



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**
Instituto de Ecología

**EXPRESIÓN DE UN ORNAMENTO Y RESPUESTA INMUNE
ADAPTATIVA EN *HETAERINA AMERICANA* (ODONATA:
CALOPTERYGIDAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

DANIEL MATÍAS GONZÁLEZ TOKMAN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2009



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**
Instituto de Ecología

**EXPRESIÓN DE UN ORNAMENTO Y RESPUESTA INMUNE
ADAPTATIVA EN *HETAERINA AMERICANA* (ODONATA:
CALOPTERYGIDAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

DANIEL MATÍAS GONZÁLEZ TOKMAN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2009

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas.
- Al CONACYT por la beca otorgada (No. 227434).
- A los miembros de comité tutorial: Dr. Alejandro Córdoba Aguilar, M. en C. Enrique González Soriano, Dr. Humberto Lanz Mendoza.

Dedico esta tesis a Veri. ¡Por la pausa, hermano!

Agradezco a todos aquéllos que fueron importantes durante la realización de esta tesis:

A Alex Córdoba, por su dedicación como tutor, por el tiempo y la calidad de las asesorías, y por ser también amigo.

A mis sinodales, por su gran colaboración en esta tesis: Enrique González Soriano, Humberto Lanz Mendoza, Julio César Carrero Sánchez, Raúl Cueva del Castillo Mendoza y Carlos Cordero Macedo.

A Miguel Moreno, por las discusiones y la ayuda con tantas consultas en el laboratorio.

A Omar Arellano, por su ayuda con la LD50.

A Martín Serrano, Héctor Maletta y Roberto Munguía por su ayuda con la estadística.

A Fernanda Baena, Fabrice Dentressangle, Diego Hernández, Isaac González, Eugenio Azpeitia, Daniela Ruiz y Alejandra López, porque fueron excelente equipo en el campo y fuera de él.

A la gente de Tehuixtla, en especial a Pelón, Flaco, Daniela, Boludo y Alejandra, porque su colaboración en el campo fue no menos que indispensable.

A Raúl Iván Martínez y todos los compañeros del laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos del Instituto de Ecología de la UNAM: Jesús, Memo, Haydeé, Angela, Martín, Daniela, Ale, Isaac, por el placer de trabajar juntos.

A los amigos de aquí y de todas partes.

A la mejor amiga, Fernanda, por ser la mejor compañía, por ayudarme a pensar y a aprender y, por si fuera poco, por ayudarme en el campo.

Y a mi familia: Ale, Mariano, Ceci, Adriana y Oscar, porque estuvieron y colaboraron todos los días.

Sin alguno de ustedes, esta tesis no estaría. ¡GRACIAS!

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
I. High expression of a secondary sexual trait reduces immune priming ability in males of the damselfly <i>Hetaerina americana</i> (Odonata: Calopterygidae).....	9
Conclusiones.....	23
Perspectivas.....	25
Referencias.....	27

Resumen

Estudios recientes han demostrado que los invertebrados, al igual que los vertebrados, pueden adquirir protección ante un patógeno al cual han estado expuestos previamente. Aunque los mecanismos de esta “sensibilización” del sistema inmune (*priming*) son desconocidos en invertebrados, podrían ser funcionalmente análogos a la memoria inmune de los vertebrados. En este trabajo utilicé machos de la libélula *Hetaerina americana* para determinar experimentalmente si la exposición a un patógeno inactivo puede proteger a los individuos contra un reto posterior con el mismo patógeno activo. Debido a que la eficiencia de la respuesta inmune es reflejada frecuentemente en la expresión de los caracteres sexuales secundarios, por ser ambas funciones dependientes de la condición, predije que la eficiencia del *priming* podría estar relacionada a la expresión de un carácter que ha evolucionado por competencia intrasexual, en este caso la pigmentación alar. Para determinar la presencia de *priming*, inmunicé a un grupo de machos con una bacteria muerta (*Micrococcus lysodeikticus*) antes de exponerlo a la misma bacteria viva. Comparé la supervivencia de este grupo con la de un grupo infectado sin previa inmunización y dos grupos controles (uno con dos inyecciones del medio de cultivo de las bacterias y otro con dos inyecciones de bacterias muertas). Mis resultados muestran que una primera exposición a la bacteria muerta confiere protección contra la bacteria viva, y que los machos menos pigmentados sobrevivieron más que los más pigmentados en el grupo de machos que fueron inmunizados antes de ser infectados. No encontré una relación entre la supervivencia y la pigmentación alar en los machos de los otros tres tratamientos. Mis resultados contradicen la teoría y la evidencia empírica en esta y otras especies sobre que los caracteres sexuales secundarios indican la habilidad inmune de un individuo. Mi estudio es el único en explorar la relación entre la expresión de un ornamento y la eficiencia del *priming* inmune, por lo que abre nuevas preguntas en el campo de la ecología evolutiva del sistema inmune.

Abstract

Adaptive immune responses allow animals to acquire protection against continuous infections with pathogenic microorganisms. Such responses, initially thought to be exclusive of vertebrates, have been recently uncovered in invertebrates. Here we took an experimental approach to test for the presence of a primed immune response in adult males of the damselfly *Hetaerina americana*, and hypothesized that the efficiency of such response must be related to animal condition, assessed by the expression of a sexual signal (wing pigmentation). Using the bacterium *Micrococcus lysodeikticus*, we immunized a male group with dead bacteria prior to an exposure to the same, active bacteria, and compared their survival with that of males that were infected but not previously immunized and two control groups. Sensitization with dead bacteria (priming) reduced male mortality, but less pigmented males survived for longer than more pigmented males in the sensitized group. No relation between survival and pigmentation was detected in non-immunized or control males. Our results are not compatible with theoretical and empirical evidence that suggest that sexually selected traits are indicators of immune ability. Our study is pioneering in exploring a relation between the expression of a secondary sexual trait and the efficiency of a primed immune response, and opens new exciting possibilities in the field of ecological immunology.

Introducción

La relación entre hospederos y parásitos es una de las interacciones ecológicas más ampliamente estudiada por sus repercusiones en la evolución de las especies (Ridley 2004). A medida que los parásitos intentan maximizar el aprovechamiento de los recursos brindados por los hospederos, los hospederos procuran minimizar los efectos negativos de los parásitos. Esta carrera armamentista, en la que los parásitos actúan como una presión de selección sobre los hospederos y viceversa, ha llevado a la evolución de estrategias muy complejas por parte de ambos (Paulin 2007). En el presente trabajo abordo esta interacción desde el punto de vista del hospedero, estudiando una de las estrategias que podría haber evolucionado como consecuencia del costo del parasitismo.

Vertebrados e invertebrados poseen un sistema inmune que les permite reconocer y atacar partículas extrañas que entran en su organismo, aunque los mecanismos responsables de la respuesta inmune son diferentes entre ambos grupos. La respuesta inmune puede ser innata (inducida rápidamente después de una infección) o adaptativa (adquirida a partir de infecciones previas, confiriendo protección a ataques secundarios por un patógeno). Los vertebrados poseen una respuesta inmune mediada por anticuerpos, macrófagos, linfocitos B y T, e inmunoglobulinas, los cuales son responsables de las respuestas innatas y la memoria inmunológica típica de este grupo de animales (revisado en Kimbrell y Beutler 2001). Aunque ninguno de estos mecanismos existe en invertebrados, estudios recientes han descubierto que en éstos han evolucionado respuestas funcionalmente similares (análogas) a las de los vertebrados, lo cual, en principio, puede ser explicado por la similitud en las presiones de selección ejercidas por los parásitos (e. g. Moret y Siva-Jothy 2003; Sadd y Schmid-Hempel 2006).

