



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Posibles conflictos de distribución de recursos entre  
respuesta inmune y reproducción en el grillo común  
Acheta domesticus Linnaeus (Insecta: Orthoptera)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**BIÓLOGA**

PRESENTA  
**Ana Priscila Bascuñán García**

TUTOR:  
**Dr. Alejandro Córdoba Aguilar**



**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# ÍNDICE

## RESUMEN

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Teoría de la distribución diferencial de recursos

#### 1.2 Respuesta inmune en Insectos

##### 1.2.1. Respuesta inmune vía encapsulación

#### 1.3 Formación del corion de los huevos

#### 1.4 Respuesta inmune y reproducción

#### 1.5 Biología de la especie

### 2. ANTECEDENTES

### 3. JUSTIFICACIÓN

### 4. HIPÓTESIS

### 5. OBJETIVO

#### 5.1. Objetivo general

#### 5.2 Objetivos particulares

### 6. MÉTODOS

#### 6.1 Producción de huevos

#### 6.2 Costo del apareamiento sobre la respuesta inmune

#### 6.3 Costo de la respuesta inmune sobre la producción de huevos

#### 6.4 Medición de melanina adherida al implante

#### 6.5 Conteo de huevos

#### 6.6 Análisis estadísticos

### 7. RESULTADOS

#### 7.1 Producción de huevos

#### 7.2 Costo del apareamiento sobre la respuesta inmune

#### 7.3 Costo de la respuesta inmune sobre la producción de huevos

### 8. DISCUSIÓN

### 9. PERSPECTIVAS

### 10. CONCLUSIONES

### 11. REFERENCIAS

## Resumen

La teoría de la distribución diferencial de recursos predice que, dado que los recursos son limitados para los organismos, éstos frecuentemente enfrentan compromisos de cómo distribuirlos para sus diferentes funciones vitales. La melanina es un polímero esencial para distintas funciones. En los insectos es importante para el desarrollo de estructuras clave como son la esclerotización y melanización de la cutícula y el corion de los huevos, la formación de caracteres sexuales en machos y la respuesta inmune. Cabe resaltar que la melanina es un recurso dependiente de la ingesta de alimentos. En este trabajo se evaluó experimentalmente la existencia de un compromiso de asignación de melanina entre el sistema inmune y dos aspectos de la reproducción del grillo común *Acheta domesticus*: el apareamiento y la oviposición. Los experimentos se dividieron en dos partes: (1) el costo del apareamiento sobre la respuesta inmune y (2) el costo de la respuesta inmune sobre la producción de huevos. Los individuos del primer experimento se dividieron en: hembras vírgenes y hembras apareadas. Ambos grupos fueron retados con un implante de nylon. Los resultados indicaron que las hembras que se aparearon melanizaron el implante en menor cantidad que las hembras vírgenes. Los individuos del segundo experimento se dividieron en tres grupos: control, reto con un implante y reto con dos implantes. Las hembras de los dos tratamientos siguieron estrategias muy diferentes. Las hembras expuestas a un implante produjeron más huevos incluso que las hembras expuestas a dos o ningún reto inmune (control), mientras que las hembras con dos implantes mantuvieron su producción de huevos por debajo que la del grupo control. Los resultados sugieren que las hembras invierten recursos tanto en la respuesta inmune como en el apareamiento y la oviposición, y que dicha inversión ocurre de manera diferencial para una u otra función.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Teoría de la distribución diferencial de recursos

La teoría de la distribución diferencial de recursos predice que, dado que los recursos son limitados para los organismos, éstos frecuentemente enfrentan compromisos sobre cómo distribuirlos a las diferentes funciones. Dichos compromisos o “trade-offs” son la base conceptual de la teoría de las historias de vida y un punto de vista para ver la evolución del crecimiento, reproducción y supervivencia (Stearns, 2000). Los compromisos que enfrenta un animal no son necesariamente de carácter energético. Fisiológicamente puede ocurrir que dos mecanismos se contrapongan en acción. Un ejemplo es el caso de la hormona juvenil en insectos. La evidencia sugiere que al mismo tiempo que la hormona juvenil promueve la actividad sexual, reduce la capacidad de respuesta inmune (Rantala et al., 2003). Asimismo, en libélulas, la oviposición desencadenó una menor habilidad inmunológica (Siva-Jothy et al., 1998). Aunque en estos casos los mecanismos entre ambas funciones son desconocidos, este tipo de compromisos, no contemplados por la teoría de la distribución diferencial de recursos, deben ser igualmente abordados.

La actividad del sistema inmune está directamente correlacionada con la supervivencia del individuo (Revisado por Schmidt-Hempel, 2005). Dado que ciertos recursos limitados pueden ser invertidos en la defensa, otras funciones de la historia de vida del individuo (Fellowes et al., 1998; Sheldon & Verhulst, 1996) se ven limitadas. Así, en *Drosophila melanogaster*, Fellowes et al. (1998) al seleccionar líneas resistentes al endoparásitoide *Leptopilina boulardi* encontraron que ante un aumento en la resistencia de las larvas de un grupo experimental, hubo una reducción en la

supervivencia a nivel de competencia intraespecífica por el alimento. Por otro lado, en *Aedes aegypti* varios grupos fueron inyectados con distintos antígenos artificiales. El grupo que fue inyectado con esferas de sephadex, mostró una reducción significativa en su fecundidad (medida en número de huevos). Los autores sugieren que el costo puede estar ocurriendo durante el reconocimiento del agente extraño y la activación de la respuesta inmune o que el animal está comprometiendo directamente la melanina usada para elaborar huevos con aquella utilizada para la respuesta inmune (Schwartz & Koella, 2004).

La melanización es uno de los procesos inmunológicos que los insectos usan para combatir patógenos de gran tamaño. La melanina, pigmento básico en el proceso de melanización, es sintetizada a partir de la tirosina, un aminoácido que puede ser ingerido directamente de la dieta del animal, o ser sintetizado mediante el catabolismo de la fenilalanina (Stoehr, 2006). Varias funciones vitales de los insectos requieren de melanina. Este polímero es esencial para la esclerotización y melanización en procesos como la formación de la cutícula y el corion de los huevos. Dada la contribución de la melanina a distintas funciones y en el desarrollo de estructuras clave en los insectos, y por ser un recurso dependiente de la ingesta de alimentos, este polímero es un componente idóneo para poner a prueba la teoría de la distribución diferencial de recursos.

## **1.2 Respuesta inmune en Insectos**

Los insectos presentan una respuesta inmune innata, la cual se caracteriza por ser inmediata e inespecífica. Inmediata se refiere a que comienza a actuar en cuanto el patógeno entra en contacto con el organismo; e inespecífica, a que no hay una serie de moléculas antígeno-anticuerpo como en el caso del sistema inmune adquirido en

vertebrados. La respuesta inmune innata se ha dividido en tres tipos: barreras físicas, respuesta humoral y respuesta celular. Sin embargo, esta división es arbitraria ya que existe un alto grado de interacción entre ellas (Lavine & Strand, 2001). Las barreras físicas como lo son la cutícula (exoesqueleto), el integumento y la mucosa intestinal y traqueal (Christensen, 2005) son la primera forma de defensa de los insectos. Los agentes que logran pasar estas barreras, entran en contacto, primero con el epitelio que produce principalmente péptidos antimicrobianos (AMP) y posteriormente con la cavidad del hospedero (hemocele), y con todos los componentes circulantes en la hemolinfa, los cuales forman parte de la respuesta inmune humoral y celular del insecto. En la respuesta inmune humoral está implicada la producción de AMP que atacan bacterias gram-negativas, gram-positivas y hongos (Christensen et al., 2005), así como la cascada de la fenoloxidasa (FO). La respuesta celular está dada por las células de la hemolinfa (hemocitos) que incluyen procesos como la formación de nódulos, fagocitosis, y encapsulación. La formación de nódulos consiste en microagregados de múltiples hemocitos que atrapan un gran número de bacterias, y que posteriormente son melanizados y removidos de la circulación. La fagocitosis ocurre cuando se trata de partículas bióticas o abióticas pequeñas (<10  $\mu\text{m}$  de diámetro) como bacterias, mientras que la encapsulación rodea y melaniza partículas de mayor tamaño (Karp, 1990; Gillespie, 1997; Lavine & Beckage, 1995; Fig.1).

