



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Respuesta inmune en hembras de libélulas:
cambios en función de la oviposición y edad

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

DANIELA RUIZ SILVA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2011



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de noviembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **RUIZ SILVA DANIELA** con número de cuenta **99264220** con la tesis titulada **"RESPUESTA INMUNE EN HEMBRAS DE LIBÉLULAS: CAMBIOS EN FUNCIÓN DE LA OVIPOSICIÓN Y EDAD"**, realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO CORDOBA AGUILAR**.

Presidente: DR. JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA
Vocal: DR. ALEJANDRO ARIEL RÍOS CHELEN
Secretario: M. EN C. ENRIQUE GONZÁLEZ SORIANO
Suplente: DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS
Suplente: DR. CARLOS ALBERTO LARA RODRÍGUEZ

De acuerdo con lo anterior, la alumna se acogió a la nueva normatividad, con base en el Artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 25 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (29 septiembre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de enero de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
- Al CONACYT por la beca otorgada (No. 220299)
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN216808 y IN204610) por los recursos económicos para la realización de este proyecto.
- A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Alejandro Córdoba Aguilar, M. en C. Enrique González Soriano y Dr. Rogelio Macías Ordoñez

Agradezco:

- Al Dr. Alejandro Córdoba, por su asesoría, su tiempo, por los conocimientos transmitidos y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.
- A mis sinodales: M. en C. Enrique González Soriano, Dr. Humberto Lanz Mendoza, Dr. Alejandro Ríos Chelén, Dr. Atilano Contreras Ramos y Dr. Carlos Lara Rodríguez, por sus valiosos comentarios, los cuales enriquecieron este trabajo.
- Al Maestro Enrique González, por ser el mejor maestro y enseñarme mucho de lo que ahora sé.
- Al Dr. Rogelio Macías, por sus observaciones y aportaciones al trabajo.
- Al Dr. Humberto Lanz, por permitirme utilizar su laboratorio en el INSP en Cuernavaca.
- A Miguel Moreno, por su gran ayuda en el laboratorio.
- A Roberto Munguía y Daniel González, por su inigualable apoyo con la estadística.
- A Adriana Nava, Daniel González e Isaac González, por su ayuda en las recolectas y en el laboratorio.
- A todos los que me ayudaron en el campo con el proyecto de las peleas: Mariana, Daniel R., Tania, Jesús, Memo, Alejandra, Sylvia, Carlos, Liliana, Adriana, Mamá, Papá, Julio y Daniela.
- A Raúl Iván Martínez y a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos: Memo, Jesús, Daniel, Isaac, Angela, Adriana, Robert, Haydeé, Alejandra, Nubia, Víctor y Liz, por hacer del laboratorio un lugar muy ameno para trabajar.
- A Dani y Chak, por ser excelentes amigos y colegas, por las experiencias en Xochi y por las que seguro vendrán, ¡los quiero morros!

Dedico este trabajo y agradezco infinitamente:

- A mis papás, por su ayuda incondicional, por su amor y por ser mis maestros en la vida.
- A mis hermanos Alejandro, Edgar y Mariana y a mis sobrinos Alejandra, Carlos Alejandro y Arturo, por su apoyo y cariño.
- A toda mi familia, en especial a mi abue Paty, que sigue y seguirá en mi corazón por siempre.
- A mis amigos, por estar presentes, aún en la distancia.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Inmunoeología.....	5
1.2 Sistema inmune en insectos.....	6
1.3 Inmunidad y edad.....	6
1.4 Costos inmunológicos de la oviposición.....	7
1.5 Estacionalidad.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. HIPÓTESIS.....	11
4. PREDICCIONES.....	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
5.1 Sujetos de estudio.....	12
5.1.1 <i>Hetaerina americana</i>	12
5.1.2 <i>Argia anceps</i>	12
5.2 Análisis estadísticos.....	16
6. RESULTADOS.....	17
6.1 Variación en la actividad de FO entre temporadas y edades de hembras de <i>H. americana</i>	17
6.2 Diferencias en el número y tamaño de los huevos entre edades de hembras de <i>H. americana</i>	18
6.3 Variación en la actividad de FO entre temporadas y conductas de hembras de <i>A. anceps</i>	20
7. DISCUSIÓN.....	23
7.1 Variación estacional en la actividad de FO en hembras de <i>H. americana</i> y <i>A. anceps</i>	23
7.2 Número y tamaño de los huevos entre edades de hembras de <i>H. americana</i>	25
7.3 Actividad de FO por edades en hembras de <i>H. americana</i>	25
7.4 Variación de FO en <i>A. anceps</i> durante el tándem, oviposición y percha.....	26
7.5 Perspectivas de estudio en el futuro.....	27
8. CONCLUSIONES.....	28
9. REFERENCIAS.....	29

RESUMEN

Los costos de la defensa inmune y los compromisos entre ésta y otros componentes de la adecuación, son temas actuales de estudio de la inmunoeología. En este trabajo se investigó: (a) si la actividad de una enzima clave en la respuesta inmune, la fenoloxidasa (FO), varía en las hembras adultas de la libélula *Hetaerina americana* con respecto a la temporada y edad; (b) si el número y tamaño de los huevos de estas hembras difiere con la edad.; y (c) los posibles costos inmunológicos de la oviposición en hembras de la libélula *Argia anceps*. El estudio se realizó en el río Tetlama, Xochitepec, Morelos. Se recolectaron hembras adultas de *H. americana* de cuatro edades distintas, en dos temporadas (septiembre 2009 y marzo 2010). Se registró la actividad de FO y se contaron y midieron sus huevos. También se registró la actividad de la FO en las hembras de *A. anceps* que se encontraron en las siguientes conductas: tándem, oviposición y percha, todas en dos temporadas (diciembre 2009 y marzo 2010). Los resultados indicaron variación en FO para las dos especies: en marzo hubo mayor actividad que en septiembre y diciembre. Además, las hembras jóvenes de *H. americana* tuvieron una mayor actividad de FO y menos huevos, mientras que las hembras maduras presentaron una menor actividad de FO y más huevos (pero no más grandes). Este cambio puede ser explicado por el desgaste energético con la edad. Las hembras en tándem tuvieron mayor actividad de FO que las hembras en oviposición y percha, lo cual parcialmente sugiere que la oviposición es una actividad costosa.

ABSTRACT

The cost of immune defense and the emerging trade-offs between immunity and other fitness components are current study questions in the recent field of ecological immunology. In this study I investigated whether: (a) the activity of a key immune response enzyme in insects, phenoloxidase (PO), differs in adult females of the damselfly *Hetaerina americana* according to season and age; (b) the number and size of carried eggs differ with age in *H. americana*, and (c) there is an immunological cost of oviposition in females of the damselfly *Argia anceps*. The study was conducted in the Tetlama River, Xochitepec, Morelos. Adult *H. americana* females of four different ages and in two seasons (September 2009 and March 2010) were collected. PO activity was recorded. Eggs were counted and their size measured. I recorded PO activity of female *A. anceps* that engaged in the following behaviors in two seasons (December 2009 and March 2010): in tandem, ovipositing and perching. Results showed variation in PO activity for the two species, and PO values of March were higher than in September and December. Young females had a higher PO activity and produced fewer eggs, and mature females had a lower PO activity and produced more (but not larger) eggs. This change can be explained by the reduction of energetic resources with age. Females in tandem had higher PO activity than females during oviposition and perching, partly suggesting that oviposition is a costly activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunoeología

Recientemente los ecólogos se han interesado en el papel que el sistema inmune juega sobre la adecuación de los hospederos. Es así, como ha surgido un nuevo campo llamado inmunoeología, el cual examina las causas y consecuencias de la variación del sistema inmune en un contexto evolutivo y ecológico (Rolf y Siva-Jothy, 2003, Schmid-Hempel, 2005). La inmunoeología busca entender cuándo y cuáles recursos los hospederos deben asignar para defenderse contra patógenos (Sheldon y Verhulst, 1996).