En los invertebrados la respuesta inmune comienza con el reconocimiento de moléculas extrañas que están presentes en los microbios pero no en los hospederos. Una vez ocurrido el reconocimiento, se inicia una respuesta que puede ser celular (hemocitos), humoral (moléculas que circulan en la hemolinfa), o una combinación de ambas (revisado en Schmid-Hempel 2005). La respuesta celular puede involucrar diferentes hemocitos que fagocitan o encapsulan (mediante una cascada de fenoloxidasas (PO)) a los patógenos para matarlos (revisado en Schmid-Hempel 2005). La respuesta humoral consiste de péptidos antimicrobianos y otras moléculas de defensa que tienen

la misma función (ver Schmid-Hempel 2005). Estos mecanismos de respuesta inmune permiten a los invertebrados combatir a una gran diversidad de patógenos mediante distintos mecanismos (Lemaître et al. 1997).

Aunque el sistema inmune de los invertebrados utiliza únicamente respuestas innatas, diversos estudios han mostrado que estas respuestas pueden ser funcionalmente adaptativas, ya que pueden permitir una respuesta más rápida y eficiente la segunda vez que se enfrentan a algún patógeno. En invertebrados la forma más compleja de este tipo de respuesta consiste en la activación del sistema inmune ante un primer reto y confiere protección duradera después un segundo reto ocasionado por el mismo patógeno (i. e. Sadd y Schmid-Hempel 2006; Roth et al. 2009). Su funcionamiento es análogo a la memoria inmunológica de los vertebrados. En una respuesta adaptativa, la actividad inmune desciende después del primer reto y actúa de forma más rápida, eficiente y específica después del segundo reto (i. e. Pham et al. 2007), y puede incluso ser transferida a la descendencia por vía materna (i. e. Little et al. 2003; Sadd et al. 2005). Esta respuesta puede ser tan específica como para detectar diferentes líneas de una misma bacteria (Roth et al. 2009), y tan duradera que puede conferir protección durante toda la vida de los individuos (Sadd y Schmid-Hempel 2006; Pham et al. 2007).

Una alternativa más simple, pero que puede ser funcionalmente adaptativa, consiste en que el sistema inmune se mantiene activo durante un largo tiempo después de una primera infección, la cual es profiláctica ante cualquier otro patógeno detectado por el sistema inmune (i. e. Moret y Siva-Jothy 2003). Este tipo de respuesta ha sido recientemente estudiada en escarabajos del género *Tenebrio* (Moret y Siva-Jothy 2003). Los individuos expuestos experimentalmente a una primera inyección con lipopolisacáridos (LPS, antígenos bacterianos activadores de la respuesta inmune) sobrevivieron significativamente más y mostraron además una mayor actividad antimicrobiana después de un segundo reto ante un hongo patógeno, en comparación con los individuos que no habían sido expuestos a los LPS. El efecto profiláctico del primer reto con LPS se mantuvo incluso en individuos que fueron infectados con el hongo 7 días después, mostrando que esta respuesta es inespecífica (los antígenos bacterianos confieren protección a una infección con un hongo) y de larga duración (Moret y Siva-Jothy 2003).

A pesar de que las respuestas inmunes funcionalmente adaptativas pueden reducir el efecto negativo de los patógenos sobre la supervivencia de los hospederos e incrementar su adecuación, su expresión es costosa (Schmid-Hempel 2005; Moret y

Schmid-Hempel 2000). Por lo tanto, debe existir alguna ventaja selectiva que mantenga este tipo de respuestas (Moret y Siva-Jothy 2003). La respuesta inmune demanda recursos energéticos que el hospedero no puede utilizar para cubrir otras funciones (Sheldon y Verhulst 1996), por lo que puede repercutir negativamente en la reproducción de los organismos. El esfuerzo reproductivo de un individuo puede llevar al incremento en la prevalencia de patógenos, debido a una reducción en los recursos asignados a la defensa (Sheldon y Verhulst 1996). Asimismo, la expresión de las señales sexuales utilizadas por los machos durante el apareamiento puede ser costosa, por lo que podría comprometer la función inmunológica (i. e. Swaddle 1996; Siefferman y Hill 2003; Doucet et al. 2005). De acuerdo con esta idea, se ha predicho que el costo de producir y mantener este tipo de señales será menor para los individuos que estén en mejor condición fisiológica, puesto que sólo ellos podrán sobrellevar el compromiso o “trade-off” entre la respuesta inmune y la expresión de un carácter sexual secundario (Sheldon y Verhulst 1996).

Las señales sexuales pueden mantenerse por elección femenina o por competencia entre machos (ver Andersson 1994). En ambos casos, su expresión suele ser dependiente de la condición nutricional y puede estar asociada a la condición inmunológica. Durante la elección femenina, las hembras pueden adquirir información sobre la condición inmunológica de sus posibles parejas a partir de sus ornamentos (Hamilton y Zuk 1982), y aparearse preferentemente con los más ornamentados (ver Andersson 1994). En la competencia entre machos, las señales sexuales son desplegadas a machos rivales durante costosas contiendas por parejas que suelen ganar aquéllos con señales más desarrolladas (ver Andersson 1994). La buena condición necesaria para las contiendas podría favorecer una buena habilidad inmunológica en este caso (Contreras-Garduño et al. 2007), por lo que, a pesar de no elegir a su pareja, las hembras obtienen beneficios indirectos. Tanto en la elección femenina como en la competencia entre machos, los machos que sobrevivan a infecciones patogénicas y además sean capaces de desplegar señales sexuales elaboradas son los que dejarán más descendencia, independientemente de si la hembra elige o no a su pareja (Hamilton y Zuk 1982; Sheldon y Verhulst 1996; Contreras-Garduño et al. 2007).

A pesar de que la idea del trade-off ha sido ampliamente utilizada para explicar relaciones positivas entre las señales sexuales y alguna medida de respuesta inmune en invertebrados (Hamilton y Zuk 1982; Siva-Jothy 2000; Rantala y Kortet 2004), no existen estudios que hayan explorado dicha relación utilizando respuestas inmunes

funcionalmente adaptativas como parámetro inmunológico. De acuerdo con Sheldon y Verhulst (1996), sólo los individuos que estén en buena condición podrían pagar el costo de presentar caracteres sexuales secundarios desarrollados y un priming inmune eficiente. La idea del presente trabajo es explorar esta posibilidad en machos de la libélula *H. americana* (Odonata: Calopterygidae).

Los odonatos han sido sujeto de muchos estudios sobre selección sexual y respuesta inmune en invertebrados (i. e. Siva-Jothy 2000, Rantala et al. 2000, Contreras-Garduño et al. 2006, 2007), pero nunca se ha explorado la presencia de respuestas inmunes funcionalmente adaptativas en este taxón. Los patrones de pigmentación alar típicos de muchas especies han evolucionado por selección sexual, ya sea vía elección femenina (i. e. Siva-Jothy 1999; Córdoba-Aguilar 2002) o vía competencia entre machos (i. e. Grether 1996; Serrano-Meneses et al. 2007), por lo que la expresión de estos pigmentos se ha asociado directamente con el éxito reproductivo de los machos (Grether 1996; Serrano-Meneses et al. 2007). En diversas especies, el pigmento de las alas refleja la condición nutricional (i. e. Hooper et al. 1999; Fitzstephens y Getty 2000), energética (i. e. Contreras-Garduño et al. 2006; Córdoba-Aguilar et al. 2007, 2009a) e inmunológica de los machos (i. e. Rantala et al. 2000; Siva-Jothy 2000; Contreras-Garduño et al. 2006, 2008).

