos para la determinación de la actividad de lisozima en los insectos. Por otra parte se ha comprobado la capacidad de la lisozima de este lepidóptero de conservar su actividad, en presencia del sustrato (*Micrococcus* sp.) por tres días después de ser extraída la hemolinfa. Esta característica no la poseen las muestras de lisozima correspondientes a mamíferos. Una razón biológica podría residir en el hecho que la defensa antimicrobiana de estos animales ectotérmicos exige una actividad lítica que sea eficiente a temperatura ambiente y que persista aún después de la muerte del individuo para disminuir los riesgos de propagación del microorganismo atacante.

#### COMPONENTE CELULAR EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA

El papel que juegan las células de la hemolinfa en los mecanismos de defensa ha sido destacado por Fauvarque y Williams (2011) cuando detallan las funciones de los hemocitos (respuesta a señales de lesión tisular, cicatrización de heridas, iniciación de coagulación, fagocitosis, encapsulación, participación en la remoción de cuerpos apoptóticos y producción de matriz extracelular).

Las diferencias entre expresión humoral y celular en la inmunidad han sido ya mencionadas. De esta forma se distinguen específicamente las funciones que transcurren en forma humoral (coagulación, melanización, actividad de péptidos antimicrobianos y producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno) de los correspondientes a las celulares (fagocitosis, encapsulación) (Lavigne y Strand, 2002). Los hemocitos derivan de células madres mesodérmicas que se diferencian en linajes especializados. En los lepidópteros los mecanismos de defensa comprometen a las células granulares y a los

plasmatocitos, mientras que en *Drosophila* incluyen a los plasmatocitos, las células cristal y a los lamelocitos.

El componente celular está integrado por los hemocitos circulantes en el hemocele que son capaces de reconocer (indirectamente) los elementos extraños mediante receptores tipo Toll que activan la expresión y liberación de péptidos antimicrobianos. Gran parte de las funciones de inmunidad celular en los insectos es dependiente de la actividad de reconocimiento que lleva a cabo la proteína *hemolina* (Eleftherianos *et al.*, 2007). También se ha comprobado que en *Manduca sexta* Linnaeus (1763), la mayoría de estas funciones está a cargo de los hemocitos. Entre estas funciones se destaca la fagocitosis, la encapsulación y la formación de nódulos melanóticos.

Hay coincidencia en el sentido que cuando la concentración de microorganismos patógenos es baja, la fagocitosis es el principal mecanismo para eliminar a los invasores. A concentraciones mayores se forman agregados denominados nódulos. La proPO como enzima clave en la melanogénesis juega un papel muy importante en la nodulación. El polímero de melanina se deposita sobre los microorganismos patógenos encapsulándolos (Tellez Jurado *et al.*, 2009). Son varias las acciones que los diferentes tipos celulares, hemocitos en general, plasmatocitos, granulocitos, etc. llevan a cabo, jugando un papel central en la eliminación de las noxas invasoras.

#### FAGOCITOSIS

Las células con actividad fagocítica usualmente representan una subpoblación de los hemocitos de insectos, los plasmatocitos. Las moléculas de la superficie celular descritas en los hemocitos fagocíticos exhiben una sorprendente similitud con los receptores encontrados en células fagocíticas de mamíferos (Vilmos y Kurucz, 1998). Después de la fagocitosis, el material fagocitado queda atrapado dentro del fagosoma, una estructura compleja compuesta de al menos 600 proteínas diferentes (Vilmos y Kurucz, 1998; Feldhaar y Gross, 2008).

La fagocitosis involucra la inclusión de partículas usualmente de un tamaño de más de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro como bacterias, levaduras, células o fracciones celulares apoptóticas. Los tipos de hemocitos más citados en la literatura por tener actividad fagocítica son los plasmatocitos y células granulares. Sin embargo, no se puede generalizar ya que existen diferencias entre taxones y dentro de una misma especie en cuanto al tipo de hemocitos encontrados. En Lepidoptera, los tipos celulares comprometidos en la actividad fagocíticas son los plasmatocitos y células granulares (Lavine y Strand, 2002). En *Spodoptera littoralis* Boisduval (1833) se encontró que los prohemocitos también cumplen con esta función (Berger y Jurèová, 2012). En *Drosophila*, el tipo predominante son los plasmatocitos, constituyendo el 90-95 % de la población de hemocitos (Feldhaar y Gross, 2008).

El proceso de la fagocitosis comienza con el reconocimiento de la partícula extraña por parte de los receptores fagocíticos. Entre éstos se han identificado las siguientes proteínas: *Eater*, *Dscam*, de la familia de proteínas dSR-CI, y una proteína de reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos (LRP) (Lemaitre y Hoffmann, 2007). En el interior de la célula los receptores activan vías de señalización que provocan cambios en la dinámica de la membrana plasmática y el citoesqueleto. La membrana extiende los pseudopodios rodeando la partícula. Al fusionarse la membrana alrededor del microbio queda el material fagocitado dentro del fagosoma, que contiene una alta actividad de enzimas hidrolíticas que detienen la replicación de las bacterias y las eliminan (Rosales, 2011). Asimismo debe mencionarse que dentro del fagosoma se generan especies reactivas del oxígeno que son reconocidamente bactericidas.

#### OPSONIZACIÓN

A partir de la información acumulada sobre mamíferos y vertebrados, es sabido la fagocitosis generalmente se acompaña de un paso previo de reconocimiento por parte de moléculas específicas del hospedador que se

unen a las partículas extrañas, fundamentalmente agentes microbianos, lo que facilita la adherencia y fagocitosis. En los insectos hay información concreta, obtenida sobre todo en *Drosophila*, sobre las proteínas de este tipo (Lemaitre y Hoffmann, 2007). Entre ellas se destaca un grupo que presenta homología con proteínas del sistema del Complemento de los vertebrados. De un total de seis, cinco poseen un grupo interno tioéster (*thioester containing proteins*: TEP). Todas ellas son secretadas a la hemolinfa, y de tres (TEP1, TEP2 y TEP4) se ha comprobado que se aumenta su síntesis en caso de infección. Otra proteína perteneciente a esta familia, TEP6, llamada también Mcr (*macroglobulin-complement related*), no contiene el grupo tioéster, y se ha observado que interviene en el reconocimiento de *Candida albicans* por los fagocitos. En el mosquito *Anopheles gambiae* se ha descrito que el mecanismo mediante el cual las proteínas TEPs se activan y se unen al parásito de la malaria *Plasmodium berghei* depende de la actividad de un heterodímero de alto peso molecular integrado por dos proteínas LRIM1 y APL1C que circulan en la hemolinfa (Povolones *et al.*, 2009) y, en presencia del parásito clivan a TEP1 de manera que ésta actúa como una convertasa de otras moléculas de TEP1 las cuales adquieren la capacidad de adherirse a la cubierta del protozoo permitiendo la fagocitosis. Las funciones de las moléculas intervinientes guardan una gran homología con las del componente C3 del complemento de vertebrados (Baxter *et al.*, 2010). Es interesante la particularmente pormenorizada revisión de Rosales (2011) sobre los mecanismos moleculares de la fagocitosis y opsonización en los insectos.

