



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

SELECCIÓN SEXUAL, SEÑALES HONESTAS Y SISTEMA INMUNE EN *GRYLLODES*

SIGILLATUS (ORTHOPTERA)

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

ADOLFO GALICIA NARANJO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAÚL CUEVA DEL CASTILLO MENDOZA



MÉXICO, ESTADO DE MÉXICO

SEPTIEMBRE , 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A mi asesor de tesis Dr. Raúl Cueva del Castillo Mendoza, al Dr. Humberto Lanz Mendoza, por facilitarme las instalaciones del laboratorio de enfermedades infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca para realizar los ensayos inmunológicos. Así mismo, a Jorge Contreras Garduño por su ayuda y comentarios en la revisión de la esta tesis.

Agradezco la beca del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT); Título: Señales honestas y sistema inmune en Ortópteros tropicales, clave: IN206109.

Así mismo a mis sinodales:

- Dra. Juana Alba Luis Díaz.
- M en C. Miguel Jiménez Valdez
- Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
- Dr. Héctor Octavio Godínez Álvarez

ÍNDICE	Página
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Selección sexual.....	5
1.2 Sistema inmune en insectos	8
1.3 Especie de estudio; <i>Gryllodes sigillatus</i>	9
II. Objetivo general	12
2.1. Objetivos particulares	12
III. Hipótesis	13
IV. Métodos	14
4.1. Zona de colecta	14
4.2 Familias y Estrés Alimenticio	16
4.3 Parámetros morfológicos	17
4.4 Cuantificación de proteína	18
4.5 Ensayo de Lisozima.....	18
4.6 Ensayo de Fenol Oxidasa (FO).....	19
V. Análisis estadísticos	19
VI. Resultados	20
6.1 Análisis global para la cuantificación de proteína en machos y hembras; covariable tórax	20
6.2 Análisis global para la cuantificación de proteína en machos y hembras; covariable fémur	20
6.3 Cuantificación de proteína en los machos; covariable ala	21
6.4 Análisis global para la cuantificación de lisozima en machos y hembras; covariable tórax	27
6.5 Análisis Global para la cuantificación de lisozima en machos y hembras; covariable fémur III	27
6.6 Cuantificación de lisozima en los machos; covariable ala	28
6.7 Análisis global para la cuantificación de fenol oxidasa en machos y hembras; covariable tórax	33
6.8 Análisis global para la cuantificación de fenol oxidasa en machos y hembras; covariable fémur III	33
6.9 Cuantificación de fenol oxidasa en los machos; covariable ala	33
VII. Discusión	36
VIII. Referencias:	42

RESUMEN

Los atributos bajo selección sexual de los machos pueden ser indicadores de salud y calidad genética de sus portadores (buenos genes), por lo cual las hembras han desarrollado mecanismos para discriminar entre organismos sanos y enfermos; y así reducir el riesgo de aparearse con machos que les puedan transmitir una enfermedad infecciosa, así como transmitirle a su descendencia los genes de resistencia asociados a los machos preferidos para el apareamiento. Los atributos bajo selección como el tamaño corporal, las alas, los regalos nupciales y la intensidad de los cantos, así como el sistema inmune son costosos; por lo cual, sólo aquellos organismos en buenas condiciones físicas y/o genéticas podrán cubrir los costos asociados a su expresión. En este trabajo se analizó el impacto de la disponibilidad de alimento en la expresión del tamaño corporal y del sistema inmune en el genotipo (familias) de hembras y machos del grillo *Gryllodes sigillatus*. A los organismos experimentales de ambos sexos se les sometió a un desafío inmune con el fin de determinar si los individuos de mayor tamaño poseían un sistema inmune más eficiente. El sistema inmune se analizó considerando la producción de lisozima y fenol oxidasa. Ambas enzimas están relacionadas con el sistema inmune de los insectos. Se encontraron diferencias en la producción de lisozima entre machos y hembras; independientemente de la calidad nutricional de la dieta, las hembras invirtieron en un sistema inmune más eficiente, el cual está asociado a una mayor producción de lisozima. En el caso de los machos sólo aquellos sometidos a una dieta nutritiva tuvieron mayor producción de lisozima. Por otro lado, los organismos de mayor tamaño (independientemente de su genotipo, sexo y/o diferencias en la dieta) produjeron una mayor cantidad de Fenol Oxidasa, lo cual sugiere que el tamaño corporal es un indicador de la capacidad para resistir enfermedades. Sin embargo, las alas de los machos; un atributo relacionado con su éxito de apareamiento, no estuvo relacionado con la actividad inmunológica. Por lo cual no es considerado una señal que refleje la condición inmune del macho.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Selección sexual

El concepto de selección sexual es utilizado para explicar la evolución de ciertos atributos como armas, espolones o patrones de coloración vistosos que, generalmente se encuentran asociados a los machos de diferentes especies animales. Los atributos bajo selección sexual pueden ser costosos, ya que hacen que sus portadores sean más conspicuos a los depredadores. Sin embargo, su mantenimiento se justifica si el éxito reproductivo de los machos compensa el decremento en las posibilidades de supervivencia (Darwin 1859).

La selección sexual tiene su origen en los diferentes costos energéticos que representa la producción de los gametos para cada sexo. Debido a la anisogamia los machos producen una gran cantidad de gametos y de un menor tamaño, mientras que las hembras producen pocos gametos, de mayor tamaño y más costosos (Trivers, 1972). Como resultado de esto, el éxito reproductivo de los machos está determinado por su acceso a las hembras y el número de apareamientos que tengan, mientras que en las hembras depende de los recursos que puedan ser canalizados a la producción de huevos y posteriormente a los cigotos. Debido a esta asimetría, las hembras son generalmente más selectivas que los machos (Wagner, 2007). En la arena ecológica esto genera que la selección sexual opere por la competencia entre los machos por el acceso a las hembras (selección intrasexual) y por elección de pareja (selección intersexual) por parte de las hembras (Darwin, 1871).

El alto costo de la reproducción en las hembras es suficiente para explicar su resistencia para acceder al apareamiento, así como la evolución de rasgos masculinos que funcionen para vencer dicha resistencia (Chapman, 2003). La selectividad de las hembras sobre sus parejas potenciales es un mecanismo que les permite incrementar la capacidad competitiva de su progenie.

Los beneficios que puede recibir una hembra por aparearse con un tipo particular de macho puede ser directos e indirectos. Entre los directos se encuentra la protección, el alimento y el territorio, mientras que los indirectos son de índole genética (Arnqvist, 2005).

Fisher (1930) propuso la teoría de Runaway ó selección desbocada para explicar la correlación que puede existir entre los atributos bajo selección sexual exhibidos por los machos y las preferencias de las hembras a dichos atributos. Bajo este modelo los hijos heredarán los rasgos atractivos de los padres y las hijas las preferencias para dichos atributos mediante un desequilibrio de ligamiento. Por otro lado Zahavi (1977) planteó que los atributos exhibidos por los machos son hándicaps (desventajas), que limitan la supervivencia de sus portadores. Por lo tanto, los machos que sobreviven a pesar de estas limitantes, le indicarían a las hembras mediante sus ornamentos que tienen una mayor capacidad de supervivencia que aquellos machos que han llegado a la edad adulta y no los poseen o no los expresan en la misma magnitud que ellos. En consecuencia a esto Alan Grafen (1990), planteó que dichos atributos más que limitantes podrían representar señales honestas (buenos genes) respecto a la calidad genética de sus portadores. Sin embargo, dado que los atributos bajo selección sexual son costosos, sólo los machos en buenas condiciones y/o con buenos genes podrían tenerlos (Michael, 1998).

Debido a que los atributos favorecidos por la selección sexual son costosos de producir, la canalización de recursos hacia ellos puede afectar negativamente la expresión de otros atributos asociados con el mantenimiento y supervivencia de los individuos (trade-off) como puede ser la inmunidad (Adamo *et al.*, 2001; Fedorka, 2004; Cotter, 2004; Kurt, 2007; French, 2007; Malcolm, 2007; Adamo, 2009). La expresión de los ornamentos en los machos podría depender exclusivamente de la condición física y/o genética de su portador (Brown, 2000; Stoehr, 2006; Arnqvist,

2005) y de las condiciones ambientales a las que fue expuesto durante su desarrollo. Por lo cual aquellos individuos que han crecido expuestos a una alimentación pobre no alcanzan un gran tamaño y sus ornamentos no se expresaran en la misma magnitud que los exhibidos por los machos que se han desarrollado bajo condiciones favorables (Arnqvist, 2005). No obstante, es posible que bajo condiciones desfavorables los machos que posean una alta calidad genética (buenos genes) puedan compensar los costos asociados a la expresión de ornamentos vistosos, así mismo, los machos de baja calidad expresarían en menor medida sus ornamentos sexuales (Siva-Jothy, 1998).

Estudios recientes han sugerido que la expresión de los ornamentos puede indicar la capacidad inmune de un organismo (Mc Kean, 2007), así como su calidad genética (señales honestas). Estas señales son de gran importancia para las hembras ya que pueden evaluar la calidad del macho y evitar ser infectadas ó parasitadas al aparearse con un macho enfermo. (Andersson, 1994). Como resultado de las preferencias de las hembras por un tipo particular de machos los hijos de ambos sexos pueden heredar los genes que les confieran un sistema inmune más eficiente (buenos genes). Sin embargo la asignación diferencial de recursos al sistema inmune está limitada por los costos y beneficios asociados a cada sexo durante la reproducción (Cotton, 2004).