El sujeto de estudio

En *H. americana* los machos compiten por territorios donde las hembras llegan para reproducirse, y esta competencia es energéticamente costosa (Contreras-Garduño et al. 2006, 2008). Debido a que los territorios no brindan ningún recurso evidente a las hembras, se ha determinado que el sistema de apareamiento de esta especie es un lek (Córdoba-Aguilar et al. 2009b). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los leks tradicionales (i. e. Höglund y Alatalo 1995), los machos de *H. americana* acosan excesivamente a las hembras antes de copular, lo cual repercute negativamente en las reservas energéticas de éstas últimas (Córdoba-Aguilar 2009). La pigmentación alar de los machos consiste en una mancha roja en la base de las cuatro alas, la cual ha evolucionado por competencia entre machos (Grether 1996; Serrano-Meneses et al. 2007). Debido a que la expresión de este carácter se correlaciona cercanamente con las reservas energéticas, siendo un buen reflejo de la condición individual (Contreras-Garduño et al. 2006, 2008), se ha propuesto que puede funcionar como indicador de la

habilidad de un macho para mantenerse en vuelo durante una contienda prolongada (Córdoba-Aguilar et al. 2007). Los machos con manchas más grandes tienen, en comparación con los de manchas de menor tamaño, mayores reservas energéticas, mayores probabilidades de conseguir y mantener territorios, mayor probabilidad de copular y mejor respuesta inmune (i. e. óxido nítrico, melanización, enzimas hidrolíticas, fenoloxidasa después de un reto bacteriano y supervivencia después de un reto con un implante de nylon; Contreras-Garduño et al. 2006, 2008). La competencia entre machos por el acceso a las hembras, así como la expresión de la mancha y la respuesta inmune, son variables a lo largo del año: en temporadas en las que esta competencia es mayor, los machos tienen mayores valores de pigmentación alar y respuesta inmune que en temporadas en las que la competencia es menor (Córdoba-Aguilar et al. 2009a).

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar (1) la presencia de una respuesta inmune funcionalmente adaptativa (priming) y (2) la relación entre la eficiencia de esta respuesta y la expresión de la pigmentación alar en machos de *H. americana*. Mi hipótesis es que los machos de esta especie deberían tener la capacidad de generar priming inmunológico, y que la eficiencia de dicha respuesta puede ser reflejada en la expresión de la mancha alar. Mi predicción es que los machos expuestos a una bacteria muerta antes de ser expuestos a la misma bacteria viva sobrevivirán más que los machos que reciban la bacteria viva sin haber sido previamente expuestos a la bacteria muerta. Adicionalmente, la eficiencia de dicha respuesta inmune será mayor en los machos más pigmentados, lo que les permitirá sobrevivir por más tiempo que los machos menos pigmentados. El enfoque de esta tesis es novedoso por los siguientes aspectos: (1) no existe evidencia en odonatos sobre respuestas inmunes que puedan ser funcionalmente adaptativas; (2) los animales utilizados provienen de condiciones naturales y no de laboratorio, por lo que los resultados de este trabajo pueden ser aplicados a organismos de vida salvaje, y (3) nunca se ha explorado si los ornamentos pueden reflejar la calidad de la respuesta inmune de un individuo medida como algún tipo de respuesta funcionalmente adaptativa.

El hecho de que los odonatos tengan una posición ancestral dentro de los insectos (Corbet 1999) permite extrapolar los resultados de este estudio a otros taxa más derivados. Mi tesis se presenta en un formato diferente al tradicional en el sentido de que he redactado la parte central a manera de artículo, el cual ha sido sometido a una revista científica.

High expression of a secondary sexual trait reduces immune priming ability in males of the damselfly *Hetaerina americana* (Odonata: Calopterygidae)

Abstract

Adaptive immune responses allow animals to acquire protection against continuous infections with pathogenic microorganisms. Such responses, initially thought to be exclusive of vertebrates, have been recently uncovered in invertebrates. Here we took an experimental approach to test for the presence of a primed immune response in adult males of the damselfly *Hetaerina americana*, and hypothesized that the efficiency of such response must be related to animal condition, assessed by the expression of a sexual signal (wing pigmentation). Using the bacterium *Micrococcus lysodeikticus*, we immunized a male group with dead bacteria prior to an exposure to the same, active bacteria, and compared their survival with that of males that were infected but not previously immunized and two control groups. Sensitization with dead bacteria (priming) reduced male mortality, but less pigmented males survived for longer than more pigmented males in the sensitized group. No relation between survival and pigmentation was detected in non-immunized or control males. Our results are not compatible with theoretical and empirical evidence that suggest that sexually selected traits are indicators of immune ability. Our study is pioneering in exploring a relation between the expression of a secondary sexual trait and the efficiency of a primed immune response, and opens new exciting possibilities in the field of ecological immunology.

Introduction

Invertebrate immune systems have proven to be more complex than it was originally assumed (Little and Kraaijeveld 2004). The traditional view placed invertebrate immune systems as primitive since, unlike vertebrates, the former rely solely in innate responses. Notwithstanding, recent work has uncovered the presence of functionally adaptive responses that, despite the gap in our understanding of the underlying mechanisms, are functionally equivalent to those of vertebrate specific immune memory (Little and Kraaijeveld 2004). These responses allow invertebrates to produce faster and improved immune reactions after secondary encounters with a similar pathogen (Kurtz 2004). Independently of the mechanisms involved in memory-like responses in invertebrates, we will refer to this phenomenon as immunological priming. The protective effects of such responses have proven to be highly specific, and not due to a general activation of immune response (Sadd and Schmid-Hempel 2006; Pham et al. 2007). Moreover, such acquired immune response may be transferred from the mother to the offspring (Sadd et al. 2005). All these findings place invertebrate immune systems and their improved immune reactions at the forefront of ecological immunology studies (Schulenburg et al. 2009).

A simpler, functionally adaptive strategy that invertebrates use to fight against repeated exposures to frequently-encountered pathogens is the induction of long lasting, more general immune responses. During pathogenic infections, the host's effector mechanisms of the immune system are activated in the first hours after the infection, and last until the pathogen is neutralized, which may occur after a few days (e. g. Moret and Siva-Jothy 2003). For example, the advantages of long lasting immune response were tested in *Tenebrio molitor* beetles (Moret and Siva-Jothy 2003): larvae that were exposed to bacterial lipopolysaccharides (LPS) four or seven days prior to an infection with a fungus survived for longer and held higher antimicrobial activity than larvae that were not pre-challenged with LPS, suggesting a long-lasting, non-specific immune response. Such primed response can be considered functionally adaptive in the sense that it is prophylactic against subsequent pathogenic challenges (Moret and Siva-Jothy 2003).

Despite the hosts' fitness benefits accrued via such long lasting immune responses, their induction and maintenance are presumably costly (Moret and Schmid-Hempel 2000; Rolff and Siva-Jothy 2003). Costs of immunity may arise from different

sources. First, immunity can be costly simply due to its use. For example, the phenoloxidase (PO) cascade that is used in encapsulation response produces cytotoxic compounds that are used in response against non-self agents. Such compounds bear negative effects as they can also attack the host itself (Sugumaran et al. 2000). A similar situation occurs with reactive oxygen and nitrogen species that may lead to cellular damage in the host (Nappi and Ottaviani 2000). Another immunity cost is that it demands nutrients that the host will not be able to use for other functions related to fitness (i. e. trade-off; Sheldon and Verhulst 1996). For example, it has been shown that immunity can reduce competitive feeding ability in *Drosophila melanogaster* (Kraaijeveld et al. 2001), larval development and egg viability in Indian meal moths *Plodia interpunctella* (Boots and Begon 1993) or lifespan in *T. molitor* beetles (Armitage et al. 2003). Another important cost of immunity arises from an assumed trade-off with reproductive traits, which has been previously documented in invertebrates (reviewed by Lawniczak et al. 2007). For example, in dung flies *Scathophaga stercoraria*, males and females of polyandrous lines invest more in reproductive tissue than do monogamous lines, which nevertheless comes at a cost of reduced PO production (Hosken 2001). In the cricket *Teleogryllus oceanicus*, genetic variance for high levels of antibacterial immune response is associated with genetic variance for low sperm viability (Simmons and Roberts 2005). Also there is a trade-off between immunity and development of secondary sexual traits. In *D. melanogaster*, male courtship activity impairs immune response (McKean and Nunney 2001). All this evidence suggests that high expression of sexually selected traits reflects immune ability (reviewed by Lawniczak et al. 2006), as was proposed by Hamilton and Zuk (1982). The theoretical evidence underlying this idea is that only individuals in good physiological condition are able to pay the costs of the trade-off between production of sexual signals and immunocompetence (Sheldon and Verhulst 1996; Rantala and Kortet 2004; Pomfret and Knell 2006). In the present study, we took a novel approach to explore the trade-off between immunity and reproduction. Here, we related the expression of a condition-dependent sexually selected trait with the ability to induce a primed immune response that may convey protection against a secondary bacterial challenge in males of the damselfly *Hetaerina americana* (Odonata: Calopterygidae).