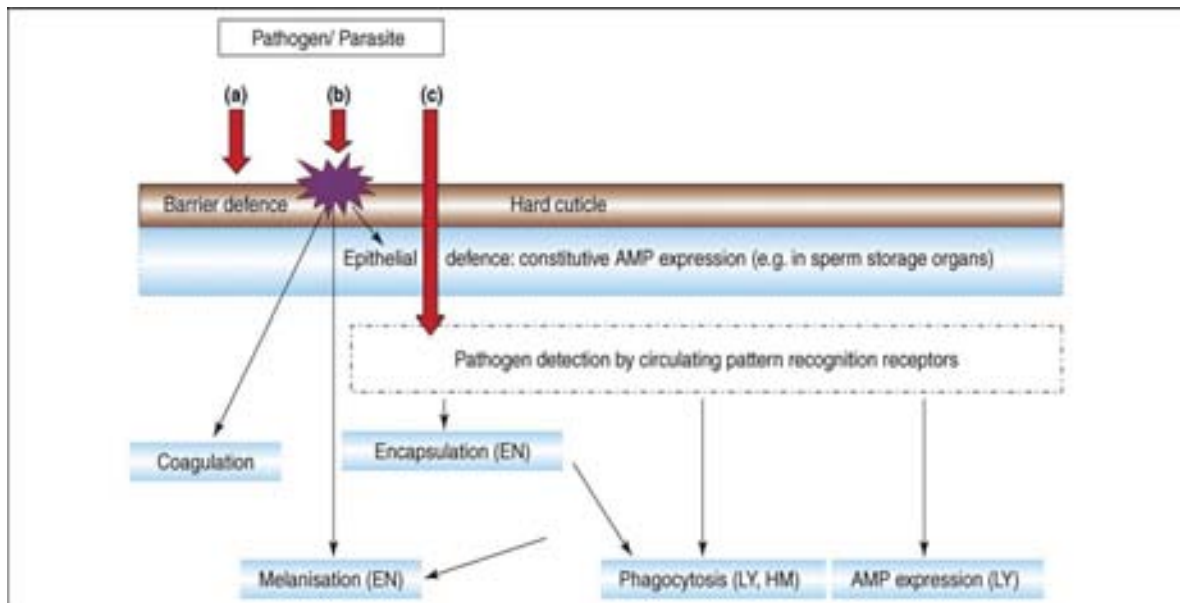


Fig. 1. Esquema general de respuesta inmune de artrópodos. Las flechas rojas representan los niveles de intromisión de un patógeno en el hospedero: (a) barreras físicas, (b) contacto con epitelio y (c) contacto con hemolinfa. Los cuadros azules representan la respuesta inmune que ocurre en cada caso. Tomado de Lawniczak et al., (2007).

### 1.2.1 Respuesta inmune vía encapsulación

La encapsulación sirve como forma de defensa contra parásitos protozoarios y metazoarios, hongos (Gillespie et al., 1997, Lavine & Strand, 2002) y parasitoides como huevos o larvas de avispas (Brennan & Anderson, 2004). Además, también parece ser utilizada ante agentes artificiales como filamentos de nylon (Lawniczak, et al., 2007; Rantala et al., 2002 y 2003; Rantala & Roff, 2007; Siva-Jothy, 1998), esferas de cromatografía (Lavine & Strand, 2002), de sephadex (Adamo, 1999; Schwartz & Koella, 2004), de latex (Gillespie et al., 1997) y de vidrio (Schwartz & Koella, 2004). La encapsulación parece ser igualmente equivalente tanto para retos vivos como no vivos (Rantala & Roff, 2007).



El proceso de encapsulación comienza una vez que el patógeno entra en contacto con la hemolinfa. Los hemocitos se aproximan a éste, lo rodean y se adhieren a él, formando una cápsula de varias capas. Los hemocitos de la capa más interna comienzan el proceso de melanización, del cual se generan componentes citotóxicos que probablemente contribuyen a la muerte del patógeno, además de la falta de oxígeno (asfixia), nutrientes y el detenimiento de su crecimiento (Cerenius & Söderhall, 2004; Gillespie et al., 1997; Lawniczak et al., 2007).

La actividad de la FO es clave en la ruta de la melanización. La FO es una enzima que está presente en la hemolinfa de los insectos en su forma inactiva como pro-feniloxidasas (proFO o PFO) y que se activa cuando reconoce un agente extraño o la formación de una herida (Barillas-Mury, 2000; Christensen et al., 2005). En su forma activa, la enzima FO cataliza la hidroxilación de la tirosina a dopa, ésta a dopaquinona y posteriormente a indolequinona, transformándose finalmente en eumelanina mediante reacciones no enzimáticas (Christensen et al., 2005). Al mismo tiempo, ocurre una descarboxilación que da como resultado la formación de dopamina que, mediante una ruta de oxidación, también resulta en melanina (Barillas-Mury, 2000, Christensen, et al., 2005).

### **1. 3 Formación del corion de los huevos**

En insectos el corion del huevo corresponde a la parte más externa que rodea al embrión durante su desarrollo. En grillos, el corion de los huevos es una estructura multilaminar en la que cada capa varía sus componentes no sólo en apariencia, sino también en su histoquímica y composición (Furneau, et al., 1969).

El proceso de formación del corion en insectos comienza una vez que el oocito ha llegado a su máximo tamaño. Los huevos que tienen el corion completo son liberados de los folículos a un reservorio donde permanecen atados, mediante un músculo, a la base de los oviductos laterales hasta que atraviesan la vagina para ser fertilizados y ovipositados (Beament, 1946). Los huevos de muchos insectos y otros grupos de artrópodos son melanizados (Cerenius & Söderhäll, 2004). Estudios con *Aedes aegypti* mostraron que cuando los huevos de esta especie son ovipositados, llevan una carga de proFO, que se activa y comienza el proceso de melanización, pasando de color blanco a café/negro en tan sólo 1.5 hrs post-oviposición (Li & Li, 2006). De igual forma, en el huevo de *Locusta migratoria* y *Locustana pardalina* (Orthoptera) se encontró tanto la tirosinasa (FO) como el sustrato necesario para la formación de melanina (Jones, 1956). Si bien la melanina no está siendo depositada directamente por la hembra al producir los huevos, la hembra sí está destinando los recursos necesarios (el precursor: tirosina y la enzima: proPO) para que se lleve a cabo la síntesis del pigmento una vez que los huevos se encuentren en el exterior.

#### **1.4 Respuesta inmune y reproducción**

Dados los compromisos fisiológicos, el inicio de la reproducción genera disyuntivas en un animal; que hacen que se invierta en la reproducción más que en otras funciones, incluyendo la respuesta inmune. Esto explica los resultados de experimentos en varias especies donde se han bloqueado los mecanismos hormonales que promueven la cópula, y la respuesta inmune ha mejorado (e.g. Rolff & Siva-Jothy, 2005).