A pesar de que la reproducción puede ser más costosa para las hembras, debido a la producción de gametos y a la inversión que realizan en la producción de los cigotos, se espera que ellas canalicen más recursos a su sistema inmune, ya que si éste es eficiente incrementa sus posibilidades de supervivencia hasta el momento de la oviposición y reducir el riesgo de una muerte pre reproductiva (Mc Kean, 2005).

En los grillos *Teleogryllus commodus*, *G. texensis* y *G. sigillatus* se ha reportado que el tiempo invertido en el canto puede ser efectivo para atraer a las hembras (Adamo, 2001. Hunt, 2004. Champagnon y Cueva, 2008). Sin embargo, esta inversión reduce la longevidad del macho (Hunt, 2004). En *Gryllus texensis* los machos

disminuyen su capacidad inmune (FO) al llegar a la edad reproductiva, mientras que las hembras ocurre lo contrario (Adamo, 2001). Así mismo en *G. texensis* el estrés causado por el vuelo puede predisponer al organismo a contraer una infección, lo cual sugiere la existencia de "trade-offs" entre múltiples vías fisiológicas (Adamo, 2008).

1.2 Sistema inmune en insectos

La defensa inmune de los invertebrados es innata, por lo cual se basa en una respuesta humoral y celular generalista y de rápida acción (Schmid, 2003). Entre los parámetros inmunológicos más utilizados para estimar la actividad inmune en grillos se consideran la cuantificación de lisozima y fenol oxidasa (Adamo, 2003) y de manera indirecta la cuantificación de proteína en la hemolinfa. En este último caso se espera que al registrar una mayor cantidad de proteína, una parte proporcional de ésta corresponda a proteínas inmunológicas.

La lisozima es una enzima presente en la hemolinfa que tiene actividad contra bacterias Gram(+). Se sintetiza poco después de la infección y se plantea que estimula la síntesis de otras moléculas con actividad bactericida (Gram -) (Adamo, 2006). Esta vía es de gran importancia ya que al parecer los grillos carecen de péptidos antimicrobianos (Adamo, 2003). Por otra parte, la vía de fenol oxidasa (FO) deriva de la activación del zimógeno inactivo pro-phenoloxidasa (pro-FO), que a su vez, interviene en la melanización de la cutícula (Cerenius, 2004; Gillespie, 1997; Schmind-Hempel, 2002). La melanina es utilizada para combatir a los patógenos de manera humoral y celular, ya que los aísla del cuerpo del hospedero al agregarse en capas, y al mismo tiempo genera radicales libres para dañarlos (Cerenius & Soderhall, 1988; Gillespie, 1997). La pro-FO puede ser activada como respuesta a daños físicos, químicos ó por la detección de algún patógeno en la hemolinfa. (Hetru, 2003; Schmid, 2004; Wilson, 2009).

En grillos, se ha observado que la lisozima se incrementa después de una infección bacteriana (Adamo, 2004), así mismo la producción de lisozima se relaciona con la condición fisiológica de los machos, sin embargo esto no ocurre con la FO (Adamo,2001). En *G. texensis* los machos con una mayor concentración de proteína en la hemolinfa tienen más posibilidades de sobrevivir a un desafío inmune (Adamo, 2004). Sin embargo, no todas las proteínas presentes en la hemolinfa están relacionadas con la inmunidad.

1.3 Especie de estudio; *Gryllodes sigillatus*

G. sigillatus ó grillo decorado fue descrito por primera vez en Sri Lanka (Walker, 1958). No obstante, actualmente se encuentra distribuido en la mayoría de los ecosistemas tropicales urbanos (Walker,1984; Sakaluk,1984,1987). Esta especie presenta un marcado dimorfismo sexual; las hembras son ápteras y más grandes que los machos, las alas de los machos sólo cubren una parte del abdomen (braquípteros; Fig. 1).

Durante el cortejo, los machos de *G. sigillatus* emiten cantos para atraer a las hembras. Si una hembra se muestra receptiva, monta al macho; el cual le transfiere un espermatóforo que se adhiere a la genitalia de la hembra. Los espermatóforos son estructuras gelatinosas que contiene los espermatozoides y al espermatofilax; parte nutritiva aportada por el macho como regalo nupcial. La producción del espermatofilax representa un alto costo para los machos, ya que puede representar el 2.2% del peso del macho (Sakaluk, 1985) y este puede producir uno cada día. El tamaño del regalo nupcial es favorecido por selección natural y sexual, ya que al proporcionar un regalo nupcial grande el macho incrementa el tiempo de copula con la hembra y la transferencia espermática (Sakaluk, 1985, Fedorka, 2002). Como medida de protección ante un competidor el macho de *G. sigillatus* puede incrementar el tamaño relativo del espermatofilax y la cantidad de esperma transferido a la hembra (Mallard, 2003), por lo tanto también los costos asociados a la reproducción.

En el caso de *G. sigillatus* el tamaño corporal puede ser un estimador para predecir el éxito reproductivo de los machos ya que está correlacionado con cantos más atractivos para las hembras y a la producción de espermatofilax de mayor tamaño (Champagnon y Cueva del Castillo 2008, Sakaluk, 1985). No obstante, en *G. campestris* se reporta que el tamaño corporal no es un parámetro que determine en su totalidad el éxito reproductivo de un macho, sugiriendo que el tiempo invertido en el canto es más efectivo para atraer a una pareja (Rodríguez, 2010).

Debido a que el canto y los espermatozoides son energéticamente costosos de producir, sólo aquellos organismos que se encuentren en una buena condición física y/o genética podrán invertir de manera más eficiente en la expresión de dichos atributos. La inversión en el canto tiene un fuerte componente ambiental (disponibilidad de recursos) y sólo los machos en buena condición física podrán invertir en su expresión (Judge, 2007). Estudios recientes realizados en insectos reportan numerosos trade off's entre la inmunidad y la expresión de los atributos bajo selección sexual (Chapman, 2003; Hunt, 2004; Rantala, 2005; Adamo, 2009), los cuales se encuentran principalmente en los machos. En ortópteros, los machos parasitados ó enfermos producen cantos menos atractivos para las hembras, por lo cual, aquellos machos con un sistema inmune más eficiente pueden ser preferidos para el apareamiento (Arnqvist, 2005).

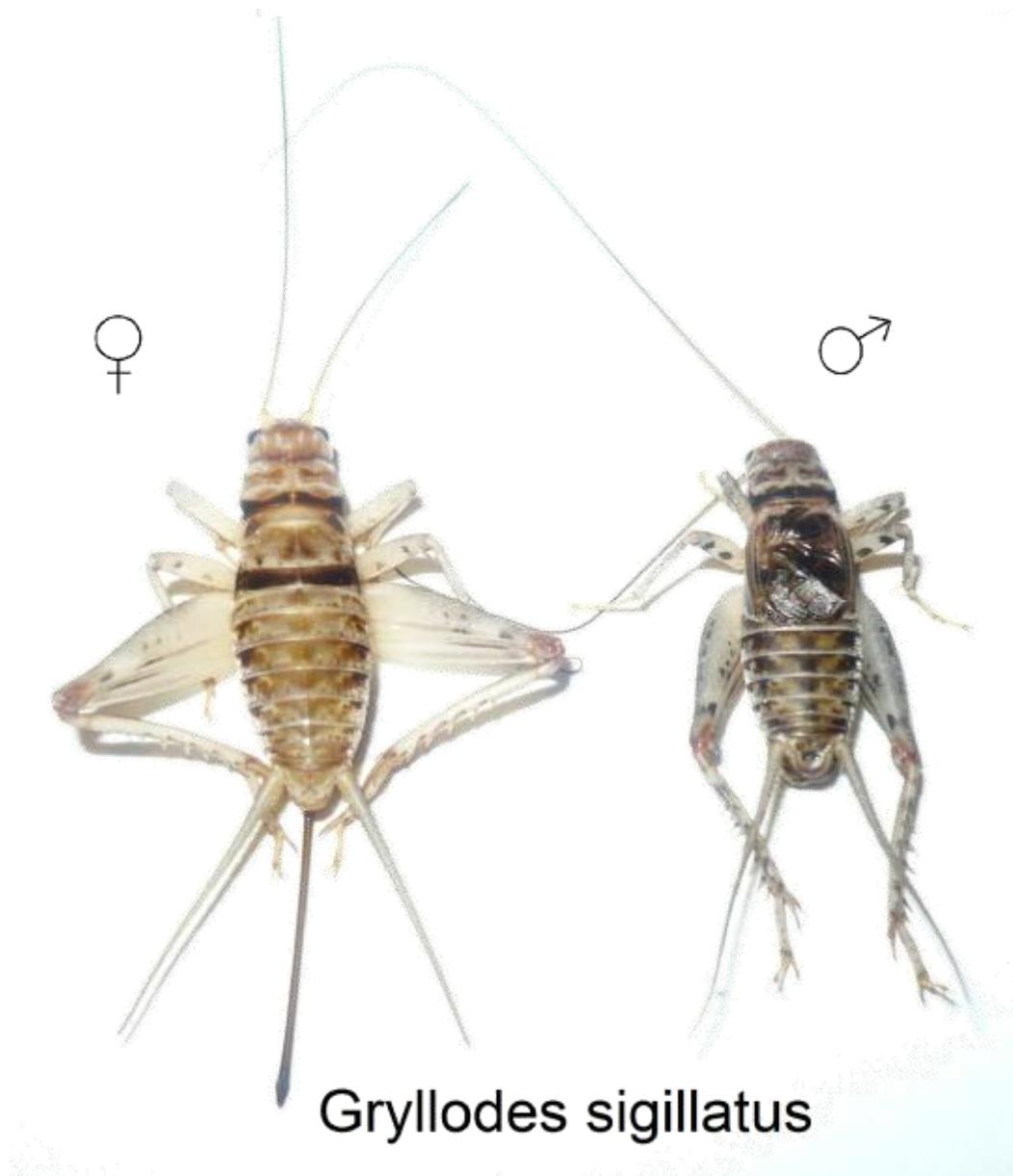


Figura. 1 Dimorfismo sexual en *Gryllodes sigillatus*.