We carried out an experiment in which we primed a group of males with heat-killed bacteria prior to an exposure to the same, active bacteria, and compared their survival with that of males that were infected but not previously faced to the dead

bacteria. Our study aims and findings are unique in the sense that functionally adaptive immune responses had not been investigated in relation to their presumable costs, which could be related to the costs of investment in sexually selected traits. Our prediction was that males with higher expression of sexual signals will survive for longer compared to males with lower expression of that traits, for being in better immunological condition.

Materials and methods

Study subject

The present study was carried out in the damselfly *H. americana*. Males of this species bear wing pigmentation spots that are evolutionary maintained via male-male competition (Grether 1996). Males mate in leks: they fight for the possession of riverine territories that are visited by females with the only purpose of copulation (Córdoba-Aguilar et al. 2009b). Winners of such territorial fights have usually larger pigmentation spots than losers (Grether 1996, Contreras-Garduño et al. 2006) and have higher probabilities to increase their reproductive success (Grether 1996). Expression of spots has proven to be a condition-dependent trait, since it is a good indicator of energetic reserves (Contreras-Garduño et al. 2006, 2008). Wing pigmentation is also positively related to immune ability, measured as the level of phenoloxidase, hydrolytic enzymes and nitric oxide in the haemolymph, melanization of a nylon implant, and survival after a bacterial challenge (Contreras-Garduño et al. 2006, 2008).

Field work

Field work was carried out in the Amacuzac river in Tehuixtla, Morelos, Mexico (18°23'56" N, 99°16'23" W), from December 2008 to January 2009. *H. americana* adult males were captured with a butterfly net between 1000 and 1600 hours, the time at which males are more active. Since individual condition may vary with age (Plaistow and Siva-Jothy 1996), males of approximately the same age were collected. Males were aged according to the four visual categories proposed by Plaistow and Siva-Jothy (1996): age 1, teneral males, bear soft, dorso-ventrally flexible undamaged wings; age 2 males have harder wings, flexible from the nodus to the tip; age 3 males have less flexible wings and show some signs of pruinescence in the thorax; class 4 males, the oldest, show abundant thoracic pruinescence and unflexible, damaged wings. Only young, sexually mature males of ages 2 and 3 were used in the present study.

In all experiments carried out in the present study, male survival in captivity was the response variable. After being captured, males were placed individually in plastic, transparent essay tubes with a piece of wood as a perch and permanently humid cotton to maintain humidity and a temperature at approximately 26° C inside the tubes. Males

were not fed in any case and conditions of captivity were always the same. Males were inoculated with different treatments with a microsyringe Hamilton ®, between the insertion of the wings to the thorax. Individual manipulation never lasted more than 1 minute.

Determination of a medium for bacterial injection

Since the present study required the injection of bacteria resuspended in a medium, 1 µL of four different culture media or buffer were injected on *H. americana* males to test their effect on survival. 15 males were inoculated with phosphate buffered saline (PBS 1X) pH = 7.0, 16 with medium 199 (1X), 15 with GIBCO® Schneider's *Drosophila* medium, and 17 with RPMI-1640 medium (pH = 8.3). Male mortality was registered after 24 and 48 hrs. Since RPMI medium showed to be less toxic after 48 hours than any of the other tried media (see results), it was used in posterior experiments.

Determination of an LD50

Bacterial infections of *H. americana* males were made with lyophilized cells of the gram-positive *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma ®) resuspended in RPMI medium. A lethal concentration (LD50) after 24 hrs was calculated to assure that males treated with bacteria would die because of the pathogenic effect of bacteria and not because of an anaphylactic shock produced by an overwhelming infection, which could shade the effect of male condition. Since during the immunization experiment individuals are inoculated twice (see below), being the second infection 24 hrs after the first, we considered this for calculating the LD50. For such purpose, 84 males were netted and injected with 1 µL of RPMI medium 24 hrs. prior to the second inoculation with either bacteria or RPMI medium in the case of the control group (N = 13). Since 11 males died before receiving the second treatment, they were omitted from the analyses, leaving a sample size of 63 males. The four different concentrations of *M. lysodeikticus* were used in 40 males (10 per group): 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL and 1000 µg/mL. 24 hrs after the second inoculation (which means 48 hrs after the first inoculation with RPMI), male mortality was registered in each of the four bacteria concentration treatments and the RPMI control.

Immunization

In order to test if males of *H. americana* became resistant to an experimental infection with *M. lysodeikticus* when they had been previously exposed to the same pathogen, we carried out an experiment in which every male received two injections of 1 μ L of different substances, being the second 24 hrs after the first. 24 hrs prior to an infection with an LC50 of active *M. lysodeikticus*, a group of males was immunized with the same dosage of heat-killed bacteria (previously boiled for 15 minutes; “Dead bacteria - Bacteria” group, N = 28). Animals were monitored every hour in order to register their total survival. We compared survival of immunized males with that of males that only received RPMI before being infected with the LC50 (“RPMI - Bacteria” group, N = 24), and with two control groups, one consisting of two injections with RPMI (“RPMI - RPMI” group, N = 13) and the other of two injections with heat-killed bacteria (“Dead bacteria - Dead bacteria” group, N = 14). Registration of survival started right after the second injection. 47 animals that died before were not considered in survival analyses. The experiment finished when the last male died. For each individual, a measure of body length was taken with a digital caliper (± 0.1 mm), from the tip of the head to the end of the last abdominal segment. Wing spot size was also measured for each male. For this, the four wings were cut at their basis of insertion to the thorax, and a digital image of the whole wing was obtained with a scanner HP Scanjet G4050. For every wing, total area and pigmented area (in pixels) were measured with Adobe® Photoshop® Elements version 2.0, and the average proportion of pigmented area in the four wings was taken as a measure of wing spot size (see Contreras-Garduño et al. 2006).

Statistical analyses

An LD50 of *M. lysodeikticus* was estimated with the Trimmed Spearman-Kärber method (see Hamilton et al. 1977), version 1.5. In the immunization experiment, *t*-tests and one way analyses of variance were used to assure no differences in initial conditions of body length and wing pigmentation between males of different treatments. Kolmogorov-Smirnoff and Levene tests were used for testing normality and homogeneity of variances. Differences in survival of males exposed to the four

experimental treatments were tested with a Cox Regression Model (see Sadd & Schmid-Hempel 2006) that included treatment, body length, wing pigmentation and the interaction between treatment and wing pigmentation as predictor variables. The interaction between treatment and body length was also tested but failed to explain differences in survival (Wald = 1.181; $P = 0.758$), so it was omitted from the analysis. Analyses were carried out with SPSS version 13.0 for Windows.

Results

Determination of a medium for bacterial injection

From the four different media used to determine their effect on survival of *H. americana* males, PBS and 199 showed to be more toxic 24 and 48 hours after inoculation (Table 1). Schneider medium was the less toxic 24 hours after inoculation but increased male mortality after 48 hours. RPMI medium, despite being more toxic than Schneider 24 hours after inoculation, showed the minor mortality after 48 hours (Table 1), so it was used in posterior experiments (see below).

Determination of an LD50

Mortality of males 24 hrs. after being exposed to *M. lysodeikticus* did not increase with concentration. Moreover, mortality in the control group (54%) was higher than mortality of males exposed to bacterial concentrations of 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (30 % and 40 % respectively). However, since mortality of males exposed to concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was higher (90 % and 60 % respectively) than mortality of control males, an LD50 could be obtained with the Spearman-Kärber method. Although confidence limits were not reliable in the model, the estimated LC50 was 76.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the Spearman-Kärber trim was 43.42 %.