Un principio central de la inmunoeología es que el establecimiento y mantenimiento de la respuesta inmune son generalmente costosos para los hospederos. Ya que los recursos se encuentran limitados en la mayoría de los animales, la asignación hacia la inmunidad debe balancearse con lo asignado para otras funciones (la reproducción, por ejemplo) (Sheldon y Verhulst, 1996), lo que se interpreta como compromisos o “trade-offs” entre estos dos componentes de la adecuación (Lawniczak *et al.*, 2006). Por esto, los costos de la defensa inmune y los compromisos entre ésta y otros componentes de la adecuación, son temas centrales en este nuevo campo (Schmid-Hempel, 2003, 2005). Existen varios ejemplos de estos compromisos. Un caso es el de las larvas de la mosca *Drosophila* resistentes a parasitoides pero que son menos capaces en la competencia por alimento (Kraaijeveld y Godfray, 1997). Por el contrario, una fuerte selección sobre otros componentes de la adecuación puede reducir la actividad del sistema inmune. Por ejemplo, se observó una disminución de la actividad enzimática de la cascada de fenoloxidasa (una enzima clave en la respuesta inmune en insectos; Cerenius y Soderhäll, 2004) en machos y hembras de la mosca *Scatophaga stercoraria*, debido a una selección sexual intensa (Hosken, 2003). El costo que la activación de la respuesta inmune tiene para otros componentes de la adecuación es fácil de medir e interpretar, algunos ejemplos son la baja tolerancia a la desecación e inanición (Hoang, 2001) y reducción en la fecundidad en *Drosophila* después de que la respuesta inmune fue activada (Fellowes *et al.*, 1999). Por otro lado, efectuar actividades demandantes también puede reducir la respuesta inmune. Ejemplos de esto son la reducción en la tasa de encapsulación de patógenos artificiales en la libélula *Hetaerina americana* después de una pelea (Contreras-Garduño *et al.*, 2006) y la reducción en la actividad de fenoloxidasa y resistencia a infecciones bacterianas en grillos machos de *Gryllus texensis*, después de actividades reproductivas intensas (Adamo *et al.*, 2001). La respuesta inmune

puede ser experimentalmente activada para probar posibles consecuencias adversas en otros componentes. Por ejemplo, una inversión constante en la defensa vía encapsulación de un intruso, reduce el crecimiento, producción de huevos y supervivencia en el grillo común *Acheta domestica* (Bascañan-García *et al.*, 2010). Una reducción en la producción de huevos después de que la respuesta inmune se ha activado por medio de inyecciones de la bacteria *Micrococcus luteus* y de cuentas de gel Sephadex, se ha observado en dos especies de mosquitos, *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti*, respectivamente (Ahmed *et al.*, 2002; Schwartz y Koella, 2004).

1.2. Sistema inmune en insectos

El sistema inmune en insectos es innato y se compone de respuestas celulares y humorales (Levine y Strand, 2002; Schmid-Hempel, 2005). La respuesta celular está mediada por células llamadas hemocitos, que fagocitan o encapsulan patógenos para matarlos (e.g. Schmid-Hempel, 2005). La respuesta humoral está mediada por moléculas que circulan en la hemolinfa, tales como péptidos antimicrobianos y otras proteínas complementarias (e.g. Schmid-Hempel, 2005).

La fenoloxidasa (FO) es una enzima que se sintetiza a partir de enzimas precursoras (proFO) en presencia de patógenos. La FO reacciona con el oxígeno y transforma principalmente grupos difenoles en quinonas, que posteriormente se polimerizan, siendo las responsables de la síntesis de melanina, la cual recubre y mata a los patógenos mediante la formación de cápsulas celulares (Cerenius y Söderhall, 2004).

1.3 Inmunidad y edad

La inversión en inmunidad en la vida de un hospedero depende de una serie de situaciones, entre las que destacan: a) los momentos que el hospedero está más expuesto a ataques por patógenos; y, b) si otras funciones energéticamente demandantes no son prioritarias en ese momento para el hospedero. Estas situaciones raramente se han abordado en el contexto de cambios en inversión a la respuesta inmune a lo largo de la vida de los organismos. Existen estudios comparativos para conocer las diferencias en la actividad de enzimas relacionadas con el establecimiento de respuestas inmunes (FO y enzimas hidrolíticas) entre estadios larvales, juveniles y adultos de moluscos (Luna-González *et al.*, 2003, 2004). Estos estudios han encontrado diferencias significativas en la actividad de esas enzimas entre estadios, siendo la etapa de adulto la que presenta una mayor

actividad. Otro estudio relacionado con el desarrollo y la respuesta inmune es el de Koella y Böete (2002) quienes encontraron una correlación genética entre la edad de pupación y la melanización en el mosquito *Aedes aegypti*. En este estudio, los mosquitos que puparon más tardíamente tuvieron mayor encapsulación que aquellos que puparon más temprano. Esto sugiere una correlación genética entre la edad de pupación y la inmunocompetencia. Sin embargo, estos estudios no contextualizaron la inversión a la respuesta inmune en relación a cambios adaptativos a diferentes edades.

Es importante realizar estudios que evalúen los compromisos que los individuos asumen en diferentes etapas de su vida. Por ejemplo, debe existir un compromiso en el momento de producción de huevos (en número y tamaño) y la respuesta inmune. Ante este momento en la vida de un organismo, se predice que los individuos adultos producirán más huevos o huevos más grandes a costo de la respuesta inmune.

La senescencia es un proceso progresivo de degeneración somática, que perjudica las funciones celulares, interrumpe la homeostasis fisiológica y disminuye la capacidad de supervivencia (Zerofsky *et al.*, 2005). La actividad y eficacia del sistema inmune cambia durante la vida de un animal, y típicamente muestra un declive con la edad, especialmente después de la reproducción. Este declive ha sido llamado inmunosenescencia, y se ha observado tanto en vertebrados como en invertebrados (Moret y Schmid-Hempel, 2009). Ejemplos de estos estudios son los realizados con *Bombus terrestris*, una especie de abejorro, donde se encontró una disminución en la densidad de hemocitos y en la actividad de FO con la edad, y que la producción de péptidos antibacterianos no fue afectada por la misma (Moret y Schmid-Hempel, 2009); en otro trabajo con las especies de abejorros, *B. terrestris* y *B. lucorum*, se observó un decremento en la habilidad de encapsular patógenos y en la concentración de hemocitos con la edad (Doums *et al.*, 2002).

1.4 Costos inmunológicos de la oviposición

Una de las actividades presumiblemente más costosas en la vida de un insecto es la oviposición. Siva-Jothy y colaboradores (1998) realizaron lo que hasta el momento es el único trabajo sobre costos de oviposición en invertebrados. El estudio fue realizado con la libélula *Matrona basilaris japonica*, cuyas hembras presentaron una reducción rápida y significativa de la encapsulación después de la oviposición. Los autores sugirieron un efecto negativo en la longevidad de las

hembras como un costo de la reproducción debido a una baja en el sistema inmune después de un esfuerzo reproductivo. Al parecer, la hormona juvenil está involucrada en estos cambios como sugieren Rolff y Siva-Jothy (2002). La hormona juvenil sería el vínculo fisiológico que haría que los recursos destinados a funciones sexuales afecten la respuesta inmune (Contreras-Garduño *et al.*, en prensa).

1.5 Estacionalidad

En condiciones generales los animales viven en ambientes temporales donde existen cambios en la disponibilidad de recursos, condiciones atmosféricas y riesgo de infecciones (Martin *et al.*, 2008). La variación de estas condiciones en los diferentes momentos del año tiene efectos en la adecuación como la reproducción y el sistema inmune. Por ejemplo, en momentos del año cuando la disposición de alimento es escasa, la respuesta inmune puede verse afectada (Martin *et al.*, 2008).