#### NODULACIÓN

Los nódulos constituyen un agregado de hemocitos cuya función es atrapar microorganismos, como bacterias y hongos, en un material extracelular. Estas formaciones o agregados nodulares de tamaño variable pueden adherirse a los tejidos, siendo seguidamente encapsulados los de mayor tamaño (Gillespie y Kanost, 1997). Howard *et al.*

(1998) encontraron que la intensidad de la reacción de nodulación está relacionada exponencialmente al número y especie de bacterias causantes de la infección, y a la naturaleza de la misma. Este hecho pondría de manifiesto la capacidad de los insectos para desarrollar respuestas hemocíticas a una escala apropiada.

La formación de los nódulos es inducida por LPS, zymosan y algunas glucoproteínas (Gillespie y Kanost, 1997). También los eicosanoides están comprometidos en la nodulación de bacterias y hongos en muchas especies de insectos (Merchant *et al.*, 2008; Tunaz *et al.*, 2008), mediando la migración de los hemocitos entre otros probables efectos. En este sentido, se señalan a compuestos eicosanoides, probablemente prostaglandinas, por estar involucrados en la inducción de dos líneas de defensa contra hongos patógenos: la defensa celular de nodulación y el aumento de temperatura para disminuir la viabilidad de los hongos (Stanley *et al.*, 2009). Por otra parte, se observó una reducción de la nodulación en el escarabajo *Zophobas atratus* Blanchard (1845) y en larvas de *Manduca sexta* L. tratadas con dexametasona, un inhibidor de la biosíntesis de eicosanoides (Howard *et al.*, 1998). En *Ceratitis capitata* Wiedemann (1824) se encontró una proteína de 47 kDa, secretada por los hemocitos, que produce una agregación de células de *Escherichia coli* Migula (1895), cuando es incubada junto con tirosina y tirosinasa. Asimismo, en nódulos de *M. sexta* se encontró una lectina llamada *scolexina* que es secretada por células epidermales y actuaría en estos efectos.

Una novel proteína de 168 aminoácidos, que fue denominada *noduler*, es secretada en la hemolinfa aumentando su concentración luego de una infección. Esta proteína no posee actividad antibacteriana. Su función consiste en mediar el proceso de nodulación por su capacidad de unirse a componentes específicos de una amplia variedad de microorganismos como bacterias Gram(+), Gram(-) y levaduras. De esta manera, inicia la nodulación uniendo los microorganismos a ciertos tipos de hemocitos que sólo participan en este proceso y que no se encuentran

involucrados en funciones de fagocitosis (Gandhe *et al.*, 2007).

#### ENCAPSULACIÓN

Constituye un mecanismo destinado a la eliminación de parásitos o material extraño que, debido a su tamaño, no pueden ser fagocitados. Su formación se debe a la acción de lamelocitos que se adhieren y rodean al material extraño. Esta acción se ve claramente sobre huevos de parasitoides y sobre nemátodos. La consecuencia de la aplicación de esta envoltura consiste en que los invasores se tornan inactivos.

En *Drosophila* los microorganismos son reconocidos y atacados por los plasmotocitos. A continuación se lleva a cabo una diferenciación masiva de lamelocitos que reconocen el invasor y que forman una estructura capsular alrededor de él. Luego de la encapsulación se produce generalmente la melanización del material con lo que resulta la muerte del parásito. Este último efecto puede deberse a la acción de radicales libres de oxígeno, aunque también puede ser el efecto de péptidos antimicrobianos (Feldhaar y Gross, 2008). Recientemente se ha observado (Falabella *et al.*, 2012) que los hemocitos de las larvas de *Heliothis virescens* Fabricius (1777) producen una proteína que forma fibras amiloides que, como una red, rodean al parásito. Ello facilita la melanización del atacante y la adherencia de más células que llevan a cabo la encapsulación.

Entre los factores en que se basa la capacidad de los parasitoides (microhimenópteros) de anular algunos de los mecanismos de defensa de los hospedadores (por ejemplo, larvas de lepidópteros) se encuentran algunas fosfatasa codificadas en el bracovirus que se inyecta junto con los huevos. Estas enzimas se expresan transitoriamente en los hemocitos del hospedador y producen en ellos una disminución de la capacidad de adherirse a las células extrañas y como consecuencia de llevar a cabo la encapsulación del invasor (Ibrahim y Kim, 2008). Este es un ejemplo concreto de una falla en los mecanismos de defensa del hospedador producida por el parásito atacante.

El estudio de los aspectos comparativos de moléculas homólogas de vertebrados y de invertebrados ha promovido el análisis de los alcances funcionales de la apolipoproteína III (apoLp-III) de los insectos, homóloga de la apolipoproteína E (apo E) de los mamíferos. Se ha comprobado una multifuncionalidad de la apoLp-III que incluye mecanismos tales como: la estimulación de la producción de péptidos antimicrobianos, incremento de la fagocitosis, reconocimiento de patrones en células extrañas y actividad en las reacciones de encapsulación multicelular (Whitten *et al.*, 2004).