Immunization

Males that received a first injection (N = 126) with either RPMI medium (N = 44) or dead bacteria (N = 82) did not differ in body length ($t = 1.44$, d. f. = 124; $P = 0.15$) or wing pigmentation ($t = 0.71$, d. f. = 124; $P = 0.48$). Body length and wing

pigmentation were positively correlated (Pearson $r = 0.445$; $P < 0.001$; $N = 126$). From those 126 males, 47 (37%) died before receiving the second treatment 24 hours later. From those 47 males, 7 (15%) had received a first injection with buffer and the other 40 (85%) had been treated with dead bacteria, showing a negative effect of dead bacteria on male survival during the first 24 hours. The 79 (63%) males that remained alive until the moment of the second injection, and that were allocated to each of the four experimental groups (RPMI-RPMI ($N = 13$), RPMI-bacteria ($N = 24$), Dead bacteria-Dead bacteria ($N = 14$) and Dead bacteria-Bacteria ($N = 28$)) did not differ in body length (one-way ANOVA; $F_{3,75} = 0.83$, $P = 0.48$) or wing pigmentation ($F_{3,75} = 1.64$, $P = 0.19$) between groups.

Males that were immunized with dead bacteria prior to be injected with active bacteria survived for longer than males treated with RPMI medium before being exposed to active bacteria, and their survival did not differ from RPMI-RPMI or Dead bacteria-Dead bacteria treated males (Table 2, Figure 1). Control males did not differ in survival values between each other or with RPMI-Bacteria treated males (Wald statistic $P > 0.05$). Wing pigmentation was marginally significant in predicting male survival ($P = 0.052$), with more pigmented males having less survival values ($\text{Exp}(B) > 1$; Table 2). When comparing Dead bacteria-Bacteria with RPMI-Bacteria treated males, the interaction of treatment and wing pigmentation significantly explained differences in survival (Table 2), although the overall significance value for the interaction was nonsignificant ($P = 0.082$). The relation of wing pigmentation and survival showed a negative trend in Dead bacteria-Bacteria treated males and no trend in RPMI-Bacteria treated males (Figure 2).

Table 1. Effect of four different buffer or culture media on *H. americana* male survival 24 and 48 hrs after inoculation.

Medium	Initial N	Mortality (%) after inoculation	
		24 hours	48 hours
PBS	15	40	67
199	16	13	56
Schneider	15	0	60
RPMI	17	6	47

Table 2. Results of the Cox Regression Model for *H. americana* male survival after experimental manipulation.

	B ^a	S. E. ^b	Wald ^c	df	P ^d	Exp(B) ^e
Treatment			7.128	3	0.068	
Dead bacteria-Bacteria vs RPMI-RPMI	5.000	3.749	1.778	1	0.182	148.384
Dead bacteria-Bacteria vs RPMI-Bacteria	8.015	3.004	7.120	1	0.008	3026.837
Dead bacteria-Bacteria vs Dead bacteria-Dead bacteria	5.200	3.713	1.961	1	0.161	181.184
Body length	0.077	0.106	0.530	1	0.466	1.080
Wing spot	0.391	0.201	3.776	1	0.052	1.479
Wing spot * Treatment			6.698	3	0.082	
Dead bacteria-Bacteria vs RPMI-RPMI	-0.411	0.317	1.683	1	0.195	0.663
Dead bacteria-Bacteria vs RPMI-Bacteria	-0.642	0.248	6.683	1	0.010	0.526
Dead bacteria-Bacteria vs Dead bacteria-Dead bacteria	-0.421	0.322	1.711	1	0.191	0.656

^aEstimated regression coefficient

^bStandard error of regression coefficient

^cWald statistics

^dSignificance of Wald statistics (values < 0.05 are given in bold)

^ePredicted change in survival for a unit increase in the variable

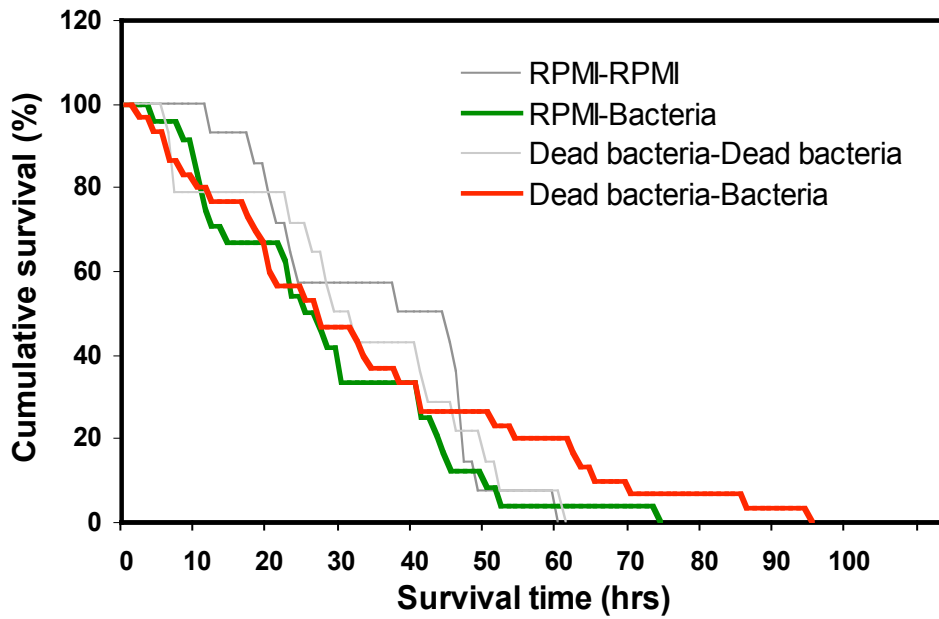


Figure 1. Mortality of *H. americana* males exposed to four different treatments.

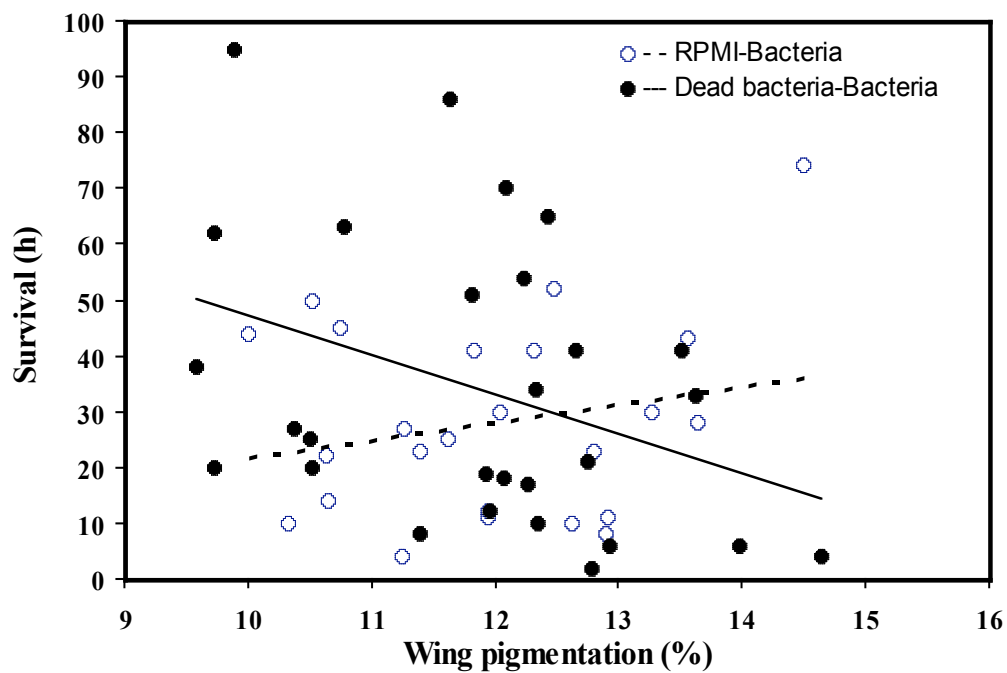


Figure 2. Relation between wing spot size and survival of *H. americana* males exposed to two different bacterial treatments.