Existen muy pocos estudios que han documentado la variación estacional de la respuesta inmune, y los que se han realizado han utilizado vertebrados (aves y mamíferos). El patrón general es que la respuesta inmune aumenta en invierno y disminuye en primavera (Martin *et al.*, 2008). Por el contrario, sólo unos pocos estudios se han llevado a cabo usando invertebrados. Córdoba-Aguilar y Contreras-Garduño (2006) han sugerido que la respuesta inmune en libélulas está fuertemente ligada a componentes bióticos y abióticos del ambiente, por lo que puede ser un buen indicador de la calidad ambiental, y que esta calidad puede variar de acuerdo a la estacionalidad. Como apoyo a esto, se sabe que existe variación en la inmunidad de individuos que emergen a diferentes tiempos de una misma temporada (Yourth *et al.*, 2001 y 2002).

Uno de los trabajos que ha documentado la variación estacional en la respuesta inmune fue realizado por Córdoba-Aguilar y colaboradores (2009a). Estos autores encontraron que tres componentes esenciales de la respuesta inmune (FO, encapsulación y óxido nítrico) de machos de la libélula *H. americana* variaron en dos temporadas, lluvias (junio y octubre) y secas (enero y abril), en una población en Morelos, México. Hubo una mayor actividad de FO y melanización en los meses de lluvia comparado con los meses de secas. Dado que este animal no vive más de dos meses como adulto (Córdoba-Aguilar, 2009), los resultados indican que hay generaciones donde los animales tienen un sistema inmune más deprimido, donde se pueden ver más expuestos a patógenos. Es por esto que conocer esta variación es importante por las consecuencias para los

hospederos. En un animal como *H. americana* que vive todo el año, las actividades sexuales costosas y que conflictúan a la respuesta inmune tendrán costos variables dependiendo del momento del año (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009a).

2. OBJETIVOS

- 1) Conocer si existe variación en la actividad de fenoloxidasa entre temporadas y edades de hembras adultas de la libélula *Hetaerina americana*.
- 2) Investigar si existen diferencias en el número y tamaño de los huevos entre edades de hembras adultas de la libélula *Hetaerina americana*.
- 3) Evaluar los posibles costos inmunológicos de la oviposición en hembras adultas de la libélula *Argia anceps*.

3. HIPÓTESIS

- 1) Existen cambios en la actividad de componentes de la respuesta inmune (fenoloxidasa) y en el número y/o tamaño de huevos, en las hembras adultas de la libélula *H. americana* en dos diferentes temporadas.
- 2) Existe variación en la actividad de la enzima fenoloxidasa y en el número y/o tamaño de huevos, en las hembras adultas de la libélula *H. americana* de acuerdo a su edad.
- 3) La oviposición es una actividad costosa en la libélula *A. anceps*.

4. PREDICCIONES

- 1) La respuesta inmune será mayor en la temporada de lluvias (septiembre) que en la temporada de secas (marzo).
- 2) Las hembras más jóvenes tendrán mejor respuesta inmune (mayor actividad de fenoloxidasa) y más huevos que las hembras más viejas.
- 3) Las hembras que ovipositan tendrán una menor respuesta inmune que las hembras que no están realizando esta conducta.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Sujetos de estudio

5.1.1 *Hetaerina americana*

La libélula *H. americana* es un zigóptero de la familia Calopterygidae. Se distribuye desde el norte de Estados Unidos hasta Honduras (Paulson, 2007). Los adultos presentan un marcado dimorfismo sexual. Los machos tienen un intenso color metálico iridiscente principalmente en el tórax, con una mancha roja en la base de las alas. Estudios previos han demostrado que esta mancha roja es un carácter que refleja la condición de los individuos: los machos con manchas más grandes tienen mayores reservas energéticas, mayores probabilidades de conseguir y mantener territorios, mayor probabilidad de copular y mejor respuesta inmune (Contreras-Garduño *et al.*, 2006, 2008). Por otro lado, las hembras presentan variación en el color corporal que puede ir de verde a café, con una incipiente mancha en la base de las alas (Grether, 1996a; Contreras-Garduño, 2007). *H. americana* es una especie cuyos machos compiten, mediante peleas energéticamente costosas, por los territorios donde las hembras llegan a copular (Contreras-Garduño *et al.*, 2006, 2008). Puesto que dichos territorios no brindan ningún recurso a las hembras, se ha propuesto que esta especie presenta un sistema de apareamiento de tipo lek (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009b). Finalmente, los machos acosan excesivamente a las hembras antes de copular, lo que afecta la condición de estas últimas (Córdoba-Aguilar, 2009). Cuando el acoso es muy alto, las hembras tratan de evadir a los machos lo cual reduce las reservas energéticas y respuesta inmune de las primeras, reduciendo su supervivencia (Córdoba-Aguilar, 2009).

5.1.2 *Argia anceps*

A. anceps es una libélula del suborden Zygoptera y la familia Coenagrionidae. Se distribuye desde el norte de México hasta Panamá. También presenta dimorfismo sexual. Los machos tienen una coloración azul con algunas bandas oscuras en el tórax y abdomen y las alas presentan una ligera coloración hialina. Las hembras son marrones y tienen alas ambarinas (Westfall y May, 1996). *A. anceps* es una especie abundante en pequeños ríos y su temporada de vuelo es prácticamente todo el año (Garrison, 1996). No existen datos publicados sobre su historia natural o fisiología.

En este trabajo las hembras de *H. americana* se utilizaron para responder las preguntas relacionadas con la edad y el número y tamaño de huevos. Las hembras de *A. anceps* se usaron para responder las cuestiones relacionadas con la oviposición. En ambas especies se evaluó la actividad de FO en relación a la temporalidad.

El trabajo de campo se llevó a cabo en el río Tetlama (18°46'11''N, 99°14'16'' W) en Xochitepec, Morelos, en los meses de septiembre y diciembre de 2009 y marzo de 2010. Estos son los meses de mayor y menor densidad de individuos, respectivamente, para *H. americana* (Córdoba-Aguilar, 2009) y para *A. anceps* (observación personal).

En septiembre de 2009 y marzo 2010 se recolectaron hembras de *H. americana* (Fig. 1a) de dos grupos de edades (tenerales-jóvenes: $n_{\text{sep}} = 25$, $n_{\text{marzo}} = 26$, maduras-viejas: $n_{\text{sep}} = 27$, $n_{\text{marzo}} = 23$). Estas se colocaron en tubos de plástico de 7.5 cm con un palillo, se taparon con un algodón húmedo y se guardaron en una hielera para evitar la deshidratación. La clasificación por edades se basó en la flexibilidad de las alas y la dureza de los últimos segmentos abdominales: las hembras más jóvenes presentan alas más flexibles y brillantes y abdomen blando, a diferencia de las hembras más viejas que tienen alas menos flexibles y opacas, y con frecuencia rotas, y abdomen duro (Córdoba-Aguilar, 2009).

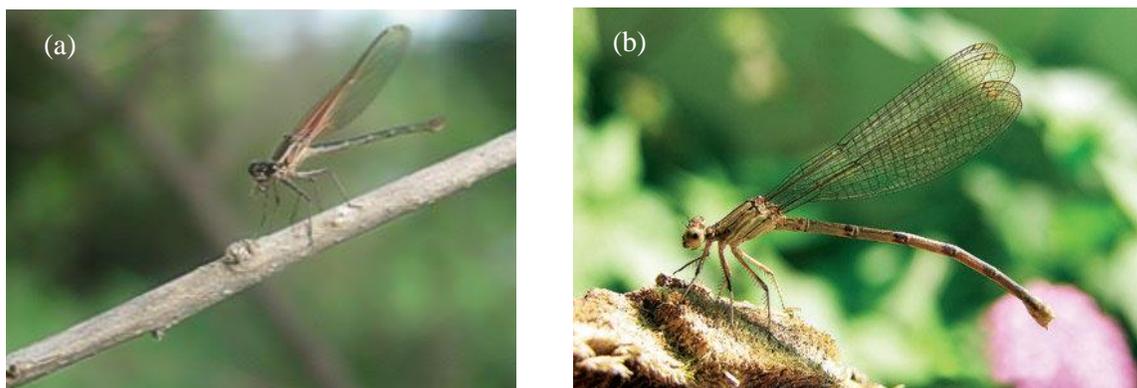


Figura 1. Hembras maduras de *H. americana* (a) y de *A. anceps* (b)

