



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIMORFISMO SEXUAL EN LA RESPUESTA
INMUNE DE VARIOS GRUPOS DE INSECTOS
CON DIFERENTE INTENSIDAD DE SELECCIÓN
SEXUAL: UNA PUESTA A PRUEBA DE LA
HIPÓTESIS DE ROLFF**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

KARLA CAROLINA NÁJERA CORDERO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Nájera
Cordero
Karla Carolina
56 41 93 73
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
401052310

2. Datos del tutor

Dr
Alejandro
Córdoba
Aguilar

3. Datos del sinodal 1

Dra
Roxana
Torres
Áviles

4. Datos del sinodal 2

Dr
Cuauhtémoc Juan Humberto
Lanz
Mendoza

5. Datos del sinodal 3

Dr
Amando
Bautista
Ortega

6. Datos del sinodal 4

Dra
Blanca Estela
Hernández
Baños

7. Datos del trabajo escrito

Dimorfismo sexual en la respuesta inmune de varios grupos de insectos con diferente intensidad de selección sexual: una puesta a prueba de la hipótesis de Rolff
65 p
2006

Agradecimientos

✧ A mi mamá y a mi papá por el apoyo incondicional y el impulso cotidiano: *Los quiero*.

✧ A mis hermanos *Carlos, Juan, Sonia, Margo y Fabricio* por su presencia: *Los quiero*.

✧ A *Katya, Siena y Emilio* por las sonrisas en los momentos complicados

✧ A *Esteban* por todo: las manos, el corazón y la fuerza.

✧ Quiero dar las gracias especiales a:

A mi director de tesis *Dr. Alejandro Córdoba* por el tiempo y el apoyo para realizar esta tesis.

A *Biol. María Luisa Castillo* por su disposición y ayuda con lo bonitos escarabajos.

Al *Dr. Martín Aluja*, al *Dr. Juan Rull* y a su laboratorio por el apoyo con las dos especies de moscas con las que trabajé, y con las dudas que fueron surgiendo a lo largo de la escritura.

A los compañeros de laboratorio que ayudaron en mucho en este trabajo: *Miguel, Jorge, Jorge Canales, Vivian, Ana y Nubia*.

A *Lizeth, Víctor y Lucho* por la eterna ayuda con las mariposas.

Al *Dr. Humberto Lanz* por el apoyo con el equipo en el INSP en Cuernavaca.

Al personal del *Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas* por permitir el uso de las instalaciones.

Gracias por el apoyo brindado del proyecto IN230603-2 de PAPIIT.

A TODOS, TODITOS mis amigos. En especial: *Wolke, Geli, Checo, Héctor, Miguel, Abraham...* perdón por las omisiones... no hay mucho espacio.

Mi más profundo agradecimiento a *Paty*: doctora y amiga.

✧ No puedo dejar de agradecer a todos lo bichitos que existieron y permitieron la realización de este trabajo... GRACIAS a los escarabajos rechonchetes, a las mariposas con vuelo pausado y a las diminutas moscas.

“Quienes se pierden a sí mismos en las cosas
y pierden su naturaleza en seguir al mundo,
son gentes vueltas al revés.”

Chang Tzu

“Como la luciérnaga es para la gente... sin que nadie sepa
cómo se es, si se está apareciendo o desapareciendo
sin que nadie adivine, ¿pero, piensas que mientras
tanto uno vive?, vive, tiene historia y todo,
como la luciérnaga.”

Clarice Lispector

Índice

Resumen

1. Introducción.....	1
1.1. Selección sexual.....	1
1.2. Sistemas de apareamiento.....	3
1.3. El dimorfismo sexual en sistema inmune y la hipótesis de Rolff.....	6
1.4. La teoría de la distribución diferencial de recursos y la inmunidad.....	9
1.5. Sistemas de apareamiento e inmunidad.....	11
1.6. Sistema inmune de insectos.....	11
1.6.1. Vías de respuesta del sistema inmune.....	13
Cascada de fenoloxidasa.....	13
Vías Imd y Toll.....	16
Mecanismos citotóxicos.....	17
2. Antecedentes.....	19
3. Objetivos.....	22
4. Hipótesis.....	22
5. Sujetos de estudio.....	23
6. Materiales y Métodos.....	28
7. Resultados.....	34
8. Discusión.....	37
9. Conclusiones.....	48
Literatura citada.....	49

Resumen

En varios estudios se ha visto que las hembras tienen respuestas inmunes más robustas que los machos. Para explicar este patrón Rolff (2002), planteó una hipótesis basada en el principio de Bateman que indica que en machos la presión por obtener más apareamientos hará que inviertan más en caracteres sujetos a selección sexual, lo cual no ocurre en las hembras. Éstas, por otra parte, invertirán más en rasgos que les permitan vivir más tiempo y producir más huevos. Esta diferencia hará que las hembras inviertan más en defensa (para aumentar su longevidad y así su tiempo de producción de huevos) que los machos (quienes invertirán sus recursos en la producción de caracteres sexuales). Esta diferencia en inversión va a ser más evidente si la selección sexual es muy intensa.

En esta tesis se estudió la intensidad de la respuesta inmune en seis especies de tres órdenes de insectos (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera; dos especies por orden) que difieren en intensidad de selección sexual (tres especies monándricas y tres poliándricas, una de cada tipo de intensidad de selección sexual por orden) para poner a prueba si las hembras son más inmunocompetentes que los machos y si esto es particularmente claro en las especies con alta intensidad de selección sexual. Se consideraron tres parámetros inmunológicos que reflejan tanto la capacidad humoral como celular: encapsulación, enzimas hidrolíticas y actividad de fenoloxidasa. Los resultados indican que en sólo tres de las 18 comparaciones, las hembras presentan mayor capacidad de respuesta inmune; en tres casos, los machos presentaron valores mayores que las hembras; en el resto no hubo diferencias. En cuanto a la intensidad de selección sexual, las especies con mayor intensidad de selección sexual no fueron más dimórficas en respuesta inmune que las de menor intensidad de selección sexual. Estos resultados no apoyan la hipótesis de Rolff, los valores de los parámetros inmunológicos no muestran una tendencia clara y consistente, y no obedecen las reglas puestas por el principio de Bateman. Lo que nos permite asumir que la respuesta inmune es mucho más plástica de lo que se ha considerado en otros estudios.

I. Introducción

1.1. Selección sexual

En *El origen de las especies*, Darwin (1872) propuso la teoría de la selección sexual para explicar la evolución y mantenimiento de aquellas características muy conspicuas presentes en diferentes especies (sobre todo en los machos), no asociadas con la formación de gametos, pero sí con la reproducción. Ejemplos de estas características son algunos caracteres como las astas en los alces, los plumajes conspicuos y cantos de algunas aves y los despliegues de ciertas conductas en varios animales. A estos caracteres, Darwin les denominó caracteres sexuales secundarios, porque a diferencia de los caracteres sexuales primarios que están relacionados directamente con el acto de la reproducción, los secundarios están relacionados sólo indirectamente (Darwin 1872). La base de Darwin es que los caracteres sexuales secundarios han evolucionado como consecuencia de la competencia por dejar más descendencia y no sólo para aumentar su longevidad, como sería el caso de aquellos caracteres que han evolucionado por selección natural.

Darwin (1872) sugirió dos procesos dentro de la selección sexual de cómo los caracteres sexuales secundarios resultan favorecidos. El primer proceso es la selección intrasexual, en la cual los individuos del mismo sexo, usualmente los machos, compiten entre sí para tener acceso a individuos del sexo opuesto (Darwin 1872). Dos ejemplos claros de selección intrasexual es la competencia entre los machos del ciervo *Cervus elaphus* para aparearse con las hembras (Carranza *et al.* 1990) y el de los elefantes marinos por el control de un harén de hembras (Le Boeuf y Laws 1994). Este mismo patrón de competencia se presenta en la mosca *Plecia nearctica* donde el macho, una vez

que ha tomado a una hembra recién emergida, tiene que luchar con otros machos por mantenerla. Se han observado hasta diez machos agruparse alrededor de una hembra intentando desplazar al macho (Thornhill 1980). El segundo proceso es la selección intersexual, en donde los individuos de un sexo muestran preferencias por ciertas características del sexo opuesto, eligiendo así a sus parejas (Darwin 1872). A este proceso se le ha llamado elección femenina ya que por lo general las hembras son el sexo que elige con que macho aparearse. Un ejemplo de este tipo de proceso se da en el pez espinoso, *Gasterosteus aculeatus*, en el cual las hembras dejan los huevos en los nidos del macho que tenga la garganta de color rojo más brillante (Semler 1971). Otro ejemplo es el ave *Euplectes progne*, donde los machos presentan colas largas las cuales son utilizadas durante el cortejo (Andersson 1982). En un experimento ya clásico, Andersson (1982) manipuló el largo de la cola y demostró que las hembras tienen preferencias por machos con colas más larga. En insectos, un ejemplo de elección femenina se da en la mosca *Cyrtodiopsis dalmanni*, donde las hembras prefieren copular con machos que tengan el espacio más largo entre los ojos (David *et al.* 2000).

El por qué los machos compiten y las hembras eligen, tiene su origen en la inversión diferencial en la reproducción de cada sexo. En este contexto, un estudio clásico realizado por Bateman (1948) con *Drosophila melanogaster* sentó las bases. Bateman, mostró que la varianza en el éxito de apareamiento era mayor en los machos que en las hembras. Los resultados fueron explicados en términos de inversión energética diferencial en la producción de gametos por parte de cada sexo (Bateman 1948). Los machos pueden producir muchos más gametos a menor costo que las hembras, y de esta forma, los machos pueden tener más apareamientos en menos tiempo y por lo tanto tener

más descendencia. De esta forma, mientras más veces se aparee un macho, mayor será su éxito reproductivo, lo cual no es el caso de las hembras (Bateman 1948). Así, la selección por mayor éxito reproductivo en los machos depende de cuántas parejas puede tener en toda la vida, mientras que para las hembras, un solo macho es suficiente para fertilizar todos los huevos de una hembra.

1.2. Sistemas de apareamiento

La continua competencia entre machos y la elección por parte de las hembras determinan las asociaciones sexuales entre machos y hembras, lo que genera diferentes sistemas de apareamiento (Thornhill y Alcock 1983). El sistema de apareamiento es la estrategia conductual de un individuo para obtener pareja (Emlen y Oring 1977; Reynolds 1996). El criterio para definir los diferentes sistemas de apareamiento está determinado a partir del número de parejas que un individuo tiene durante una época reproductiva (Emlen y Oring 1977; Thornhill y Alcock 1983; Andersson 1994), por la permanencia del vínculo de pareja (Scott y Clutton-Brock 1990), o por las proporciones de los sexos en las crías de la época (cantidad de crías hembras y machos que se tuvieron en una época reproductiva) (Andersson 1994).

Hay dos grandes tipos de sistemas de apareamiento: la monogamia, en la que machos y hembras se aparean sólo con un individuo durante la temporada de reproducción, y la poligamia en la que un individuo se aparea con varios del sexo opuesto (Emlen y Oring 1977; Thornhill y Alcock 1983; Andersson 1994). Si las hembras se aparean con más de un macho se le llama poliandria, si son los machos los que se aparean con más de una hembra se le conoce como poliginia (Emlen y Oring 1977; Carranza

1994). Si las hembras sólo se aparean con un macho se le llama monandria, mientras que si los machos únicamente se aparean con una hembra se le llama monoginia (Emlen y Oring 1977; Thornhill y Alcock 1983; Andersson 1994). Estos sistemas de apareamiento no son estrategias que permanezcan estáticas a lo largo de la vida, pueden variar drásticamente entre especies, dentro de la misma población, así como también en cada individuo, el cual puede presentar diferentes estrategias de apareamiento a lo largo de su vida; esto de acuerdo a las circunstancias ecológicas de la época reproductiva en curso. Las condiciones que pueden provocar que esta característica cambie son la disponibilidad de comida, de parejas (Andersson 1994), la dispersión de alguno de los sexos y patrones de deserción de los mismos (Davies 1991).

En las especies de animales que son polígamas la competencia por dejar mayor descendencia (la intensidad de la selección sexual) en general es mayor que en las especies monógamas (Emlen y Oring 1977). Esto es claro de entender ya que en las especies polígamas hay mayores oportunidades de cópula, lo que en ocasiones no ocurre con las monógamas. Con esto se esperan presiones de selección diferentes en intensidad, según el tipo de sistema, presentándose así un dimorfismo sexual más marcado en las especies polígamas con expresión mas exagerada de caracteres sexuales secundarios (Darwin 1872). En las especies monógamas, la intensidad de la selección sexual es menor (Trivers 1972), por lo tanto el dimorfismo sexual es menos intenso y la expresión de los caracteres sexuales secundarios es menos acentuada comparada con las especies polígamas (Clutton-Brock 1977).

Sin embargo, en algunas especies que se consideran monógamas es común que ocurran cópulas extra pareja por parte de las hembras, lo que podría resultar en beneficios

como mayor cantidad de recursos, el aseguramiento de la fertilización y quizás mejores genes (Hasselquist y Sherman 2001; Torres y Velando 2005). Los beneficios por cópulas extra pareja provocan que la intensidad de la selección sexual se modifique y tome cierta dirección.