Discussion

We have shown that an initial exposure to an inactive pathogen may be prophylactic against future infections with the same, active pathogen. It does not necessarily imply that such response is specific to the pathogen we tested, since we did not carry out an experiment with reciprocal design with different first- and second-exposure pathogens (e. g. Sadd and Schmid-Hempel 2006). Instead, our work is more similar to that of Moret and Siva-Jothy (2003), where they induced protection against a fungus using LPS typical from bacteria, in *T. molitor* beetles. They found that antimicrobial activity was one mechanism responsible of such long-lasting, non-specific response and, although we did not measure any parameter of immune system, this mechanism could also explain the higher survival in males that were immunized prior to be infected with the active bacteria. The lack of significant differences in survival of Dead bacteria-Bacteria treated males and both control treatments (RPMI-RPMI and Dead bacteria-Dead bacteria) discards the possibility that the harm caused by the injection itself may be activating the immune response in the same way that dead bacteria does (e. g. Lemaître et al. 1997; Moret and Siva-Jothy 2003). Surprisingly, survival of RPMI-Bacteria did not differ from that of control treated males. This could be due to the bacterial dosage used in our experiment: we decided to use a ‘moderate’ dosage that killed half of the males in the first 24 hrs after the second injection (an LD50), and such dose could be relatively low for evidencing differences in survival of these groups, mainly if we consider that mortality caused by control RPMI treatment was relatively high (see table 1). Using a minimum lethal dose, that kills 100% of the males in 24 hrs, could enlarge the differences in survival of infected and control treated males.

Our results also suggest that wing spot size, which is a predictor of adult male condition (Contreras-Garduño et al. 2006, 2008), was marginally negatively related to survival (see Table 2, Wing spot size $P = 0.052$, $\text{Exp}(B) > 1$). However, such negative trend does not seem to be independent of treatment (see Table 2: Treatment * Wing spot size, $P = 0.082$). This trend could become significant when increasing sample size or bacterial dose (see above). However, comparisons between treatments shows that the negative relation between wing spot size and survival occurs in Dead bacteria-Bacteria treated males (see Table 2 and Fig. 2: Treatment * Wing spot size, Dead bacteria-Bacteria vs RPMI-Bacteria, $P = 0.01$), and not in the other treatments, suggesting that the costs of the mechanisms involved in sensitization (i. e. Dead bacteria-Bacteria) are different from those involved in protection against a direct challenge with bacteria (i. e.

RPMI-bacteria). This last result seems contradictory with previous findings in the same species, where expression of wing pigmentation was positively related to immune activity after a bacterial challenge (Contreras-Garduño et al. 2008). However, the main difference between our study and that of Contreras-Garduño et al. (2008) is that, while they used a gramnegative bacteria (*Serratia marcescens*), we used a grampositive one (*M. lysodeikticus*). It is known that immune mechanisms involved in recognition as well as in response against both kinds of pathogens are different. While gramnegative bacteria induce the *imd* pathway for directing the production of antimicrobial peptides, grampositive bacteria induce the Spaetzle-Toll pathway (Lemaître et al., 1997; Schmid-Hempel 2005). Another difference between both studies is that, unlike Contreras-Garduño et al., we measured survival, and not immune activity after the bacterial challenge. Since different components of immune response may trade-off with each other (i. e. Rantala and Roff 2005), and one or a few components of immune response may be insufficient for assessing an individual's immunocompetence, using survival as an indirect measure of immunocompetence seems a good approach for understanding the costs of parasitism (Adamo 2004). Unexpectedly, body size was not a good predictor of survival. Despite it has been used as a measure of condition (i. e. Contreras-Garduño et al. 2008) and has found to correlate positively with immune response (i. e. Ryder and Siva-Jothy 2001) and wing pigmentation (our results), there is also contradictory evidence for such relation (i. e. Rantala and Roff 2005; Contreras-Garduño et al. 2008).

Our results suggest that the expression of a condition-dependent sexually selected trait (wing pigmentation) in *H. americana* males is traded-off with their ability to induce an improved response after a secondary encounter with the same pathogen. Trade-offs between immune response and expression of sexual signals has been a central tenet in ecological studies of immune systems when assessing the costs of both traits (Sheldon and Verhulst 1996; Kotiaho 2001). Our results also seem contradictory with the broadly accepted idea that secondary sexual traits are good indicators of immune condition (Hamilton and Zuk 1982). However, referring to such cost should imply that bearing developed sexual signals reduces individual's fitness, and that this reduction is higher in individuals in poor condition (Kotiaho 2001). The present study was carried out during a season where *H. americana* males are known to be in poor immunological condition (PO, NO and melanization response), reflected in low values of wing spot size during this season (Contreras-Garduño et al. 2009; Córdoba-Aguilar in

press b). Under this circumstance, males that allocate more resources to wing spot could be reducing their investment to immune responses, including those that are functionally adaptive, like immune priming. In a contrasting season, where males are in general good condition (i. e. there is higher food availability), it would be expected that allocating resources to wing pigmentation should be less costly, and males could pay the cost of being highly pigmented and bearing an efficient primed immune response.

Despite it was previously shown that immune induction could reduce sexual signaling (Jacot et al. 2004), no studies had been carried out in order to test the costs of secondary sexual traits on functionally adaptive immune responses. Previous studies that have found some kind of adaptive immune responses in invertebrates (i. e. Sadd and Schmid-Hempel 2006; Pham et al. 2007) have not explained variation within the response of their 'primed' treatments. We argue that such variation may be due to individual condition, which could be assessed by the expression of a secondary sexual trait. Future research is needed to determine the mechanisms underlying the trade-off between sexual signaling and functionally adaptive immune responses in invertebrates.

Conclusión

El presente trabajo representa un aporte al campo de la ecología evolutiva de la respuesta inmune de los invertebrados, considerando que las respuestas inmunes funcionalmente adaptativas en este grupo han sido poco estudiadas. El tipo de respuesta inmune estudiado en el presente trabajo tiene características que podrían asociarse a una respuesta funcionalmente adaptativa (ver Moret y Siva-Jothy 2003), por el hecho de que un primer encuentro con un patógeno confirió protección ante un segundo encuentro con el mismo patógeno. Debido al corto tiempo transcurrido entre el primer encuentro y el segundo, sugerimos que la protección ante el segundo reto puede deberse al remanente de un proceso de sensibilización del sistema inmune innato provocado por el primer reto.

Desde que Hamilton y Zuk propusieron en 1982 la idea de que la resistencia a patógenos podría reflejarse en los ornamentos, muchos trabajos han estudiado la relación entre ambas funciones. Sin embargo, ninguno de ellos había evaluado la posibilidad de que la eficiencia de las respuestas inmunes funcionalmente adaptativas pudiera reflejarse en un ornamento. Los trabajos sobre este tipo de respuesta inmune en invertebrados se han enfocado a estudiar su existencia y especificidad, pero no han determinado los factores ecológicos que puedan influir en su eficiencia. En este trabajo propusimos que uno de esos factores podría ser la inversión masculina en la reproducción, medida en este caso como la expresión de un carácter sexual secundario dependiente de la condición. Los resultados indicaron que los machos de *H. americana* son capaces de montar una respuesta inmune protectora a un segundo reto homólogo, y que esta capacidad está comprometida con la expresión de la mancha alar, lo cual sugiere un costo de este último carácter.