Después de la captura, se recolectó la hemolinfa (150 μ l aprox.) por perfusión, haciendo una pequeña incisión en los últimos segmentos abdominales e inyectando 500 μ l de PBS (buffer de fosfatos) entre el segundo y tercer par de patas. Las alas anteriores derechas (de la base a la punta)

se midieron (en mm) con un vernier digital y los cuerpos se conservaron en tubos eppendorf con alcohol al 70% para posteriormente contar el número de huevos. La longitud del ala anterior derecha se midió para controlar el efecto de la talla sobre los parámetros del sistema inmunitario. Una vez obtenida la hemolinfa, se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada muestra por medio de un kit comercial (Pierce protein assay BCA™) para estandarizarla y que fuera la misma en todos los individuos (Contreras-Garduño *et al.*, 2007). Posteriormente se utilizó el método del ácido biciconínico que consiste en mezclar 10 µl de cada muestra de hemolinfa, 40 µl de PBS y 150 µl de una mezcla de reactivo de Pierce. Después se usó una concentración de albúmina conocida para hacer una curva estándar la cual se comparó con las muestras. Conocida la cantidad de proteína presente en cada muestra, se ajustó a 25 µg de proteína para medir posteriormente la actividad de FO. Esta actividad se midió espectrofotométricamente a través de la oxidación de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y la formación de melanina. Se colocaron en cada pozo de una placa de ELISA de 96 pozos (Costar 96™) 100 µl que contenían 25 µg de proteína de cada muestra. A estos 100 µl se les adicionó 50 µl del sustrato (L-DOPA) a una concentración de 4mg/ml para iniciar la reacción de activación de la FO. La placa se dejó incubar durante 20 minutos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, para posteriormente dar inicio a las lecturas espectrofotométricas. Las mediciones fueron hechas por medio de un lector de ELISA (ELX 800, Biotek) a una longitud de onda de 490 nm, realizándose cada 10 minutos durante una hora.

Las hembras jóvenes, maduras y viejas usadas para medir los parámetros inmunológicos son las que se disectaron bajo un microscopio estereoscópico (Olympus, SZX7) para contar sus huevos. Para este fin, se realizó una incisión en la parte ventral del abdomen, se colocaron gotas de hidróxido de potasio sobre los racimos de huevos para disolver la grasa que los une, se separaron los huevos con pinzas de punta fina y se contaron. Se colocaron cinco huevos tomados al azar en un portaobjetos a una escala de un milímetro y posteriormente se les tomó una fotografía (Fig. 2). La longitud de los huevos se midió utilizando el programa Image Tool®.

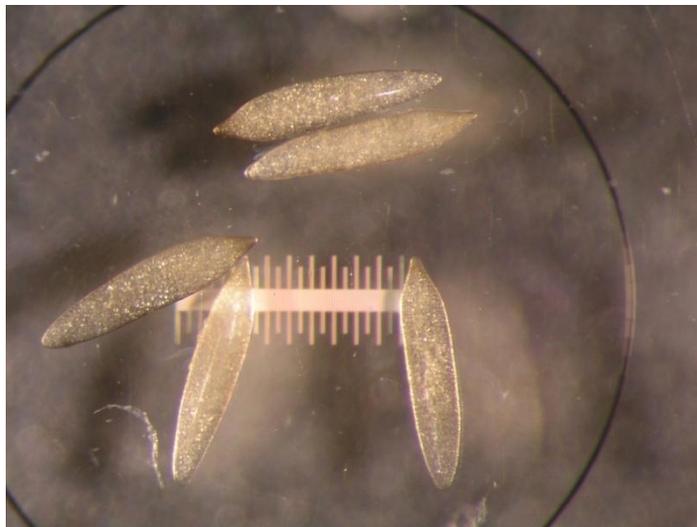


Figura 2. Huevos de *H. americana* (escala=1 mm)

Para conocer los posibles costos de la oviposición, se capturaron hembras de *A. anceps* (Fig. 1b) en diciembre de 2009 y marzo de 2010, entre las 1000 y las 1200 hrs, que se encontraban realizando las siguientes conductas: tándem ($n_{\text{dic}} = 17$, $n_{\text{marzo}} = 15$), oviposición ($n_{\text{dic}} = 26$, $n_{\text{marzo}} = 18$) y percha ($n_{\text{dic}} = 10$, $n_{\text{marzo}} = 4$). Las hembras en tándem se encontraron en la vegetación a la orilla del río, las hembras ovipositando se capturaron mientras eran resguardadas por su pareja en las rocas y la vegetación sumergida. Por último, las hembras perchadas se encontraron solitarias y en la vegetación de la orilla del río. Los criterios para inferir que las hembras perchadas no habían incurrido en oviposición fueron los siguientes: a) no participaron en actividades de cópula (incluyendo el tándem) y oviposición después de cinco minutos de observación, y, b) el número de huevos de las hembras perchadas debía ser considerablemente inferior al de las hembras en tándem y oviposición. El número de huevos se obtuvo mediante una disección, descrita anteriormente en esta sección. El análisis estadístico del número de huevos de *A. anceps* se puede consultar en la sección de resultados.

Los individuos de *A. anceps* se perfundieron como se indicó antes para *H. americana* para cuantificar proteína y actividad de FO. Para controlar el efecto de la talla sobre la respuesta inmune, se midió la longitud del ala anterior derecha (de la base a la punta) con un vernier (en mm).

5.2 Análisis estadísticos

Para determinar la variación en la actividad de FO por edad (*H.americana*), conducta (*A. anceps*) y temporada (ambas especies) se utilizó una transformación logarítmica ($\ln+0.01$) para los valores de FO para así usar un análisis de covarianza (ANCOVA). Para analizar los datos de huevos de *H. americana*, se realizó un modelo lineal generalizado utilizando una distribución binomial negativa, con el objetivo de conocer si existían diferencias en el número y tamaño de huevos entre las edades y en las dos temporadas. Para analizar los datos de los huevos de *A. anceps* se efectuó un análisis de covarianza (ANCOVA) y de esta manera determinar se existían diferencias en el número de huevos entre conductas. En todos los análisis se usó la longitud del ala como covariable. Los datos se analizaron con el software R 2.10.1 y las gráficas se realizaron en el programa SPSS versión 13 y en R 2.10.1.

6. RESULTADOS

6.1 Variación en la actividad de FO entre temporadas y edades de hembras de *H. americana*

Existió variación en la actividad de FO entre las dos temporadas (ANCOVA, $F_{1, 95} = 479.5026$, $P < 0.0001$; cuadro 1, Fig. 3). En la segunda temporada (marzo) se observó una mayor actividad de FO que en la primera (septiembre).

Se encontraron diferencias entre los dos grupos de edades (ANCOVA, $F_{1, 95} = 15.3912$, $P = 0.0001$; Fig. 3) en el mes de marzo. Las hembras tenerales-jóvenes presentaron una mayor actividad de FO que las maduras-viejas. El tamaño no explicó la variación en FO ni las interacciones entre los distintos factores (cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de covarianza de la actividad de FO en hembras de *H. americana* en función de la temporada y la edad, utilizando como covariable la longitud del ala anterior derecha.