II. Objetivo general

Determinar si el estrés alimenticio afecta el tamaño corporal de las hembras y los machos de *G. sigillatus*, así como verificar si existen diferencias en el sistema inmune asociadas al tamaño, al sexo y a la dieta.

2.1. Objetivos particulares

- ◆ Cuantificar las concentraciones de proteína en los tratamientos de alta y baja calidad nutrimental, y compararla entre sexos.
- ◆ Evaluar la respuesta de la enzima lisozima en los tratamientos de alta y baja calidad nutrimental, y compararla entre sexos.
- ◆ Evaluar la respuesta de la enzima fenol oxidasa en los tratamientos de alta y baja calidad nutrimental, y compararla entre sexos.
- ◆ Correlacionar la producción de proteína, lisozima y fenol oxidasa con el tamaño de las covariables (ala, tórax, fémur) y determinar si existe alguna relación entre el tamaño y la producción de estas enzimas ó con la cantidad de proteína.
- ◆ Evaluar la respuesta inmune asociada a la dieta de alta y baja calidad nutrimental.

III. Hipótesis

1.- Se espera encontrar diferencias en el tamaño corporal y en la respuestas del sistema inmune entre los organismos que se desarrollan en condiciones de alta y baja calidad nutrimental, así como entre hembras y machos.

2.- Se espera que los machos de mayor tamaño y con los atributos mas grandes tengan un sistema inmune más eficiente que aquellos de menor tamaño.

3.- Se espera que las hembras posean un sistema inmune más eficiente que los machos.

4.- Si los atributos bajo selección sexual representan una señal honesta, se espera que su tamaño no sea afectado por una dieta de baja calidad nutricional, y que se correlacione con una buena respuesta inmune.

IV. Métodos

4.1. Zona de colecta

Los grillos empleados para este estudio fueron obtenidos de la primera y segunda generación de organismos colectados en Zapotitlán de las Salinas (Fig. 2). Este municipio se localiza al sureste del estado de Puebla ($18^{\circ} 19.61' 2''$ N; longitud: $97^{\circ} 28' 10.96''$ O; a 1486 msnm), está ubicado en el valle de Tehuacán, dentro de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán. El clima es semiárido sub-húmedo con lluvias en verano. La vegetación dominante corresponde a matorral xerófilo, tiene una precipitación anual de 412 mm y una temperatura promedio de 25°C .

Se realizaron tres salidas a Zapotitlán en el año 2010, con una duración de tres días cada una (Tabla 1).

Tabla 1. Número de organismos por colecta

Colecta	♀	♂	Juveniles	Total
Septiembre	40	30	78	148
Octubre	58	96	149	303
Noviembre	128	95	179	402

Los organismos colectados fueron transportados al laboratorio de Ecología de la UBIPRO en la FES-Iztacala para su manutención y el establecimiento de un criadero. Fueron mantenidos a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo 12/12hr luz/obscuridad. En los criaderos, se utilizó alimento industrial para pollos (Purina) y agua *ad libitum*. Antes de alcanzar la madurez sexual los organismos fueron retirados de los criaderos y agrupados de acuerdo con su sexo; una vez alcanzada la madurez sexual se formaron parejas aleatorias de insectos; los cuales se mantuvieron juntos por tres semanas para que se aparearan y para que la hembra depositara la mayoría ó la totalidad de los huevos. Las parejas experimentales se mantuvieron en mascoterías

plásticas de 500ml, como sustrato para la oviposición se utilizó musgo *Sphagnum* marca peat moss. Al igual que con los criaderos, se utilizó pollina como alimento. Los huevos fueron incubados a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su eclosión.



Figura 2. Zona de colecta, Zapotitlán Salinas Puebla, México.

4.2 Familias y Estrés Alimenticio

Se establecieron 60 parejas experimentales, de las cuales sólo se analizó la descendencia de 10 (Tabla. 2) debido a que en la mayoría de los casos el número de crías asociadas a cada tratamiento no alcanzó un número suficiente para ser analizado estadísticamente. Las crías de cada familia (hermanos completos) fueron separadas de manera aleatoria en dos grupos y dispuestos en frascos de plástico de 500ml; manteniendo la identidad por familia se les sometió a una dieta de alta y otra de baja calidad nutricional. El alimento de alta calidad nutricional constó de 9:1 partes de (conejina/salvado), mientras que el de baja calidad nutricional constó de 9:1 (salvado/conejina). Las dietas de alta y baja calidad nutricional fueron elaboradas con comida para conejo (PURINA granja familiar) la cual contiene un alto contenido de proteína y con salvado de trigo Flory-vida Natural. Las proporciones utilizadas en ambas dietas maximizaron el aporte o deficiencia nutricional a la cual están sometidos los grillos. El agua y el alimento fueron suministrados *ad libitum*. Poco antes de que las crías alcanzaran la madurez sexual, fueron separadas según con su sexo. Posteriormente, fueron transportadas al **Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca**, en donde se realizó la cuantificación de tres parámetros relacionados con la actividad inmunológica en ortópteros y así comprobar la efectividad de las dietas y verificar si existe una correlación en cuanto al tamaño y la actividad inmune. Los parámetros a cuantificar fueron las concentraciones de proteína, lisozima y de *fenol oxidasa (FO)*.

A las crías de cada familia y tratamiento se les inyectaron 2 μ l de LPS (lipopolisacárido 100 μ g/2 μ l), un componente molecular de *Serratia marcescens*; una bacteria gram(-) de distribución cosmopolitana, *S. marcescens* es un organismo oportunista y solo es letal cuando se introduce en el hemocele (Adamo, 2004). La inyección de LPS es capaz de estimular la respuesta humoral del sistema inmune (Adamo, 2003). Se utilizó una jeringa Hamilton de 10 μ l para inyectar el LPS y una

hora después se extrajo hemolinfa para registrar la respuesta inmunitaria de cada insecto. Se extrajeron 10 μ l de hemolinfa por insecto. La hemolinfa fue extraída mediante una punción en el abdomen y colectada con una micro pipeta, la hemolinfa se depositó en tubos Eppendorf (previamente refrigerados) con 80 μ l de buffer fosfato salino (PBS) (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.2) posteriormente fueron refrigeradas a -80 °C, hasta el momento de su análisis.

4.3 Parámetros morfológicos

El número total de organismos utilizados en este trabajo fue de 459 grillos, de los cuales 254 fueron hembras y 205 machos (Tabla. 2). Para cada uno de ellos se registró el largo del fémur III, el ancho del tórax y en el caso de los machos el largo de las alas, se utilizó un vernier digital (0.05mm Mitutoyo Corp, Tokio, Japón).

Tabla. 2 Número de grillos por familia, sexo y tratamiento.

Familia	<i>Dieta nutritiva</i>		<i>Dieta pobre</i>		<i>Total</i>
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	
1	7	8	7	3	25
3	2	5	5	5	17
4	16	10	3	2	31
5	10	6	14	3	33
7	11	11	13	3	38
8	25	15	23	13	76
9	20	17	14	9	60
10	16	29	15	16	76
12	14	19	4	17	54
24	22	9	13	5	49
Total	143	129	111	76	459

4.4 Cuantificación de proteína

En este método se utilizó el kit para cuantificación de proteína de Pierce. Se utilizaron micro placas de 96 pozos (Corning incorporated). A cada pozo se le agregaron 40µl de buffer fosfato salino (PBS) 1mol. Posteriormente se agregaron 10µl de las muestras de hemolinfa/PBS (cada pozo contenía la muestra de hemolinfa de un insecto diferente). Una vez colocadas las muestras se agregaron 150µl de la mezcla de reactivos A y B que vienen en el kit. Como control se utilizó una curva patrón elaborada con albúmina (sigma). Las placas fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C y posteriormente se registró la absorbancia a 540nm (Microplate Reader Series, BMG LABTECH). La concentración de proteína fue ajustada a 10 mg para estandarizarla y evitar que la proteína afectara las lecturas de los parámetros inmunitarios (Contreras-Garduño et al., 2007).

4.5 Ensayo de Lisozima

Se utilizaron micro placas de 96 pozos (Corning incorporated), a cada pozo se le adicionaron 200 µl de una solución de 25ml de buffer potasio 0.1M/12mg *micrococcus*, posteriormente se agregaron 30µl de la solución de hemolinfa/BPS. Se emplearon los siguientes controles:

- B.- 200µl de la solución de 25ml de buffer potasio 0.1M/ 12mg *micrococcus* + 30µl de buffer potasio 0.1M.
- C.- 230 µl de la solución de 25ml de buffer potasio 0.1M/ 12mg *micrococcus*

Se registró la absorbancia a 540nm durante 20 minutos cada 5 minutos. La actividad lítica de la enzima fue cuantificada como un cambio en la absorbancia total de las muestras y se les restó la lectura del control B. En este caso se espera que la absorbancia disminuya debido a la acción lítica de la lisozima sobre la pared celular de *micrococcus*.