Con respecto a la intensidad de selección sexual, es importante mencionar que ésta no es fuerte sólo en las especies poligínicas, la intensidad de selección puede ser igual de fuerte en especies que son monógamas, debido a que existe una variación en la calidad de las parejas, lo que provoca que haya una intensidad de selección sexual fuerte en ambos sexos. Que las hembras también desarrollen caracteres sexuales elaborados puede ser por elección de pareja por parte de los machos o por competencia entre las hembras (Darwin 1872; Andersson 1994). Es por esto que ambos sexos presentan caracteres sexuales secundarios conspicuos y son consideradas especies monomórficas (Andersson 1994). Ejemplos de estas “excepciones” son en su mayoría aves monógamas y muy pocos mamíferos. En los patos buceadores (*Podiceps cristatus*), ambos sexos tienen un penacho en la cabeza que utilizan para realizar despliegues antes del periodo de apareamiento (Andersson 1994; Wachtmeister 2001). Lo mismo ocurre en las aves alcas crestadas (*Aethia cristatella*), ambos sexos presentan ornamentos elaborados en la cabeza que utilizan para despliegues sexuales antes del apareamiento (Andersson 1994; Jones y Hunter 1999). Otro ejemplo en aves es el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) en donde hembras y machos tienen las patas de color azul y es un elemento importante en la elección de pareja (Torres y Velando 2003, Torres y Velando 2005).

En mamíferos hay pocos casos de especies monógamas (3 a 5% del total de las especies), algunas de éstas presentan un poco de dimorfismo sexual en el tamaño

corporal, pero son especies que no se consideran dimórficas (Kleiman 1977). Un ejemplo es el de los zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*), únicamente se aparean una vez al año y la pareja se mantiene, las hembras son un poco más pequeñas que los machos (Hall 1981; Jansa 1999). Otro mamífero con estas características es el roedor *Microtus ochrogaster* (Getz et al. 1981; Edwards y Self 2006).

Como se ve, existe una gran variedad de especies que tienen combinaciones de sistemas de apareamientos, dimorfismo sexual e intensidad de selección sexual. Lo que nos puede llevar a pensar que no hay una regla sobre estas características, hay una flexibilidad que se presenta en éstas y muchas otras características y que depende en cierto grado de las circunstancias ecológicas y de las historias de vida de cada individuo.

1.3. El dimorfismo sexual en sistema inmune y la hipótesis de Rolff

Una de las diferencias entre sexos que más ha llamado la atención recientemente es la capacidad inmune en relación con la resistencia a patógenos. Algunos ejemplos de lo anterior se han observado en varias especies de aves, donde los machos son más susceptibles al parasitismo que las hembras (Møller *et al.* 1998), en roedores del género *Microtus*, donde los machos poligínicos fueron más susceptibles a las infecciones que las hembras co-específicas (Klein 2000), y en grillos de la especie *Gryllus texensis* donde los machos son más vulnerables a la bacteria *Serratia marcescens* que las hembras (Adamo *et al.* 2001), entre otros casos.

La diferencia en respuesta inmune entre sexos en vertebrados se ha atribuido usualmente al efecto negativo de la testosterona en los machos (Folstad y Karter 1992). A este respecto la hipótesis de la inmunocompetencia indica que la presencia de

testosterona promueve el desarrollo a menudo exagerado de los caracteres sexuales secundarios, pero al mismo tiempo tiene un efecto inmunosupresor (Folstad y Karter 1992). La idea es que la testosterona afectaría a los machos pero no a las hembras, ya que ellas producen menor cantidad de esta hormona, lo que disminuiría la capacidad inmune de los machos y, por consiguiente, su capacidad para lidiar con patógenos.

Con respecto a esta hipótesis se ha generado una controversia que no permite llegar a una conclusión clara ya que las evidencias están divididas. Por un lado se ha documentado que la testosterona participa en el comportamiento sexual y llega a afectar la expresión de ornamentos sexuales (color, tamaño, brillo) haciendo estos más exagerados o llamativos (Hunt *et al.* 1997). Por ejemplo en varios experimentos con aves (*Calcarius lapponicus*, *Junco hyemalis*) en los que se les ha administrado más testosterona a los machos, éstos hacen más despliegues de cortejo, se vuelven más atractivos para las hembras o aumentan el tiempo de canto (Enstrom *et al.* 1997; Hunt *et al.* 1997). En un experimento similar con lagartijas los machos incrementan la territorialidad (Marler *et al.* 1995). Sin embargo, hay otros estudios que no exponen estos mismos efectos y más bien muestran un efecto negativo de la testosterona en los caracteres sexuales secundarios. En el pinzón *Carpodacus mexicanus*, altos niveles de testosterona provocaron que el plumaje se tornara sin brillo y con menos color (Store y Hill 2001), en el ave *Agelaius phoeniceus*, el estudio mostró poca correlación entre la testosterona y los caracteres sexuales secundarios (Weatherhead *et al.* 1993).

Por otro lado hay evidencia que asegura el efecto inmunosupresor de la testosterona (e.g. Grossman 1985; Braude *et al.* 1999; Duffy *et al.* 2000; Korter *et al.* 2003). Un ejemplo muy claro sobre esto, es el experimento realizado por Verhulst (1999)

con el ave *Gallus gallus domesticus*, en el cual se realizaron líneas de animales que variaban en inmunocompetencia. En este estudio los resultados mostraron que el grupo seleccionado con bajos niveles de anticuerpos desarrollaron más la cresta (carácter sexual secundario) y tuvieron altos niveles de testosterona, lo que no ocurrió con el grupo seleccionado con una respuesta inmune alta. No obstante también hay estudios en los que no se ha encontrado ninguna correlación importante entre los niveles de testosterona y la disminución de la inmunocompetencia que permita dar soporte a esta hipótesis (e.g. Roberts *et al.* 2004). Es notorio que las evidencias muestran una amplia gama de posibilidades con respecto a la relación de la testosterona y la inmunocompetencia (Roberts *et al.* 2004).

Curiosamente, el patrón de dimorfismo sexual en respuesta inmune también se ha observado en algunos invertebrados, los cuales no tienen testosterona (Rolff 2002; Zuk y Stoehr 2002; Schmid-Hempel 2005). Por ejemplo, en la libélula *Lestes forcipatus* se estudió la diferencia sexual en inmunocompetencia midiendo específicamente la encapsulación por melanina (proceso mediante el cual el sistema inmune aísla a los patógenos cubriéndolos con capas de melanina; Götz 1986; Gillespie y Kanost 1997). Los resultados de este estudio muestran que las hembras melanizaron más que los machos (Yourth *et al.* 2002). Otro ejemplo con el mismo género de libélulas es el estudio que realizó Rolff (2001) donde las hembras maduras tuvieron mayor actividad de fenoloxidasa (la enzima que participa en la melanización y se utiliza para inducir la capacidad inmune; (Söderhäll y Cerenius 1998) que los machos maduros.

Para explicar este patrón en los insectos, se necesitaba una teoría que no se basara en las ideas desarrolladas en vertebrados para explicar el dimorfismo sexual en la respuesta inmune. Roff (2002) explicó este patrón utilizando la lógica del principio de Bateman. Roff plantea que existe una diferencia en la intensidad de la respuesta inmune entre machos y hembras ya que la asignación de recursos a la inmunidad y a otros aspectos como longevidad y reproducción se presenta de manera diferencial entre los sexos. Las hembras tratarán de aumentar su longevidad para poder tener más tiempo para producir más huevos; para conseguir esto asignarán más recursos a la función inmune. Por el contrario, en los machos los recursos se asignarán en su mayoría a aquellos caracteres que les permitan conseguir más apareamientos. Esto tendrá como consecuencia que los machos inviertan menos en la respuesta inmune que las hembras (Roff 2002). Este principio está basado en las diferentes presiones de selección que cada sexo tendría: la selección natural actuando en las hembras por aumentar la longevidad y la sexual en los machos por aumentar el éxito reproductivo. La base de Bateman implícita en esto es que las presiones de selección son diferentes en cada sexo, esto generará repercusiones distintas en las historias de vida de cada uno.

1.4. La teoría de la distribución diferencial de recursos y la defensa inmune

Esta teoría indica que los individuos tienen la flexibilidad de asignar los recursos de manera diferencial dependiendo de necesidades, prioridades y en ocasiones de restricciones (Clutton-Brock 1983; Roff 1992; Stearns 1992). La teoría está basada en el hecho de que los recursos del ambiente son limitados y frecuentemente los individuos pueden enfrentarse a disyuntivas de asignación de éstos (Begon *et al.* 1990). Un ejemplo

de lo anterior se ha documentado en el pez de agua dulce *Xiphophorus helleri*. Se ha observado en varios experimentos que la elección de las hembras se basa en el tamaño de los machos y en el largo de la cola, siendo éste último el de mayor importancia para la elección de pareja en algunas especies de este género (Basolo 1990). Basolo (1998) además observó, que el grupo de machos jóvenes que eran colocados en un ambiente con pocos recursos invertían en una característica poco costosa pero suficientemente atractiva para las hembras, y de esta forma conseguirían apareamientos. Así, los machos que se desarrollaron en estos ambientes invirtieron más en el largo de la cola y menos en el crecimiento corporal (Basolo 1998). Esto no sucedió en los peces que tuvieron acceso a más recursos, lo que sugiere que el animal enfrenta disyuntivas y “toma” decisiones económicas basadas en un posible conflicto de asignación de recursos. Otro ejemplo es lo que ocurre en los grillos *Teleogryllus commodus*. En un experimento, los machos de estos insectos aumentan el tiempo de canto si la disponibilidad de comida es limitada, pero a su vez se disminuye su longevidad ya que los recursos están siendo utilizados para la producción de señales sexuales (Hunt *et al.* 2004). Estos ejemplos indican claramente que el organismo es sensible a los cambios en el ambiente y que la producción de caracteres sexuales secundarios no está libre de costos.

La respuesta inmune es una función que se considera costosa para los individuos ya que se requiere de abundantes recursos para tener un sistema inmune efectivo (e.g. Schmid-Hempel 2005), así como para su mantenimiento (e.g. Kraaijeveld y Godfray 1997) y su uso (e.g. Moret *et al.* 2000). Los recursos pueden ser los mismos que se requieren para otros componentes de la adecuación como el crecimiento y la

reproducción (revisado por Rolff y Siva-Jothy 2002; Schmid-Hempel 2005). De esta manera se puede esperar que los individuos se vean obligados a asignar los recursos de manera diferencial entre la respuesta inmune y otras funciones (Zuk y Stoehr 2002). A este respecto, se han encontrado evidencias de posibles conflictos entre la respuesta inmune y otras funciones en varias especies de invertebrados. En el caracol *Lymnaea stagnalis* la inversión en la defensa inmune provocó una disminución en el número de huevos puestos y, por lo tanto, en el éxito reproductivo (Rigby *et al.* 2000). Otro ejemplo es lo observado en la abeja *Bombus terrestris* en donde la activación de la respuesta inmune humoral afectó negativamente la supervivencia (Moret *et al.* 2000). En otro estudio en esta misma especie, Köing y Schmid-Hempel (1995) encontraron que la actividad de forrajeo redujo la capacidad inmune de los individuos. Kraaijeveld y Godfray también demostraron el costo del desarrollo de la respuesta inmune, al crear líneas de *D. melanogaster* con alta capacidad inmune. En este estudio las moscas más resistentes inmunológicamente a parasitoides tuvieron una capacidad competitiva más baja para alimentarse (Kraaijeveld y Goodfray 1997).

1.5. Sistemas de apareamiento e inmunidad

Como ya se mencionó anteriormente las presiones de selección difieren de acuerdo al sistema de apareamiento. Éstas pueden llegar a ser más intensas en especies polígamas que en especies monógamas (Emlen y Oring 1977). Dependiendo del sistema de apareamiento y según la hipótesis de Rolff (2002), si se consideran los costos de producción de los caracteres sexuales secundarios y de la respuesta inmune, se esperarían diferencias en la inversión de los recursos a estos dos elementos. En especies polígamas,

la inversión en la reproducción por parte de los machos es más pronunciada, lo cual provocaría una disminución en los recursos dirigidos a la defensa inmune. En cambio, en las especies monógamas, los recursos invertidos a la reproducción y a la respuesta inmune son equivalentes, por lo que la diferencia en ésta última entre los sexos deberá ser menor comparado con lo que ocurriría en las especies polígamas (Zuk 1990; Zuk y McKean 1996). Esto es, dependiendo de la intensidad de selección sexual será el grado de inversión en inmunidad y/o otros elementos de las historias de vida. Las predicciones anteriores son la base de esta tesis.

1.6. Sistema inmune de insectos

Los insectos tienen un sistema de defensa contra patógenos y parásitos muy eficiente. Este sistema está conformado por diferentes barreras. La primera es la barrera física que está formada por el exoesqueleto, la cutícula y el endotelio; la segunda son un conjunto de respuestas coordinadas de diferentes hemocitos, la tercera es la síntesis inducida de péptidos antimicrobianos y de proteínas (Gillespie y Kanost 1997) y la cuarta es la producción de moléculas reactivas de O_2 y N_2 (Nappi *et al.* 2005). Algunos parásitos son capaces de evitar estas defensas y entran al organismo, lo cual provoca la activación del sistema inmune (Fig. 1) (Kanost *et al.* 2004; Steiner 2004; Iwanaga y Lee 2005). Los mecanismos de defensa pueden distinguirse en aquellos de reconocimiento y los de no-reconocimiento de partes del insecto y desencadenan una cascada de eventos que generan una respuesta determinada.