## 1.5 Biología de la especie

La especie de estudio es el grillo común *Acheta domesticus* Linnaeus (Insecta: Orthoptera). Pertenece al suborden Ensífera, cuyos machos presentan un tipo de estridulación ala-ala. (Nayar et al., 1976). El grillo común tiene un desarrollo paurometábolo, es decir un desarrollo incompleto (huevo, ninfa, adulto o imago; Fig. 2). El desarrollo comienza con el huevo, a partir del cual se desarrolla la ninfa que es idéntica en forma al adulto pero difiere en tamaño y carece de alas y órganos reproductores. Los huevos de *Acheta domesticus* son casi cilíndricos con bordes redondeados, miden aproximadamente 2.5 mm de largo y 0.3 mm de diámetro (Furneaux et al., 1969). Los huevos tardan de 13 a 14 días en eclosionar. En un tiempo de aproximadamente 40-50 días las ninfas pasan por 5 instar antes de ser adultas. Los adultos en cautiverio pueden sobrevivir aproximadamente 60 días, mientras que en condiciones naturales viven menos de 40 días. Las hembras son sexualmente receptivas después de 4 días de haber alcanzado la etapa adulta, pero comienzan la conducta de oviposición solo después de 12-14 días de adulto (Murtaugh & Delinger, 1985).

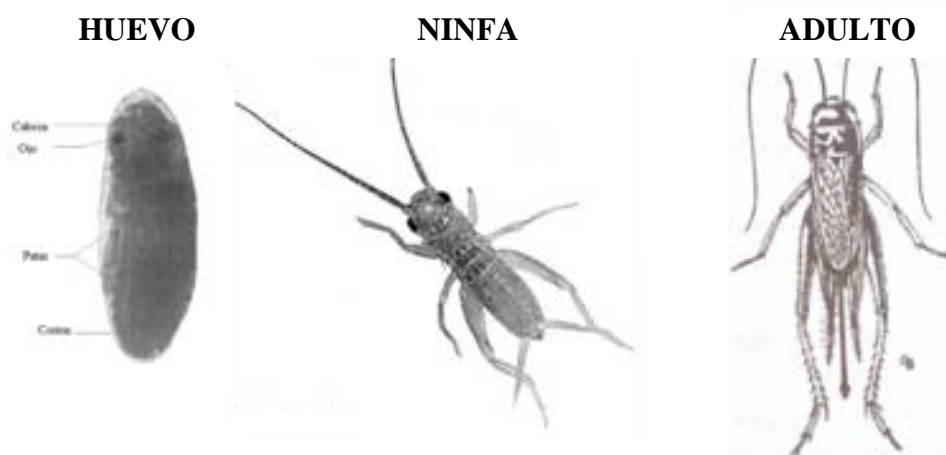


Fig 2. Diferentes estadios de vida del grillo común *Acheta domesticus*. (Tomada y modificada de [www.microscopy-uk/.../rs-cricket.html](http://www.microscopy-uk/.../rs-cricket.html)).

Durante la cópula, el macho le transfiere un espermátforo a la hembra, y ésta lo almacena en la espermateca hasta el momento de la oviposición (Guillot, 1995). La oviposición depende de algunos factores como el hecho de que haya o no apareamiento. En esta especie, la hembra retiene los huevos maduros hasta que copula y es entonces cuando el macho le proporciona grandes cantidades de guanosa monofosfato (GMP) cíclico y prostaglandinas que estimulan la conducta de oviposición en la hembra (Destephano et al., 1974, Murtaugh et al., 1985). Incluso se ha visto que con una sola cópula las hembras pueden ovipositar durante toda su vida. (Murtaugh & Delinger, 1985). Otro factor que influye es la presencia de un sustrato con características de dureza y humedad apropiadas para la oviposición (Murtaugh & Delinger, 1985; Shoemaker et al., 2006).

*Acheta domesticus*, es una especie fácil de mantener en condiciones de insectario ya que requiere de poco espacio y alimento. Además, al ser una especie omnívora no presenta problemas en cuanto al tipo de alimentación. Así mismo, tienen una reproducción de tipo activa y continua (Murtaugh & Denlinger, 1985), lo que permite hacer mediciones constantes y, ya que cada instar del estadio ninfal dura aproximadamente 8 días, se pueden observar cambios a lo largo de su ciclo vital.

## 2. ANTECEDENTES

Existen trabajos en donde se ha observado un compromiso entre reproducción y respuesta inmune. En algunos de ellos se manipula la reproducción con el fin de encontrar cambios a nivel de respuesta inmune, y en otros se manipula la respuesta inmune para observar cambios en la reproducción. Deerenberg et al (1997) demostraron que un aumento en el esfuerzo reproductivo en *Taeniopygia guttata* puede resultar en la disminución en la inmunocompetencia. Así mismo, Siva-Jothy et al, (1998) demostraron que cuando los caballitos del diablo *Matrona bailaris japonica* se vuelven reproductivamente activos disminuyen su capacidad de respuesta inmune por encapsulación. Por otro lado Ferdig et al (1993) encontraron que el mosquito *Armigeres subalbatus* puede encapsular y matar más del 80% de la microfilaria *Brugia malayi* pero se afecta su éxito reproductivo. Fellowes et al. (1998) encontraron que *D. melanogaster* puede encapsular exitosamente a un parasitoide pero reduce su fecundidad. En el grillo común *Acheta domesticus*, se ha visto que al estimular la respuesta inmune con larvas de *Ormia Ochracia*, una mosca parasitoide natural del grillo, y con implantes de nylon, hay una disminución significativa en la producción del número de huevos (Adamo, 1999; Canales-Lazcano, 2007).

En esta tesis he examinado los efectos de los costos de la reproducción sobre la respuesta inmune y de la respuesta inmune sobre la producción de huevos, en el grillo común; *A. domesticus*. Se esperaba incitar que el uso de la melanina se viera comprometido tanto para la respuesta inmune como para la producción y puesta de huevos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Algunos de los estudios que se han realizado con encapsulación, sugieren que la melanina está implicada en el compromiso entre respuesta inmune y reproducción (e.g. Canales-Lazcano, 2007). Sin embargo, no se han hecho trabajos en donde se ponga a prueba la melanina tanto en la respuesta inmune como en la producción de huevos. Los estudios solo han medido una de las dos partes pero nunca ambas. En la presente tesis, se analizan las consecuencias de la reproducción en la respuesta inmune (otra función → respuesta inmune). Asimismo, se analiza el efecto de suministrar retos inmunológicos y sus consecuencias en la producción de huevos (respuesta inmune → otra función).

#### **4. HIPÓTESIS**

1. El apareamiento y, por consecuencia, la producción y puesta de huevos tendrán un efecto negativo sobre la respuesta inmune celular vía melanización de la hembra del grillo común.
  
2. La respuesta inmune (en términos de melanización), afectará negativamente la producción y puesta de huevos del grillo común.

## **5. OBJETIVO**

### **5.1. Objetivo general**

Investigar si existe un compromiso de asignación de melanina entre el sistema inmune y dos aspectos de la reproducción como son el apareamiento y la oviposición en el grillo común *Acheta domesticus*.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Determinar si el apareamiento y producción de huevos afecta la capacidad de respuesta inmune celular vía melanización en el grillo común.
2. Investigar cómo la respuesta inmune celular vía melanización antes y después de la última muda, afecta la producción de huevos en el grillo común.