Variable	S.C.	g.l.	C.M.	F	P
Edad	8.622	1	8.622	15.391	0.001
Temporada	268.603	1	268.603	479.502	< 0.001
Long. ala dcha.	0.106	1	0.106	0.189	0.664
Edad*Temporada	1.382	1	1.382	2.466	0.119
Edad*Long. ala dcha.	0.478	1	0.478	0.852	0.358
Temporada*Ala	1.334	1	1.334	2.382	0.126
Residuales	53.216	95	0.560		

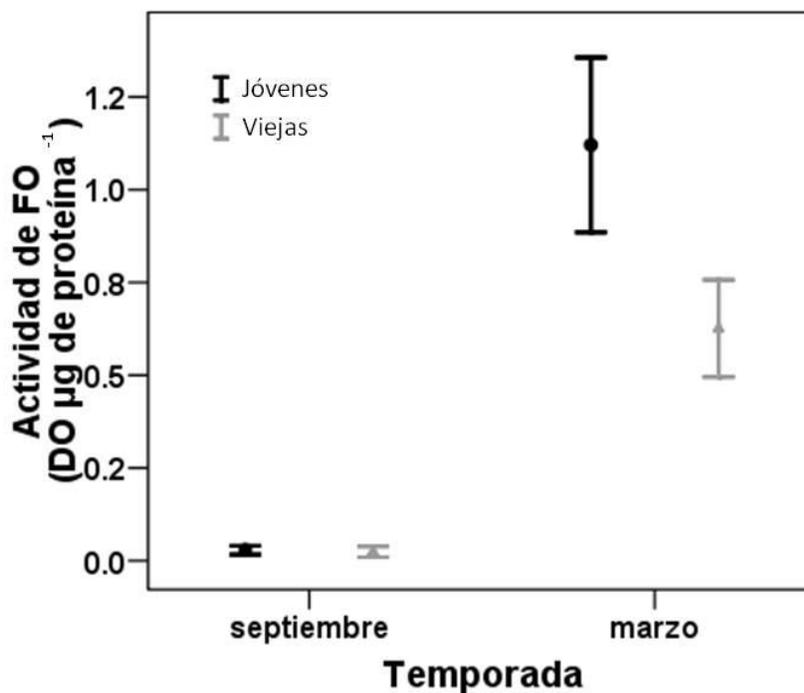


Figura 3. Actividad de FO por temporada y edad (Jóvenes, grupo jóvenes-tenerales; Viejas, grupo maduras-viejas) en hembras de *H. americana*. DO se refiere a la densidad óptica.

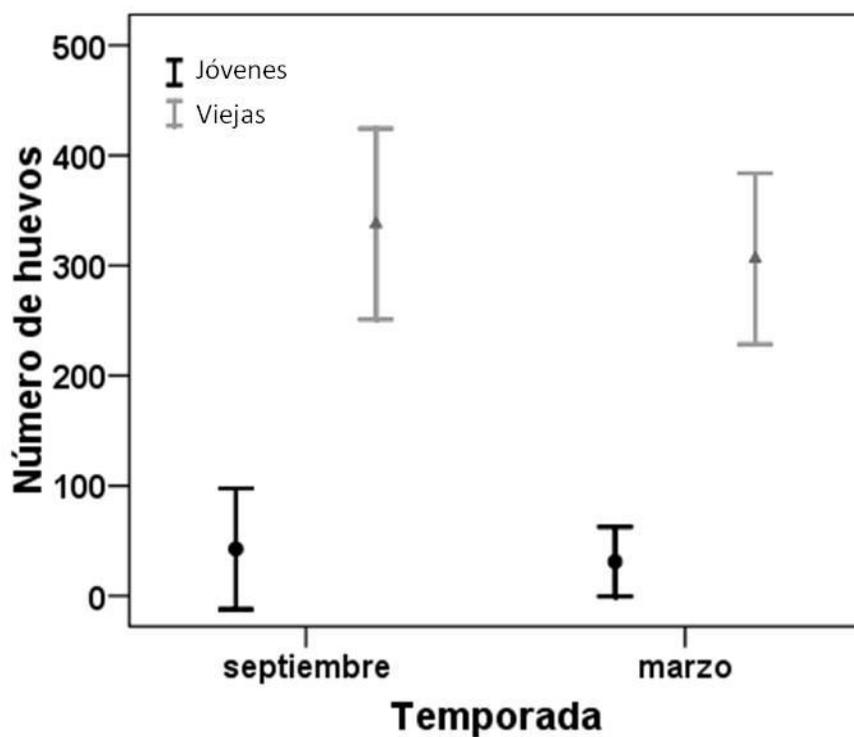
6.2 Diferencias en el número y tamaño de los huevos entre edades de hembras de *H. americana*

Existieron diferencias en el número de huevos entre grupos de edades pero no entre temporadas (Cuadro 2; Fig. 4). Las hembras maduras-viejas tienen un mayor número de huevos que las tenerales-jóvenes.

No se observó variación en el tamaño de los huevos entre temporadas (ANCOVA, $F_{1, 54} = 0.241$, $P = 0.625$; cuadro 3) ni entre grupo de edades (ANCOVA $F_{1, 54} = 1.225$, $P = 0.273$; cuadro 3). La longitud alar no explicó la variación en el número y tamaño de los huevos ni las interacciones entre los distintos factores (cuadro 3).

Cuadro 2. Análisis de covarianza del número de huevos en hembras de *H. americana* en función de la temporada y la edad.

Variable	g.l.	Devianza residual	p(> Chi)
Nulo		134.40	
Temporada	1	134.26	0.717
Edad	1	110.86	< 0.001
Long. ala dcha.	1	109.20	0.198

Figura 4. Número de huevos por temporada y edad (Jóvenes, grupo jóvenes-tenerales; Viejas, grupo maduras-viejas) de hembras de *H. americana*.

Cuadro 3. Análisis de covarianza del tamaño de huevos en hembras de *H. americana* en función de la temporada y la edad.

Variable	S.C.	g.l.	C.M.	F	P
Edad	0.003	1	8.622	1.225	0.273
Temporada	0.001	1	0.001	0.241	0.625
Long. ala dcha.	0.001	1	0.001	0.588	0.447
Residuales	0.135	54	0.002		

6.3 Variación en la actividad de FO entre temporadas y conductas de hembras de *A. anceps*

Existieron diferencias en el número de huevos según el tipo de conducta (ANCOVA, $F_{2, 85} = 14.72$, $P < 0.0001$; Cuadro 4; Fig. 5). Las hembras perchadas presentaron menos huevos que las hembras en tándem y en oviposición. No hubo diferencias significativas en el número de huevos entre las conductas tándem y oviposición. El número de huevos se incrementa con el tamaño de la hembra (ANCOVA, $F_{2, 85} = 8.50$, $P = 0.005$; Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de covarianza del número de huevos en hembras de *A. anceps* en función de la temporada y tres conductas (tándem, ovipositando y perchando), utilizando como covariable la longitud del ala anterior derecha.

Variable	S.C.	g.l.	C.M.	F	P
Temporada	47346	1	47346	1.95	0.170
Conducta	726951	2	363475	14.72	<0.001
Long. ala dcha.	209745	1	209745	8.50	0.005
Residuales	2098677	85	24690		

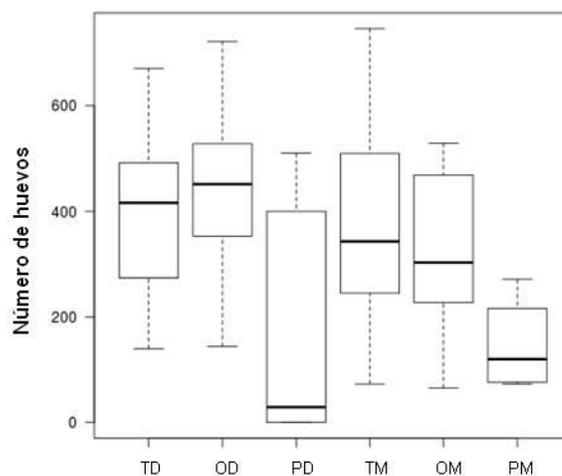


Figura 5. Número de huevos por temporada (D, diciembre; M, marzo) y conducta (T, tándem; O, oviposición; P, percha) de *A. anceps*.

Existió variación en la actividad de FO entre temporadas (ANCOVA, $F_{1, 80} = 159.2688$, $P < 0.0001$; Cuadro 5; Fig. 6). En el mes de marzo la actividad fue mayor que en el mes de diciembre. El largo del ala no explica las diferencias en FO entre temporadas (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de covarianza de la actividad de FO en hembras de *A. anceps* en función de la temporada y tres conductas (tándem, oviposición y percha), utilizando como covariable la longitud del ala anterior derecha.