Cuando el sistema de reconocimiento se activa, se induce la activación de cascadas proteolíticas que a su vez, activan vías efectoras celulares y humorales: la

cascada de la fenoloxidasa, la vía Imd y la vía Toll (Gillespie y Kanost 1997; Tzou *et al.* 2002). Las vías de activación más estudiadas son de *Drosophila melanogaster* y son las que han sido tomadas como modelo en los insectos (Hetru *et al.* 2003; Kim y Kim 2005). Estas vías forman parte de la respuesta humoral y celular de los insectos, las cuales pueden ser utilizadas para infecciones patógenas o de parásitos. La respuesta humoral (moléculas que circulan en la hemolinfa), sintetiza y secreta anticuerpos pertenecientes a diversos isotipos de inmunoglobulinas y también produce sustancias antibacterianas, antifúngicas y moléculas antivirales (Beckage 2003). Así mismo, sintetiza la fenoloxidasa, enzima que participa en la melanización (Götz 1986; Söderhäll y Cerenius 1998; Beckage 2003). La respuesta celular se encarga de la formación de una gran cantidad de hemocitos diferenciados, algunos de ellos responsables de la liberación de fenoloxidasa, mientras que otros se encargan de la encapsulación por lamelocitos, y otros más de la melanización (Schmid-Hempel 2005).

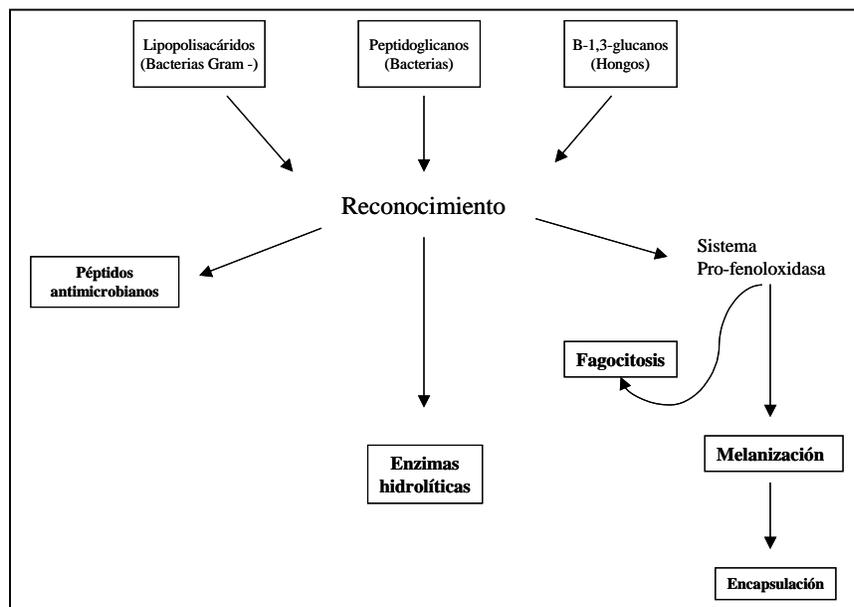


Figura 1. Esquema del sistema inmune y sus respuestas (Modificado de Schmid-Hempel 2005)

1.6.1. Vías de respuesta del sistema inmune

Cascada de fenoloxidasa

El primer evento en esta cascada es el reconocimiento del agente extraño. Las moléculas que este sistema es capaz de reconocer son los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias, los lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias gram negativas y los B-1,3 glucanos de la pared celular de los hongos (Gillespie y Kanost 1997). Este reconocimiento es posible ya que las proteasas, inhibidores de proteinasas y moléculas de reconocimiento del sistema profenoloxidasa, reconocen características estructurales de ciertos componentes de microorganismos patógenos (Söderhäll y Cerenius 1998). Al reconocer cualquier molécula de las antes mencionadas, las proteasas se activan y provocan la activación de la profenoloxidasa. Posteriormente se forma la molécula activa de la fenoloxidasa (Cerenius y Söderhäll 1998, 2004; Beckage 2003). La cascada finaliza con la formación de quinonas, a partir de derivados de tirosina, lo cual lleva a la producción de melanina (Gillespie y Kanost 1997; Cerenius y Söderhäll 2004) (Fig. 2.).

La cascada de la fenoloxidasa (Fig. 2) está encargada de la formación de nódulos, fagocitosis, melanización, encapsulación y producción de moléculas derivadas del oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo) (Götz 1986). La fenoloxidasa es la enzima que está involucrada en la síntesis de la melanina, que forma parte de la cascada que conduce a la encapsulación (Söderhäll y Cerenius 1998). Esta enzima está presente en la hemolinfa de los artrópodos y su activación depende de proteasas que se activan por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, los cuales se encuentran en los lipopolisacáridos, peptidoglicanos y B-1,3-glucanos (Nappi y Christensen 2005;

Christensen *et al.* 2005). El sistema activador de la profenoloxidasa de los artrópodos, probablemente constituye un sistema de reconocimiento y consiste en un grupo de proteínas capaces de unirse a polisacáridos y otros componentes asociados a microorganismos (Cerenius y Söderhäll 2004). La profenoloxidasa está presente en los hemocitos, en la cutícula y ha sido detectada en células epiteliales del tracto digestivo (Gillespie y Kanost 1997). Aparte de tener un papel en la respuesta inmune, es importante para la pigmentación y la esclerotización de muchos tejidos en los insectos (Cerenius y Söderhäll 2004).

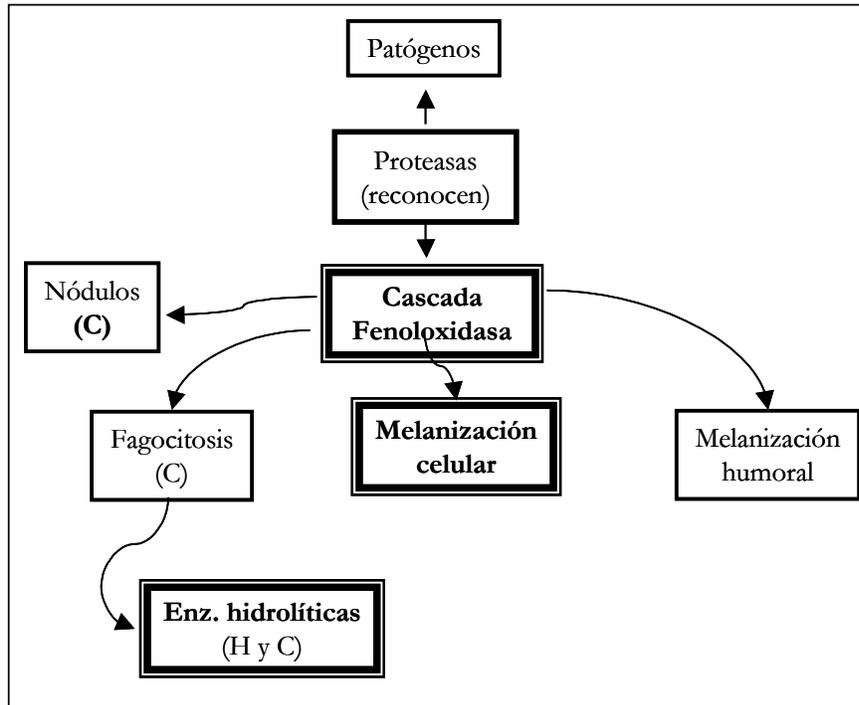


Figura 2. Esquema de la cascada de fenoloxidasa y sus reacciones. (H= respuesta humoral; C= respuesta celular)

Como se mencionó anteriormente, la cascada de fenoloxidasa participa en otras respuestas del organismo a los patógenos. Una de ellas es la formación de nódulos que es inducida por lipopolisacáridos y algunas glicoproteínas. Estos nódulos son hemocitos multicelulares que son capaces de capturar un gran número de bacterias, pueden también adherirse a los tejidos y eventualmente los agentes extraños son encapsulados (Gillespie y Kanost 1997). Otra respuesta que es producto de esta cascada es la fagocitosis. Esta es una forma de defensa simple en la que los hemocitos se activan en presencia de partículas patógenas muy pequeñas (Gillespie y Kanost 1997).

En ocasiones los parásitos o patógenos son demasiado grandes para ser fagocitados, por lo que otras rutas de la cascada son activadas, como la melanización y la encapsulación. La melanización es una reacción de defensa muy importante en los insectos, ya que permite aislar agentes externos por medio de la deposición de melanina alrededor de éste (Gillespie y Kanost 1997). Esta respuesta puede ser inducida por una amplia variedad de antígenos (Schmid-Hempel 2005). Cuando hay una infección una serie de moléculas de reconocimiento detectan al intruso (Söderhäll y Cerenius 1998) y la melanina es depositada en el patógeno. En este proceso se generan quinonas que pueden contribuir a la producción de diferentes sustancias derivadas del oxígeno (superóxido y radicales libres) con efectos citotóxicos (Gillespie y Kanost 1997; Cerenius y Söderhäll 2004). Una vez que los hemocitos han cubierto al patógeno, comienza el proceso de encapsulación (Schmid-Hempel 2005).

La encapsulación, es la forma más común de reacción de defensa en los artrópodos contra los patógenos y parásitos, o bien, cuando algunas partículas (materiales) son inyectadas en los individuos (Götz 1986). Existen dos tipos de

encapsulación: la celular, en la que participan los hemocitos, y la melatómica (humoral) que está asociada con la actividad de la fenoloxidasa (Gillespie y Kanost 1997). Esta respuesta está dirigida a protozoarios, metazoarios, parásitos y huevos o larvas de parasitoides (Gillespie y Kanost 1997).

Vías Imd y Toll

La vía Imd y Toll son rutas que inducen la activación de los péptidos anti-microbianos (Steiner 2004) y regulan la respuesta humoral después de ciertas infecciones (Tzou *et al.* 2002). La vía Imd se activa con la presencia de bacterias Gram negativas o a sus peptidoglicanos; la activación se da por medio de proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos que se encuentran en la membrana celular (Steiner 2004). La activación de esta vía tiene como resultado respuestas humorales que implican a varios péptidos anti-microbianos (Steiner 2004). La vía Toll se activa con infecciones por hongos y bacterias Gram positivas. Esta vía, es de gran importancia ya que participa en la proliferación de hemocitos, y su activación compromete tanto a la respuesta celular como a la humoral (Tzou *et al.* 2002).

Mecanismos citotóxicos

Otra característica de la respuesta inmune de los insectos es la producción de moléculas citotóxicas y enzimas asociadas (Nappi y Ottaviani 2000). Las citoquinonas están relacionadas con la organización de la respuesta inmune y la síntesis de péptidos antimicrobianos y de lisosimas, éstas últimas se encargan de deshacer la pared celular de bacterias Gram negativas (Schmid-Hempel 2005). La respuesta inmune humoral sintetiza

una diversa cantidad de péptidos y proteínas antimicrobianas (Meister *et al.* 1997; Nappi y Ottaviani 2000). Estos péptidos son sintetizados principalmente por el cuerpo gordo, aunque también los sintetizan los hemocitos, células de la cutícula y las estructuras reproductivas (Nappi y Ottaviani 2000); y tienen la capacidad de permeabilizar las membranas de los microbios que han invadido al organismo (Bulet *et al.* 1999; Nappi y Ottaviani 2000). En los insectos se han descrito más de 150 péptidos y polipéptidos que tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Nappi y Ottaviani 2000). Se clasifican en cuatro grupos: las cecropinas, las cuales responden en presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas; el grupo de las cisteínas que se activa en presencia de bacterias Gram positivas y hongos; el grupo de las prolinas que se activa con bacterias Gram negativas y hongos; y por último el grupo de las glicinas que es inducido por bacterias Gram negativas (Bulet *et al.* 1999; Nappi y Ottaviani 2000). La capacidad inmune de los artrópodos está basada en la presencia o en la síntesis de sustancias humorales como las lisosimas, cecropinas, drosopinas y otros compuestos con eficiencia antibiótica (Götz 1986).

En los insectos el sistema inmune se ha estudiado con diferentes parámetros que permiten medir la intensidad de la respuesta inmune. Algunas de las medidas que más han sido utilizadas son la actividad de la fenoloxidasa (e.g. Siva-Jothy 2000; Adamo *et al.* 2001; Tzou *et al.* 2002; Schwarzenbach *et al.* 2005), la encapsulación por melanina (e.g. Söderhäll y Cerenius 1998; Siva-Jothy *et al.* 1998; Siva-Jothy 2000; Tzou *et al.* 2002, Yourth *et al.* 2002), así como la cantidad y actividad de las enzimas hidrolíticas (e.g. Tzou *et al.* 2002; Luna-González *et al.* 2004). Estos parámetros son importantes ya que muestran un panorama general de la respuesta inmune tanto celular como humoral.

2. Antecedentes

En diferentes trabajos, se han encontrado evidencias que sugieren una diferencia en la intensidad de la respuesta inmune entre hembras y machos en insectos; no hay muchos trabajos que se dirijan a esto y que tomen en cuenta distintas intensidades de selección sexual. Éstas se revisan a continuación.

Schwarzenbach y colaboradores (2005) realizaron estudios en la mosca *Scathophaga stercoraria* e hicieron mediciones de fenoloxidasa en machos y hembras. Los sexos tuvieron diferencias cuantitativas en la actividad de esta enzima: las hembras presentaron más actividad que los machos (Schwarzenbach *et al.* 2005). Un estudio en el grillo *Acheta domesticus* mostró que los machos fueron más vulnerables que las hembras al ser infectados con la bacteria *Serratia liquefaciens* (Gray 1998). Otro estudio con los grillos *Gryllus texensis* mostró que los machos tuvieron menor actividad en la fenoloxidasa que las hembras y concluyeron que los machos sexualmente maduros eran menos inmunocompetentes que las hembras sexualmente maduras (Adamo *et al.* 2001). Kurtz y colaboradores (2000, 2001) hicieron un estudio en la mosca escorpión *Panorpa vulgaris* en donde encontraron que las hembras eran más capaces de fagocitar partículas implantadas y mostraron también niveles más altos de compuestos antibacteriales que los machos. En otro estudio, Rolff (2001) evaluó la concentración de hemocitos y la actividad de la fenoloxidasa en la libélula *Lestes viridis*, y encontró que las hembras maduras presentan una alta actividad de fenoloxidasa en comparación con los machos maduros. Radhika y colaboradores (1998) hicieron experimentos con el camarón *Streptocephalus dichotomus* y los resultados indicaron que la actividad de la fenoloxidasa

en la hemolinfa fue mayor en las hembras que en los machos. Con la mosca *D. melanogaster*, se hizo un estudio con larvas en donde se encontró una relación positiva de la encapsulación con la carga de hemocitos y una diferencia en la respuesta inmune entre machos y hembras, siendo ésta más alta en las hembras (Kurtz *et al.* 2000; Kraaijeveld *et al.* 1997). En las libélulas adultas de *Lestes forcipatus* también se encontró que las hembras invierten más melanina que los machos al momento de la encapsulación de algún cuerpo extraño (Yourth *et al.* 2002). Estas diferencias, sin considerar la intensidad de selección sexual, han mostrado un fuerte sesgo hacia las hembras como el sexo con mayor capacidad inmune.