4.6 Ensayo de Fenol Oxidasa (FO)

Para la cuantificación de la enzima fenol oxidasa se utilizaron micro placas de 96 pozos (Corning incorporated): a cada pozo se le agregaron 60 μ l de PBS 1mol, 40 μ l de la solución hemolinfa/PBS y 100 μ l de L-DOPA. La cual se utilizo a una concentración de 4 μ g/ml, la L-DOPA es un derivado de tirosina, que en presencia de FO, produce melanina (Wilson, 2008). Se registró la absorbancia de las muestras en un lector de micro placas (Microplate Reader Series, BMG LABTECH) a una densidad óptica de 490nm. Se tomaron lecturas a los 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. Como control se usaron 100 μ l de PBS/100 μ l de L-DOPA. En este caso, se analizó el promedio de las lecturas de absorbancia, en este ensayo se espera un incremento en la absorbancia como indicio de una mayor síntesis de FO.

V. Análisis estadísticos

El efecto de las familias, sexo de la progenie y dieta en la producción de proteína, lisozima y Fenol oxidasa (FO) fueron analizados empleando un modelo de covarianza (ANCOVA). Para cada variable de respuesta se realizaron dos ANCOVAS (Análisis global para hembras y machos de *G. sigillatus*). En una se consideró como covariable el ancho del tórax y en otra la longitud del fémur III. Los parámetros estimados fueron: Familia, Sexo y Dieta, y las interacciones: Familia*Sexo; Familia*Dieta; Sexo*Dieta. Ya que los machos son los únicos que tienen alas y siendo este un atributo relacionado con la selección sexual (Champagnon y Cueva del Castillo, 2008), para determinar si existían diferencias en el sistema inmune asociadas a su genotipo (familia) y tamaño, se realizaron análisis de covarianza para la proteína, lisozima y fenol oxidasa (FO). En este caso se utilizaron los niveles: familia, dieta y la interacciones Familia*Dieta, empleando la longitud del ala como covariable.

VI. Resultados

6.1 Análisis global para la cuantificación de proteína en machos y hembras; covariable tórax

Se encontraron diferencias en la concentración de proteínas entre familias: $F_{(9, 426)} = 2.089$, $P = 0.029$ (Fig. 3). Existen diferencias asociadas al sexo, los machos almacenan una mayor cantidad de proteína en la hemolinfa: $F_{(1, 426)} = 4.003$, $P = 0.046$ (Fig. 4). Asimismo, los organismos alimentados con una dieta de alta calidad nutricional tuvieron una mayor cantidad de proteína en la hemolinfa que aquellos sometidos a una dieta de baja calidad: $F_{(1,426)} = 30.54$, $P = 0.0001$ (Fig. 5). En el caso de las interacciones Familia*Sexo: $F_{(9,426)} = 0.59$, $P = 0.80$; Familia*Dieta: $F_{(9,426)} = 1.84$, $P = 0.059$ y Sexo*Dieta: $F_{(1,426)} = 0.445$, $P = 0.83$ no hay relaciones significativas. El tamaño del tórax: $F_{(1, 426)} = 0.756$, $P = 0.39$ no está relacionado a una mayor cantidad de proteína en la hemolinfa (Tabla. 3).

6.2 Análisis global para la cuantificación de proteína en machos y hembras; covariable fémur

Existen diferencias asociadas a la producción de proteína en hemolinfa entre familias: $F_{(9, 426)} = 1.948$, $P = 0.044$ (Fig. 6). Sin embargo, no se reportan diferencias entre sexos: $F_{(1, 426)} = 0.903$, $P = 0.34$. Los organismos sometidos a una dieta de alta calidad produjeron una mayor cantidad de proteína: $F_{(1, 426)} = 35.95$, $P = 0.0001$ (Fig. 7). En el caso de las interacciones: Familia*Sexo $F_{(9, 426)} = 0.66$, $P = 0.74$; Familia*Dieta $F_{(9, 426)} = 1.78$, $P = 0.067$ y Sexo*Dieta $F_{(9, 426)} = 0.001$, $P = 0.97$ no existen diferencias significativas. El tamaño del Fémur no tiene relación con una mayor cantidad de proteína en hemolinfa: $F_{(1, 426)} = 2.17$, $P = 0.14$ (Tabla 4).

6.3 Cuantificación de proteína en los machos; covariable ala

No se detectaron diferencias entre familias asociadas a la producción de proteína: $F_{(9,184)} = 1.01$, $P = 0.43$. Sin embargo, los machos sometidos a una dieta de alta calidad nutricional tuvieron una mayor concentración de proteína: $F_{(1, 184)} = 5.16$, $P = 0.014$ (Fig. 8). La interacción Familia*Dieta no fue significativa: $F_{(9, 184)} = 0.80$, $P = 0.61$. Asimismo, el tamaño del ala no tiene relación con una mayor concentración de proteína: $F_{(1, 184)} = 0.35$, $P = 0.55$ (Tabla. 5).

Tabla 3. Cuantificación de proteína en machos y hembras de *Grylodes sigillatus* utilizando el tórax como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

<i>Parámetro</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Familia	9	1507	167.4	2.089	0.0293
Sexo	1	320.8	320.8	4.003	0.0460
Dieta	1	2448.3	2448.3	30.548	0.0001
Familia*Sexo	9	430.2	47.80	0.596	0.8002
Familia*Dieta	9	1327.3	147.5	1.840	0.0594
Sexo*Dieta	1	3.6	3.6	0.445	0.8330
Tórax	1	60.6	60.6	0.756	0.3851
Error	426	34141.7	80.1		

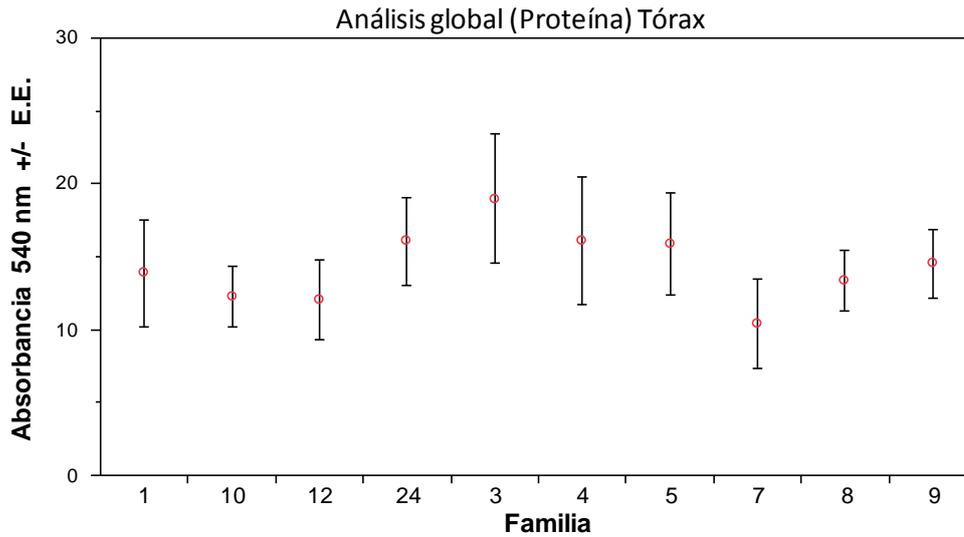


Figura 3. Cuantificación de proteína en las diferentes familias utilizando el tórax como covariable. Existen diferencias en la producción de proteína asociadas a las diferentes familias.

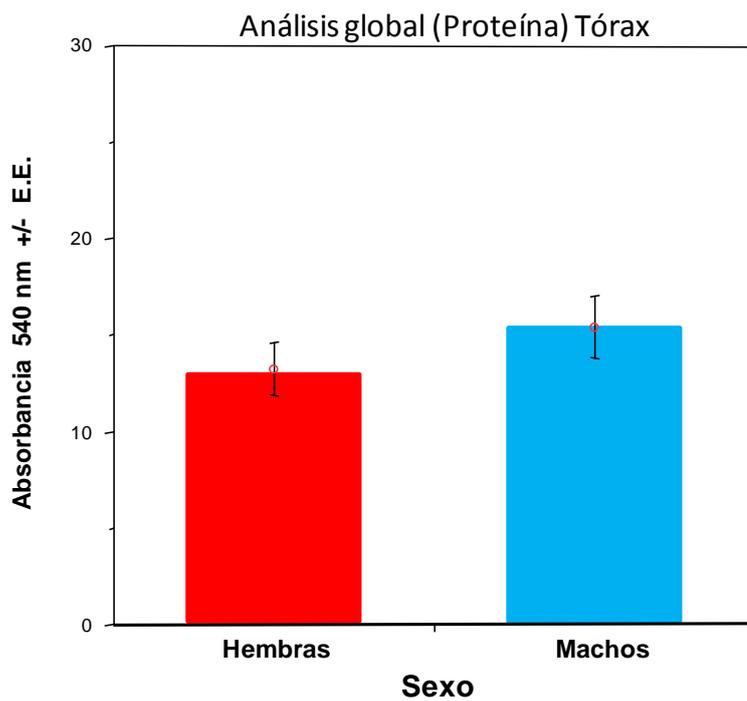


Figura 4. Cuantificación de proteína en machos y hembras utilizando el tórax como covariable. Existen diferencias entre sexos y la cantidad de proteína que pueden almacenar en la hemolinfa. En comparación con las hembras, los machos produjeron una mayor cantidad de proteína.