Variable	S.C.	g.l.	C.M.	F	P
Conducta	4.661	2	2.330	4.5087	0.014
Temporada	82.324	1	82.324	159.269	< 0.001
Long. ala dcha.	0.274	1	0.274	0.529	0.469
Conducta*Temporada	1.068	2	0.534	1.033	0.361
Conducta*Long. ala dcha.	0.118	2	0.059	0.114	0.892
Conducta*Ala	0.038	1	0.038	0.075	0.786
Residuales	41.351	80	0.517		

Se encontraron diferencias significativas entre el tándem y la oviposición ($t = -2.074$, $P = 0.0411$).

Las hembras en tándem presentaron mayor actividad de FO que las hembras en oviposición.

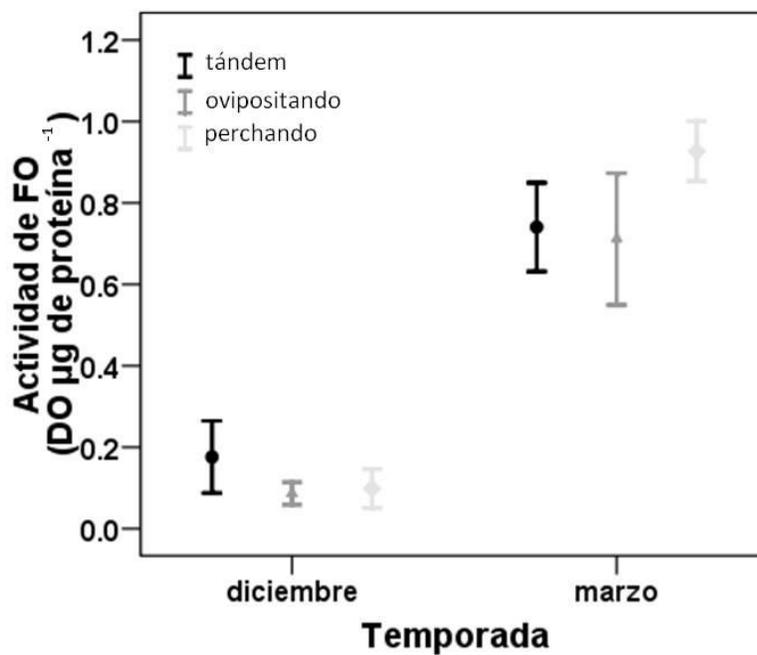


Figura 6. Actividad de FO por temporada y tipo de conducta en hembras adultas de *A. anceps*. DO significa densidad óptica.

7. DISCUSIÓN

7.1 Variación estacional en la actividad de FO en hembras de *H. americana* y *A. anceps*

En general, mis resultados contrastan con varios estudios previos en *H. americana*. En adelante desarrollo marcos explicativos de estos fenómenos. Cabe señalar que varias de mis explicaciones se sustentan en situaciones hipotéticas, dado el carácter diferente de mis resultados con respecto a lo esperado y su carácter no experimental. En principio, los resultados indicaron variación estacional en la actividad de FO en hembras adultas de *H. americana*; la segunda temporada (marzo, mes de secas) presentó una actividad más alta que la primera temporada (septiembre, mes de lluvias). Estos resultados contrastan con lo obtenido por Córdoba-Aguilar y colaboradores (2009a) para los machos de la misma especie, quienes encontraron que los individuos en los meses de secas (enero y abril) muestran una menor actividad de FO, que los individuos en los meses de lluvias (julio y octubre).

Las diferencias en actividad inmune entre los sexos pueden deberse a que los machos y las hembras asignan recursos a las diferentes funciones (por ejemplo, peleas, forrajeo, apareamiento) de manera distinta (Sheldon y Verhulst, 1996; Rolff, 2002; Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009c). La asignación de recursos hacia el sistema inmune podría tener más recompensas para las hembras, ya que un incremento en su longevidad puede resultar en una mayor descendencia (Rolff, 2002). En contraste, los machos pueden aumentar su éxito reproductivo asignando más recursos hacia caracteres sexuales, y de esta manera tener un mayor número de cópulas (Kurtz *et al.*, 2000; Rolff, 2002). En relación con mi estudio, las hembras de *H. americana* pasan la mayor parte del día forrajeando y sólo se acercan a los territorios para aparearse (observaciones personales), mientras que los machos obtienen y defienden territorios, donde las hembras llegan a copular, mediante peleas energéticamente costosas (Grether, 1996a). Cuando la competencia es mayor, los machos tienen valores más altos de FO que cuando la competencia es menor (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009a). Esto contradice las ideas arriba expuestas de si los machos invertirían menos en respuesta inmune cuando la competencia es mayor, sin embargo, al parecer hay mayor cantidad de recursos alimenticios en la época de mayor competencia masculina (Córdoba-Aguilar *et al.* 2009a) lo cual podría explicar esto. Doums y Schmid-Hempel (2000) encontraron que un incremento en la conducta de forrajeo disminuye la inmunocompetencia en una abeja del género *Bombus*. Es posible que las hembras de *H. americana*, que forrajean a tasas mucho mayores que los machos (Grether,

1996b), presenten el mismo compromiso. Puede ser que esta sea una de las razones del por qué las hembras presentan una actividad de FO más baja que los machos durante la época de lluvias que es cuando el alimento es más abundante. Otra explicación es que los meses que los machos necesitan compensar con valores altos de FO en situaciones de alta competencia no sea necesariamente el caso para las hembras. De hecho, en estas situaciones, el acoso sexual de machos a hembras es menor (porque son más los ataques entre machos que los “distrae” de seguir hembras; Córdoba-Aguilar, 2009) lo que haría que las hembras no compensaran al invertir más en el sistema inmune. Por otra parte, en la situación opuesta, cuando los machos tienen un sistema inmune menos robusto pero el acoso a las hembras es mayor, las hembras compensarían con una mejor respuesta inmune porque de otro modo su supervivencia se vería drásticamente disminuida (Córdoba-Aguilar, 2009). Los resultados en esta especie han mostrado plasticidad ontogénica en capacidad inmune y asignación de recursos en las hembras ante distintas situaciones de acoso masculino (Córdoba-Aguilar, 2009) pero las comparaciones entre sexos no se habían hecho en el marco de selección sexual.

Los resultados exhiben también variación estacional en la actividad de FO en hembras de *A. anceps*. Se encontró una mayor actividad en marzo que en diciembre. Este es el mismo patrón que encontré para hembras de *H. americana*. El vuelo y el forrajeo son algunas de las actividades energéticamente más demandantes en los insectos (Beenackers *et al.*, 1984) por lo que las tasas en las que estas libélulas forrajean pueden ser una posible explicación a la variación estacional en la actividad de FO. Durante el mes de diciembre el alimento es más abundante que durante el mes de marzo, por lo que las hembras forrajean más en esta temporada y la actividad de FO disminuye. Otra posibilidad de la variación estacional de la FO puede ser la densidad de machos y la competencia por cópulas tal como detallé para *H. americana*. *A. anceps* es una libélula que exhibe rasgos de territorialidad, como la pelea con coespecíficos (E. González-Soriano, comentario personal). Es probable que, al igual que en *H. americana*, la densidad de machos (la cual varía a lo largo del año) induzca acoso sexual hacia las hembras, lo cual disminuya o aumente su capacidad inmune. Estos supuestos, claro, tendrán que evaluarse a partir de evidencia experimental.