## 6. MÉTODOS

### 6.1 Producción de huevos a lo largo del tiempo

Se obtuvieron ninfas donadas por el vivario de la UNAM Facultad de Estudios Superiores-Iztacala. Éstas se mantuvieron en el insectario del Instituto de Ecología de la UNAM, hasta la penúltima muda en una caja de madera (1m x 1m) con pedazos de cartón a manera de refugio. Se tuvieron con periodos de luz/oscuridad de 12 horas (utilizando una lámpara de 40 watts), temperatura  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  y una dieta *ad libitum* de agua y alimento enriquecido (50% dieta de gallina y 50% dieta de tortuga; R. Cueva de Castillo, comunicación personal). Una vez alcanzada la penúltima muda, cada hembra se colocó en un bote de plástico de 500 ml con las mismas condiciones de luz, temperatura y alimento que en la caja de madera. Estos individuos se revisaron diariamente hasta obtener la fecha de la última muda. A las dos semanas de esta fecha se colocó un macho por cada hembra, durante 3 días para luego introducir una caja de Petri con algodón plisado y humedecido como sustrato de oviposición. Estos tres días son suficientes para que la pareja copule (Canales-Lazcano, 2007). El sustrato se cambió cada 5 días y se conservó en etanol al 70% para un posterior conteo de los huevos puestos. De igual forma, cada 5 días se sacrificaron 5 hembras de la misma edad y se conservaron junto con los algodones en etanol al 70%. Así, por ejemplo, el primer grupo de individuos sacrificados consistió en 5 hembras de 23 días de edad adulta (15 días de maduración sexual, 3 días de exposición al macho y 5 días de oviposición), mientras que un segundo grupo consistió en hembras de 28 días de edad adulta con el fin de que tuviera 5 días más de oviposición antes de ser sacrificada. De esta manera, y de forma sucesiva, se fueron sacrificando grupos de 5 hembras cada una con 5 días más de oviposición hasta la muerte de las últimas hembras. Esto con el fin de contar los huevos presentes en el interior de la hembra a distintas edades.

## **6.2 Costo del apareamiento sobre la respuesta inmune.**

*A. domesticus* fueron mantenidos bajo las condiciones ambientales para el cultivo de (luz, temperatura y alimento) ya anteriormente descritas, hasta que los organismos alcanzaron la madurez sexual. Las hembras se separaron de manera individual en botes de plástico de 500 ml con alimento y agua *ad libitum*, anotándose la fecha de última muda. A los 15 días de haber alcanzado el estadio adulto, se hicieron dos grupos al azar de 15 hembras cada uno. A cada uno de los botes de hembras del primer grupo se le agregó un macho el cual se dejó por 3 días con ella bajo las mismas condiciones y pasados los 3 días se retiró el macho y se colocó el sustrato de oviposición. El segundo grupo no fue expuesto a los machos. Esta diferencia entre los dos grupos daría un grupo de hembras apareadas y otro de vírgenes respectivamente.

Pasadas tres semanas, se aplicó un reto inmunológico a cada hembra de ambos grupos. El reto consistió en la inserción de un implante de nylon de 2 mm de largo y 0.1 mm de diámetro (previamente desinfectado en etanol al 100%) en las partes más blandas y laterales del abdomen (terguitos), procurando una dirección paralela al exoesqueleto para evitar dañar los órganos internos del animal (Canales-Lazcano, 2007). El implante desencadena una respuesta inmune vía melanización; un método que se ha usado ampliamente en estudios de ecología de la respuesta inmune (e.g. Rantala & Roff, 2007). El implante se dejó dentro de la hembra aproximadamente 30 horas para después retirarlo y fijarlo en etanol al 70% (ver Canales-Lazcano, 2007).

## **6.3 Costo de la respuesta inmune sobre la producción de huevos**

Se obtuvieron ninfas del vivario de la UNAM Facultad de Estudios Superiores-Iztacala y se mantuvieron en condiciones ambientales ya descritas. Se hicieron tres grupos de 80 hembras, cada una en su estadio ninfal y seleccionadas al azar: primer tratamiento,

segundo tratamiento y control. A cada una de las hembras del primer tratamiento se le insertó un implante (primera inserción: A) (ver 6.2). Cada hembra se colocó de manera individual en un bote de plástico de 500 ml bajo las mismas condiciones. A cada una de las hembras del segundo tratamiento se le insertaron dos implantes A (uno a cada lado). Y el último grupo de hembras se usó como control al no tener ningún implante. En los dos tratamientos, el implante se dejó por 30 horas aproximadamente y se retiró para fijarlo en etanol al 70%. Pasados 15 días se insertó una segunda ronda de implantes (segunda inserción: B) a ambos tratamientos (un implante para el grupo de un implante y dos implantes para el grupo de dos implantes), los cuales se dejaron por 30 horas y retiraron para fijarlos en etanol al 70%. Se anotó la fecha de última muda al estadio adulto y a los 15 días a cada hembra se le colocó un macho a cada hembra por 3 días. Pasados los tres días se retiró el macho y se colocó sustrato de oviposición (algodón plisado en una caja Petri). A partir de ese día se fue cambiando el algodón cada 5 días y se colocó en etanol al 70%. Se midió la cabeza, tórax y fémur III de todas las hembras. Se hizo una correlación de Pearson para determinar si cualquiera de las tres medidas podría ser utilizada como indicador del tamaño. Dado que las tres medidas corporales se correlacionaron entre sí (cabeza/fémur:  $r = 0.706$ ,  $P = 0.001$ ,  $N = 61$ ; tórax/fémur:  $r = 0.789$ ,  $P = 0.001$ ,  $N = 61$ ; cabeza/tórax:  $r = 0.861$ ,  $P = 0.001$ ,  $N = 61$ ) decidí elegir el fémur III por ser el valor más utilizado en otros trabajos (e.g. Hatle et al., 2002; Nosil, 2002). Este indicador de tamaño fue utilizado en los análisis estadísticos con el fin de ver si las diferencias en número de huevos puestos pueden ser explicadas por esta variable.

#### **6.4 Medición de melanina adherida al implante**

Para obtener los datos correspondientes a la cantidad de melanina adherida al implante en ambos experimentos, se tomaron fotografías con una cámara digital (Olympus C-5050 y Olympus DP12) bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZH10) para posteriormente cuantificar la melanina depositada alrededor del implante mediante un programa para medir imágenes (Image tool 3.0). La melanina, al ser un pigmento es fácil de reconocer ya que presenta un color café/negro (Christensen, 2005, Stoehr, 2006). La medición se llevó a cabo registrando las áreas oscurecidas alrededor del implante. Para estimar el área cubierta por melanina se tomaron tres fotos de cada uno de 20 implantes. Se compararon estas tres medidas usando correlaciones de Pearson, y el resultado fue una correlación positiva muy estrecha entre la primera y segunda medición ( $r = 0.829$ ,  $p = 0.003$ ), la primera y tercera medición ( $r = 0.776$ ,  $p = 0.008$ ) y la segunda y tercera ( $r = 0.910$ ,  $p = 0.001$ ). Esto sugiere que la medición de cada implante no varía de acuerdo a la posición del implante y que con una medición basta para obtener un valor confiable de melanina.

#### **6.5 Conteo de huevos**

##### *Huevos retenidos*

Las hembras que fueron sacrificadas para contar el número de huevos internos, se disectaron con la ayuda de dos pinzas de microcirugía bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZX7). La disección se realizó separando el abdomen del resto del cuerpo, para así exponer los dos ovarios con sus respectivas ovariolas, en donde están contenidos los huevos (Fig. 3). El valor del número de huevos se obtuvo con la ayuda de un contador manual (marca Barrilito modelo B-410).