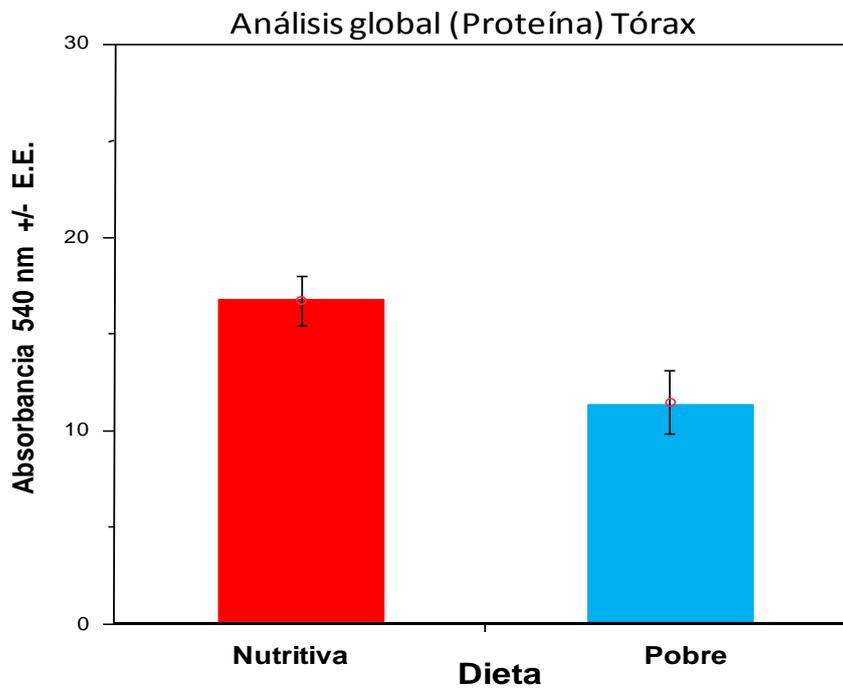


Figura 5. Cuantificación de proteína asociada a la dieta en machos y hembras utilizando el tórax como covariable. Independientemente del sexo, los organismos sometidos a una dieta de alta calidad nutricional pueden almacenar una mayor cantidad de proteína en la hemolinfa.

Tabla 4. Cuantificación de proteína en machos y hembras de *Grylodes sigillatus* utilizando el fémur III como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

Parámetro	G.L.	S.C.	C.M.	F	P
Familia	9	1401.07	155.67	1.948	0.0439
Sexo	1	72.14	72.14	0.903	0.3426
Dieta	1	2872.61	2872.61	35.95	0.0001
Familia*Sexo	9	478.69	53.19	0.666	0.7402
Familia*Dieta	9	1292.28	143.59	1.797	0.0668
Sexo*Dieta	1	0.11	0.11	0.001	0.9711
Fémur III	1	173.12	173.12	2.167	0.142
Error	427	34119.91	79.91		

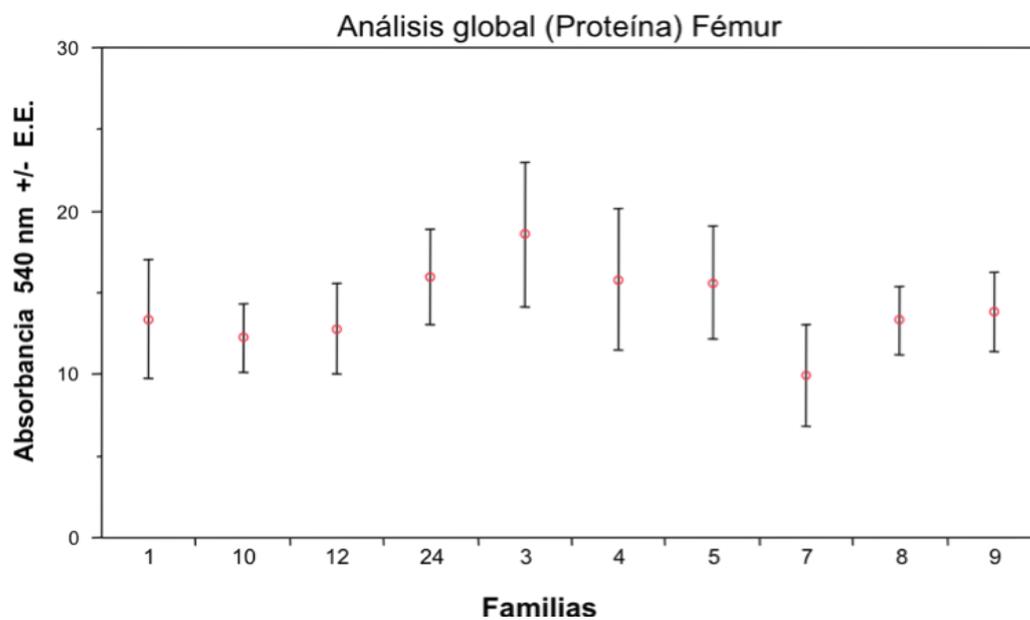


Figura 6. Cuantificación de Proteína en las diferentes familias utilizando el fémur III como covariable. Existen diferencias en la producción de proteína asociadas a las diferentes familias.

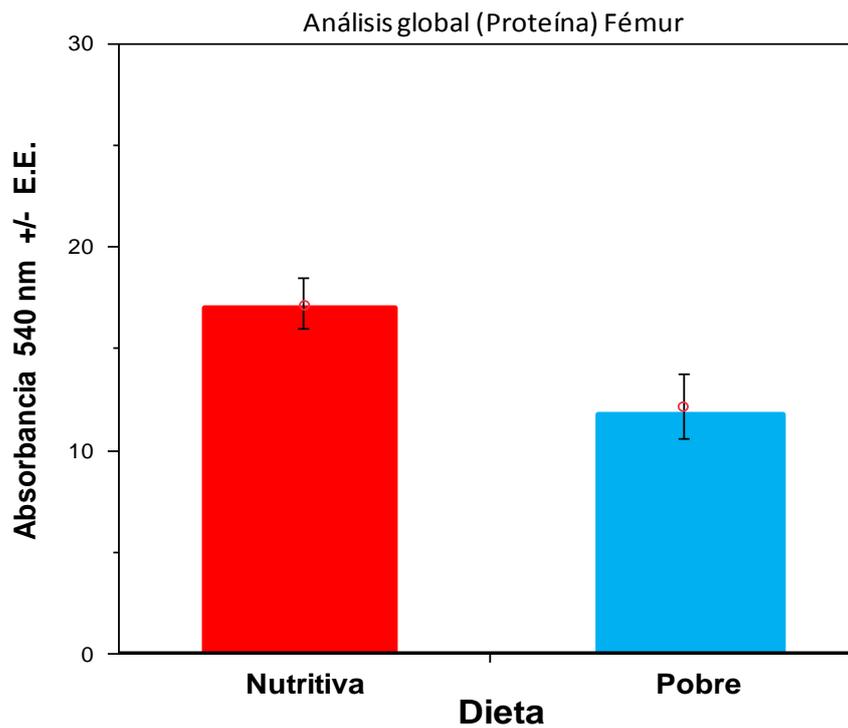


Figura 7. Cuantificación de proteína asociada a la dieta en machos y hembras utilizando el fémur III como covariable. De manera independiente al sexo, los organismos sometidos a una dieta de alta calidad nutricional pueden almacenar una mayor cantidad de proteína en hemolinfa.

Tabla 5. Cuantificación de proteína en machos de *Grylloides sigillatus* utilizando el ala como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

<i>Parámetro</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Familia	9	909.63	101.07	1.01	0.4339
Dieta	1	616.16	616.16	5.16	0.0140
Familia*Dieta	9	721.24	80.14	0.8	0.6162
Ala	1	35.41	35.41	0.35	0.5527
Error	184	18418.51	100.1		

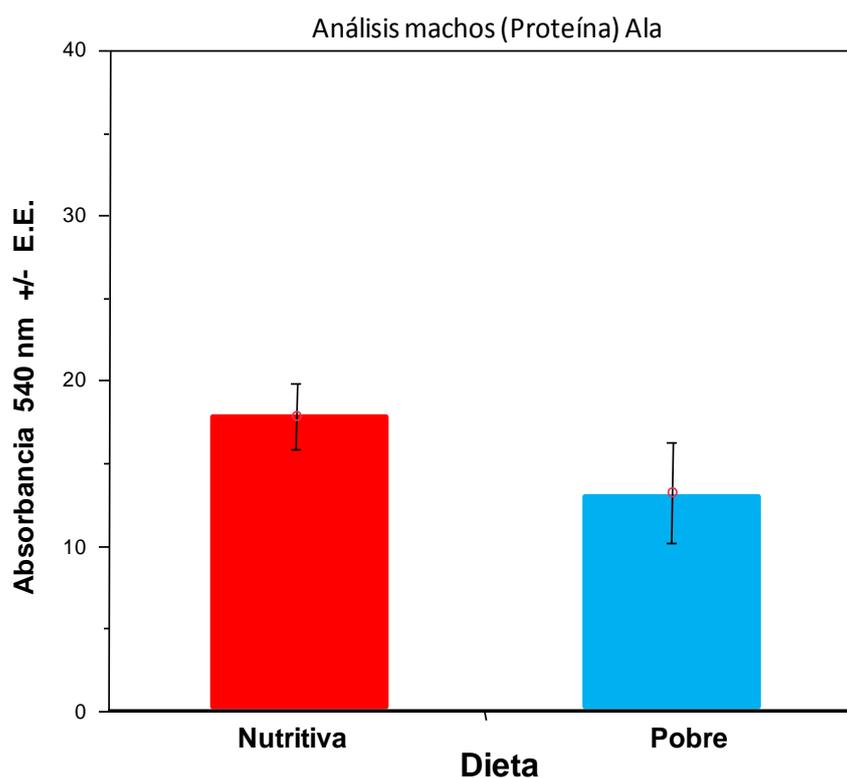


Figura 8. Cuantificación de proteína asociada a la dieta en machos, utilizando el ala como covariable. Los machos sometidos a una dieta de alta calidad nutricional tienen una mayor cantidad de proteína en la hemolinfa.