Con respecto a diferencias en la respuesta inmune según la intensidad de selección sexual, también hay evidencias de que existe una inversión diferencial de recursos a ciertas funciones y a la respuesta inmune. Usando la mosca *Scatophaga stercoraria*, Hosken (2001) creó dos líneas que variaban en intensidad de selección sexual: una línea monógama y otra polígama. Después de doce generaciones se midió el tamaño del cuerpo y la respuesta inmune (actividad de fenoloxidasa) en moscas vírgenes y no se encontró diferencia en el tamaño corporal entre las dos líneas con diferente sistema de apareamiento. Sin embargo, en cuanto a la respuesta inmune, las líneas polígamas tuvieron menor actividad de fenoloxidasa y órganos reproductivos más grandes que las monógamas. En el mismo estudio, Hosken (2001) comprobó que las líneas polígamas invierten más en tejidos reproductivos que las monógamas. Estos resultados indican que existe una disyuntiva entre la inversión en tejidos para la reproducción y la función inmune (Hosken 2001).

Aunque todos estos estudios sugieren que las hembras tienen mejor sistema inmune y la inversión en ésta depende de la intensidad de selección sexual, no existe ningún estudio comparativo entre distintas especies que difieran en intensidad de selección sexual. Tampoco se han utilizado distintos componentes del sistema inmune, ya que muchas veces utilizar un solo parámetro lleva a conclusiones erróneas (Adamo 2004). Un estudio que incluya especies con diferentes intensidades de selección sexual podría explicar de mejor manera, si los mismos parámetros inmunológicos han sido moldeados por selección sexual tal como lo ha sugerido Rolff (2002). Además, utilizar distintos parámetros inmunológicos ayudaría a entender el sistema inmune como un todo. Idealmente, un estudio así debería incluir elementos tanto de la respuesta inmune celular como de la humoral. En este trabajo se han incluido parámetros inmunológicos (encapsulación, fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas) que dan un panorama general del sistema inmune.

3. Objetivo

Cuantificar y comparar la intensidad de la respuesta inmune de machos y hembras usando seis especies de tres órdenes de insectos (dos de Lepidoptera, dos de Diptera y dos de Coleoptera) que difieren en intensidad de selección sexual dentro de cada orden, midiendo los siguientes parámetros inmunológicos: encapsulación, fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas.

4. Hipótesis

- 1) De acuerdo con la hipótesis de Rolff: La respuesta inmune en machos, independientemente de la intensidad de selección sexual, será menor que en hembras.
- 2) En especies con selección sexual intensa, la diferencia en respuesta inmune entre los sexos será más marcada que en las especies con baja intensidad de selección sexual.

Predicciones

- 1) Las hembras tendrán más encapsulación, más fenoloxidasa, y mayor cantidad de enzimas hidrolíticas que los machos.
- 2) En las especies con alta intensidad de selección sexual el dimorfismo sexual de los parámetros de la respuesta inmune será más marcado que en las especies con baja intensidad de selección sexual, donde incluso, puede no haber diferencias.

5. Sujetos de estudio

Se eligieron tres órdenes de insectos (Lepidoptera, Coleoptera y Diptera) de los cuales se pudieran obtener fácilmente dos especies con las características necesarias para poner a prueba las hipótesis de esta tesis, estas especies debían de diferir en intensidad de selección sexual (monándrica y poliándrica). El criterio para seleccionar las especies fue a partir de la disponibilidad de especies con las características necesarias, una especie debía de tener sólo un apareamiento en la época reproductiva (monándrica) y la segunda especie más de un apareamiento (poliándrica). La mayoría de las especies se eligieron por que los individuos podían ser proporcionados por insectarios de diferentes instituciones. La única especie que no se obtuvo de insectario fue la mariposa *Heliconius ismenius*.

Lepidoptera

Callophrys xami (Lepidoptera : Lycaenidae)

Esta es una especie que habita en zonas secas y rocosas, su distribución abarca desde México hasta el sur de Texas y Arizona (Beutelpacher 1980 *en* Cordero 1986). El ciclo de vida dura de 40 a 50 días, con cuatro estadios larvarios, un estado prepupal, uno pupal y el adulto (Parlange 1991). Las larvas se alimentan de plantas de la familia Crassulaceae (Benrey *et al.* 1994). Esta especie tiene una fuerte tendencia a la monandria, ya que las hembras raramente copulan dos veces en la vida (com. pers. Dr. Carlos Cordero). Existe un registro experimental donde en condiciones de laboratorio, de 526 parejas el 53.2% se aparearon una vez y de 120 parejas sólo el 5% accedieron a un segundo apareamiento. El promedio de apareamiento de esta especie es de 1.3

apareamientos por individuo (Abundis 2006). Por otro lado, los machos, al igual que las hembras, rara vez se aparean más de una vez. Un estudio mostró que de 159 machos sólo 27 copularon y de éstos únicamente tres se aparearon más de una vez (Cordero *et al.* 2000). Los ejemplares de esta especie fueron obtenidos del insectario del Dr. Carlos Cordero del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el mes de diciembre del 2004.

Heliconius ismenius (Lepidoptera : Heliconiidae)

El género *Heliconius* se distribuye en el sur de Norteamérica (zona sur de Estados Unidos y México), Centro y Sur América (Gilbert 1991). Presenta cuatro etapas de desarrollo: huevo, pupa, larva y adulto (Brown 1981). Los hospederos de oviposición son plantas de la familia Passifloraceae (Brown 1981). En general en mariposas, hay evidencia que muestra que las frecuencias de apareamiento de las hembras van de la monandria estricta a una fuerte poliandria (Wiklund 2004), mientras que en los machos el sistema de apareamiento típico es la poliginia (Arnqvist y Nilsson 2000). Algunas especies de este género presentan apareamiento pupal y hay competencia entre los machos por tener acceso a las hembras (Gilbert 1991 *en* Mendoza 2005). En particular en *H. Ismenius*, se tiene un registro que muestra que las hembras se aparean múltiples veces (Brown 1981), los machos también se aparean más de una vez en la época reproductiva (Mendoza 2005). En base a estos registros, esta especie de mariposa se considera poligínica (Mendoza 2005). En un estudio realizado a la par que éste, se registró que de 15 hembras colectadas, sólo tres tuvieron dos espermátóforos, las 12 restantes sólo presentaron uno (com pers. Víctor Sánchez). Esta muestra fue tomada en la misma época

en la que se realizó esta colecta, la densidad poblacional en la época de colecta fue muy baja, por lo cual la probabilidad de que los machos encontraran hembras vírgenes o receptivas fue muy baja (com pers. Víctor Sánchez). Los ejemplares fueron colectados en el Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero en los meses de septiembre, octubre y noviembre del 2005.

Coleoptera

Verres corticola (Coleoptera : Passalidae)

El ciclo de vida de los pasálidos tiene una duración de tres a cuatro meses y en estado adulto viven de uno a dos años (Castillo y Reyes-Castillo 1997). Presentan cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Castillo y Reyes-Castillo 1997). La familia Passalidae presenta un alto grado de comportamiento subsocial (cuidado a la cría, cooperación entre adultos progenitores y adultos hijos). La pareja fundadora es monógama y es responsable de dar las mejores condiciones a los huevos y larvas (Castillo y Reyes-Castillo 1997). Ambos sexos cooperan en la crianza de la progenie lo cual disminuye las oportunidades de apareamiento con otros individuos, lo que lleva a que hembras y machos sean monógamos al menos durante los largos periodos de cuidado parental (Schuster y Schuster 1997). Los pasálidos son saproxilófagos (mediante hábitos alimentarios y por conductas subsociales aceleran y contribuyen a la degradación física y descomposición biológica de la madera reintegrándola al ciclo de nutrientes; Castillo y Morón 1992, Castillo y Reyes-Castillo 1997). Esta especie posee un cuerpo convexo y está adaptada para vivir bajo troncos podridos (Castillo y Reyes-Castillo 1997). Los individuos de esta especie fueron obtenidos del insectario de pasálidos a cargo

de la Biól. María Luisa Castillo del Instituto de Ecología de Xalapa, Veracruz, en el mes de febrero del 2005.

Tenebrio molitor (Coleoptera : Tenebrionidae)

Este es uno de los insectos más comunes en todo el mundo. A la larva se le conoce comúnmente como “gusano amarillo de la harina” y al adulto como “gorgojo negro” (Lauhoff 1989 *en* Medina 2001). Tienen un alto potencial reproductivo, ya que una sola hembra puede depositar aproximadamente 275 huevecillos, y las oviposiciones se realizan en forma continua durante tres semanas aproximadamente (Cotton 1940 *en* Medina 2001). El periodo de incubación de estos escarabajos va de 7 a 10 días (Cotton 1940 *en* Medina 2001). Estos organismos presentan cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Esta especie tiene intensas tasas de apareamiento en ambos sexos y se considera altamente poligínica, por lo que ha sido utilizada en estudios de selección sexual (e.g. Worden *et al.* 2001; Moret y Siva-Jothy 2003). Los escarabajos fueron obtenidos de la cría a cargo del Biól. Jorge Contreras Garduño, del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Diptera

Rhagoletis pomonella (Diptera : Tephritidae)

La mosca de la manzana o del tejocote, es nativa del este de Norteamérica. Varias especies de este género se distribuyen en México, América Central y una parte de América del Sur (Norrbom *et al.* 1999 *en*: Aluja *et al.* 2001). Mide aproximadamente 5

mm de largo y tiene cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. Generalmente, las plantas hospederas de esta especie son frutales. Las hembras ovipositan dentro de las frutas (Kelly 2003). Esta especie presenta una fuerte poligamia según los datos no publicados de los Drs. Martín Aluja Schunemann y Juan Martínez Frunz. Ambos sexos se aparean múltiples veces. En condiciones semi-naturales en jaulas de campo, se registró un promedio de 8 apareamientos al día para las hembras y seis apareamientos diarios para los machos. Los ejemplares se obtuvieron de las crías establecidas por ellos mismos en el Instituto de Ecología, A.C. en Xalapa, Veracruz, en el mes de mayo del 2005.

Rhagoletis zoqui (Diptera : Tephritidae)

Esta mosca es conocida como la mosca del nogal. Es una especie de la cual se tiene poca información sobre su biología. Comparte características con las especies de moscas de la manzana (*R. pomonella*), en cuanto a la distribución y a las etapas del desarrollo. Como la mayoría de las especies de este género utiliza plantas frutales como hospederas (Prokopy *et al.* 2000). En cuanto a los apareamientos, sólo existe un estudio publicado que muestra que esta mosca tiene una fuerte tendencia a la monandria. Se observó que en condiciones ratificales y de sobrepoblación, las hembras se aparearon en promedio 1.6 veces en un periodo de nueve días (Aluja *et al.* 2001). Lo anterior permite suponer que la tasa de apareamientos en condiciones naturales es similar o todavía más baja, debido a las condiciones de sobrepoblación del estudio. Se ha registrado que esta especie se aparee menos veces que *R. pomonella* (Juan Rull Gabayet com. pers.). Los ejemplares se obtuvieron del mismo lugar que *R. pomonella*, en el mes de mayo del 2005.

6. Materiales y Métodos

Inducción de la respuesta inmune

Se obtuvieron 20 hembras y 20 machos de cada especie, todos adultos y maduros sexualmente, ya que en este estadio es en donde se espera que se manifieste el compromiso entre la inversión de recursos a la respuesta inmune y la reproducción. En el caso de *T. molitor*, *V. corticola* y *H. Ismenius*, la edad en la que se encontraban fue revisada de acuerdo a las características (color del cuerpo, calidad y color de las alas) que mencionaron las personas que proporcionaron a estas especies. En las otras tres especies, se contaba con el registro de eclosión y al momento del experimento se conocía el estado del individuo.

Usando pinzas de micro-disección, a 10 individuos de cada sexo se les insertó cuidadosamente un implante de nylon cilíndrico transparente (3 mm de largo y 0.5 mm de diámetro), previamente desinfectado con etanol al 100%. El nylon se insertó en sitios inaccesibles al animal para que éste no pudiera removerlo. En los lepidópteros el implante fue insertado en el séptimo segmento abdominal. Las especies de este orden se mantuvieron de diferente manera a los otros órdenes para disminuir el estrés. A los individuos de *C. xami* se les colocó en cajas de petri de plástico (5 cm de alto y 8 cm de diámetro) con una esponja con alimento (agua azucarada). A los individuos de *H. ismenius* se les colocó en bolsas de papel celofán (13 cm de largo y 8 cm de ancho). En los coleópteros, el implante fue insertado en el quinto segmento abdominal para después dejarlos en cajas de petri de plástico. Por último, en los dípteros el implante se insertó en el cuarto segmento abdominal y los individuos se colocaron en botes de plástico transparente (12 cm de alto y 9.5 cm de diámetro) cubierto por una malla.