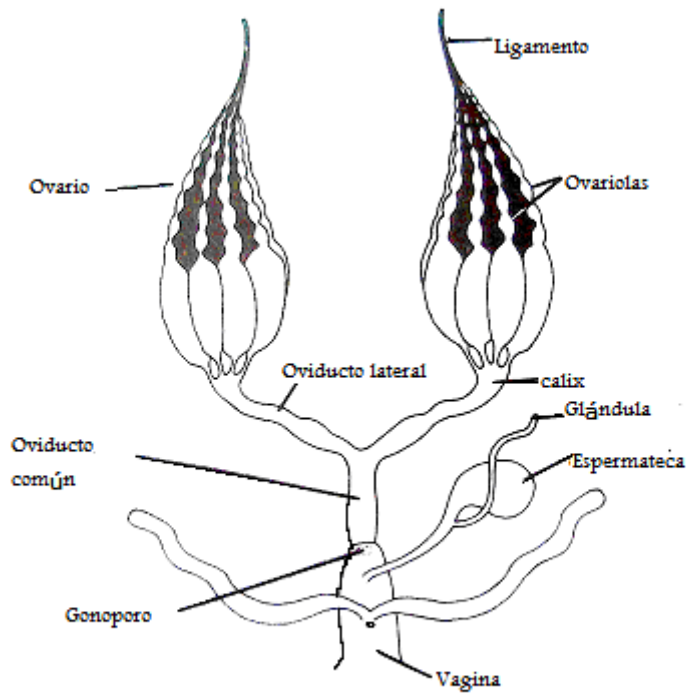


Fig.3. Aparato reproductivo femenino de insectos. Tomado de Borrór, 1971.

### *Huevos puestos*

Con el mismo contador manual se hizo un registro del número de huevos puestos por las hembras de ambos experimentos. Cada algodón correspondió a un periodo de cinco días consecutivos de oviposición.

### **6.6 Análisis estadísticos**

Todos los datos fueron previamente analizados con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Esta prueba indicó normalidad en los residuales de todos los datos excepto los datos de huevos puestos y de melanización en los dos tratamientos. De los datos obtenidos de producción de huevos en los tres grupos (0, 1 y 2 implantes), se seleccionaron los diez primeros datos (cada uno equivalente a cinco días de puesta) para homogenizar las muestras. Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa SPSS

versión 15.0, excepto las pruebas de medidas repetidas las cuales se hicieron en STATISTICA versión 7.0 y las transformaciones de datos que se hicieron mediante JMP versión 6.0.

Con los datos de producción de huevos a lo largo del tiempo, se hicieron correlaciones para observar la variación de huevos retenidos y huevos puestos en el tiempo (50 días).

Para el experimento de costo del apareamiento sobre la respuesta inmune se comparó el porcentaje de melanina presente en los retos inmunes del grupo de 1 implante y el de 2 implantes, mediante una prueba de t-Student.

Para determinar si existían diferencias en tamaño entre los diferentes grupos (0, 1 y 2 implantes) se hizo un análisis de varianza. Los datos de producción de huevos en los tres grupos (control, 1 y 2 implantes) se analizaron con un modelo general lineal de medidas repetidas para comparar la producción de huevos puestos por los tres grupos a lo largo del tiempo (50 días), incluyendo el valor de fémur III como covariable. Además, para determinar las diferencias en la cantidad de melanina presente en los implantes según en orden de inserción (A o B) en y entre tratamientos (1 y 2 implantes) se hizo un análisis de varianza de medidas repetidas y una prueba de Tukey.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Producción de huevos

El número de huevos retenidos ( $248.50 \pm 28.863$ ), correlacionó positivamente con la edad de la hembra ( $r = 0.307$ ,  $P < 0.05$ ,  $N = 50$ ; Fig. 4). Así mismo, los huevos puestos correlacionaron negativamente con el tiempo de puesta ( $157.86 \pm 9.439$ ;  $r_s = -0.262$ ,  $P = 0.0001$ ,  $N = 263$ ; Fig. 5).

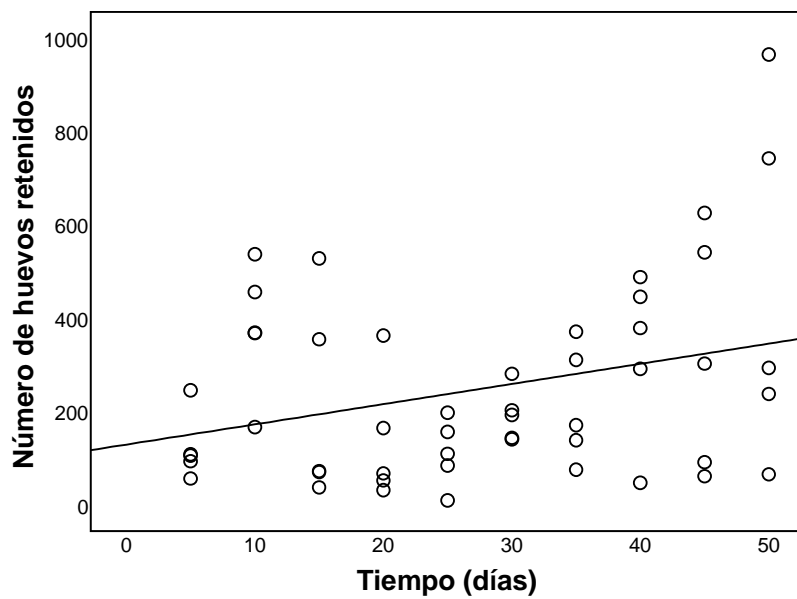


Fig. 4. Relación entre el número de huevos retenidos por las hembras a lo largo del tiempo.

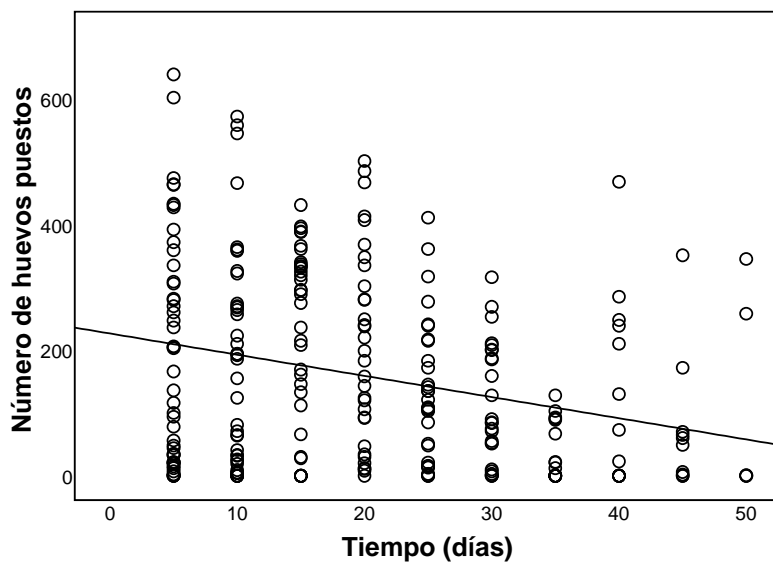


Fig. 5. Relación entre el número de huevos puestos (valores acumulados) con el tiempo.

## 7.2 Costo del apareamiento sobre la respuesta inmune

Se encontraron diferencias significativas ( $t_{21} = -2.237$ ,  $P = 0.036$ ) en el porcentaje de melanina medida en implantes de hembras apareadas ( $2.01 \pm 0.409$ ) y hembras vírgenes ( $4.15 \pm 0.961$ ), donde las segundas depositaron más melanina en los implantes que las primeras (Fig. 6).