#### MECANISMO DE OBTURACIÓN Y CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

Los mecanismos de obturación y cicatrización de heridas en los insectos dependen fuertemente de: a) las funciones de coagulación y melanización, y b) del papel que juegan funciones asociadas a los mecanismos de defensa que son efectuados por la activación de una bifurcación del sistema intracelular *Imd*, según se ha estudiado en *Drosophila melanogaster* (Galko y Krasnow, 2004). Esta última consiste en la vía JNK que activa las células epidermales promoviendo las funciones de cicatrización. Sucintamente, cuando se produce una rotura de la cutícula y alteración de la arquitectura del tejido epidérmico se provoca la salida de hemolinfa y se activan las funciones de coagulación y de melanización. La primera produce un tapón que obtura la herida impidiendo la pérdida de hemolinfa. Este tapón incluye las proteínas del coágulo y los restos celulares de la herida incluidos en el coágulo. A continuación se produce una melanización de la parte externa del coágulo que se transformará paulatinamente en la costra de la herida. Los sustratos de las reacciones de melanización proveerían de especies reactivas del oxígeno (ROS) que tienen actividad bactericida. Por otra parte y movilizadas a partir de la activación de la vía JNK (Fig. 1), las células de la epidermis empiezan a confluir, a formar un sincicio que comprenderá células multinucleadas. Parte de estas células estarán incluidas en la región interna del

tapón obturante. Dentro de una o dos horas se observa la síntesis de una nueva cutícula que empieza a separar las células de la epidermis de la costra. La formación de un nuevo epitelio se lleva a cabo en muy pocos días.

#### MECANISMOS DE DEFENSA ANTIVIRAL

Estos mecanismos de defensa merecen un párrafo aparte en razón de que se trata de un campo sobre el cual existe menos información que respecto al resto de las formas de defensa, pero que experimenta un crecimiento excepcional. A partir de lo que se ha encontrado en *Drosophila* y *Aedes*, la información (Park y Lee, 2012) parece indicar que los insectos poseen por lo menos dos formas de defensa contra los virus: un sistema inducible por la infección viral que se lleva a cabo mediante la vía de activación JAK/STAT, y el sistema del RNA interferente.

#### ACTIVIDAD ANTIVÍRICA DEL JAK/STAT

Una tercera forma de defensa antivírica la constituye el sistema de la proteína *vago* que involucra dos pasos, según se describe más adelante.

Las mutaciones que afectan al gen de la Jak quinasa tornan a la mosca de la fruta muy susceptible al virus C de la *Drosophila*, produciendo su muerte. Se ha propuesto el siguiente modelo del mecanismo de defensa. Cuando el virus invade a la *Drosophila* induce la activación de una citoquina de la familia *Unpaired* (Upd) la cual dispara la respuesta antiviral a través de la vía Jak/STAT (Kingsolver y Hardy, 2012) (Fig. 3). Esta vía induce la expresión del gen *vir-1* que es uno de los genes que se activan en la respuesta antivírica.

#### ACTIVIDAD ANTIVÍRICA DEL RNA INTERFERENTE

El mecanismo del ARN interferente tiene varios pasos (Vodovar y Saleh, 2012). En primer lugar, cuando el virus penetra la célula y se desarrollan las primeras etapas de

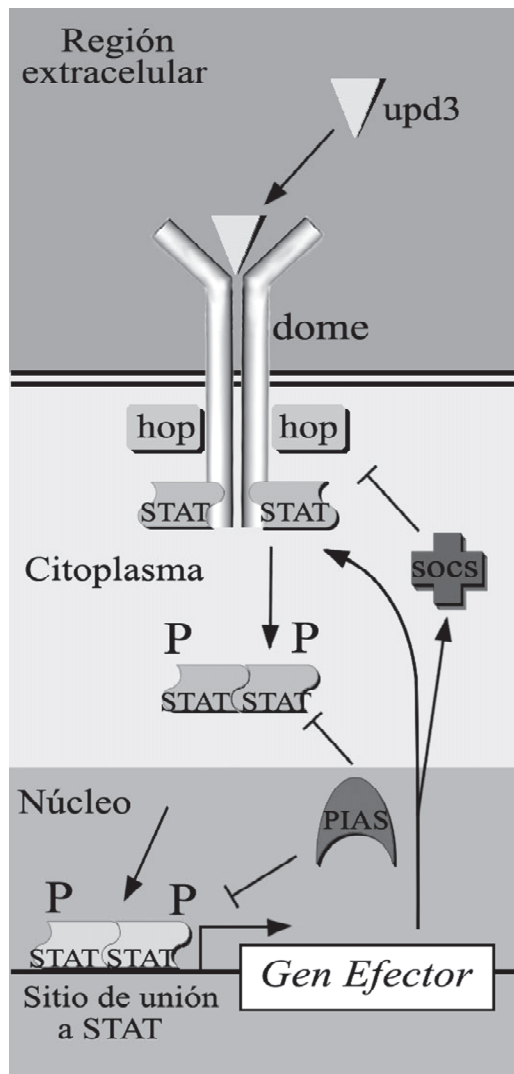
la infección, la doble hebra virósica de ARN es atacada por la enzima Dicer-2 de las células larvales, la cual la escinde formando cadenas de ARN de 20 nucleótidos (vsiRNA). Estas cadenas son separadas por un complejo multimolecular llamado RISC (*RNA inducing silencing complex*) que capta la hemicadena antisentido y la presenta de forma tal que la cadena del ARN virósico se una a ella. El complejo efector mencionado destruye la cadena del virus, se desprende (conservando la hemicadena mencionada) y toma una nueva cadena intacta y la destruye. Es decir que mediante este proceso ejecutado por este complejo molecular, y a partir de esta porción de ARN (microbiano) se produce la interferencia en la formación de los nuevos viriones y se destruyen los existentes. Además de haberse confirmado en *Drosophila* y mosquitos, hay claros indicios que este mecanismo opera en otras 30 especies pertenecientes a Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Blattaria, Hymenoptera, Lepidoptera y Orthoptera (Vodovar y Saleh, 2012). Asimismo, se ha demostrado que varias proteínas homólogas, incluidas enzimas, que se encuentran en la mayor parte de los animales e incluso en las plantas, forman parte de este mecanismo de defensa (por ejemplo la enzima Dicer) (Obbard *et al.*, 2009).

Existen otros mecanismos RNA interferentes muy similares al antiviral, (que sirven a otros propósitos) y que se activan: a) durante las etapas del desarrollo, b) para la regulación de la expresión genética, c) para proteger la estabilidad del genoma reprimiendo la transposición. Estos mecanismos utilizan RNA de cadenas cortas (endo-siRNA, miRNA y piRNA) pero en estos casos provienen de la transcripción desde el propio genoma del insecto, y no del genoma viral. Hay que mencionar que varias de estas funciones no antivíricas se presentan en otros animales incluidos los mamíferos.