Todos los individuos fueron colocados en una cámara de luz y temperatura controlada durante 10 horas. Se eligió este número de horas para estandarizar el tiempo enfrentados al reto inmune y, por lo tanto se tuvo el mismo tiempo por cada individuo para que la respuesta inmune se activara. Posteriormente los animales se guardaron en etanol al 70%. Utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus SZH10), se retiró el implante con pinzas de disección para remover cuidadosamente la cutícula y demás tejidos, alrededor del implante. El implante se guardó en etanol al 70%.

Encapsulación

Para conocer la capacidad de encapsulación por implante. Cada uno de éstos se observó bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZH10) tomándose 3 fotos digitales en diferentes posiciones usando una cámara Olympus C-5050 (3x optical zoom). Todas las fotos fueron realizadas teniendo el implante y el objetivo del microscopio a la misma distancia. Dado que la distribución de la melanina en el implante es irregular (Siva-Jothy 2000; Rantala *et al.* 2000; Contreras-Garduño *et al.* 2006), las tres fotos de cada implante sirven para tener una mejor estimación de toda la melanina depositada. Las fotos se abrieron usando el programa Image tool® (versión 3.0.) mismo que se utilizó para medir el área (píxeles) que cubre la melanina por cada foto. Esto se realizó seleccionando de manera manual cada zona cubierta por melanina (la cual aparece más oscura con respecto al nylon transparente); los valores de área melanizada por implante se acumulaban automáticamente de manera individual después de cada medición. Para calcular el área total melanizada, se sumaron las áreas medidas de cada una de las tres fotos y se obtuvo una media. Se usaron los valores absolutos para los análisis estadísticos.

Medición de fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas

Cada uno de los 10 machos y 10 hembras restantes de cada especie, los cuales no recibieron ningún reto inmune (implante), fueron colocados de manera individual en tubos Eppendorf con 1 ml de buffer que contenía fosfato monobásico, fosfato dibásico y agua destilada. Esta combinación evita la descomposición de las muestras y la activación de las enzimas que participan en la respuesta inmune (Luna-González *et al.* 2004). Cada individuo de la muestra se maceró en el buffer hasta tener una mezcla homogénea. Ésta se centrifugó (centrífuga ALC PK121R) a 15,000 r.p.m. por gramo a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante de esta mezcla se removió y nuevamente se le agregó 1 ml de buffer de fosfatos, para después volver a homogeneizar y centrifugar. Este procedimiento se repitió tres veces más, ya que es necesario que la muestra no contenga otro tipo de células que al momento de macerar se quedan en el sobrenadante (Contreras *et al.* 2005). Después de este procedimiento se obtuvo la muestra de cada individuo para las pruebas de actividad de fenoloxidasa y cuantificación de enzimas hidrolíticas. Antes de cuantificar la actividad de fenoloxidasa fue necesario calcular la concentración de esta proteína.

Determinación de proteína

Para calcular la concentración de proteína para cada individuo, se usó el método de Bradford (1976), que se describe a continuación. Como estándar se utilizó albumina bovina (Sigma®). Se agregaron 20µl de muestra del individuo a 200µl de buffer de fosfatos y se colocaron en micro-celdas, a estas muestras se les agregaron 40µl de reactivo de Bradford. Después se midió la absorbancia a 495nm. El control fue de 220µl

de buffer y 40µl de reactivo de Bradford. De esta manera se obtuvo µg/µl por individuo. Se hizo un ajuste a 30 µg/µl por cada individuo, con la finalidad de obtener la misma cantidad de proteína y conocer la cantidad de muestra que se tenía que utilizar para cuantificar la actividad de la fenoloxidasa. Este método se realizó de manera individual para las seis especies de este estudio.

Fenoloxidasa

La actividad de la fenoloxidasa se cuantificó en un lector de micro-celdas (Mod. 350. Bio-Rad®). Para esto se tomaron 50 µl de la muestra y se mezclaron con 50 µl de buffer más de L-DOPA (3 mg/ml de buffer). Las mezclas se colocaron en una micro-celda y se les agregó 50 µl de buffer. Las mediciones en el lector de micro-celdas fueron hechas a 490 nm. A esta absorbancia es posible medir la actividad de la fenoloxidasa (Luna-González *et al.* 2004; Rishan Cong *et al.* 2005). Se hizo un solo registro de la actividad de esta enzima después de 15 minutos, ya que a este tiempo la actividad de la enzima es mayor. Como control se usaron 100 µl de buffer con 50 µl de buffer y L-DOPA (3 mg/ml de buffer)(Luna-González *et al.* 2003; 2004).

Enzimas hidrolíticas

Para esta prueba se utilizó el kit APY ZYM® (BioMériux). El cual permite detectar 19 enzimas hidrolíticas (fosfatasa: fosfatasa ácida, naftol fosfohidrolasa, fosfatasa alcalina; esterases: esterasa (C1); lipasas: lipasa esterasa (C8), lipasa (C14); proteasas: leucil-arilomidasa, valil-arilamidasa, cistil-arilomidasa, tripsina, α-quimotripsina; glicosidasas: α-galactosidasa, β-galactosidasa, β-glucuronidasa, α-

glucosidasa, β -glucosidasa, α -manosidasa, α -fucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa; lisosimas). Este kit es un sistema semicuantitativo de actividades enzimáticas aplicable a diferentes tipos de muestras y permite estudiar de manera rápida y simultánea, 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra. Para la medición de las enzimas se agregaron 65 μ l de las muestras a las tiras y se incubaron a 37° C por 4 horas. Después de 10 minutos se observan cambios de color en las tiras, las cuales pueden ser leídas en términos cuantitativos de acuerdo a la escala provista por el mismo. Los resultados se transformaron a nM (cantidad de substrato hidrolizado). La actividad enzimática se representa en unidades, en donde una unidad representa el substrato hidrolizado en nM mg⁻¹ de la proteína (Luna-González *et al.* 2004).

Análisis estadísticos

Dimorfismo sexual en la respuesta inmune

Para comparar el dimorfismo sexual en la respuesta inmune en cada especie se realizó el siguiente procedimiento. Se realizó una transformación a logaritmo natural de las variables tamaño corporal y parámetros inmunes, ya que éstas no presentaron distribución normal. En algunos casos se utilizaron los residuales, los cuales indican la variación en la respuesta inmune que no está asociada al tamaño corporal y reflejan el dimorfismo sexual de cada una de las especies. Debido a que los valores de la respuesta inmune pueden ser afectados por el tamaño corporal, se realizó una regresión lineal a partir de la cual se hicieron dos procedimientos. En primer lugar, si existía una relación positiva entre el tamaño y el parámetro inmune, se calcularon los residuales estandarizados. Posteriormente se compararon los residuales de cada sexo utilizando una

prueba no paramétrica Mann Whitney (U) para los que no cumplieron la normalidad; o con una prueba t para los datos que si mostraron esta característica. En segundo lugar, en el caso de que no existiera una relación entre el tamaño corporal y el parámetro inmune, únicamente se revisó la normalidad de los datos (ln), si éstos no cumplían con esta característica se aplicó la prueba de Mann Whitney (U). Si los datos eran normales se usó una ANCOVA para analizar los datos, teniendo como co-variable el tamaño corporal y como factor el sexo.

Comparación del dimorfismo sexual de la respuesta inmune entre especies monándricas y poliándricas

Para comparar los parámetros inmunológicos entre especies poliándricas y monándricas del mismo orden, se realizó un análisis que permitiera obtener los valores de dimorfismo sexual por especie. Estos valores fueron obtenidos de manera individual para cada sexo y parámetro inmune, a partir de una regresión entre el parámetro inmune y el tamaño corporal se obtuvieron los residuales de cada sexo aun cuando no fuera significativa para homogeneizar todos los datos. Posteriormente se hizo otra regresión con los valores de las hembras y de los machos y se calcularon nuevamente los residuales. Para comparar las dos especies del mismo orden, se utilizó una prueba de t o de Mann Whitney (U) dependiendo si los datos fueron normales o no.

Para estas pruebas se utilizaron los programas estadísticos JMP© (Versión 4.04) y el STATISTICA© (6.0). Los resultados, se dan como medias \pm desviación estándar a menos que se indique lo contrario.

7. Resultados

7.1. *Dimorfismo sexual en la respuesta inmune.*

En general la mayoría de las especies no presentó diferencias significativas entre machos y hembras en la capacidad de encapsulación, en la cantidad de fenoloxidasa y en enzimas hidrolíticas (Cuadro 1). No hubo patrones consistentes en términos de si las hembras fueron más inmunocompetentes para la encapsulación (uno de tres casos) y fenoloxidasa (uno de dos). Curiosamente, los machos también presentaron valores altos en los parámetros medidos, dos de tres casos para la encapsulación y uno de dos para fenoloxidasa. Es interesante señalar que en varios casos, no hubo diferencias entre sexos: tres de seis para melanina y cuatro de seis para fenoloxidasa. En cuanto a las enzimas hidrolíticas, únicamente se encontraron diferencias entre los sexos en un caso de seis, siendo las hembras las que presentaron valores más altos.

7.2. *Comparación del dimorfismo sexual de la respuesta inmune en especies monándricas y poliándricas.*

De las tres especies polígamas, los machos fueron significativamente más inmunocompetentes (tres casos de nueve). En las especies monógamas se esperaba que una gran mayoría no presentara diferencias, o bien, que las hembras superaran a los machos, sólo en un caso de nueve se presentaron diferencias, siendo las hembras más inmunocompetentes. De los casos totales, en tres las hembras fueron más inmunocompetentes, al igual que los machos (Cuadro 1)

Comparando directamente especies monándricas y poliándricas, no se encontraron diferencias significativas entre los pares de especies de cada orden (Cuadro 2).

Cuadro 1. Diferencias entre machos y hembras en tres parámetros inmunológicos. En cada columna de los parámetros se muestra que estadístico se utilizó y cuál sexo presentó mayor respuesta inmune (↑). (P= poliándrica, M= monándrica).

Especie	Encapsulación (x ± d.e.)	Diferencia	Fenoloxidasa (x ± d.e.)	Diferencia	Enzimas (x ± d.e.)	Diferencia
			ANCOVA		ANCOVA	
<i>T. molitor</i> (P)	$U_{(10,10)} = 0, p = 0.00037$	Machos ↑	Sexo $F_{(1,17)} = 4.68, p = 0.045$ Tamaño $F_{(1,17)} = 6.001, p = 0.025$	Machos ↑	Sexo $F_{(1,17)} = 9.13, p = 0.007$ Tamaño $F_{(1,17)} = 3.37, p = 0.084$	Hembras ↑
	ANCOVA		ANCOVA		ANCOVA	
<i>V. corticola</i> (M)	Sexo $F_{(1,12)} = 2.954, p = 0.111$ Tamaño $F_{(1,12)} = 0.187, p = 0.673$	NO	Sexo $F_{(1,13)} = 0.051, p = 0.824$ Tamaño $F_{(1,13)} = 0.007, p = 0.934$	NO	Sexo $F_{(1,13)} = 0.052, p = 0.824$ Tamaño $F_{(1,13)} = 0.007, p = 0.934$	NO
	ANCOVA		ANCOVA		ANCOVA	
<i>R. pomonella</i> (P)	Sexo $F_{(1,10)} = 8.11, p = 0.017$ Tamaño $F_{(1,10)} = 0.047, p = 0.831$	Hembras ↑	Sexo $F_{(1,17)} = 3.042, p = 0.099$ Tamaño $F_{(1,17)} = 0.0309, p = 0.862$	NO	Sexo $F_{(1,17)} = 0.116, p = 0.738$ Tamaño $F_{(1,17)} = 0.185, p = 0.672$	NO
					ANCOVA	
<i>R. zoqui</i> (M)	$U_{(10,10)} = 4, p = 0.0008$	Machos ↑	$U_{(10,10)} = 33.51, p = 0.212$	NO	Sexo $F_{(1,15)} = 0.187, p = 0.671$ Tamaño $F_{(1,15)} = 0.171, p = 0.684$	NO
	ANCOVA		ANCOVA		ANCOVA	
<i>H. ismenius</i> (P)	Sexo $F_{(1,4)} = 2.880, p = 0.164$ Tamaño $F_{(1,4)} = 6.393, p = 0.064$	NO	Sexo $F_{(1,8)} = 0.0576, p = 0.816$ Tamaño $F_{(1,8)} = 0.207, p = 0.661$	NO	Sexo $F_{(1,8)} = 0.0003, p = 0.986$ Tamaño $F_{(1,8)} = 0.387, p = 0.551$	NO
			ANCOVA		ANCOVA	
<i>C. xami</i> (M)	$T = -0.0659, p = 0.948$	NO	Sexo $F_{(1,12)} = 22.725, p = 0.0005$ Tamaño $F_{(1,12)} = 0.093, p = 0.352$	Hembras ↑	Sexo $F_{(1,12)} = 2.322, p = 0.153$ Tamaño $F_{(1,12)} = 1.281, p = 0.279$	NO

Cuadro 2. Diferencias entre especies monándricas y poliándricas por orden de insectos en los tres parámetros de la respuesta inmune (P= poliándrica, M= monándrica).