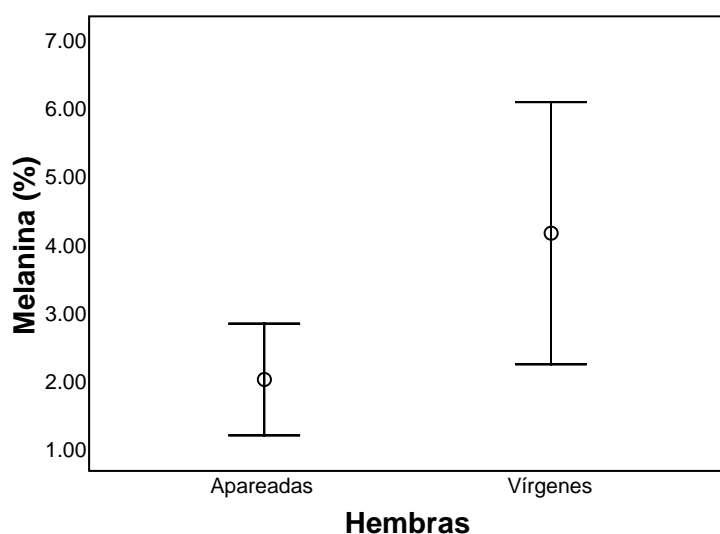


Fig. 6. Diferencia en el porcentaje de melanina depositada en el implante de nylon entre hembras apareadas y vírgenes. Las barras indican medias  $\pm$  error estándar.

## 7.3 Costo de la respuesta inmune sobre la producción de huevos

No hubo diferencias significativas entre los tamaños corporales (control:  $0.300 \pm 0.004$ ; 1 implante:  $0.311 \pm 0.004$ ; dos implantes:  $0.301 \pm 0.004$ ) de los individuos de los diferentes grupos ( $F_{2, 36}=1.276$ ,  $P = 0.291$ ).

Se encontraron diferencias significativas en el número de huevos puestos a lo largo del tiempo entre las hembras de los tres grupos (control, uno y dos implantes) (Cuadro 1; Fig. 8).



	SS	df	MS	F	p
Femur	138353	1	138352.8	2.237892	0.146705
Tiempo	88475	9	9830.5	0.926620	0.502627
Tiempo*Femur	154488	9	17165.4	1.617994	0.110858
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	<b>391247</b>	<b>18</b>	<b>21735.9</b>	<b>2.048814</b>	<b>0.008428</b>
Error	2482515	234	10609.0		

Cuadro 1. Resultados obtenidos a partir del modelo general lineal de medidas repetidas.

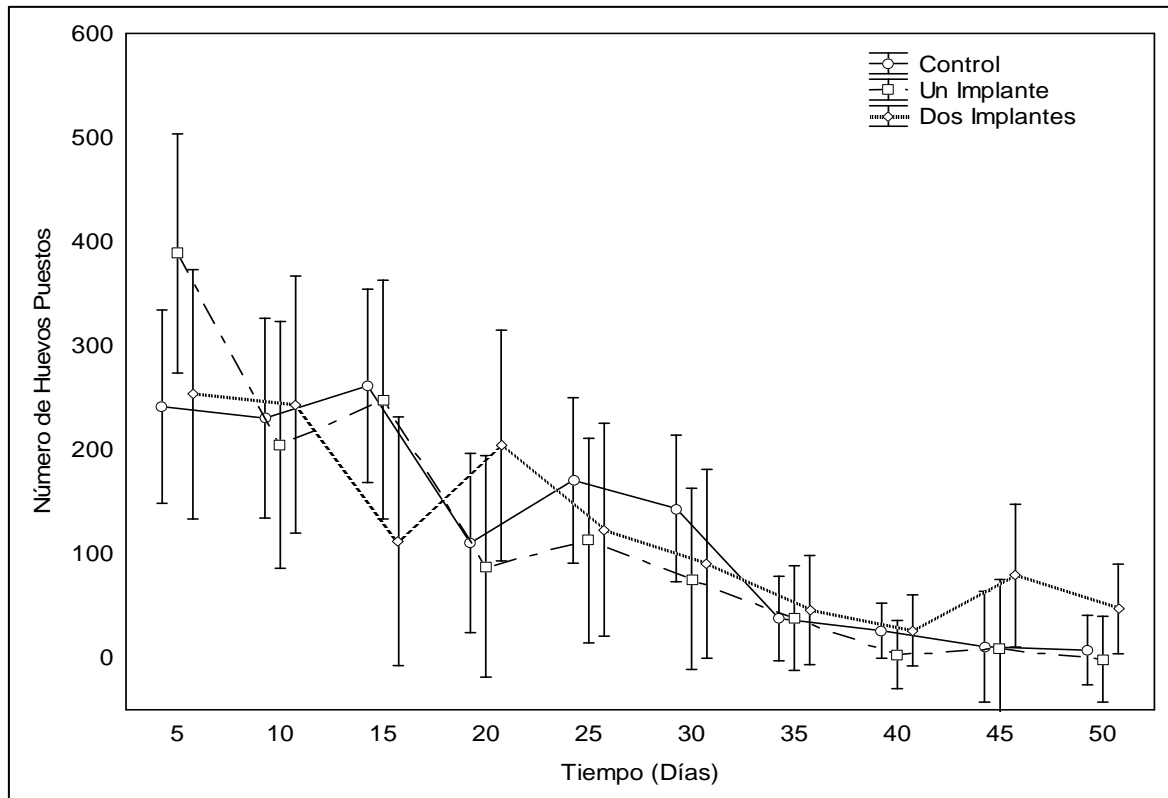


Fig. 8. Relación del número de huevos puestos por los individuos del grupo control y los tratamientos (1 y 2 implantes) a lo largo del tiempo.

El análisis de varianza de medida repetidas con los datos de melanización de implantes, arrojó diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{1, 32} = 12.703$ ,  $P = 0.001$ ). Hubo diferencias significativas entre el porcentaje de melanina presente en el implante A ( $15.01 \pm 2.16$ ) y el implante B del primer tratamiento ( $24.09 \pm 3.50$ ) (Prueba de Tukey,  $P = 0.0001$ ) y de los implantes A ( $25.22 \pm 3.88$ ) y B ( $40.80 \pm 6.21$ ) (Prueba de Tukey,  $P = 0.0001$ ) del segundo tratamiento. Esto indicó que la segunda vez las hembras melanizaron más que la primera. No hubo diferencias significativas entre los implantes

A, pero si entre los implantes B de ambos tratamientos (Prueba de Tukey,  $P = 0.019$ ; Fig. 7).

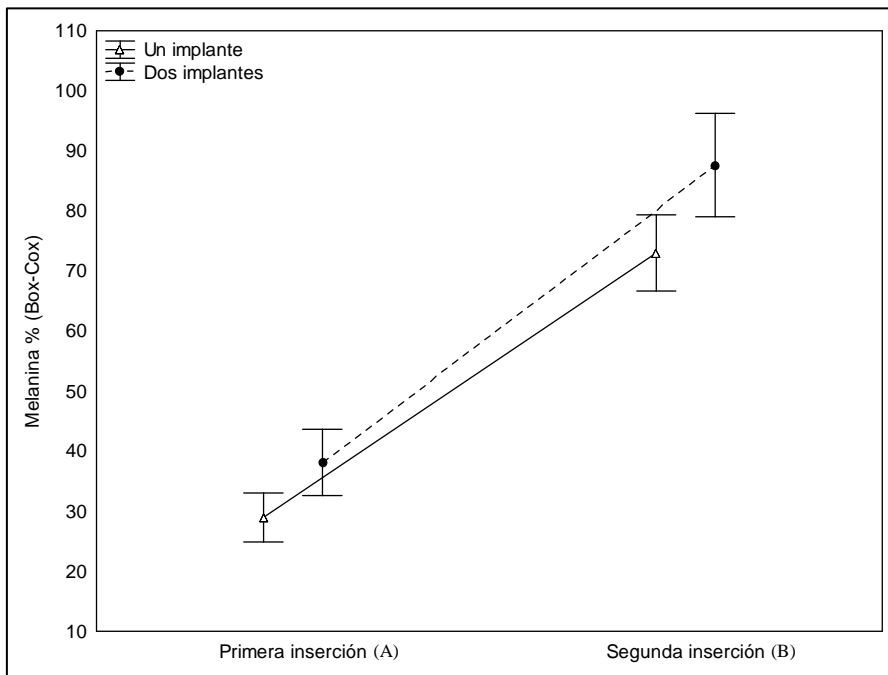


Fig. 7. Comparación del porcentaje de melanina (Box-Cox) presente en los implantes según el orden de inserción (A y B) en ambos tratamientos (uno y dos implantes). Las barras indican medias  $\pm$  error estándar.