#### DEFENSA ANTIVIRAL MEDIADA POR JAK-STAT Y LA PROTEÍNA VAGO

Existe otro mecanismo que parece tener formas de expresión similares pero no idénticas, según la especie de insecto o de virus

intervinientes. Es muy interesante el hecho que la función que lleva a cabo es parecida a la del Interferón de los vertebrados. En este sentido las células atacadas del insecto sintetizan una proteína (denominada *Vago*) que se secreta a la hemolinfa y se une a otras células del insecto induciendo en éstas la



**Figura 3.** Activación de la vía Jak/STAT. La infección viral induce la unión de la citocina Upd-3 a los receptores dimerizados Domeless (dome) activando a hopscotch (hop) y STAT. La fosforilación de STAT produce la translocación al núcleo activando los genes efectores (figura modificada de Kingsolver y Hardy, 2012).

resistencia a la infección virósica mediante la síntesis de proteínas antivíricas (Kingsolver y Hardy, 2012). Paradkar *et al.* (2012) han observado que durante la infección de mosquitos del género *Culex* por el West Nile Virus, se activa el mecanismo de RNA interferente a través de la enzima Dicer-2 que actúa sobre la doble hebra de RNA virósico y a partir de un mecanismo de activación de la transcripción se produce la síntesis de una proteína de 18 kDa que es procesada y secretada al exterior de la célula (Fig. 4). Esta proteína (*Vago*) se une a un receptor de membrana de otra célula que se encuentra en contacto funcional por su lado citoplasmático con el sistema Jak-STAT. Ello aumenta la resistencia de estas células al ataque virósico. En general, por lo que se sabe de varias líneas de investigación, se acepta que el segundo paso del mecanismo funciona de la siguiente forma. La kinasa Janus (Jak) fosforila a las proteínas STAT asociadas y éstas se dimerizan y desprenden. La proteína STAT, dimerizada se transloca al núcleo, sirviendo de factor de transcripción que activa la síntesis de proteínas antivíricas. La activación de sistema Jak-STAT aumenta la resistencia antivírica de la célula, uno de los mediadores de esta resistencia es la proteína *vir-1* (Kingsolver y Hardy, 2012). En *Aedes aegypti*, Souza Neto *et al.* (2009) han observado un mecanismo de la resistencia contra el virus del dengue, en este caso habiendo identificado la síntesis de *factores de restricción del dengue virus* producido por la activación de Jak-STAT. Las investigaciones en curso están arrojando luz sobre la distribución entre taxones que tiene el mecanismo combinado antivírico RNAi- Jak-STAT.

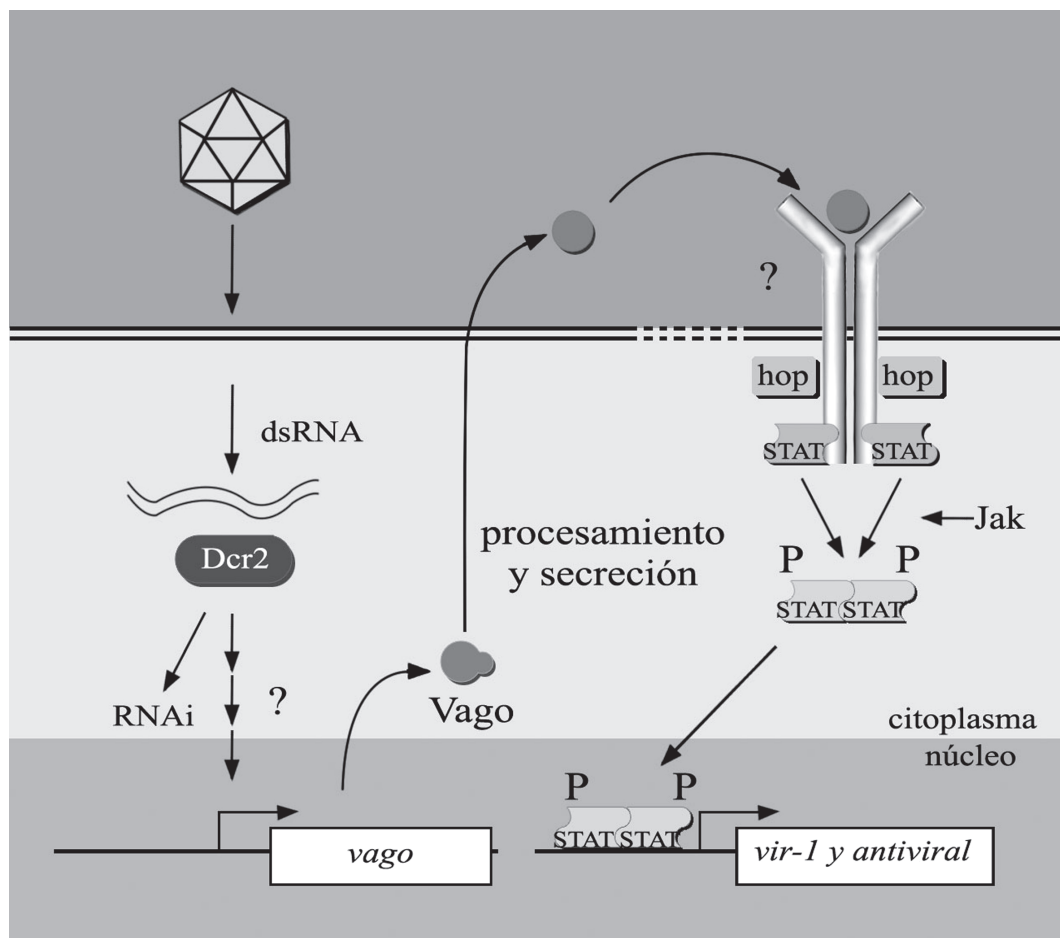
#### OTRAS FORMAS DE DEFENSA ANTIMICROBIANAS

Un ejemplo que involucra al comportamiento del insecto es el incremento en la temperatura corporal de *Locusta migratoria* Volkonsky (1939) que resulta por exposición al sol para evitar el desarrollo del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Hay datos en el sentido que el aumento

de temperatura del organismo se debe a la acción de derivados eicosanoides que se liberan a partir de la inducción de la respuesta inmune (Stanley *et al.*, 2009).