Especies	Encapsulación (x±d.e.)	t	Fenoloxidasa (x±d.e.)	t	E. hidrolíticas (x±d.e.)	t
<i>T. molitor</i> (P)	0.012 ±1.08	-0.08	-0.007 ±1.06	-0.11	0.006 ±1.05	-0.02
<i>V. corticola</i> (M)	-0.03 ±1.06		-0.067 ±1.04		-0.005 ±1.0	
<i>R. pomonella</i> (P)	0.10 ±1.17	0.16	0.02 ±1.03	0.05	-0.05 ±1.07	0.15
<i>R. zoqui</i> (M)	0.004±1.06		-0.006 ±1.03		-0.13 ±1.18	
<i>H. ismenius</i> (P)	-0.33 ±1.15	-0.08	-0.33 ±1.15	-0.11	-0.33 ±1.15	-0.02
<i>C. xami</i> (M)	-0.02 ±1.02		0.03 ±1.05		0.05 ±1.08	

8. Discusión

La comparación de la respuesta inmune entre machos y hembras no arrojó una dirección clara; sólo en un caso para la encapsulación y fenoloxidasa las hembras tuvieron mejor respuesta inmune, los machos tuvieron mejor respuesta inmune en tres casos. Con las enzimas hidrolíticas, la tendencia fue menos clara aún ya que sólo en un caso las hembras presentaron valores mayores que los machos. No hubo casos donde los machos fueron más inmunocompetentes en este parámetro. Estos resultados en general no apoyan la idea de que existe dimorfismo sexual en la respuesta inmune, ya que no se encontró un patrón claro que mostrara que las hembras tienen mejor respuesta inmune que los machos, que es lo que la idea de Rolff (2002) plantea. Por otra parte, independientemente de la comparación entre los sexos, se esperaba encontrar una diferencia en la respuesta inmune en relación con la intensidad de selección sexual, esperando encontrar mayores diferencias en especies con tendencia poliándrica que en las especies con tendencia monándrica. En ningún caso se presentaron las diferencias esperadas.

Por estos resultados, este trabajo no apoya la hipótesis de Rolff, ya que sólo algunos casos coincidieron con esta idea; otros casos presentaron diferencias entre los sexos pero a la inversa de esta idea y en los casos restantes no existieron diferencias entre machos y hembras. Uno de los puntos robustos de este trabajo es que se tomaron en cuenta varios parámetros de la respuesta inmune los cuales permiten tener una visión general de la respuesta celular (encapsulación) y humoral (fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas). Los diferentes procesos de la respuesta inmune y su posible conflicto en el

uso de recursos con otras funciones no se conocen en su totalidad, por lo que no se debe tener un solo parámetro para estimar la capacidad inmunitaria global del individuo (Adamo *et al.* 2001; Adamo 2004). De esta manera, si sólo se toma en cuenta un parámetro es posible que las interpretaciones no sean acertadas, ya que únicamente se tienen los resultados de un componente de la respuesta inmune. Por esto es necesario utilizar mediciones de diferentes indicadores de la respuesta inmune para interpretar de manera más general la inmunocompetencia de los sujetos de estudio (Adamo 2004). Otro aspecto importante en esta tesis es que se usaron especies que difieren en intensidad de selección sexual y que pertenecen al mismo orden. En otros estudios estas diferencias no han sido del todo claras, por lo tanto, las predicciones son difíciles de subrayar. Aunque moldeados por un ancestro común, las diferencias serían explicadas parcialmente por las diferentes presiones de selección. Otro de los beneficios de este trabajo es que se utilizaron animales adultos sexualmente maduros, los cuales a diferencia de los recién emergidos al estado adulto (e.g. Schwarzenbach *et al.* 2001), muestran diferencias en la respuesta inmune en la madurez sexual quizás por que a esta edad los machos ya han invertido sus recursos a funciones relacionados con la obtención de pareja. En cambio, en los recién emergidos probablemente la inversión diferencial apenas comienza (Adamo *et al.* 2001). Otro factor importante es que los animales venían en su mayoría de condiciones benignas, lo que garantiza poco estrés y, por lo tanto, pocas fluctuaciones (o menos extremas) en la respuesta inmune.

Sin embargo, este trabajo tiene el problema de que no se cuenta con una filogenia que permita explicar la relación filogenética de estas seis especies con el ancestro común, y de esta forma conocer en cuanto a los parámetros medidos. Si existiera una filogenia, se

tendría que utilizar un método comparativo que tome en cuenta la filogenia y que quitara el efecto del ancestro en cada una de las especies. Estas características compartidas (similitudes) se tomarían en cuenta en un estudio comparativo (Harvey y Pagel 1991). Si existiera una filogenia, ésta nos permitiría identificar los eventos independientes y se tendría que utilizar un método comparativo que tome en cuenta la filogenia y que quitara el efecto del ancestro en cada una de las especies. Las comparaciones hechas entre especies no son eventos independientes. Si hubiera un efecto del ancestro, se esperaría que se mostrara la misma tendencia dentro del orden, esto no ocurrió en ninguno de los tres ordenes. Pero aún con esto, se esperaría que al menos el balance fuera a favor de las hembras (sobre todo en el caso de las especies poliándricas). En suma, con las bondades de este trabajo, no hay apoyo para la hipótesis de Rolff.

Este trabajo no coincide con un gran número de estudios donde se ha visto que las hembras son más inmunocompetentes que los machos (Kraaijeveld *et al.* 1997; Gray 1998; Radhika *et al.* 1998; Hosken 2001; Adamo *et al.* 2001; Kurtz *et al.* 2001, 2000; Rolff 2001; Yourth *et al.* 2002; Schwarzenbach *et al.* 2005). En cuanto a la intensidad de selección sexual, el estudio más parecido a este es el de las moscas del estiércol, *Scatophaga stercoraria*, donde trabajaron con líneas monógamas y polígamas, éstas últimas tuvieron menos actividad de fenoloxidasa que las primeras (Hosken 2001). Cabe señalar, que cuando los animales se expusieron a un ataque de bacterias, la inhibición de la infección, no estuvo correlacionado con la producción de fenoloxidasa (Hosken 2001), lo que sugiere que no es buena idea utilizar éste parámetro inmunológico para asociarlo con la capacidad de defensa inmune. Es por esto que en esta tesis se utilizó más de un

parámetro y, sobre todo, principalmente aquellos relacionados directamente con el ataque a patógenos (encapsulación y enzimas hidrolíticas).

Uno de los problemas que tiene la idea de Rolff es que en ningún momento toma en cuenta el efecto que tiene el ambiente (disponibilidad de parejas, de alimento), en la respuesta inmune de los individuos. Sobre esto, en algunos estudios se ha demostrado que hay algunos factores ambientales, por ejemplo, la limitación de recursos y de parejas (Thompson *et al.* 2002; McKean y Nunney 2001, 2005), que tienen efectos negativos en la respuesta inmune, pero estos efectos no se presentan de la misma manera en machos y hembras, ya que cada sexo difiere en los intereses de adquirir ciertos recursos y en su prioridad de asignación a diferentes funciones. La limitación de alimento es un factor que se ha comprobado que afecta la respuesta inmune, sobre todo en las hembras (Thompson *et al.* 2002; Tsubaki y Hooper 2004; McKean y Nunney 2005). En cambio, la limitación en la disponibilidad de parejas es un factor que provoca la disminución de la respuesta inmune en los machos (McKean y Nunney 2001). Con factores como estos, la variación en la respuesta inmune en ambos sexos es enorme, llegando incluso a mostrar patrones contrarios a lo predicho por Rolff. Al parecer, Rolff da por sentado que las diferencias entre hembras y machos están presentes intrínsecamente y deja a un lado que las fluctuaciones en el ambiente pueden dar lugar a fluctuaciones extremas y opuestas en la respuesta inmune de cada sexo. Es claro que los machos invierten muchos recursos en todos los aspectos relacionados con la selección sexual (caracteres sexuales secundarios, cópulas, competencia, defensa de territorios), lo cual es costoso para ellos, ya que dejan de invertir en aspectos como la respuesta inmune y otros parámetros de las historias de vida (longevidad, forrajeo) (Siva-Jothy *et al.* 1998; Schmid-Hempel 2003). Esto se ha

visto en algunos grupos de insectos como en el escarabajo *Tenebrio molitor* (Rolff y Siva-Jothy 2002), en la libélula *Matrona basilaris* (Siva-Jothy *et al.* 1998), en la mosca *Scathophaga stercoraria* (Hosken 2001) entre otros. Pero, es posible que las hembras también inviertan en otros aspectos (producción de huevos, longevidad, alimentación) que las haga enfrentarse a compromisos severos (por ejemplo efecto negativo de la cópula, Rolff y Siva-Jothy 2002; efecto negativo de la oviposición, Siva-Jothy *et al.* 1998). Aunque estos factores están presentes y afectan diferencialmente a ambos sexos, los límites bajos en la respuesta inmune son más extremos de lo que Rolff supone.

Relacionado con esto, McKean y Nunney (2005) plantearon una hipótesis alternativa a la de Rolff. Ésta propone que las diferencias entre machos y hembras en la respuesta inmune se originan por la variación en la adecuación provocada por la limitación en la disponibilidad de recursos (McKean y Nunney 2005). Como consecuencia se dan cambios en el comportamiento reproductivo (plasticidad conductual) específicos del sexo. Esta plasticidad conductual puede tener efectos específicos para cada uno de los sexos en diferentes aspectos de las historias de vida al igual que en la inmunidad. A diferencia de la hipótesis de Rolff esta hipótesis sugiere que la respuesta inmune es más plástica en los dos sexos y está mucho más afectada por la disponibilidad de recursos, o bien, por las decisiones que los individuos tomen de acuerdo a las condiciones en que éstos se encuentren o del ambiente (Schmid-Hempel 2003). Esta hipótesis además vislumbra que los efectos del ambiente pueden afectar a cada sexo dramáticamente, de tal manera que se puede observar casos donde las hembras puedan incluso tener respuestas inmunes más bajas que los machos (McKean y Nunney 2005). La hipótesis da menos preponderancia a las trayectorias de historias de vida producto de

estrategias distintas en cada sexo, y ve cada uno como una entidad más independiente. Esta hipótesis plantea que cada sexo puede tener diferentes óptimos sin ninguna predicción de quién será más inmunocompetente en relación a la intensidad de selección sexual, lo que coincide con lo obtenido en esta tesis.

Es curioso que dentro de cada especie los parámetros inmunológicos no estuvieron correlacionados entre sí, por ejemplo, en *T. molitor* los machos presentaron valores altos de encapsulación y fenoloxidasa, pero no se presentaron los mismos valores en las enzimas, al contrario en éste último parámetro fueron las hembras las que mostraron valores más altos. Esto habla de que los componentes de la respuesta inmune actúan sin correlación entre sí, como fue el caso de todas las especies. La falta de correlación entre los parámetros, muestra que es un error, utilizar un solo parámetro inmunológico para ilustrar la condición fisiológica e inmune del individuo. En muchos estudios (melanización: Siva-Jothy *et al.* 1998; Tzou 2002, Yourth *et al.* 2002; fenoloxidasa: Adamo 2001; Muclow *et al.* 2003; Cong *et al.* 2005; Schwarzenbach *et al.* 2005; y enzimas hidrolíticas: Tzou 2002; Luna-González *et al.* 2004), sólo se ha usado un parámetro, lo cual llevaría a conclusiones prematuras (Adamo 2004). Sin embargo, un estudio reciente en libélulas, ha encontrado correlaciones en los tres componentes que se usaron también en este trabajo, además de la producción de óxido nítrico (Contreras-Garduño *et al.* 2006) el cual perfora la pared celular del patógeno (Müller 1997).

8.1. Respuesta inmune en el contexto de la historia natural de las especies utilizadas

Los insectos continuamente están expuestos a diversos agentes infecciosos como microbios, parásitos y parasitoides (Schmid-Hempel 1998) los cuáles afectan la supervivencia y la reproducción. Los lepidópteros generalmente son atacados por virus, bacterias y hongos, que en algunos casos son los principales causantes de mortalidad en huevos y larvas de estos organismos (López y Ramírez 1996). En particular con las especies utilizadas para este estudio no hay mucha información bibliográfica acerca de agentes infecciosos registrados para cada una de ellas. Se ha observado que larvas de *C. xami* son atacadas por un virus y bacterias que no se han identificado ni estudiado (López y Ramírez 1996). Otros registros muestran que esta especie es parasitada en el estadio de huevo, por la avispa *Trichogramma pretiosum*, la cual oviposita en los huevos durante los primeros días después de la oviposición (López y Ramírez 1996). Este parásito constituye la principal causa de mortalidad en los huevos de este lepidóptero (Benrey *et al.* 1994). También se han encontrado moscas parasitoides (Fam: Tachinidae) que atacan a las larvas de tercer y cuarto estadio; larvas de coleópteros (Fam: Dermestidae), pequeños roedores y aves que atacan a las pupas (López y Ramírez 1996). En los adultos no se tiene ningún registro de agentes infecciosos, únicamente la depredación por aves (López y Ramírez 1996). A pesar de que se cuenta con poca información, suponemos que estos agentes patógenos van a desencadenar diferentes componentes de la respuesta inmune incluyendo los examinados en esta tesis. Las hembras en este caso, mostraron mayor inmunocompetencia en melanización y fenoloxidasa. Una predicción a partir de esta información es que, las hembras son el sexo que se ve más afectado por patógenos y es

por esto que están más preparadas para cualquier infección e invierten más en la respuesta inmune.