## 8. DISCUSIÓN

Este estudio pretende entender si hay o no un compromiso entre la respuesta inmune dos aspectos de la reproducción en el grillo común *Acheta domesticus*, asumiendo que la melanina es un recurso limitante y participa en ambos procesos.

Los resultados indicaron que existe un costo de producción de huevos, que se puede ver reflejado a nivel de melanización. Las hembras que se aparearon melanizaron menos el implante en comparación con las hembras vírgenes. Esto indicaría que las hembras apareadas invirtieron recursos continuamente hacia la producción de huevos disminuyendo su capacidad de respuesta inmune. Estudios con el grillo *Allonemobius*

*socius* mostraron que, posterior al apareamiento, las hembras tuvieron reducciones significativas en la carga de hemocitos, actividad lítica y encapsulación (Fedorka et al., 2004). En el caso de las hembras vírgenes, aunque también tuvieron un costo inicial de producción de huevos, éstos pudieron haber sido reabsorbidos al no haber apareamiento (Denlinger et al, 1978; Guillot, 1995). De manera que los recursos inicialmente destinados a la producción de huevos (dentro de ellos la tirosina y la enzima FO) pueden ser reutilizados por las hembras vírgenes en otras funciones, como en este caso, al sistema inmune.

Un mecanismo que pudiera explicar la inversión de recursos hacia una función u otra es el efecto inmunosupresivo que puede tener el fluido seminal o el regalo nupcial del macho sobre la hembra (Fedorka et al., 2004). Parte del fluido seminal del macho está conformado por péptidos que estimulan la producción de la HJ, que es sintetizada en el *corpora allata* de los insectos, con efectos positivos sobre la reproducción, como aumentar la producción y deposición de huevos; pero que también tiene efectos negativos en otras características como la supervivencia, longevidad, resistencia al estrés e inmunidad del insecto (Flatt et al., 2005). Rantala et al (2003) demostraron que en la especie *Tenebrio monitor*, la HJ disminuye la actividad de la FO y la melanización. De acuerdo con esto, las hembras vírgenes, al no aparearse, no tuvieron estímulo que aumentara la producción de HJ, evitando consecuencias negativas en la melanización. La HJ puede actuar como un mediador de los compromisos que ocurren entre las diferentes funciones del organismo (Flatt et al., 2005). En este caso, la HJ estaría provocando un desvío de recursos hacia la reproducción o la respuesta inmune.

Los resultados también indicaron que diferentes niveles de reto inmunológico desencadenan estrategias distintas de producción de huevos. En los tres grupos de hembras (control, 1 y 2 implantes) la cantidad de huevos puestos a lo largo del tiempo fue disminuyendo de la misma manera en la que indicaron las primeras observaciones de este trabajo. Sin embargo, el inicio de la reproducción varió significativamente entre tratamientos. Contrario a lo esperado, las hembras retadas con un implante mostraron una elevada producción de huevos desde el día 5 de puesta, incluso mayor que el grupo control. Esto puede deberse a que las hembras de este grupo tuvieron un reto de menor nivel, lo que quiere decir que tuvieron que dedicar menos recursos a respuesta inmune que las hembras del tratamiento de dos implantes. En este sentido, el reto fungió más como una “alerta”, que como un costo que provocara un compromiso entre las dos funciones.

En el caso de las hembras retadas con dos implantes la estrategia de producción de huevos se reflejó en la disminución de la oviposición desde los primeros días de puesta y permaneció siempre por debajo de los niveles de producción de huevos del grupo control. En este caso sí podríamos estar hablando de un compromiso de asignación de recursos, ya que, dado que el nivel de reto inmunológico fue mayor (el doble), el costo también aumentó y se vio reflejado a nivel de la reproducción.

El bajo número de huevos puestos se pudo deber a la falta de recursos indispensables para la buena formación del corion de los huevos como es la melanina que es esencial para evitar daños mecánicos en los huevos, como es la desecación y como se ha visto que ocurre en los huevos del mosquito *Aedes Aegypti* (Li & Christensen, 1993). Además, Zografou et al (2001) demostraron que la deficiencia de tirosina y fenilalanina en adultos de la mosca del olivo, lleva a una baja producción de huevos y a malformaciones del corion. Los resultados sugieren que en este caso las hembras dieron

prioridad a la respuesta inmune o, en otras palabras, a la supervivencia. Si la supervivencia está amenazada, como nos sugieren los resultados del grupo de dos implantes, en donde, al parecer, los retos fueron no solamente costosos sino devastadores, las hembras no tuvieron otra opción mejor que la de sobrevivir, y aquellas que lo lograron pudieron mantener la producción de huevos al máximo posible, de acuerdo con la cantidad de recursos disponibles.

Los resultados de ambos experimentos demuestran que sí existe un compromiso de asignación de recursos, ya sea directamente de melanina o indirectamente de enzimas y precursores, entre la respuesta inmune vía encapsulación melanótica y la producción de huevos en el grillo común *Acheta domesticus*, siempre y cuando el reto inmune sea lo suficientemente costoso.

Otro resultado interesante mostró que en ambos tratamientos, la primera vez que las hembras encapsularon el reto, destinaron menor cantidad de melanina que la segunda vez. Hay dos posibles explicaciones para estos resultados. La primera es la llamada respuesta anticipatoria o “priming” (Kurtz & Franz 2003) en el sistema inmune y sugiere que éste puede reaccionar mejor si los invertebrados han sido previamente expuestos a patógenos antigénicamente similares. Un caso similar fue descrito en el trabajo de Canales-Lazcano (2007) quien observó que grillos expuestos a un reto inmunológico aumentaron significativamente el grosor del exoesqueleto, no sólo más que el grupo de dos implantes sino que también más que el grupo control. En este caso el autor sugiere un tipo de respuesta anticipatoria ante futuros patógenos, destinando los recursos a aumentar el grosor del exoesqueleto de manera que se pueda impedir el cruce de patógenos a través de esta barrera física. Un posible mecanismo puede estar basado

en los AMP's que se producen de 1-4 horas después del reconocimiento del cuerpo extraño y pueden durar en la hemolinfa por hasta 3 semanas, lo cual es muy conveniente para encuentros subsecuentes con patógenos (Schmidt-Hempel, 2005). El "priming" también puede explicarse por un aumento en la producción de hemocitos después de la primera implantación (Little et al., 2004), específicamente lamelocitos que son los encargados de rodear el implante y producir melanina. Las avispas parasitoides activan la proliferación de hemocitos y la diferenciación de lamelocitos (ver Brennan & Anderson, 2004). Esto podría sugerir que el implante funciona en los grillos de *A. domesticus* como un estímulo similar al de la larva de una avispa parasítica (principal parasitoide de los grillos) y que probablemente esté activando la proliferación de lamelocitos también conveniente para futuras infecciones. Otra posible explicación; propuesta por algunos autores (Loehle, 1995; Moore, 2002) plantea que los organismos pueden modificar la expresión de ciertas conductas con el objetivo de evadir infecciones. Una conducta podría ser aumentar el consumo de alimento, sugiriendo que las hembras al tener una mayor ingesta de alimento, tiene una mayor cantidad de recursos (M. Moreno García, comunicación personal).

## **9. CONCLUSIONES**

1. Existe un compromiso de asignación de recursos entre el sistema inmune y la reproducción.

1.1 El apareamiento y producción de huevos afecta negativamente la capacidad de respuesta inmune celular vía melanización. Las hembras que tienen por lo menos un evento reproductivo, reducen su capacidad de melanizar el reto inmunológico.