La defensa en los insectos sociales es especial porque también involucra al comportamiento, en este caso la conducta colectiva, sobre todo en los nidos. Los representantes más estudiados son las hormigas, abejas y termitas puesto que, además de ser los más abundantes, tienen importancia económica. Estas especies ponen de manifiesto estrategias a nivel grupal que pueden denominarse «inmunidad social». En un nivel claramente sanitario se observa que estas especies

ponen un especial énfasis en la prevención de las enfermedades, tal como lo muestran los comportamientos relacionados con la higiene y con la exclusión de causas y situaciones que sean proclives a generar epizootias. Por ejemplo, en estas especies se lleva a cabo la remoción de los miembros de la colonia que presenten signos de enfermedad. Por otra parte, se sabe que las abejas obreras se aglomeran incrementando la temperatura en torno a las larvas enfermas. Este comportamiento ha sido interpretado como un mecanismo para eliminar patógenos. Asimismo el comportamiento de interacción de individuos sanos con individuos afectados ha reci-



**Figura 4.** Activación de STAT dependiente de la transcripción de la proteína vago. La unión de Dicer-2 (Dcr2) a dsRNA viral activa la expresión de vago. La unión de la proteína vago a un receptor celular resulta en la activación del complejo Jak/STAT y en la expresión de genes antivirales como Vir-1 (figura modificada de Kingsolver y Hardy, 2012).

bido varias opiniones. Es probable que la presencia de sustancias antimicrobianas en la superficie de la cutícula de estos insectos explique este comportamiento.

#### LA RELACIÓN HOSPEDERO-PARASITOIDE Y LOS MICROHIMENÓPTEROS PARASITOIDES

Una mención especial merece la relación hospedero-parasitoide, en la cual, a través de la evolución han ocurrido cambios en los mecanismos de ataque de los parasitoides que han sido parcialmente neutralizados por cambios o reprogramaciones de las estrategias de defensa en los hospedadores. La primera fase de esta relación se presenta en el hecho de que algunos insectos, para el caso microhimenópteros parasitoides, logran evadir el sistema inmune de sus hospederos por la introducción de factores específicos en el momento de la oviposición. Un ejemplo claro es el de los parasitoides que anulan la actividad de melanización que posee el hospedador, sin anular en forma permanente su defensa contra los microorganismos.

Son particularmente interesantes las estrategias desarrolladas por los insectos que parasitoidizan las larvas y los huevos de otros insectos por el hecho que afectan directamente el funcionamiento de los mecanismos de defensa de ambas especies. Existen varias revisiones especializadas en el tema, entre las que cabe mencionar a Beckage y Gelman (2004) y Pennacchio y Strand (2006).

Las especies parasitoides han llegado a desarrollar mecanismos sumamente complejos que tienen una enorme eficiencia para asegurar el desarrollo de los huevos que depositan en el interior de la larva del hospedador. Existe una enorme cantidad de especies parasitoides que abarcan siete órdenes de insectos. El grupo más grande (80 %) corresponde a los himenópteros y dentro de ellos la superfamilia Ichneumonoidea, (con la familias Braconidae e Ichneumonidae), que posee más de 100.000 especies entre ectoparasitoides y endoparasitoides. Entre los endoparasitoides han surgido especies que, a la vez que inyectan los huevos en la

larva hospedadora, también inyectan: a) péptidos y proteínas con funciones específicas en el líquido (el denominado «veneno») contenido en el cáliz de oviposición; b) viriones correspondientes a una especie de virus constituido por varios segmentos de doble cadenas de DNA. Este virus es conocido con el nombre de polidnavirus (PDV), contiene los genes necesarios para facilitar el proceso de desarrollo del huevo del parasitoide y constituye una estrategia prácticamente única en la biología del parasitismo: el virus está integrado al genoma del himenóptero y se activa, formando viriones, en el momento de la reproducción; c) además, a partir de la cubierta celular de los huevos del himenóptero se desarrollan células gigantes conocidas con el nombre de teratocitos que, ejecutando funciones ya sea propias o complementarias, contribuyen a la protección del desarrollo de la larva del parasitoide. Los hospedadores más comunes de estos endoparasitoides son lepidópteros, le siguen en importancia los dípteros y coleópteros, aunque también se incluyen heterópteros y homópteros.

La hembra parasitoide puede llevar a cabo la oviposición en los huevos, las larvas, pupas, o ninfas de la especie hospedadora. En algunos casos, la relación hospedero/parasitoide es fisiológicamente muy específica y los huevos se colocan en solamente uno de los estados mencionados. En otros, es algo menos específica y puede oviponer en las formas correspondientes a dos estados distintos, por ejemplo en huevos y larvas, etc.

La secuencia de las maniobras del parásito se inicia con la inyección de polidnavirus, conjuntamente con los huevos por parte de las hembras, en el hemocoele del hospedador. Con ello logran, por ejemplo, evitar la encapsulación de los huevos depositados en el interior del insecto huésped, asegurar el desarrollo de sus larvas y la posterior emergencia de las formas adultas de los mismos (Strand y Pech, 1995).

En líneas generales, la estrategia del mecanismo de parasitoidización consiste en paralizar a la larva hospedera e inactivar aquellos mecanismos de defensa que afecten

el desarrollo de las larvas endoparasitoides. Entre otros efectos ello conlleva, generalmente, el estancamiento del crecimiento de la larva hospedadora en los últimos estadios y la anulación de la metamorfosis. No obstante en algunos sistemas parásito/hospedador puede llevarse a cabo una metamorfosis anticipada e imperfecta. La avispa adulta emerge generalmente al final de la vida larval del hospedador.

El PDV se reproduce en las células del hospedador, en gran parte en los hemocitos circulantes, pero también en otros tejidos, por ejemplo en las glándulas protorácicas; esta actividad vírica ocurre entre algunas horas y varios días, dependiendo de la especie. En la glándula protorácica el PDV induce cambios citopáticos que destruyen las células secretoras. Las proteínas del veneno llevan a cabo varios efectos. Inyectadas conjuntamente con el PDV pueden actuar alterando la actividad de la esterasa que inactiva a la hormona juvenil (JH), entre otras acciones relevantes. En varias especies los efectos mencionados actúan sobre las gónadas del hospedador produciendo la castración de la larva. El PDV produce una paralización de la respuesta inmune al atacar los hemocitos impidiendo con ello la encapsulación del parasitoide. Por otra parte, se ha observado que el virus aumenta la concentración de la trealosa en la hemolinfa, con lo cual se facilita el desarrollo del parasitoide. De la misma forma, se ha visto que en algunas especies se producen alteraciones cromosómicas en la mitosis o meiosis que llevan a la castración. Asimismo, en varias especies se observó que la acción conjunta del veneno, el PDV y los teratocitos retardan la pupación o la inhiben.