7.2 Número y tamaño de los huevos entre edades de hembras de *H. americana*

Los resultados mostraron diferencias en el número de huevos en distintas edades de *H. americana*. Las hembras maduras y viejas presentan un mayor número de huevos que las teneales y jóvenes, pero no existió variación en el número ni en el tamaño de huevos entre temporadas. Es de esperarse que las hembras teneales presenten menos huevos que las maduras y las viejas, ya que sus ovarios son menos desarrollados (Corbet, 1999). La edad en la que se desarrollan los primeros folículos maduros varía entre especies de libélulas (Corbet, 1999). Por ejemplo, en *Ischnura verticalis* los folículos aparecen de 4-8 días después de la emergencia (Grieve, 1937), mientras que en *Leucorrhinia dubia* esto ocurre entre los 6 y los 12 días (Pajunen, 1962). En un estudio previo, Watanabe y Adachi (1987) determinaron la fecundidad y el número de huevos del zigóptero *Copera annulata* encontrando que el número de huevos maduros decrece con la edad de la hembra, lo cual es contrario a lo que yo encontré. Existen muchos otros factores que, además de la edad, afectan la cantidad de huevos, de los que destacan el intervalo entre puestas, la temperatura, el alimento, el parasitismo (Corbet, 1999) y el grado de acoso sexual masculino (Córdoba-Aguilar, 2009).

Un estudio previo mostró que cuando el acoso es alto en *H. americana*, las hembras “responden” produciendo más huevos al principio de su vida (Córdoba-Aguilar, 2009). Puede ser que a lo largo de mi estudio, el grado de acoso no fuera tan alto de tal modo que no observé que los individuos jóvenes tuvieran más huevos que los viejos. Lo que sí es compatible con el estudio de Córdoba-Aguilar (2009) es que independientemente del grado de acoso y temporalidad, las hembras siempre producen el mismo número de huevos.

7.3 Actividad de FO por edades en hembras de *H. americana*

De acuerdo con los resultados, las hembras teneales y jóvenes presentan una mayor actividad de FO que las maduras y viejas en las dos temporadas (aunque las diferencias son significativas solamente para marzo). Una interpretación de esto es que las hembras recién emergidas son más susceptibles a ataques por patógenos y por eso invierten más en el sistema inmune para así aumentar su probabilidad de supervivencia, contrario a lo que sucede con las hembras más viejas que ya han superado esta etapa. Esto está de acuerdo con las predicciones de Rolff (2002) donde la apuesta al principio de la vida es proteger al organismo de infecciones para no sacrificar la

reproducción. Por otro lado, las hembras más jóvenes presentan un menor número de huevos que las hembras más viejas, lo que apoya la existencia de compromisos entre el establecimiento de respuestas inmunes y la reproducción tal y como Carton y David (1983) y Fellowes y colaboradores (1999) encontraron para las hembras de *Drosophila melanogaster* con huevos de parasitoides encapsulados, las cuales producen significativamente menos huevos que las hembras control. Otra explicación es que poco después de la emergencia, a la hembra le toma varios días obtener los recursos para fabricar sus huevos. De hecho, se cree que la fase teneral es una especie de preparación sexual para machos y hembras, donde ambos buscan recursos para afrontar su vida futura (Corbet, 1999).

7.4 Variación de FO en *A. anceps* durante el tándem, oviposición y percha

Los resultados mostraron que las hembras que se encontraban ovipositando presentaron una menor actividad de FO que las hembras que se encontraban perchando. Este resultado apoya la idea de que la oviposición es una actividad costosa en la vida de los animales y coincide con el trabajo de Siva-Jothy y colaboradores (1998), quienes encontraron una reducción en la encapsulación de patógenos artificiales después de la oviposición en la libélula *Matrona basilaris japonica*. En la preparación para la cópula, las hembras se encuentran preparadas inmunológicamente para enfrentar a posibles patógenos; es por esto que la actividad de FO es alta. Parte de la explicación de por qué la respuesta inmune se hace menos robusta, es que la hormona juvenil induce el reparto de recursos lo cual favorece la actividad copulatoria a partir de proveer menos recursos a la respuesta inmune (Rolf y Siva-Jothy, 2002). No es que necesariamente el animal tenga pocos recursos, sino que la hormona juvenil “apaga” ciertas funciones al asignar menos recursos. Resulta curioso que el tercer tratamiento (perchadas) presentó una actividad intermedia de FO. Una explicación es que después de la oviposición exista una fase de “recuperación”. Asumiendo que la producción de huevos fue costosa en recursos, las hembras podrían necesitar re-abastecerse de los mismos, hasta que terminan de producir el siguiente grupo de huevos. A ciencia cierta, no se conoce cómo la dieta impacta la producción de huevos, pero sí se sabe que estos se producen toda la vida y se “reparten” en las oviposiciones en puntos discretos, incluso en especies monógamas, como la libélula *Ischnura verticalis* (Corbet, 1999). Esto supondría que las hembras adultas no tienen que usar todos los recursos obtenidos durante el periodo larvario para la producción de huevos, sino que podrían también depender del forrajeo como adulto, tal como lo proponen Richardson y Baker (1996) para la libélula *Ischnura verticalis*.

7.5 *Perspectivas de estudio en el futuro*

Mi trabajo es correlativo lo cual me impidió conocer con más certidumbre cómo distintas variables ambientales (e.g. variación en disposición de alimento, condiciones climáticas, acoso sexual masculino, entre otros) podrían afectar los valores de inmunidad. En futuros trabajos sería de gran interés controlar y evaluar variables como la densidad de individuos (la cual determina en gran medida el grado de acoso de los machos hacia las hembras) así como la tasa de forrajeo (que es una actividad energéticamente demandante y que presumiblemente afecta la actividad de parámetros inmunológicos, como la FO). Sería también interesante estudiar otras especies de libélulas tanto territoriales como no territoriales y evaluar si los resultados siguen el mismo patrón. Esta comparación es válida ya que los niveles de acoso sexual masculino son diferentes entre especies territoriales y no territoriales (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009d). Como se propone en esta discusión, la estacionalidad es una variable sumamente importante que determina la distribución y cantidad de recursos alimenticios, es por eso que una evaluación precisa de los mismos sería útil. Asimismo, es importante realizar experimentos en condiciones de laboratorio con situaciones controladas para poner a prueba los compromisos entre la producción de huevos y la capacidad inmune (por ejemplo, hembras infectadas y control o hembras bien alimentadas y hembras sin alimentar), y de esta manera ver si las hembras “apuestan” más a la producción de huevos que a la respuesta inmune. De igual manera, sería muy interesante comparar los niveles de FO en hembras que se encuentren en diferentes fases de la oviposición.

8. CONCLUSIONES

1) Se encontró variación en la actividad de FO entre temporadas en hembras de las libélulas *H. americana* y *A. anceps*. El mes de marzo presentó niveles más altos que los meses de septiembre y diciembre. El desgaste energético debido al forrajeo y al acoso por parte de los machos son probables explicaciones.

2) Las hembras más viejas de *H. americana* produjeron más huevos, pero de igual tamaño, que las más jóvenes. Es probable que este patrón se deba a que las hembras jóvenes invierten más recursos a la respuesta inmune que a la producción de huevos. Existen otros factores que además de la edad afectan la producción de huevos como: el parasitismo, el grado de acoso, el alimento, el intervalo entre puestas, las bajas temperaturas, entre otros, aunque estos deben ser probados en estudios posteriores en esta libélula.

3) Existió variación en la actividad de FO entre edades de hembras de *H. americana*. Las más jóvenes presentaron mayor actividad que las más viejas, lo cual coincide con la teoría, que predice que individuos más jóvenes tienen respuestas inmunes más robustas.

4) Las hembras de *A. anceps* que se encontraban en tándem presentaron la menor actividad de FO, las hembras en oviposición tuvieron una actividad intermedia, mientras que las hembras perchadas presentaron la mayor actividad de FO. Esto sugiere que el tándem y la oviposición son actividades inmunológicamente demandantes.