1.2 La respuesta inmune celular vía melanización antes y después de la última muda reduce la frecuencia de oviposición en el grillo común, y el compromiso se ve reflejado en el grupo de dos implantes en donde la producción de huevos disminuyó desde el inicio del ciclo reproductivo. Un solo implante permite a las hembras llevar estrategias de supervivencia y reproducción distintas al grupo control.

## **10. PERSPECTIVAS**

Me parece importante probar si estas respuestas existen también bajo condiciones naturales ya que en los estudios de laboratorio las presiones de selección natural están ausentes.

Es importante abarcar los temas de distribución diferencial de recursos desde el punto de vista hormonal ya que muchos de los procesos fisiológicos están regidos por las hormonas. Para este caso me parece esencial hacer pruebas donde se manipule las concentraciones de HJ en las diferentes etapas de la vida del grillo y sobretodo durante su fase reproductiva.

Por otro lado, sería interesante hacer pruebas de supervivencia de los huevos de los tres grupos. Aunque más mediciones de efectos en la producción de huevos mostraron diferencias en número, otra variable importante a medir es el tamaño de los huevos, lo cual tiene que ver con la cantidad de nutrientes asignados y posible supervivencia para los huevos. Por ejemplo, esperaría que las hembras con un reto inmunológico agudo, destinaran más nutrientes a sus huevos.



## 11. REFERENCIAS

- Adamo, S.A. 1999. Evidence for adaptative changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour* 54: 117-124.
- Barillas-Mury C., B. Wizel., Y. S. Han. 2000. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model system and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 429-442.
- Beament J. W. L. 1946. The formation and structure of the chorion of the egg in an hemipteran, *Rhodnius prolixus*. Agricultural Research Council Unit of Insect Physiology, Cambridge: 393-439.
- Brennan C. A & K. V Anderson. 2004. *Drosophila*: The genetics of the innate immune recognition and response. *Annual Review of Immunology* 22: 457-472.
- Borror D. J. & D. W. DeLong. 1971. An introduction to the study of insects. Holt, Rinehart and Winston, New York. Pp. 812.
- Canales-Lazcano J. 2007. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas: Efectos de la respuesta inmune celular sobre algunos componentes de la adecuación en el grillo común *Acheta domesticus* Linnaeus (Insecta: Orthoptera). Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Cerenius L & K. Söderhall. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198: 116-126.
- Christensen B. M., J. Li, Ch. Chen., A. J. Nappi. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*. 21: 192-199.
- Denlinger D L, Chaudhury M F B, T. S. Dhadialla. 1978. Cyclic AMP is a likely mediator of ovulation in the tsetse fly. *Physiological Entomology* 6: 375 – 385.

Destephano D. B. Brady U. E. Lovins R. E. 1974. Synthesis of prostaglandin by reproductive tissue of the male house cricket, *Acheta domesticus*. *Prostaglandins* 6: 71-79.

Fedorka K. M., Zuk, M., Mousseau, T.A. 2004. *Evolution*, 58: 2478–2485.

Fellowes M D E, A R Kraaijeveld, H C J Godfray. 1998 Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 265: 1553-1558.

Flatt T, Tu M, Tatar M. 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *BioEssay* 27: 999-1010.

Furneaux P J S, James C R, Potter S A. 1969. The egg shell of the house cricket (*Acheta domesticus*): an electron-microscope study. *Journal of Cell Science* 5: 227-249.

Gillespie, J., M. Kanost & T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*. 42: 611-643.

Gray, D. A. 1997. Female house crickets, *Acheta domesticus*, prefer the chirps of large males. *Animal Behaviour*. 54: 1553-1562.

Guillot, C. 1995. Entomology. 2<sup>o</sup> ed. Plenum Press. USA. Pp. 798.

Hattle, J.D, Crowley M. C, Andrews A. L, Juliano S.A. 2002. Geographic variation of reproductive tactics in lubber grasshoppers. *Oecologia* 132: 517-523.

Jacot. A, Scheuber. H, Kurtz. J & Brinkhof. M. W. G. 2005. Juvenile immune status affects the expression of a sexually selected trait in field crickets. *Journal of Evolutionary Biology*. 18: 1060–1068.

Jones, B. M. 1956. Endocrine Activity During Insect Embryogenesis. Control of Events in Development Following the Embryonic Molt (*Locusta Migratoria* and *Locustana Pardalina*, Orthoptera). *Journal of Experimental Biology* 33: 685-696.

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

Lavine M D & Beckage N E. 1995. Polydnviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitology Today* 11: 368-378.

Lavine M D & Strand M R. 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudaletia includens*. *Journal of Insect Physiology* 47: 965-974.

Lavine M D & Strand M R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry Biology* 32: 1295-1309.

Lawnczak, M. K. N., Barnes, A. I., Linklater, J. R., Boone, J. M., Wigby, S., Chapman, T. 2007. Mating and immunity en invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 48-55

Li J, Christensen B M. 1993. Involvement of L-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23: 739-748.

Li, J.S, Li, J. 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 954-964.

Little T J & Kraaijeveld A R. 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19: 58-60.

Loehle C. 1995. Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. *Ecology* 76: 326-335

Moore J. 2002. Parasites and the behaviour of animals. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, New York.

Murtaugh, M.P & D. L. Denlinger. 1985. Physiological regulation of long-term oviposition in the house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology*. 31: 611-617.

Murtaugh, M.P., Kapoor C. L., Denlinger D. L. 1985. Extracellular localization of cyclic GMP in the house cricket male accessory reproductive gland and its fate in mating

*Journal of Experimental Zoology* 233: 413 – 423.

Nayar, K. K. Ananthakrishnan T. N., David, B. V. 1976. General and applied entomology. McGraw-hill, New delhi. Pp. 589.

Nosil, P. 2002. Food fights in house crickets, *Acheta domesticus*, and the effects of body size and hunger level. *Canadian Journal of Zoology*. 80(3): 409–417.

Rantala M. J. Jokinen I, Kortet R, Vainikka A, Suhonen J. 2002. Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings of Royal Society of London B*. 269:1681-1685.

Rantala M J, Vainikka A & Kortet R. 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone Production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of Royal Society of London B*: 270: 2257–2261.

Rantala M. J & Roff D. A. 2007. Inbreeding and extreme outbreeding cause sex differences in immune defences and life history traits in *epirrita autumnata*. *Heredity* 98: 329-336.

Rolff J & M. T. Siva-Jothy. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science* 301(5632):472-475.

Rolff J & M. T. Siva-Jothy. 2005. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. *Proceedings of Natural Academy of Sciences. USA*. 99, 9916-9918.

Sheldon B.C. & Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *TREE*. 11: 317-321.

Schmidt-Hempel P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of Royal Society of London B: review* 270: 357-366.

Schwartz, A & Koella, J. C. 2004. The cost of immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* depends on immune activation. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 834-840.

Shoemaker K. L., N. M. Parsons., S. A. Adamo. 2006. Egg-laying behaviour following infection in the cricket *Gryllus texensis*. *Canadian Journal of Zoology* 84: 412-418.

Simmons L. W. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton: Princeton University Press.

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

Stearns, S.C. 2000. Life history evolution: success, limitations and prospects. *Naturewissenschaften* 87:476-486

Stoehr, A. M. 2006. Costly melanin ornaments: the importance of taxon? *Functional Ecology* 20: 276-281.

Zografou E. N; Tsiropoulos G. J; Margaritis L. H. 2001. Effect of phenylalanine and tyrosine analogues on *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt., Tephritidae) reproduction. *Journal of Applied Entomology* 125: 365-369.