El veneno de la avispa induce la captación del virus por las células del hospedador, aumentando sus efectos. Se ha observado que el veneno también produce una parálisis transitoria de la larva, como así también una inhibición de la muda de ésta.

Los teratocitos se forman a partir de células de la serosa que recubren el embrión parasitoide. Estos teratocitos no se dividen, pero aumentan su volumen y con frecuencia

se hacen poliploides. Su tamaño llega a 200-400  $\mu\text{m}$ , y adquieren vellosidades que les sirven para una mejor absorción de metabolitos y catabolitos. Su número disminuye al final del lapso en que los parasitoides alcanzan su completo desarrollo. Los teratocitos segregan una proteína similar a la vitelogenina y otras similares a proteínas de reserva de la especie (Kadono Okuda *et al.*, 1998, citados por Beckage y Gelman, 2004). La inyección de teratocitos en larvas indemnes causan distintos efectos según la especie: retardan la pupación, disminuyen la concentración de esterasa de la JH (JHE), reducen los niveles de arilforinas, reducen el cuerpo graso. En *Manduca sexta* se observó que la larva de este hospedador aumenta de tamaño y se torna color rosa indicando altos niveles de JH. La disminución de la JHE aparentemente no se produce por una disminución de la transcripción intracelular sino por eventos postranscripcionales.

Las proteínas segregadas por los teratocitos (TSP) disminuyen la síntesis de proteínas en los cultivos celulares y también reducen la actividad de fenoloxidasas. Como efectos generales se ha observado que los propios parasitoides liberan ecdisteroides y JH a la hemolinfa, con la consecuencia de alterar el equilibrio endócrino del hospedador.

Estos efectos han sido mencionados por investigadores interesados en aprovecharlos en el control biológico de insectos dañinos para la agricultura que sean susceptibles a los endoparasitoides.

#### LA INMUNIDAD INNATA Y SUS ASPECTOS ADAPTATIVOS EN INSECTOS

A diferencia de la distinción existente en vertebrados entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa, en los insectos y en numerosos invertebrados existen varios procesos entre los mecanismos de defensa que conforman un cuadro distinto. Los investigadores actuales están develando la asombrosa variedad de mecanismos de defensa existentes en invertebrados, sobre todo en insectos. Estos mecanismos son altamente eficientes, tal como lo demuestra, entre otros hechos la

enorme cantidad de especies de insectos existentes y su sorprendente ubicuidad.

Hay varios ejemplos de características presentes en peces agnatos y en invertebrados que constituyen respuestas adaptativas en un sentido amplio. En las lampreas se ha descubierto que son capaces de llevar a cabo, en ciertas condiciones, un reordenamiento génico que genera una diversificación somática de receptores de la membrana de linfocitos (Pancer *et al.* 2004, citado por Flajnik y Du Pasquier, 2004). Este mecanismo corresponde a una forma de adquisición de variabilidad de detección de antígenos que se consideraba privativo de los gnatostomados y sus descendientes. En un caso similar, aunque no homólogo estructuralmente, estudios llevados a cabo en moluscos por Zhang *et al.* (2004) han demostrado que estos animales pueden efectuar una diversificación somática de proteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas, ampliando la capacidad de detección de moléculas extrañas.

Los insectos, grupo sobre el cual existe la mayor parte de la información, muestran varios mecanismos interesantes. Cabe mencionar el descubierto en *Drosophila* que consiste en responder en forma diferencial a ciertas bacterias y con la particularidad (inesperada) de que una segunda respuesta a la misma bacteria es de mayor intensidad (Agaisse, 2007; Pham *et al.*, 2007). Este hecho, pone en evidencia una doble característica que solamente se había atribuido a la respuesta adaptativa de los vertebrados: la capacidad de una cierta especificidad respecto al atacante, y la memoria de una respuesta inmune. Asimismo es muy interesante el mecanismo correspondiente al sistema antiviral del RNA interferente. En este mecanismo se utiliza un segmento de una hebra del RNA del virus para reconocer la otra hebra (complementaria) y destruirla. Con ello se elimina la posibilidad de reproducción de este virus particular. Es decir que el reconocimiento del microorganismo atacante es específico. Cuando este sistema actúa contra otra especie de virus lo hace de la misma forma, o sea en forma específica. Es claro

que el mecanismo constituye un caso conspicuo de especificidad. En este mecanismo la especificidad se basa en el hecho que la estructura de reconocimiento corresponde a una molécula (para el caso RNA virósico) que no se encuentra codificada en el genoma del hospedador. Cabe señalar que, estrictamente, el sistema es más específico que el sistema generador de diversidad de las moléculas de inmunoglobulinas (Igs) de los vertebrados, dado que este último exige una selección entre las numerosas variantes de Igs que se forman en repuesta a un antígeno, de manera que las Igs que se imponen durante esta maduración (a medida que avanza el proceso de defensa inmune), son las más eficientes, es decir las que tienden a ser más «específicas».

Estos ejemplos aislados, que seguramente se incrementarán en consonancia con las nuevas investigaciones, demostrarían que los insectos cuentan con mecanismos los cuales, por su forma de generación y por los resultados que obtienen (destrucción específica del organismo infectante), tienen características adaptativas.

#### CONSIDERACIONES FINALES

En el intento por plantear una visión integradora de los mecanismos de defensa en insectos se ponen de manifiesto algunas conclusiones. En primer lugar que la relación entre la inmunidad innata constitutiva, la respuesta inmune innata inducida por la noxa y la inmunidad adaptativa (que incluiría a inmunidad de especificidad variable) de los insectos son claramente interdependientes. Los mecanismos de defensa existentes en insectos, que las investigaciones van sacando a la luz, muestran que existe una gran variedad en la expresión. Algunos de ellos contienen aspectos funcionales idénticos o similares en varios taxones y otros parecen estar restringidos a grupos o especies. En consonancia con el último punto debe inevitablemente mencionarse el caso de la gran cantidad de genes que han cambiado su función a través de la evolución, o que las han ampliado a campos fisiológicos muy

diferentes. A este punto hay que agregar el correspondiente a la transferencia horizontal de genes entre especies, aspecto que se está empezando a dilucidar velozmente merced al conocimiento de los genomas completos de distintas especies.

En los últimos años la gran cantidad de información sobre inmunidad en insectos permite tener una visión bastante más elástica al respecto y deja abierto, al mismo tiempo un amplio campo de estudio para ahondar en esta temática.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Navarro, Dra. Teresa Vera y Dra. Marta Bühler por la lectura crítica del borrador. Al Lic. Pablo Pereyra de la sección Iconografía de la Fundación Miguel Lillo por la realización de las figuras.