6.4 Análisis global para la cuantificación de lisozima en machos y hembras; covariable tórax

Existen diferencias en la producción de lisozima entre familias: $F_{(9, 426)} = 6.21$, $P < 0.0001$ (Fig. 9). Así mismo, se encontraron diferencias asociadas al sexo; las hembras tuvieron una mayor producción de esta enzima: $F_{(1, 426)} = 6.54$, $P = 0.0109$ (Fig. 10). Sin embargo, a nivel global la dieta no afectó la producción de lisozima: $F_{(1, 426)} = 1.71$, $P = 0.19$. Tanto las hembras como los machos de las diferentes familias respondieron de manera similar a las interacciones, por lo cual, no hay resultados significativos para: Familia*Sexo: $F_{(9, 426)} = 0.92$, $P = 0.50$; Familia*Dieta: $F_{(9, 426)} = 0.91$, $P = 0.52$ y Sexo*Dieta: $F_{(1, 426)} = 0.000$, $P = 0.99$. No se encontró una relación entre el tamaño del tórax y una mayor actividad de la lisozima: $F_{(1, 426)} = 3.54$, $P = 0.06$ (Tabla. 6).

6.5 Análisis Global para la cuantificación de lisozima en machos y hembras; covariable fémur III

Se encontraron diferencias asociadas a la producción de lisozima entre familias: $F_{(9, 426)} = 5.99$, $P < 0.0001$ (Fig. 11). La producción de lisozima fue similar entre hembras y machos, por lo cual no hay diferencias entre sexos: $F_{(1, 426)} = 3.32$, $P = 0.07$, ni asociadas a las diferentes dietas: $F_{(1, 426)} = 0.96$, $P = 0.32$. Los machos y hembras de las diferentes familias respondieron de manera similar a la interacción Familia*Sexo: $F_{(9, 426)} = 0.84$, $P = 0.58$; Familia*Dieta: $F_{(9, 426)} = 0.94$, $P = 0.49$ y Sexo*Dieta: $F_{(1, 426)} = 0.0002$, $P = 0.99$. La longitud del fémur III no mostró una relación positiva con la actividad de la lisozima: $F_{(1, 426)} = 0.04$, $P = 0.85$ (Tabla. 7).

6.6 Cuantificación de lisozima en los machos; covariable ala

En el caso de los machos, hay diferencias entre familias en la producción de lisozima: $F_{(9,184)} = 4.47$, $P = 0.0001$ (Fig. 12). Sin embargo, no se detectaron diferencias asociadas a la dieta: $F_{(1, 184)} = 1.59$, $P = 0.21$. Aunque si las hay en la forma en que responden los machos de diferentes familias en la interacción: Familia*Dieta: $F_{(9, 184)} = 2.58$, $P = 0.008$ (Fig. 13). Los machos de algunas familias sometidas a una dieta de alta calidad producen más lisozima, sin embargo, también se observan casos totalmente opuestos, en donde familias de machos sometidos a una dieta baja en nutrientes producen más lisozima. El tamaño del ala no es un indicador de una mayor producción de esta enzima: $F_{(1, 184)} = 0.26$, $P = 0.66$ (Tabla. 8).

Tabla 6. Cuantificación de lisozima en machos y hembras de *Gryllodes sigillatus* utilizando el tórax como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

<i>Parámetro</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Familia	9	0.0153	0.0017	6.21	0.0001
Sexo	1	0.0018	0.0018	6.54	0.0109
Dieta	1	0.0005	0.0005	1.71	0.1918
Familia*Sexo	9	0.0023	0.0003	0.92	0.5064
Familia*Dieta	9	0.0022	0.0002	0.91	0.5158
Sexo*Dieta	1	0.0000	0.0000	0.00	0.9949
Tórax	1	0.001	0.001	3.54	0.0606
Error	426	0.1163	0.0003		

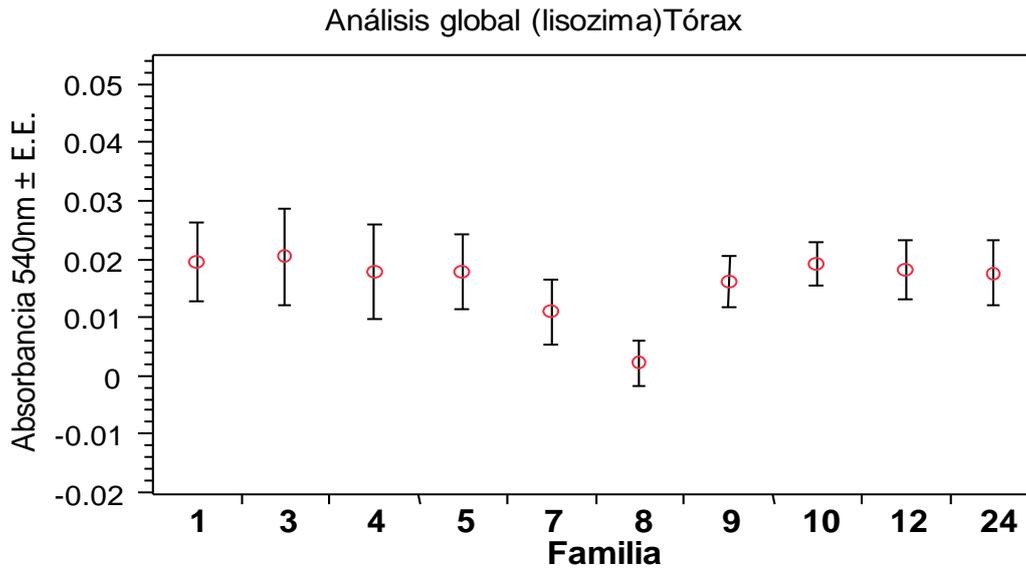


Figura 9. Cuantificación de lisozima en las diferentes familias utilizando el tórax como covariable. Existen diferencias en la producción de lisozima asociadas a las diferentes familias.

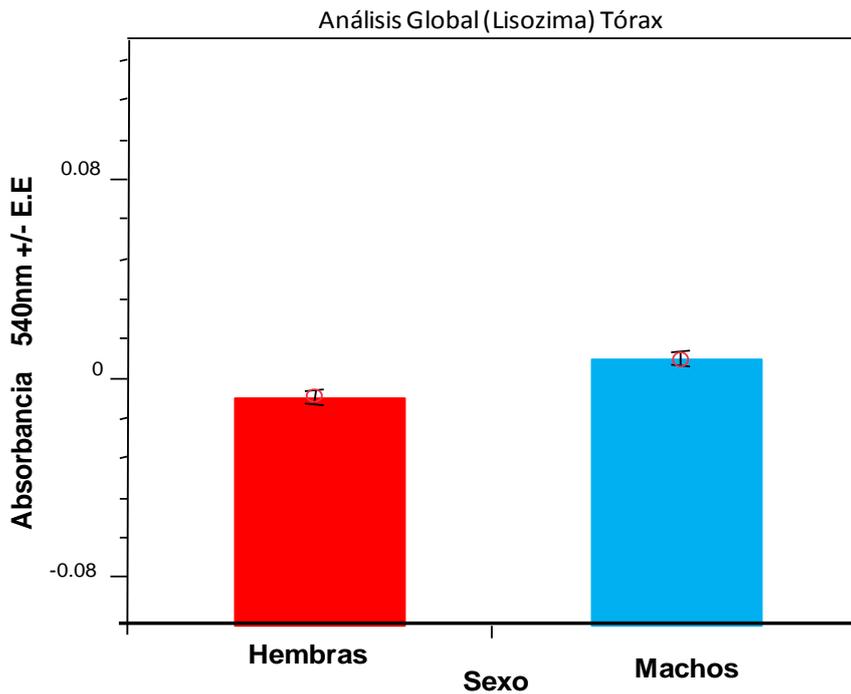


Figura 10. Cuantificación de lisozima en machos y hembras utilizando el tórax como covariable. De manera independiente al aporte nutrimental de una dieta de alta calidad las hembras tienen una mayor actividad de lisozima, lo cual sugiere dimorfismo sexual en la respuesta inmune de esta especie.