Los resultados de la asociación entre la respuesta inmune y la mancha alar encontrados en el presente trabajo parecen contradictorios con los encontrados en estudios previos, que indican que la pigmentación alar de los machos de *H. americana* es un buen reflejo de su condición inmunológica (Contreras-Garduño et al. 2006, 2008). Mis resultados también parecen contradecir la idea de que los caracteres sexuales secundarios son un reflejo de la condición inmunológica de los individuos (Hamilton y Zuk 1982). Sin embargo, el presente estudio fue realizado durante una temporada en la que se sabe que los machos poseen, en general, una mala condición (Contreras-Garduño et al. 2009). De repetir este experimento durante una temporada contrastante,

esperaríamos encontrar una relación distinta entre la pigmentación alar y la supervivencia de los machos, debido a que el costo de estar ornamentados debería ser mayor para machos en mala condición (Kotiaho 2001).

Perspectivas

Las respuestas inmunes funcionalmente adaptativas son relativamente poco conocidas en los invertebrados. Como se puede ver en mi trabajo y el de otros autores en el tema (e.g. Little et al. 2008), aún quedan muchas preguntas sin resolver. En el presente proyecto analicé la habilidad de los machos de *H. americana* para montar una respuesta inmune funcionalmente adaptativa, es decir, una respuesta que, una vez activada, confiera protección contra infecciones futuras. Este experimento lo realicé durante una temporada en la que los machos están en baja condición (i. e. enero a abril; Córdoba-Aguilar et al. 2009a), por lo que repetir el experimento en una temporada contrastante (i. e. julio a octubre), con machos en buena condición, sería de gran interés para conocer los costos de la ornamentación sobre la respuesta inmune.

Este trabajo estuvo enfocado a determinar la presencia de una sensibilización del sistema inmune ante un primer reto, que puede seguir protegiendo a los individuos ante retos posteriores con cualquier patógeno. Sería interesante explorar en odonatos la presencia de una forma más compleja de respuesta adaptativa, la memoria inmunológica, que ya ha sido descrita en otros artrópodos, y que consiste en que el primer encuentro con un patógeno confiere una protección específica de muy larga duración contra infecciones subsecuentes del mismo patógeno. Este último tipo de respuesta implicaría que la respuesta inmune se apague después de combatir el primer reto, y se reactive de forma más rápida y eficiente ante el segundo reto con el mismo patógeno, reduciendo así los costos que implica mantener activo el sistema inmune durante un tiempo prolongado. Para determinar la presencia de la memoria inmunológica sería necesario un diseño experimental recíproco que permitiera determinar la especificidad de la respuesta, donde los individuos que reciban el primer reto con un patógeno determinado, reciban en el segundo reto al mismo patógeno o a uno distinto. El intervalo de tiempo que debería transcurrir entre el primer reto y el segundo debería ser considerablemente mayor que el utilizado en el presente trabajo (24 horas). Desafortunadamente, *H. americana* no es un modelo adecuado para realizar esta investigación debido a que los individuos de esta especie difícilmente viven más de 5 días en condiciones de laboratorio (obs. pers.). Sin embargo, existen otras libélulas cuya cría y manutención en el laboratorio permiten que éstas sobrevivan varias semanas (por ejemplo, las especies del género *Ischnura* (Van Gossum et al. 2003)).

Debido a que los mecanismos efectores de la memoria inmunológica son pobremente conocidos en los insectos, sería interesante explorarlos, enfatizando en los mecanismos involucrados en la respuesta ante diferentes patógenos. Podrían cuantificarse los niveles de diversas sustancias efectoras de la respuesta inmune, como la fenoloxidasa, el óxido nítrico, las enzimas hidrolíticas o los péptidos antimicrobianos después infecciones experimentales con combinaciones de distintos patógenos. La actividad de estas sustancias ha sido frecuentemente utilizada como medida de la calidad de la respuesta inmune de los insectos (i. e. Siva-Jothy 2000; Contreras-Garduño et al. 2008), e incluso se ha explorado la función de algunas de ellas en respuestas inmunes funcionalmente adaptativas (i. e. Moret y Siva-Jothy 2003; Pham et al. 2007). Sería también interesante explorar el papel de la hormona juvenil durante un experimento de memoria inmune. La hormona juvenil ha demostrado estar involucrada directamente en la respuesta inmune y en muchas otras funciones de los insectos como el desarrollo y la reproducción (Wyatt y Davey 1996; Rantala et al. 2003). Ante un ataque patogénico se esperaría que esta hormona sufriera cambios en su actividad, por lo cual controlaría los mecanismos efectores de la respuesta inmune arriba citados.

En el presente experimento exploré una posible relación de la eficiencia de una respuesta inmune funcionalmente adaptativa con la expresión de la pigmentación alar, un carácter sexual secundario dependiente de la condición. Sería interesante relacionar la eficiencia de la memoria inmunológica con la ornamentación de los machos, debido a que en esta relación se podrían evidenciar los costos de esta memoria y la posibilidad de que los ornamentos de los machos son un reflejo de su condición inmunológica, medida en este caso como la habilidad para generar memoria inmune. Ya que los ornamentos podrían ser un reflejo de la resistencia a los patógenos que representan una mayor presión de selección sobre los hospederos, y no a todos los patógenos, sería interesante explorar si la memoria inmune evoluciona localmente para defender a los hospederos contra determinados patógenos, y no contra todos.

Referencias

1. Adamo SA. 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Grillus texensis*. *J Insect Physiol* 50: 209-216. doi: 10.1016/j.jinsphys.2003.11.011.
2. Armitage SAO, Thompson JJW, Siva-Jothy MJ. 2003. Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J Evol Biol*. 16:1038-1044.
3. Boots M, Begon M. 1993. Trade-offs with resistance to granulosis virus in the Indian meal moth, examined by a laboratory evolution experiment. *Funct. Ecol*. 7:528-534. <http://www.jstor.org/stable/2390128>.
4. Contreras-Garduño J, Buzatto BA, Serrano-Meneses MA, Nájera-Cordero K, Córdoba-Aguilar A. 2008. The size of the red wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament trait. *Behav Ecol* 19: 724-732. doi: 10.1093/beheco/arn026.
5. Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J, Córdoba-Aguilar A. 2006. Wing pigmentation, immune ability and fat reserves in males of the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *J Ethol* 24: 165-173. doi: 10.1007/s10164-005-0177-z.
6. Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J, Jiménez-Cortés JG, Juárez-Valdez N, Lanz-Mendoza H, Córdoba-Aguilar A. 2009. Spatial and temporal population differences in male density and condition in the American rubyspot, *Hetaerina americana* (Insecta: Calopterygidae). *Ecol Res*. 24:21-29. doi: 10.1007/s11284-008-0476-2.
7. Contreras-Garduño J, Lanz-Mendoza H, Córdoba-Aguilar A. 2007. The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and survival ability in males of the American rubyspot. *J Insect Physiol* 53: 612-621. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.03.003.
8. Corbet PS. 1999. Dragonflies: behaviour and ecology of Odonata. Comstock, Ithaca, NY.
9. Córdoba-Aguilar A. 2009. A female evolutionary response when survival is at risk: male harassment mediates early reallocation of resources to increase egg

- number and size. *Behav Ecol Sociobiol.* 63(5):751-763. doi: 10.1007/s00265-009-0709-6.
10. Córdoba-Aguilar A, Jiménez-Cortés JG, Lanz-Mendoza H. 2009a. Seasonal variation in ornament expression, body size, energetic reserves, immune response and survival in males of a territorial insect. *Ecol Entomol.* 34(2):228-239. doi: 10.1111/j.1365-2311.2008.01061.x.
 11. Córdoba-Aguilar A, Leshner-Treviño AC, Anderson C. 2007. Sexual selection in *Hetaerina titia* males: a possible key species to understand the evolution of pigmentation in calopterygid damselflies (Odonata: Zygoptera). *Behaviour* 144: 931-952. doi: 10.1163/156853907781492672.
 12. Córdoba-Aguilar A, Raihani G, Serrano-Meneses MA, Contreras-Garduño J. 2009b. The lek mating system of *Hetaerina* damselflies. *Behaviour.* 146(2):189-207. doi: 10.1163/156853909X410739.
 13. Córdoba-Aguilar A. 2002. Wing pigmentation in territorial male damselflies, *Calopteryx haemorrhoidalis*: a possible relation to sexual selection. *Anim. Behav.* 63(4):759-766. doi: 10.1006/anbe.2001.1974.
 14. Doucet SM, Mennill DJ, Montgomerie R, Boag PT, Ratcliffe LM. 2005. Achromatic plumage reflectance predicts reproductive success in male black-capped chickadees. *Behav. Ecol.* 16(1):218-222. doi: 10.1093/beheco/arh154.
 15. Fitzstephens DM, Getty T. 2000. Colour, fat and social status in male damselflies, *Calopteryx maculata*. *Anim. Behav.* 60(6):851-855.
doi:10.1006/anbe.2000.1548.
 16. Grether GF. 1996. Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution.* 50:1949-1957. <http://www.jstor.org/stable/2410753>.
 17. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7):714-719.
 18. Hamilton WD, Zuk M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218: 384-386. doi: 10.1126/science.7123238.
 19. Höglund J, Alatalo RV. 1995. *Leks*. Princeton University Press.