#### LITERATURA CITADA

- Agaisse, H. 2007. An adaptive immune response in *Drosophila*? Cell Host & Microbe, 1: 91-93.
- Altincicek, B., Stotzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K. T. y Vilcinskas, A. 2008. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. Journal of Immunology, 181: 2705-2712.
- An, S., Dong, S., Wang, Q., Li, S., Gilbert, L. I., Stanley, D. y Song, Q. 2012. Insect neuropeptide bursicon homodimers induce innate immune and stress genes during molting by activating the NF-kappaB transcription factor Relish. PLoS One, 7: e34510.
- Banerjee, A., Datta, P. K., Basu, P. S. y Datta, T. K. 1991. Characterization of a naturally occurring protease inhibitor in the hemolymph of the scorpion, *Heterometrus bengalensis*. Developmental & Comparative Immunology, 15: 213-218.
- Baracchi, D., Francese, S. y Turillazzi, S. 2011. Beyond the antipredatory defence: honey bee venom function as a component of social immunity. Toxicon, 58: 550-557.
- Baracchi, D., Mazza, G. y Turillazzi, S. 2012. From individual to collective immunity: the role of the venom as antimicrobial agent in the Stenogastrinae wasp societies. Journal of Insect Physiology, 58: 188-193.
- Baxter, R. H., Steinert, S., Chelliah, Y., Voloshinsky, G., Levashina, L.A., Deisenhofer, J. 2010. A heteromeric complex of the LRR proteins LRIM1 and APL1C regulates complement-like immunity in *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 16817-16822.
- Beckage, N. E. y Gelman, D. B. 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implication for new biologically based strategies for insect control. Annual Reviews of Entomology, 49: 299-330.
- Berger, J. y Jurčová, M. 2012. Phagocytosis of insect haemocytes as a new alternative model. Journal of Applied Biomedicine, 10: 35-40.
- Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U. y Dushay, M. S. 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. Developmental & Comparative Immunology, 29: 669-679.
- Bidla, G., Hauling, T., Dushay, M. S. y Theopold, U. 2009. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. Journal of Innate Immunity, 1: 301-308.
- Brehelin, M., Boigegrain, R. A., Drif, L. y Coletti Previero, M. A. 1991. Purification of a protease inhibitor which controls prophenoloxidase activation in hemolymph of *Locusta migratoria* (insecta). Biochemical Biophysical Research Communications, 179: 841-846.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B. L., Nonaka, M. y Söderhäll, K. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends in Biochemical Sciences, 35: 575-583.
- Chang, H. J., Dhanasingh, I., Gou, X., Rice, A. M. y Dushay, M. S. 2012. Loss of hemolymph lectin reduces the survival of *Drosophila* larvae after wounding. Developmental & Comparative Immunology, 36: 274-278.
- Czapla, T. H., Hopkins, T. L. y Kramer, K. J. 1990. Catecholamines and related o-diphenols in cockroach hemolymph and cuticle during sclerotization and melanization: comparative studies on the order Dictyoptera. Journal of Comparative Physiology B, 160: 175-181.
- Davis, M. M. y Engstrom, Y. 2012. Immune response in the barrier epithelia: lessons from the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Journal of Innate Immunity, 4: 273-283.
- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M., y Lemaitre, B. 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98: 12590-12595.

- Dushay, M. S. 2009. Insect hemolymph clotting. *Cellular and Molecular Life Science*, 66: 2643-2650.
- Eleftherianos, I. y Revenis, C. 2011. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of Innate Immunity*, 3: 28-33.
- Eleftherianos, I., Gokcen, F., Felfoldi, G., Millichap, P. J., Trenczek, T. E, Ffrench-Constant R. H. 2007. The immunoglobulin family protein hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cellular Microbiology*, 9: 1137-1147.
- Falabella, P., Riviello, L., Pascale, M., Lelio, I. D., Tettamanti, G. y Grimaldi, A. 2012. Functional amyloids in insect immune response. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 203-211.
- Fauvarque, M. O. y Williams, M. J. 2011. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *Journal of Cell Science*, 124: 1373-1382.
- Feldhaar, H. y Gross, R. 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, 10: 1082-1088.
- Flajnik, M. F. y Du Paquier, L. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology*, 25: 640-644.
- Galko, M.J. y Krasnow, M.A. 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biology*, 2 (8) e239.
- Gandhe, A. S., John, S. H. y Nagaraju, J. 2007. Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. *The Journal of Immunology*, 179: 6943-6951.
- Gillespie, J. P. y Kanost, M. R. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 611-643.
- Gorman, M. J. y Paskewitz, S. M. 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 257-262.
- Haine, E. R., Rolff, J. y Siva Jothy, M. Y. 2007. Functional consequences of blood clotting in insects. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 456-464.
- Hamilton, C., Lay, F. y Bulmer, M. S. 2011. Subterranean termite prophylactic secretions and external antifungal defenses. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1259-1266.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C. y Toprak, U. 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Reviews of Entomology*, 54: 285-302.
- Hoffmann, J. A. 1995. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, 7: 4-10.
- Hoffmann, J. A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284: 1313-1318.
- Howard, R. W., Miller, J. S. y Stanley D. W. 1998. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *Journal of Insect Physiology*, 44 (2): 157-164.
- Ibrahim, A. M. y Kim, Y. 2008. Transient expression of protein tyrosine phosphatases encoded in *Cotesia plutella* bracovirus inhibits insect cellular immune response. *Naturwissenschaften*, 95: 25-32.
- Jiang, R., Kim, E. H., Gong, J. H., Kwon, H. M., Kim, C. H., Ryu, K. H., Park, J. W., Kurokawa, K., Zhang, J., Gubb, D. y Lee, B. L. 2009. Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 35652-35658.
- Kanost, M. R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 23: 291-301.
- Karlsson, C., Korayem, A. M., Scherfer, C., Loseva, O., Dushay, M. S. y Theopold, U. 2004. Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (50): 52033-52041.
- Kim, M. H., Joo, C. H., Cho, M. Y., Kwon, T. H., Lee, K. M. y Natori, S. 2000. Bacterial-injection-induced syntheses of N-beta-alanyldopamine and Dopa decarboxylase in the hemolymph of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 267: 2599-2608.
- Kingsolver, M. B. y Hardy, R. W. 2012. Making connections in insect innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (46): 18639-18640.
- Korayem, A. M., Fabbri, M., Takahashi, K., Scherfer, C., Lindgren, M., Schmidt, O., Ueda, R., Dushay, M. S. y Theopold, U. 2004. A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 1297-1304.
- Korayem, A. M., Hauling, T., Lesch, C., Fabbri, M., Lindgren, M., Loseva, O., Schmidt, O., Dushay, M. S. y Theopold, U. 2007. Evidence for an immune function of lepidopteran silk proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352: 317-322.