Tabla 7. Cuantificación de lisozima en machos y hembras de *Gryllodes sigillatus* utilizando el fémur III como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

Parámetro	G.L.	S.C	C.M.	F	P
Familia	9	0.015	0.002	5.99	0.0001
Sexo	1	0.001	0.001	3.32	0.0691
Dieta	1	0.0003	0.0003	0.96	0.3283
Familia*sexo	9	0.002	0.0002	0.84	0.5815
Familia*dieta	9	0.002	0.0003	0.94	0.4933
Sexo*dieta	1	0.0000001	0.0000001	0.00	0.9892
Fémur III	1	0.00001	0.00001	0.04	0.8513
Error	427	0.117	0.00028		

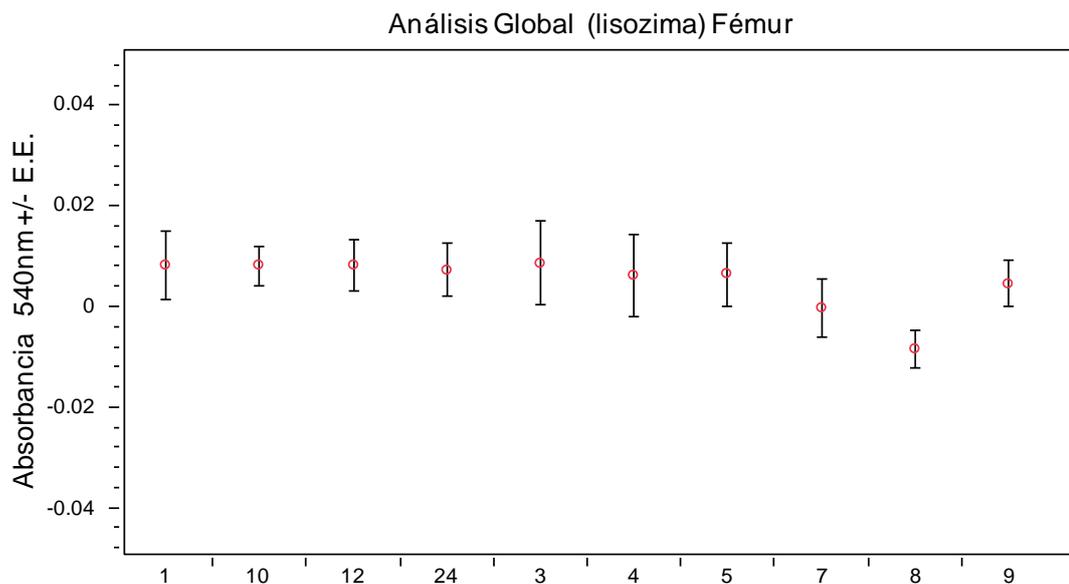


Figura 11. Cuantificación de lisozima en las diferentes familias utilizando el fémur III como covariable. Existen diferencias en la producción de lisozima asociadas a las diferentes familias.

Tabla 8. Cuantificación de lisozima en machos de *Gryllobates sigillatus*, utilizando el ala como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

Parámetro	G.L.	S.C	C.M.	F	P
Familia	9	0.00474	0.00053	4.47	0.0001
Dieta	1	0.00019	0.00019	1.59	0.2094
Familia*Dieta	9	0.00273	0.0003	2.58	0.0081
Ala	1	0.00003	0.00003	0.26	0.6139
Error	184	0.02169	0.00012		

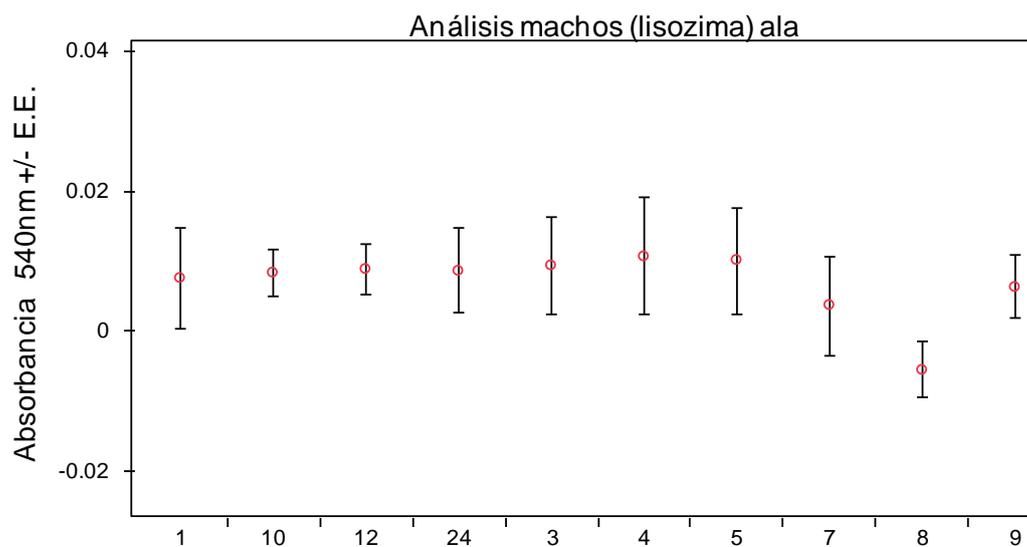


Figura 12. Cuantificación de lisozima en machos de las distintas familias utilizando el ala como covariable. Los machos de las diferentes familias responden de manera distinta a la producción de lisozima.

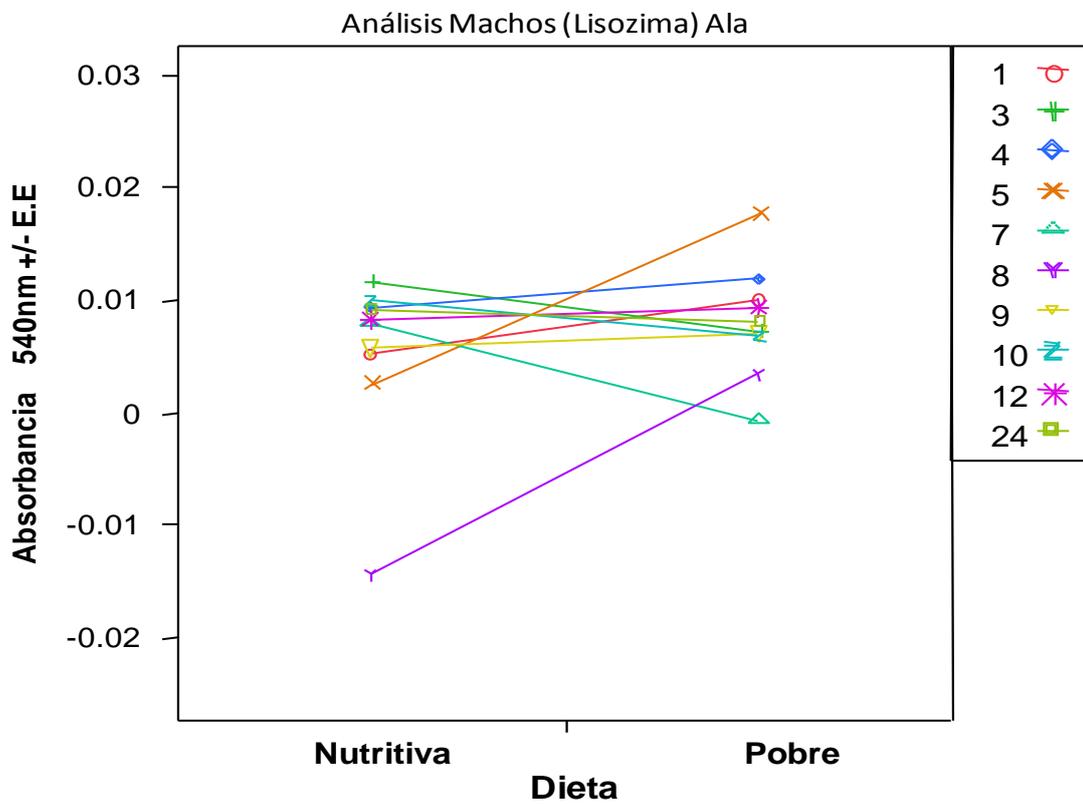


Figura 13. Cuantificación de lisozima en machos, utilizando como covariable el ala; interacción (Familia*Dieta). Los machos de algunas familias sometidas a una dieta de alta calidad nutrimental sintetizan más lisozima que aquellas sometidas a una dieta de baja calidad, sin embargo también se puede observar lo opuesto (Familias 3 y 7).

6.7 Análisis global para la cuantificación de fenol oxidasa en machos y hembras; covariable tórax

No se encontraron diferencias asociadas a la producción de fenol oxidasa entre familias: $F_{(9, 426)} = 0.88$, $P = 0.54$; tampoco se detectaron diferencias asociadas al sexo: $F_{(1, 426)} = 0.3$, $P = 0.58$, ni debidas a la dieta: $F_{(1, 426)} = 0.04$, $P = 0.83$.

Los organismos de las diferentes familias se comportaron de manera similar en las interacciones Familia*Sexo: $F_{(9, 426)} = 0.3$, $P = 0.98$; Familia*Dieta: $F_{(9, 426)} = 1.06$, $P = 0.38$ y Sexo*Dieta: $F_{(1, 426)} = 0.46$, $P = 0.49$, por lo cual no se reportan relaciones significativas. Sin embargo, la relación entre el tamaño corporal y la producción de fenol oxidasa fue significativa: $F_{(1, 426)} = 5.13$, $P = 0.024$. De modo que, los organismos de mayor tamaño producen más fenol oxidasa (Tabla.9).