En *H. ismenius* no se han encontrado registros de agentes infecciosos. El momento más vulnerable para los lepidópteros, aún en especies que son tóxicas, es cuando se encuentran en el estadio de larva (Gilbert 1991 *en* Mendoza 2005). El desarrollo de las larvas de *Heliconius* es más rápido que el de otras especies que no son tóxicas, se cree que por esta razón se reduce el tiempo de exposición a la depredación de los individuos de este género (Mendoza 2005). Sin embargo, no se tiene ninguna idea de los patógenos que afectan a esta especie de lepidóptero en particular, pero en otras especies de este género (*H. himera* y *H. charitonia*) se tiene registro de un baculovirus que afecta a las larvas provocándoles hemorragias de hemolinfa (Hay-Roe *et al.* 2003). A lo largo de la enfermedad las larvas pierden movimiento y dejan de alimentarse hasta que mueren (Hay-Roe *et al.* 2003). Este virus fue encontrado en dos especies silvestres de lepidópteros y es posible que este tipo de infección sea común entre algunas especies de lepidópteros (Hay-Roe *et al.* 2003). Los resultados de melanina indican que las hembras tuvieron más melanina que los machos, lo que supondría mayor preparación de ese sexo contra agentes infecciosos como parasitoides o virus.

En cuanto a los coleópteros, los agentes infecciosos que los atacan son por lo general hongos y algunas bacterias (Weir y Blackwell 2005; com. pers. Ma. Luisa Castillo). En el caso de *T. molitor*, se sabe que es intermediario importante en el ciclo de vida del céstodo *Hymenolepis diminuta*, parásito de mamíferos. En los escarabajos se encuentran en la etapa de cisticerco y tiene un efecto significativo en su adecuación (Worden y Parker 2005), reduciendo el atractivo del olor en los machos y por

consiguiente los eventos reproductivos (Worden *et al.* 2000). Sin embargo, no se encontraron registros de patógenos específicos que afectan a esta especie. Sería interesante saber si hay sesgos en parasitismo e infecciones como se ha predicho antes con mariposas, ya que los machos produjeron más melanina, mientras las hembras produjeron más de los otros componentes inmunológicos. Uno supondría que las hembras quizás son más atacadas que los machos.

Con respecto a la segunda especie de escarabajos (*V. coriticola*), con base en algunas observaciones en campo, se ha registrado depredación y parasitismo (com. pers. Ma. Luisa Castillo). También se sabe que son atacados por algunas bacterias de las cuales no se tiene mucha información; esta infección se ha observado en larvas de crías de laboratorio (com. pers. Ma. Luisa Castillo). En este género existe registro de parasitismo por gregarinas, ácaros, nemátodos (*Chondronema passali*) y moscas (*Zelia vertebrata*). Éstas últimas atacan directamente a las larvas. Los nemátodos usan como intermediario al escarabajo y completan su ciclo de vida en las galerías que ellos habitan (Pearse *et al.* 1936 *en* Gray 1946). En los pasálidos también se han observado laboubeniales, hongos ectoparásitos muy comunes en varios grupos de insectos (10 órdenes), el registro muestra que el 80% de estos hongos viven sobre coleópteros y el 10% sobre dípteros (Santamaría 2001; Weir y Blackwell 2005). Estos hongos crecen de modo superficial sobre los insectos y pocas veces penetran más allá del exoesqueleto, de manera que causan un daño poco visible (Alexopoulos 1966). Hay pocos estudios acerca de la relación parasitaria entre estos hongos y los pasálidos (Luna-Zendejas 1988), pero los que se han realizado muestran que estos escarabajos son parasitados principalmente por organismos pertenecientes al género *Rickia* (Luna-Zendejas 1988). Este estudio también mostró que

hay una diferencia en la incidencia de estos parásitos entre machos y hembras, siendo las hembras las que presentaron mayor parasitismo (55.85% hembras y 44.14% machos de 111). Sin embargo, en otros estudios se concluyó que, estos parásitos no afectan de manera importante a sus hospederos, ya que los insectos infectados y no infectados se desarrollaron de igual manera (Tavares 1979). Aunque el daño no fuera excesivo, también se observó que si la infección era masiva, interfería con su alimentación, causando debilitamiento y por lo tanto, la muerte (Ross 1979 *en* Luna-Zendejas 1988).

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune de los insectos se activa al detectar moléculas de agentes infecciosos, en este caso en particular los B-1,3-glucanos de los hongos, posteriormente pueden activarse cualquiera de las tres respuestas inmunes revisadas en este trabajo. Al ser los hongos el principal patógeno de los coleópteros y en especial de los pasálidos, es posible que estos organismos estén bien preparados para enfrentarse a estos agentes infecciosos. Pero es curioso, que en *V. corticola* no hubiera diferencias inmunológicas entre sexos, siendo que lo esperado de acuerdo a las revisiones anteriores, era que la fenoloxidasa y la melanina presentaran valores elevados sobre todo en las hembras. A partir de lo que estos resultados muestran, podría decirse que en el caso de *V. corticola* no existe una diferencia en la preparación de cada uno de los sexos para los agentes infecciosos, por lo menos en los parámetros inmunológicos aquí estudiados. Esto puede deberse a que los pasálidos, y puede inferirse que esta especie, tienen un comportamiento subsocial y las actividades de la reproducción, cuidado parental, alimentación y cuidado de depredadores, entre otras conductas, no es diferente entre machos y hembras (la realizan los dos sexos por igual) (Castillo y Reyes-Castillo 1997). Por supuesto, se requiere un estudio a profundidad para saber si esto es cierto.

Los dípteros por lo general, son atacados por hongos (Santamaría 2001), depredadores y parasitoides (Feder *et al.* 1995), aunque no conocemos muchos casos en específico para las dos especies del género *Rhagoletis* utilizadas en este estudio. Se han registrado 82 especies de parasitoides de diferentes familias en las moscas de la fruta (Wharton *et al.* 1983); los parasitoides más comunes son avispas de la familia Braconidae, Eucoilidae y Pteromalidae, que atacan a algunas especies de dípteros de la familia Tephritidae (Canal-Daza *et al.* 1994). Estos parasitoides han sido utilizados como control de plagas de árboles frutales (Wharton *et al.* 1983; Aluja 1994; Whitfield 1998). En particular en la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata*, que pertenece a la misma familia que *R. pomonella* y *R. zoqui*, las avispas parasitoides ovipositan sobre huevos y larvas recién eclosionadas, completando su ciclo de vida en la pupa del huésped (López *et al.* 2003). Los dípteros que pertenecen a la familia Tephritidae colocan sus huevos cerca de la superficie de las frutas y esto los hace muy susceptibles al parasitismo, lo cual deja pensar que estos organismos están muy bien preparados inmunológicamente para los ataques de parasitoides. Podríamos predecir entonces que las hembras tuvieron mayor melanización por que son ellas las que están más sujetas a ataques por parasitoides en *R. pomonella* y en *R. zoqui* la predicción sería lo contrario, ya que los machos presentaron mayor melanización.

9. Conclusiones

- Se puso a prueba la hipótesis de Rolff en la cual se plantea que las hembras son más inmunocompetentes que los machos y este será especialmente el caso en especies con alta intensidad de selección sexual. Esto se realizó con seis especies de insectos. En las seis especies, no se obtuvo una tendencia clara que indicara que las hembras son más inmunocompetentes que los machos en tres parámetros inmunológicos: encapsulación, fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas.
- No se encontró relación entre la intensidad de selección sexual y la diferencia en la respuesta inmune entre los sexos en los mismos parámetros inmunológicos arriba mencionados.
- La hipótesis de Rolff, no se apoya con estos resultados. Se sugiere que cada sexo puede tener otros compromisos, no necesariamente ligados a la selección sexual, que hacen que sus respuestas inmunes varíen de forma independiente.

Literatura citada

Abundis, L. 2006. Estudios sobre las causas y consecuencias de la tendencia a la monándria en la mariposa *Callophrys xami* (Lycaenidae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM, México.

Adamo, S.A., Jensen, M. y Younger, M. 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Anim. Behav.* **62**, 417-425.

Adamo, S.A. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity?. *Anim. Behav.* **68**, 1443-1449.

Alexopoulos, J. 1966. *Introducción a la micología*. 2ª edición. EUDEBA. Buenos Aires, Argentina. Pp. 364-366.

Aluja, M., Lozada, N., Piñero, J., Birke, A., Hernández-Ortíz, V. y Díaz-Fleischer, F. 2001. Basic behavior of *Rhagoletis turpiniae* (Diptera : Tephritidae) with comparative notes on the sexual behavior of *Rhagoletis pomonella* and *Rhagoletis zoqui*. *Entomol. Soc. Am.* **1**, 268-274.

Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Ann. Rev. Entomol.* **39**, 155-178.

Andersson, M. 1982. Female choice selects for extreme tail length in a widowbird. *Nature*, **299**, 818-820.

Andersson, M. 1994. *Sexual selection*. Princeton University Press. Princeton, NJ. USA.

Arnqvist, G. Y Nilsson, T. 2000. The evolution of poliandry: múltiple mating and female fitness in insects. *Anim. Behav.* **60**, 145-164.

Basolo, A. 1990. Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science*, **250**, 808-810.

Basolo, A. 1998. Shift in investment between sexually selected traits: tarnishing of the silver spoon. *Anim. Behav.* **55**, 665-671.

Bateman, A.J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, **2**, 349-368.

Beckage, N. 2003. Immunology. En: Resh, V. y Cardé, R. 2003. *Encyclopedia of insects*. Academic press. USA. Pp. 555-564, 1032- 1038.

Begon, M., Harper, J.L. y Townsend, C.R. 1990. *Ecology, individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications. Boston.

Benrey, B., Cordero, C., Jiménez, G. y Soberón, J. 1994. Ecología y conducta de la mariposa *Callophrys xami* (Lycaenidae). En: Rojo, A. Reserva Ecológica "El Pedregal de San Angel: Ecología, historia natural y manejo. UNAM. México.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Braude, S., Tang-Martínez, Z. y Taylor, G.T. 1999. Stress, testosterone, and the immunoredistribution hipótesis. *Behav. Ecol.* **10**, 345-350

Brown, K. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Ann. Rev. Entomol.* **26**, 427-456.

Bullet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. y Hoffman, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329-344.

Canal-Daza, N., Zucchi, R., da Silva, N. y Leonel, F. 1994. Reconocimiento de las especies de parasitoides (Hym.: Braconidae) de moscas de las frutas (Dip. : Tephritidae) en dos municipios del estado de Amazonas, Brasil. *Bol. Mus. Ento. Univ. Valle*. **2**, 1-17.

Carranza, J. 1994. *Etología. Introducción a la ciencia del comportamiento*. Universidad de Extremadura. Madrid. España.

Carranza, J., Alvarez, F. y Redondo, T. 1990. Territoriality as a mating strategy in red deer. *Anim. Behav.* **40**, 79-88.

Castillo, M.L. y Morón, M. 1992. Observaciones sobre la degradación de madera por algunas especies de pasálidos (Coleoptera : Passalidae). *Folia Entomol. Mex.* **84**, 35-44.

Castillo, M.L. y Reyes-Castillo, P. 1997. Passalidae. En: González Soriano, E., Dirzo, R. y Vogt, R. Historia Natural de Los Tuxtlas. UNAM. México. Pp. 293-297.

Cerenius, L. y Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Imm. Rev.* **198**, 116-126.

Charmantier, A., Blondel, J., Perret, P. y Lambrecht, M. 2004. Do extra-pair paternities provide genetic benefits for female blue tits *Parus caeruleus*?. *J. Av. Biol.* **35**, 524-532.

Christensen, B., Li, J., Chen, C. y Nappi, J. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Tren. parasitol.* **21**, 192-199.

Clutton-Brock, T.H., Harvey, P.H. y Rudder, B. 1977. Sexual dimorphism, socioeconomics sex ratio and body weight in primates. *Nature*, **269**, 797-800.

Clutton-Brock, T.H. 1983. The cost of reproduction to red deer hinds. *J. Anim. Ecol.* **52**, 367-384.

Cong, R., Sun, W., Liu, G., Fan, T., Meng, X., Yang, L. y Zhu, L. 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* **18**, 61-70.

Cordero, C. 1986. Defensa territorial en la mariposa *Xamia xami*. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencia, UNAM. México.

Córdoba-Aguilar, A., Contreras-Garduño, J., Peralta-Vázquez, H., Luna, A., Campa, A. y Asencio, F. 2006. Sexual comparisons in immune ability, parasite intensity and survival in two damselfly species. *J. Ins. Physiol.* **52**, 861-869.

Contreras-Garduño, J., Canales-Lazcano, J. y Córdoba-Aguilar, A. 2006. Wing pigmentation, immune ability and fat reserves in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *J. Ethol.* **24**, 165-173.

Darwin, C. 1872. *The descent of man and selection in relation to sex*. London: John Murray.

David, P., Bjorksten, T., Fowler, K. y Pomiankowski, A. 2000. Condition-dependent signaling of genetic variation in stalk-eyes flies. *Nature*, **406**, 186-188.

Davies, N.B. 1991. Mating Systems. En: Krebs, J.R. y Davies, N.B. *Behavioural ecology* (3rd ed.). Oxford, Blackwell. Pp. 263-294.

Duffy, D.L., Bentley, G.E., Drazen, D.L. y Ball, G.F. 2000. Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behav. Ecol.* **11**, 654-662.

Emlen, S. y Oring, L. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, **197**, 215- 223.

Enstrom, D.A., Ketterson, E.D. y Nolan, V. Jr. 1997. Testosterone and mate choice in the dark-eyed junco. *Anim. Behav.* **54**, 1135-1146.

Feder, J., Reynolds, K., Go, W. y Wang, E. 1995. Intra- and interspecific competition and host race formation in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* (Diptera:Tephritidae). *Oecologia*, **101**, 416-425.

Folstad, I. y Karter, A. 1992. Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *Am. Nat.* **139**, 603-622.

Getz, L.L. Carter, C.S. y Gavish, L. 1981. The mating system of the pariré vole, *Microtus ochrogaster*: field and laboratory evidence for pair-bonding. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **8**, 189-194.