- Lavine, M. D. y Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.
- Lemaitre, B. y Hoffmann, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697-743.
- Lesch, C., Goto, A., Lindgren, M., Bidla, G., Dushay, M. S. y Theopold, U. 2007. A role for Hemolectin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31: 1255-1263.
- Li, J., Tracy, J. W. y Christensen, B. M. 1992. Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae. *Developmental & Comparative Immunology*, 16: 41-48.
- Li, D., Scherfer, C., Korayem, A. M., Zhao, Z., Schmidt, O. y Theopold, U. 2002. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 919-928.
- Lindgren, M., Riaz, R., Lesch, C., Wilhelmsson, C., Theopold, U. y Dushay, M. S. 2008. Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *Journal of Insect Physiology*, 54: 586-592.
- Liu, F., Ling, E. y Wu, S. 2009. Gene expression profiling during early response to injury and microbial challenges in the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 72: 16-33.
- Medina Pereyra, P., Murúa, M. G., Navarro, F. y Fernández, F. M. 2011a. Changes in the absorption spectrum of hemolymph from *Spodoptera frugiperda* produced by phenoloxidase activity. *Biocell*, 35 (2): A138.
- Medina Pereyra, P., Hernández de Sanchez, M. y Fernández, F. M. 2011b. Cambios en los patrones electroforéticos de proteínas de la hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda* debidos a la coagulación. Serie Monográfica y Didáctica F.C.N. e IML, Universidad Nacional de Tucumán, 52: 100.
- Medina Pereyra, P., Castro, F. y Fernández, F. M. 2012. Actividad de lisozima en hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 56: 31-37.
- Merchant, D., Ertl, R. L., Rennard, S. I., Stanley, D. W. y Miller, J. S. 2008. Eicosanoids mediate insect hemocyte migration. *Journal of Insect Physiology*, 54: 215,221.
- Montaño Pérez, K. y Vargas Albores, F. 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Inter ciencia*, 27 (1): 21-27.
- Nappi, A. J. y Seymour, J. 1991. Hemolymph phenol oxidases in *Drosophila melanogaster*, *Locusta migratoria*, and *Austrototomobius pallipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180: 748-754.
- Nappi, A. J. y Christensen, B. M. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 443-459.
- Obbard, D. J., Gordon, K. H., Buck, A. H., Jiggins, F. M. 2009. The evolution of RNAi as a defense against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 99-115.
- Paradkar, P. N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J. B. y Walker, P. J. 2012. Secreted Cago restrict West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 109: 18915-18920.
- Park, J. W. y Lee, B. L. 2012. Insect immunology. En: L. I. Gilbert (ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier & Academic Press, Amsterdam and New York, pp. 480-512.
- Pechan, T., Cohen, A., Williams, W. P. y Luthe, D. S. 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 13319-13323.
- Pennacchio, F. y Strand, M. R. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Reviews of Entomology*, 51: 233-258.
- Pérez, M. M., Schachter, J., Berni, J. y Quesada Allue, L. A. 2010. The enzyme NBAD-synthase plays diverse roles during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 56: 8-13.
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. y Schneider, D. S. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLOS Pathogens*, 3 (e26): 0001-0008.
- Povolones, M., Waterhouse, R. M., Kafatos, F. C. y Christophides, G. K. 2009. Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defence against *Plasmodium* parasite. *Science*, 324: 258-261.
- Rosales, C. 2011. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 8: 109-131.

- Schachter, J., Pérez, M. M. y Quesada-Allue, L. A. 2007. The role of N- $\alpha$ -alanyl-dopamina synthase in the immune response of two insects. *Journal of Insect Physiology*, 53: 1188-1197.
- Schmidt, O., Soderhall, K., Theopold, U. y Faye, I. 2010. Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annual Review of Entomology*, 55: 485-504.
- Souza Neto, J. A., Sim, S. y Dimopoulos, G. 2009. An evolutionary conserved function of the Jak/STAT pathway in anti-dengue defence. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 106: 17841-17846.
- Stanley, D., Miller, J. y Tunaz, H. 2009. Eicosanoid actions in insect immunity. *Journal of Innate Immunity*, 1: 282-290.
- Strand, M. R. y Pech, L. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, 40: 31-56.
- Tellez Jurado, A., Cruz-Ramirez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A. y Arana Cuenca, A. 2009. Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30: 73-80.
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C. y Schmidt, O. 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 363-372.
- Tunaz, H., Bengin, C. y Er, M. K. 2008. Nodulation reaction to fungal infections in larvae of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) mediated by eicosanoids. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32: 11-18.
- Tzou, P., De Gregorio, E., y Lemaitre, B. 2002. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 102-110.
- Vargas Albores, F. y Ortega Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y Posgrado*, 4 (1): 21-28.
- Vilmos, P. y Kurucz, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62: 59-66.
- Vodovar, N. y Saleh, M. C. 2012. Of insects and viruses: The role of small RNAs in insect defense. *Advances in Insect Physiology*, 42: 1-36.
- Wang, Y. y Jiang, H. 2004. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 387-395.
- Wang, Z., Wilhelmsson, C., Hyrs, P., Loof, T. G., Dobes, P., Klupp, M., Loseva, O., Morgelin, M., Ikle, J., Cripps, R. M., Herwald, H., y Theopold, U. 2010. Pathogen entrapment by transglutaminase-a conserved early innate immune mechanism. *PLoS Pathogens*, 6: e1000763.
- Whitten, M. M., Tew, I. F., Lee, B. L. y Ratcliffe, N. A. 2004. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in beta-1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *Journal of Immunology*, 172: 2177-2185.
- Xu, J., y James, R. 2009. Genes related to immunity, as expressed in the alfalfa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*, during pathogen challenge. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 18: 785-794.
- Zhang, S. M., Adema, C. M., Kepler, T. B. y Loker, E. S. 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*, 304: 251-254.
- Zou, Z., Shin, S. W., Alvarez, K. S., Kokoza, V. y Raikhel, A. S. 2010. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 32: 41-53.