9. REFERENCIAS

1. Adamo, S.A., Jensen, M. y Younger, M. 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour* **62**: 417-425.
2. Ahmed, A.M., Baggott, S.L., Maingon, R. y Hurd, H. 2002. The cost of mounting an immune response are reflected in the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *OIKOS* **97**:371-377.
3. Bascuñan-García, P., Lara, C. y Córdoba-Aguilar, A. 2010. Immune investment impairs growth, female reproduction and survival in the house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology* **56**:204-211.
4. Beenackers, A.M., Van der Host, D.J. y Van Marrewijk, W.J.A. 1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochemistry* **14**: 243-260.
5. Carton, Y. y David, J.R. 1983. Reduction of fitness in *Drosophila* adults surviving parasitization by cynipid wasp. *Experientia* **39**: 231-233.
6. Cerenius, L., and Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* **198**: 116-126.
7. Contreras-Garduño, J. 2007. Respuestas inmunes y selección sexual en la libélula territorial *Hetaerina americana*. Tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
8. Contreras-Garduño, J. Canales-Lazcano, J. y Córdoba-Aguilar, A. 2006. Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *Journal of Ethology* **24**:165-173.
9. Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., and Córdoba-Aguilar, A. 2007. The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and survival in males of the American rubyspot. *Journal of Insect Physiology* **53**: 612-621.

10. Contreras-Garduño, J., Buzzato, B.A., Serrano-Meneses, M.A., Nájera-Cordero, K. y Córdoba-Aguilar, A. 2008. The size of the red wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament trait. *Behavioral Ecology* **19**: 724-732.
11. Contreras-Garduño, J., Córdoba-Aguilar, A., Azpilicueta-Amorín, M. y Cordero-Rivera, A. En prensa. Juvenile hormone favors sexually-selected traits but impairs fat reserves and muscle mass in males and females. *Evolutionary Ecology*
12. Corbet, P.S. 1999. Dragonflies: Behavior and Ecology of Odonata. Colchester: Harley Books.
13. Córdoba-Aguilar, A. 2009. A female evolutionary response when survival is at risk: male harassment mediates early re-allocation of resources to increase egg number and size. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**: 751-763.
14. Córdoba-Aguilar, A. y Contreras-Garduño, J. 2006. Differences in immune ability in forest habitats of varying quality: dragonflies as study models. En Forest and Dragonflies. Fourth WDA International Symposium of Odonatology. Cordero-Rivera Ed. 269-278 pp.
15. Córdoba-Aguilar, A., Jiménez-Cortés, J. G. y Lanz-Mendoza, H. 2009a. Seasonal variation in ornament expression, body size, energetic reserves, immune response, and survival in males of a territorial insect. *Ecological Entomology* **34**: 228-239.
16. Córdoba-Aguilar, A., Raihani, G., Serrano-Meneses, M.A. y Contreras-Garduño, J. 2009b. The lek mating system of *Hetaerina* damselflies. *Behaviour* **146**: 189-207.
17. Córdoba-Aguilar, A., Nájera-Cordero, K., Serrano-Meneses, M.A., Moreno-García, M.A., Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H. y Rull, J. 2009c. Sexual dimorphism in immunity: a test using insects (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Odonata). *Odonatologica* **38**: 203-211.

18. Córdoba-Aguilar, A., Serrano-Meneses, M.A. y Cordero-Rivera, A. 2009d. Copulation duration in non territorial odonate species lasts longer than in territorial species. *Annals of the Entomological Society of America* **102**: 694-701.
19. Doums, C. y Schmid-Hempel, P. 2000. Immunocompetence in workers of a social insect, *Bombus terrestris* L., in relation to foraging activity and parasitic infection. *Canadian Journal of Zoology* **78**: 1060-1066.
20. Doums, C., Moret, Y., Benelli, E. y Schmid-Hempel, P. 2002. Senescence of immune defense in *Bombus* workers. *Ecological Entomology* **27**: 138.144.
21. Fellowes, M.D.E., Kraaijeveld, A.R. y Godfray, H.C.J. 1999. The relative fitness of *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) that have successfully defended themselves against the parasitoid against the parasitoid *Asobara tabida* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 123-128.
22. Garrison, R.W. 1996. A synopsis of the *Argia fissa* group with descriptions of two new species, *A. anceps*, sp. n. and *A. westfalli* sp. n. (Zygoptera: Coenagrionidae). *Odonatologica* **25**: 31-47.
23. Grether, G.F. 1996a. Intersexual competition alone favours a sexual dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* **50**: 1949.1957.
24. Grether, G.F. 1996b. Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* **50**: 1939-1948.
25. Grieve, E.G. 1937 Studies on the biology of the damselfly *Ischnura verticalis* Say, with notes on certain parasites. *Annals of the Entomological Society of America* **17**:121-153
26. Hoang, A. 2001. Immune response to parasitism reduces resistance of *Drosophila melanogaster* to desiccation and starvation. *Evolution* **55**: 2353-2358.

27. Hosken, D. 2003. Sex and death: microevolutionary trade-offs between reproductive and immune investment in dung flies. *Current Biology* **11**: R379-380.
28. Kraaijeveld, A.R. y Godfray, H.J.C. 1997. Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **389**: 278-280.
29. Koella, J.C. y Boëte, C. 2002. A genetic correlation between age at pupation and melanization immune response of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Evolution* **56**: 1074-1079.
30. Kurtz, J., Wiesner, A., Götz, P. y Sauer, K.P. 2000. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Developmental and Comparative Immunology* **24**:1-12.
31. Lawniczak, M.K.N., Barnes, A.I., Linklater, J.R., Boone, J.M., Wigby, S. y Chapman, T. 2006. Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* **22**:48-55.
32. Levine M.D. y Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**:1295-1309.
33. Luna-González, A. Maeda-Martínez, A. Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F. y Robles-Mungaray, M. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenil homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve mollusks. *Fish and Shellfish Immunology* **15**: 275- 282.
34. Luna-González, A., Maeda-Martínez, A., Ascencio-Valle, F. y Robles-Mungaray, M. 2004. Ontogenic variations of hydrolitic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* **16**: 287- 294.
35. Martin, L.B., Zachary, M.W. y Nelson, R.J. 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **363**: 321-329.

36. Moret, Y. y Schmid-Hempel, P. 2009. Immune responses of bumblebees workers as a function of individual and colony age: senescence versus plastic adjustment of the immune function. *Oikos* **118**: 371-378.
37. Pajunen, V.I. 1962. Studies on the population ecology of *Leucorrhinia dubia* v.d. Lind. (Odon., Libellulidae). *Annals of Zoology and Botany Society* **24**:1-79
38. Paulson, D.R. 2007. Middle American Odonata. University of Puget Sound. www.ups.edu/x6527xml
39. Richardson, J.M.L. y Baker, R.L. 1996. Effect of body size and feeding on fecundity in the damselfly *Ischnura verticalis* (Odonata:Coenagrionidae). *Oikos* **79**: 477-483.
40. Rolff, J. y Siva-Jothy, M.T. 2002. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9916-9918.
41. Rolff, J. y Siva-Jothy, M.T. 2003. Invertebrate Ecological Immunology. *Science* **301**: 472-475.
42. Schmid-Hempel, P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London series B* **270**: 357-366.
43. Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary Ecology of Insect Immune Defenses. *Annual Review of Entomology* **50**: 529-551.
44. Schwartz, A. y 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.
45. Sheldon, B.C. y Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 317-321.

46. Siva-Jothy, M.T., Tsubaki, Y. y Hooper, R.E. 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiological Entomology* **23**: 274-277.
47. Watanabe, M. y Adachi, Y. 1987. Fecundity and oviposition pattern in the damselfly *Coperia annulata* (Selys) (Zigoptera: Platycnemididae). *Odonatologica* **16**:85-92.
48. Westfall, Jr., M.J. y May, M.L. 1996. Damselflies of North America. Gainesville: Scientific Publishers, Inc.
49. Yourth, C.P., Forbes, M.R. y Smith, B.P. 2001. On understanding variation in immune expression of the damselflies *Lestes* spp. *Canadian Journal of Zoology* **79**:815-821.
50. Yourth, C.P., Forbes, M.R. y Smith, B.P. 2002. Immune expression in a damselfly is related to time of season, not to fluctuation asymmetry or host size. *Ecological Entomology* **27**:123-128.
51. Zerofsky, M., Harel, E., Silverman, N. y Tatar, M. 2005. Aging of the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell* **4**:103.108.