Gilbert, L.E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* butterflies. Patterns, Process, and Problems. En: Price, P., Lewinsohn, T., Fernandes, G. y Benson, W. (eds). *Plant-Animal interactions*. John Wiley & sons. N.Y.

Gillespie, J. y Kanost, M. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* **42**, 611-643.

Götz, P. 1986. Encapsulation in Arthropods. En: Brehélin, M. 1986. *Immunity in invertebrates. Cells, molecules, and defense reactions*. Springer-Verlag, Berlín. Pp. 153-170.

Gray, E. 1946. Observation on the life history of the horned passalus. *Am. Mid. Nat.* **35**, 728-746.

Gray, D. A. 1998. Sex differences in susceptibility of house crickets, *Acheta domestica*, to experimental infection with *Serratia liquefaciens*. *J. Inv. Path.* **71**, 288-289.

Grossman, C.J. 1985. Interaction between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, **227**, 257-261.

Hall, E.R. 1981. *The Mammals of North America, Second Edition*. John Wiley and Sons, New York, USA.

Harvey, P. y Pagel, M. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press. Pp. 1-49.

Hay-Roe, M., Boucias, D., Shapiro, A. y Becnel, J. 2003. A newly discovered baculovirus induces reflex bleeding in the butterfly *Heliconius himera* (Nymphalidae : Heliconiinae). *J. Inv. Path.* **84**, 59-62.

Hosken, D. 2001. Sex and death: microevolutionary trade-offs between reproductive and immune investment in dung flies. *Current Biology*, **11**, R379-R380.

Hunt, K.E., Hahn, T.P. y Wingfield, J.C. 1997. Testosterone implants increase song but not aggression in male Laplan longspurs. *Anim. Behav.* **54**, 1177-1192.

Hunt, J., Brooks, R., Jennions, M., Smith, M., Bentsen, C. y Bussière, L. 2004. High-quality male field crickets invest heavily in sexual display but die young. *Nature*, **432**, 1024-1027.

Iwanaga, S. y Lee, B. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 128-150.

Jansa, S. 1999 "Urocyon cinereoargenteus" (On-line). Animal Diversity Web. Consultada Junio 2006 en: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Urocyon_cinereoargenteus.html

Jones, I.L. y Hunter, F.M. 1999. Experimental evidence for mutual Inter. And intrasexual selection favouring a crested auklet ornament. *Anim. Behav.* **57**, 521-528.

Kanost, M.R, Jiang, H., y Yu, X.Q. 2004. Innate immune responses of a Lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Imm. Rev.* **198**, 97-105.

Kelly, M. 2003. As the worm turns: Speciation and the apple maggot fly. National center for case study teaching in science. Department of biology.

Klein, S. L. 2000. Hormones and mating system affect sex and specien differences in immune function among vertebrates. *Behav.Proc.***51**, 149-166.

Kraaijeveld, A.R. y Godfray, H.C.J. 1997. Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **389**, 278-280.

Köing, C. y Schmid-Hempel, P. 1995. Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee *Bombus terrestris* L. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **260**, 225-227.

Kortet, R., Vainikka, A., Rantala, M.J., Jokinen, I. Y Taskinen, K. 2003. Sexual ornamentation, androgens and papillomatosis in male roach (*Rutilus rutilus*). *Evol. Ecol. R.* **5**, 411-419.

Kurtz, J., Wiesner, A., Götz, P. y Sauer, K. 2000. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta:Mecoptera). *Dev. Comp. Immunol.* **24**, 1-12.

Kurtz, J. y Saber, K. 2001. Gender differences in phenoloxidase activity of *Panorpa vulgaris* hemocytes. *J. Invert. Pathol.* **78**, 53-55.

Le Boeuf, B.J. y Laws, M. 1994. *Elephant seals. Population, ecology, behavior and phsyology*. University of California press.

López, M., Sivinski, J., Rendón, P., Holler, T., Bloem, K. Copeland, R., Trostle, M. y Aluja, M. 2003. Colonization of *Fopius ceratitivorus*, a newly discovered African egg-pupal parasitoid (Hymenoptera: Braconidae) of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **86**, 53-60

López-Mendoza, S. y Ramírez-Sánchez, D. 1996. Tabla de vida y parámetros demográficos de *C. (sandia, Xamia) xami Reakirt* (Lepidoptera : Lycaenidae) en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Luna-González, A., Maeda-Martínez, A., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F. y Robles-Mungaray, M. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenil homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* **15**, 275-282.

Luna-González, A., Maeda-Martínez, A., Ascencio-Valle, F. y Robles-Mungaray, M. 2004. Ontogenic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* **16**, 287-294.

Luna-Zendejas, H.S. 1988. Descripción de algunas especies del género *Rickia* (Laboulbeniales : Ascomycotina) parásitas de la familia Passalidae. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Marler, C.A., Walsberg, G., White, M.L. y Moor, M. 1995. Increased energy expenditure due to increased territorial defence in male lizards after phenotypic manipulation. *Behav. Ecol. Sociob.* **37**, 225-231.

McKean, K. y Nunney, L. 2001. Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 7904-7909.

McKean, K. y Nunney, L. 2005. Bateman's principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. *Evolution*, **59**, 1510-1517.

Meister, M., Lemaitre, B. y Hoffman, J. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays*, **19**, 1019-1026.

Medina Sánchez, H. 2001. Estudio comparativo de dos dietas en la alimentación del avestruz (*Struthio camelus*), utilizando el gusano amarillo de la harina (*Tenebrio molitor* L.). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Mendoza, L. 2005. Estrategias alternativas de apareamiento en la mariposa *Heliconius charitonia*: Factores involucrados en la evolución del apareamiento pupal. Tesis de Doctorado. Xalapa, Veracruz. México.

Moret, Y. y Schmid-Hempel, P. 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, **10**, 1166-1168.

Moret, Y. y Siva-Jothy, M. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. Lond. ser. B.* **270**, 2475-2480.

Møller, A.P., Christie, P. y Lux, E. 1998. Parasitism, host immune function, and sexual selection. *Q. Rev. Biol.* **74**, 3-20.

Mucklow, P. y Ebert, D. 2003. Physiology of immunity in the water flea *Daphnia magna*: Environmental and genetic aspects of phenoloxidase activity. *Physiol. and Biochem. Zool.* **76**, 836-842.

Müller, U. 1997. The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology.* **51**, 363-381.

Nappi, A. y Ottaviani, E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, **22**, 469-480.

Nappi, A. y Christensen, B. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insects innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 443-459.

Osorio-Beristain, M. y Drummond, H. 1998. Non-aggressive mate guarding by the blue-footed booby: a balance of female and male control. *Behav. Ecol. and Sociob.* **43**, 307-315.

Parlange, P.P. 1991. Ciclo de vida de *Sandia xami* (Lepidoptera: Lycaenidae). Su biología y notas acerca de su cultivo en el laboratorio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Prokopy, R.J. y Papaj, D.R. 2000. Behavior of flies of the genera *Rhagoletis*, *Zonosemata* and *Carpomya*. Fruit flies (Tephritidae). En: Phylogeny and evolution of behavior. Ed. M. Aluja y Norrbom, A. L. Pp. 219-253.

Rantala, M., Koskimäki, J., Taskinen, J., Tynkkynen, K. Y Suhonen, J. 2000. Immunocompetence, developmental stability and wing spot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. *Proc. R. Soc. Lond. ser. B.* **267**, 2453-2457.

Radhika, M., Abdul, A., Munuswamy, N. y Nellaippan, K. 1998. Sex-linked differences in phenoloxidase in the fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* Baird and their possible role (Crustacea : Anostraca). *Hydrobiologia*, **377**, 161-164.

Reynolds, J.D. 1996. Animal breeding systems. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 68-72.

Rigby, M.C. y Jokela, J. 2000. Predator avoidance and immune defence: costs and trade offs in snails. *Proc. R. Soc. Lond. ser. B.* **276**, 171-176.

Rishan, C., Wenjie, S., Guangxing, L., Tingjun, F., Xianghong, M., Lingling, Y. y Liyan, Z. 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* **18**, 61-70.

Roberts, M.L., Buchanan, K.L. y Evans, M.R. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Anim. Behav.* **68**, 227-239.

Roff, D.A. 1992. *The evolution of life histories: theory and analysis*. Chapman and Hall.

Rolff, J. 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Can. J. Zool.* **79**, 2176-2180.

Rolff, J. 2002. Bateman's principle and immunity. *Proc. R. Soc. Lond.* **269**, 867-872.

Rolff, J. y Siva-Jothy, M. T. 2002. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9916-9918.

Santamaría, S. 2001. Los Laboulbeniales, un grupo enigmático de hongos parásitos de insectos. *Lazaroa*, **22**, 3-19.

Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defense as a question of evolutionary ecology. *Proc. R. Soc. Lond. ser. B.* **270**, 357-366.

Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Ann. Rev. Entomol.* **50**, 529-551.

Schuster, J.C. y Schuster, L.B. 1997. The evolution of social behavior in Passalidae (Coleoptera). En: Choe, J.C. y Crespi, B.J. (eds). *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. Cambridge University Press. Pp. 260-269.

Schwarzenbach, G., Hosken, D. y Ward, P. 2005. Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *J. Evol. Biol.* **18**, 455-463.

Scott, T.W. y Clutton-Brock, T.H. 1990. Mating systems, parasites and plumage dimorphism in waterfowl. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **26**, 261-274.

Semler, D.E. 1971. Some aspects of adaptative polymorphism for breeding colours in the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J. of Zool. (London)*, **165**, 291-302.

Siva-Jothy, M.T., Tsubaki, Y. y Hooper, R.E. 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiol. Entomol.* **23**, 274-277.

Siva-Jothy, M.T. 2000. A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proc. R. Soc. Lond. ser. B.* **267**, 2523-2527.

Söderhäll, K. y Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Op. Immunol.* **10**, 23-28.

Stearns, S. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press.

Steiner, H. 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Imm. Rev.* **198**, 83-96.

Stoehr, A.M. y Hill, G.E. 2001. The effects of elevated testosterone on plumage hue in male house finches. *J. Avian Biol.* **32**, 153-158.

Tavares. 1979. The laboulbeniales and their arthropod hosts. En: Batra, L.R. Insect-fungus symbiosis. Nutrition, mutualism and commensalism. John Wiley & Sons. N.Y. Pp. 229-258.

Thompson, J., Armitage, S. y Siva-Jothy, M. 2002. Cuticular colour change alter imaginal eclosion is time-constrained: blacher beetles darken master. *Physiol. Entomol.* **27**, 136-141.

Thornhill, R. 1980. Rape in *Panorpa* scorpionflies and a general rape hypothesis. *Anim. Behav.* **28**, 52-59.

Thornhill, R. y Alcock, J.1983. *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press. USA.

Torres, R. y Velando, A. 2005. Male preference for female foot colour in the socially monogamous blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Anim. Behav.* **69**, 59-65.

Trivers, R.L. 1972. Parental investment and sexual selection. En: Campbell, B. *Sexual selection an the descent of man*. Chicago. Pp. 136-179.

Tsubaki, Y. y Hooper, R. 2004. Effects of eugregarine parasites on adult longevity in the polymorphic damselfly *Mnais costalis* Selys. *Ecol. Entomol.* **29**, 361-366.

Tzou, P., De Gregorio, E. y Lemaitre, B. 2002. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Op. Microbiol.* **5**, 102-110.

Verhulst, S., Dieleman, S.J. y Parmentier, H.K. 1999. A trade-off between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *P. Nat. Ac. Sci.* **96**, 4478-4481.

Wachtmesiter, C. 2001. Display in monogamus pairs: a review of empirical data and evolutionary explanations. *Anim. Behav.* **61**, 861-868.

Weir, A., y Blackwell, M. 2005. Laboulbeniales: Intimate Associates of Arthropods. Insect-Fungal Associations. En: *Insect-fungal Associations: ecology and evolution*. Fernando E. Vega & Meredith Blackwell (Eds), Oxford University Press.

Weatherhead, P.J., Metz, K.J., Bennett, G.F. e Irwin, R.E. 1993. Parasite faunas, testosterone and secondary sexual traits in male red-winged blackbirds. *P. Nat. Ac. Sci.* **33**, 13-23.

Whitfield, J.B. 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. *Ann. Rev. Entomol.* **43**, 129-151.

Wharton , R.A. y Gilstrap, F.E. 1983. Key to and status of Opiinae Braconid (Hymenoptera) parasitoids used un biological control of *Ceratitis* and *Dacus s.l.* (Diptera : Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc-Am.* **76**, 721-746.

Wiklund, C. 2004. Sexual selection and the evolution of butterfly mating systems. En: Boggs, C.L., Watt, W.B. y Ehrlich, P.R. (eds). *Ecology and evolution taking flight: butterflies as model systems*. University Chicago Press. Pp. 67-90.

Worden, B., Parker, P, y Pappas, P. 2000. Parasites reduce attractiveness and reproductive success in male grain beetles. *Anim. Behav.* **59**, 543-550.

Worden, B. y Parker, P. 2005. Females prefer noninfected males as mates in the grain beetle *Tenebrio molitor*: evidence in pre- and post copulatory behaviours. *Anim. Behav.* 1047-1053.

Yourth, C., Forbes, M. y Baker, R. 2002. Sex differences in melanotic encapsulation responses (immunocompetence) in the damselfly *Lestes forcipatus Rambur*. *Can. J. Zool.* **80**, 1578-1583.

Zuk, M. 1990. Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. *Parasitol. Today*, **6**, 231-233.

Zuk, M. y McKean, K. 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int. J. of Parasitol.* **26**, 1009-1024.

Zuk, M. y Stoehr, A.M. 2002. Immune defense and host life history. *Am. Nat.* **160**, s9-s22.