20. Hooper RE, Tsubaki Y, Siva-Jothy MT. 1999. Expression of a costly secondary sexual trait is correlated with age and condition in a damselfly with two male morphs. *Physiol Entomol* 24: 364-369. doi: 10.1046/j.1365-3032.1999.00152.x.
21. Hooper RE, Tsubaki Y, Siva-Jothy MT. 1999. Expression of a costly, plastic secondary sexual trait is correlated with age and condition in a damselfly with two male morphs. *Physiol. Entomol.* 24(4):364-369. doi: 10.1046/j.1365-3032.1999.00152.x.
22. Hosken DJ. 2001. Sex and death: microevolutionary trade-offs between reproductive and immune investment in dung flies. *Curr. Biol.* 11(10):R379-R380. doi:10.1016/S0960-9822(01)00211-1.
23. Jacot A, Scheuber H, Brinkhof MWG. 2004. Costs of an induced immune response on sexual display and longevity in field crickets. *Evolution.* 58(10):2280-2286. doi: 10.1554/03-660.
24. Kimbrell DA, Beutler B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Rev. Genetics.* 2:256-267. doi:10.1038/35066006.
25. Kotiaho JS. 2001. Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biol. Rev.* 76:365-376. doi: 10.1017/S1464793101005711.
26. Kraaijeveld AR, Limentani EC, Godfray HCJ. 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268: 259-261. doi: 10.1098/rspb.2000.1354.
27. Kurtz J. 2004. Memory in innate and adaptive immune systems. *Microbes and Infection.* 6:1410-1417. doi:10.1016/j.micinf.2004.10.002.
28. Lawniczak MKN, Barnes AI, Linklater JR, Boone JM, Wigby S, Chapman T (2006) Mating and immunity in invertebrates. *Trends. Ecol. Evol.* 22: 48-55. doi: 10.1016/j.tree.2006.09.012.
29. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffman JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 88:973-983.
30. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffman JA. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *PNAS.* 94:14614-14619.

31. Little TJ, O'Connor B, Colegrave N, Watt K, Read AF. 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.* 13:489-492. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00163-5.
32. Little TJ, Colegrave N, Sadd BM, Schmid-Hempel P. 2008. Studying immunity at the whole organism level. *BioEssays* 30:404-405.
33. Little TJ, Kraaijeveld AR. 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 19(2):58-60. doi: 10.1016/j.tree.2003.11.011.
34. McKean KA, Nunney L. 2001. Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster*. *PNAS.* 98(14):7904-7909. doi: 10.1073/pnas.131216398.
35. Moret Y, Schmid-Hempel P. 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumble-bee workers. *Science.* 290(5494):1166-1168. doi: 10.1126/science.290.5494.1166.
36. Moret Y, Siva-Jothy MT. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270:2475-2480. doi: 10.1098/rspb.2003.2511.
37. Nappi AJ, Ottaviani E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays.* 22(5):469-480.
38. Paulin R. 2007. Evolutionary ecology of parasites. Princeton Univ. Press. Princeton. 332 pp.
39. Pham LN, Dione MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent of phagocytes. *PLOS path.* 3(3):1-8. doi:10.1371/journal.ppat.0030026.
40. Plaistow SJ, Siva-Jothy MT. 1996. Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proc R Soc Lond B* 263: 1233-1239. Available from <http://www.jstor.org/stable/50526>.
41. Pomfret JC, Knell RJ. 2006. Immunity and the expression of a secondary sexual trait in a horned beetle. *Behav. Ecol.* 17:466-472. doi: 10.1093/beheco/arj050.
42. Rantala MJ, Kortet R (2003) Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biol J Linn Soc* 79: 503-510. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00202.x.

43. Rantala MJ, Kortet R. 2004. Male dominance and immunocompetence in a field cricket. *Behav. Ecol.* 15(2):187-191. doi: 10.1093/beheco/arg103.
44. Rantala MJ, Koskimäki J, Taskinen J, Tynkkynen K, Suhonen J (2000). Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267:2453-2457. doi: 10.1098/rspb.2000.1305.
45. Rantala MJ, Roff DA (2005) An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Funct. Ecol.* 19(2):323-330. doi: 10.1111/j. 1365-2435.2005.00979.x.
46. Rantala MJ, Vainikka A, Kortet R. 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270:2257-2261. doi:10.1098/rspb.2003.2472.
47. Ridley M. 2004. *Evolution*. Wiley-Blackwell. Boston. 751 pp.
48. Rolff J, Siva-Jothy MT. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science.* 301: 472-475. doi: 10.1126/science.1080623.
49. Roth O, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Kurtz J. 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. B.* 276:145-151. doi:10.1098/rspb.2008.1157.
50. Ryder JJ, Siva-Jothy MT. 2000. Male calling song provides a reliable signal of immune function in a cricket. *Proc R Soc Lond B* 267: 1171-1175. doi: 10.1098/rspb.2000.1125.
51. Sadd BM, Kleinlogel Y, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. 2005. Trans-generational immune priming in a social insect. *Biol. Lett.* 1:386-388. doi: 10.1098/rsbl.2005.0369.
52. Sadd BM, Schmid-Hempel P. 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr. Biol.* 16:1206-1210. doi: 10.1016/j.cub.2006.04.047.
53. Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529-551. doi:10.1146/annurev.ento.50.071803.130420.

54. Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, Siva-Jothy MT. 2009. Introduction. *Ecological immunology*. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364:3-14. doi: 10.1098/rstb.2008.0249.
55. Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen SJ, Székely T. 2007. Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Anim. Behav.* 73: 987-997. doi: 10.1016/j.anbehav.2006.08.012.
56. Sheldon BC, Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11: 317-321. doi: 10.1016/0169-5347(96)10039-2.
57. Siefferman L, Hill GE. 2003. Structural and melanin coloration indicate parental effort and reproductive success in male eastern bluebirds. *Behav. Ecol.* 14(6):855-861. doi: 10.1093/beheco/arg063.
58. Simmons LW, Roberts B. 2005. Bacterial immunity traded for sperm viability in male crickets. *Science.* 309(5743):2031. doi: 10.1126/science.1114500.
59. Siva-Jothy MT. 1999. Male wing pigmentation may affect reproductive success via female choice in a calopterygid damselfly (Zygoptera). *Behaviour.* 136: 1365-1377. doi: 10.1163/156853999500776.
60. Siva-Jothy MT. 2000. A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 2523-2527. doi: 10.1098/rspb.2000.1315.
61. Swaddle JP. 1996. Reproductive success and symmetry in zebra finches. *Anim. Behav.* 51:203-210. doi:10.1006/anbe.1996.0017.
62. Van Gossum H, Sánchez-Guillén RA, Cordero-Rivera A. 2003. Observations on rearing damselflies under laboratory conditions. *Anim. Biol.* 53:37-45.
63. Wyatt GR, Davey KG. 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormones in adult insects en Evans PD, Ed. *Advances in insect physiology.*