6.8 Análisis global para la cuantificación de fenol oxidasa en machos y hembras; covariable fémur III

No se encontraron diferencias asociadas a la producción de fenol oxidasa entre familias: $F_{(9, 426)} = 0.98$, $P = 0.456$. No hay diferencias entre sexos: $F_{(1, 426)} = 1.65$, $P = 0.20$ ni debidas a la dieta: $F_{(1, 426)} = 0.07$, $P = 0.79$, que indiquen una mayor producción de FO. Las diferentes interacciones resultaron no significativas: Familia*Sexo: $F_{(9, 426)} = 0.28$, $P = 0.98$, Familia*Dieta: $F_{(9, 426)} = 1.13$, $P = 0.34$ y Sexo*Dieta: $F_{(1, 426)} = 0.43$, $P = 0.51$. El tamaño del fémur III no se relaciona a organismos con una mayor producción de fenol oxidasa: $F_{(1, 426)} = 0.01$, $P = 0.90$ (Tabla. 10).

6.9 Cuantificación de fenol oxidasa en los machos; covariable ala

En el caso de los machos, no se detectaron diferencias entre familias: $F_{(9, 184)} = 0.61$, $P = 0.79$; ni asociadas a las dietas: $F_{(1, 184)} = 0.05$, $P = 0.82$. La interacción Familia*Dieta no fue significativa: $F_{(9, 184)} = 1.11$, $P = 0.36$. El tamaño del ala no es un indicador de una mayor cantidad de fenol oxidasa: $F_{(1, 184)} = 0.12$, $P = 0.73$ (Tabla. 11).

Tabla 9. Cuantificación de fenol oxidasa en machos y hembras de *Grylloides sigillatus* utilizando el tórax como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

<i>Parámetro</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Familia	9	0.0013	0.0001	0.88	0.5426
Sexo	1	0.0001	0.0001	0.3	0.5846
Dieta	1	0.0000	0.0000	0.04	0.8375
Familia*Sexo	9	0.0005	0.0001	0.3	0.9746
Familia *Dieta	1	0.0016	0.0016	1.06	0.3881
Sexo*Dieta	1	0.0001	0.0001	0.46	0.4963
Tórax	1	0.0009	0.0009	5.13	0.0240
Error	426	0.0775	0.0002		

Tabla 10. Cuantificación de fenol oxidasa en machos y hembras de *Grylloides sigillatus* utilizando el fémur III como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

<i>Parámetro</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Familia	9	0.0015	0.00017	0.98	0.4560
Sexo	1	0.0003	0.00028	1.65	0.1993
Dieta	1	0.00001	0.00001	0.07	0.7964
Familia*Sexo	9	0.0004	0.00005	0.28	0.9810
Familia*Dieta	9	0.0017	0.00019	1.13	0.3389
Sexo*Dieta	1	0.0001	0.00007	0.43	0.5130
Fémur III	1	0.000003	0.00000	0.01	0.9033
Error	426	0.0728	0.00017		

Tabla 11. Cuantificación de fenol oxidasa en machos de *Gryllodes sigillatus* utilizando el ala como covariable. Los valores en negritas indican las variables que resultaron significativas (G.L. = grados de libertad, S.C.=Suma de Cuadrados, C.M. Cuadrado Medio).

<i>Parámetro</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Familia	9	0.0009	0.0001	0.61	0.7894
Dieta	1	0.00001	0.00001	0.05	0.8207
Familia*Dieta	9	0.0016	0.0002	1.11	0.3611
Ala	1	0.00002	0.00002	0.12	0.7304
Error	184	0.288	0.0016		

Resumen de Resultados

<i>Hembras y Machos</i>						
Variable	Proteína(T)	Proteína(F)	Lisozima(T)	Lisozima(F)	FO (T)	FO (F)
Familia	X	X	X	X	-	-
Sexo	X	-	X	-	-	-
Dieta	X	X	-	-	-	-
Familia*Sexo	-	-	-	-	-	-
Familia*Dieta	-	-	-	-	-	-
Sexo*Dieta	-	-	-	-	-	-
Covariable	-	-	-	-	X	-

(X) Resultado significativo;(-)resultado no significativo;(F)Fémur; (T)Tórax

<i>Machos</i>			
Variable	Proteína	Lisozima	FO
Familia	-	X	-
Dieta	X	-	-
Familia*Dieta	-	X	-
Ala	-	-	-

VII. Discusión

Variables morfométricas.

En insectos y en vertebrados el tamaño corporal es un atributo favorecido por la selección sexual y natural, en las hembras un mayor tamaño está asociado con un incremento en la fecundidad; ya que, pueden producir una mayor cantidad de huevos ó crías, mientras que en los machos, un mayor tamaño les puede generar ventajas competitivas por el acceso a las hembras. En *G. sigillatus* los machos de mayor tamaño emiten cantos más atractivos para las hembras (Champagnon y Cueva del Castillo, 2008), además de producir regalos nupciales de mayor tamaño (Sakaluk, 1987). Sin embargo, en este trabajo se encontró que el tamaño de los atributos bajo selección sexual (alas) de los machos no están correlacionados con la inmunidad del organismo. Bajo el modelos de buenos genes se espera que los machos con atributos grandes tengan un mejor sistema inmune, pues a pesar del costo de su expresión, estos reflejarían la calidad genética del organismo, y les aportarían ventajas selectivas en la reproducción. Sin embargo, en este estudio la inversión energética en el tamaño de las alas podría no represente un gasto tan elevado para el organismo, por lo cual, su expresión puede no estar relacionada con su respuesta inmune, y/ó al aporte nutrimental de la dieta, como podría ser el caso de otros atributos como el canto y los regalos nupciales, lo cual se ha reportado en estudios previos realizados en grillos.

En otras especies se ha encontrado que la inversión en atributos que incrementan el éxito de apareamiento de los machos, puede reducir sus expectativas de vida, lo cual indica la existencia de trade-off's entre diferentes factores involucrados en la adecuación de un organismo (Adamo, 2004; Rantalla, 2005; Arnqvist, 2005).

Proteína.

La concentración de proteína registrada en machos y hembras de *G. sigillatus* no está correlacionada con el tamaño del tórax, el fémur ó con las alas de los machos. Por lo

cual el tamaño de los organismos no es un indicador de una mayor cantidad de proteínas en la hemolinfa. Sin embargo, los resultados indican diferencias en la producción de proteínas entre familias (Fig. 3) y que los organismos sometidos a una dieta de alta calidad nutrimental tienen una mayor concentración de proteína en la hemolinfa (Fig. 5).

En comparación con las hembras, los machos acumularon una mayor cantidad de proteína en la hemolinfa (Fig. 4). Asimismo, en el análisis realizado solo para los machos se encontró que los grillos sometidos a una dieta de alta calidad tienen más proteínas en la hemolinfa (Fig. 7). Posiblemente, los machos estén almacenando más recursos (proteína) que las hembras, como una estrategia para hacer frente a los altos costos de la reproducción; ya que ellos pueden donar en el apareamiento un regalo nupcial que puede tener una gran cantidad de nutrientes; por otro lado las hembras podrían estar canalizando los recursos de las dietas a la producción de huevos ó a un mejor sistema inmune como se observa en la producción de lisozima.

La emisión del canto en *G. pennsylvanicus* es costosa y está relacionada con la disponibilidad de alimento; por lo cual solo aquellos organismos sometidos a una dieta de alta calidad nutrimental pueden invertir más tiempo en el canto (Judge, 2007), el cual se ha reportado que, en *Teleogryllus commodus*, *G. texensis* y *G. sigillatus* incrementa las posibilidades de aparearse (Adamo, 2001. Hunt, 2004. Champagnon y Cueva, 2008). Lo cual podría explicar porque los machos en condiciones favorables tienden a almacenar más proteínas. Asimismo, la cantidad de proteína en la hemolinfa es un estimador indirecto de la actividad inmune, pues se espera que a mayor concentración de esta, una parte proporcional corresponda a proteínas inmunológicas (Adamo, 2004). En *Gryllus texensis* se determinó que machos con niveles altos de proteína en la hemolinfa tienen más posibilidades de sobrevivir a un desafío inmune (Adamo, 2004). Por lo tanto, si la cantidad de proteína está relacionada con la eficiencia en el sistema inmune, esto indicaría que puede haber una respuesta

evolutiva a la selección natural en la eficiencia del sistema inmunológico, además de que, en condiciones favorables de alimentación los organismos podrían mejorar aún más su respuesta. No obstante, las diferencias en los costos de la reproducción para cada sexo podrían explicar porque las hembras canalizaron menos recursos a la síntesis de proteínas.

Lisozima

La lisozima es de gran importancia para la inmunidad de los grillos, tiene actividad contra bacterias gram (+) y se cree que su expresión promueve la síntesis de otras proteínas inmunológicas que complementan su actividad atacando a bacterias gram (-) (Adamo, 2006). Asimismo su producción está relacionada con la condición del macho (Adamo, 2004). Los resultados de la cuantificación de lisozima indican que el tamaño de los parámetros morfológicos como el tórax, el fémur ó las alas no tienen relación con una mayor actividad de esta enzima. Sin embargo, se encontraron diferencias asociadas a la producción de lisozima entre familias (Fig. 9 y 11).

De manera independiente a la dieta, las hembras tuvieron una producción más elevada de esta enzima (Fig. 10). Por lo cual se reportan dimorfismo sexual en la respuesta inmune. Las diferencias fenotípicas entre hembras y machos pueden ser el resultado de diferentes presiones selectivas que actúan sobre cada sexo (Fairbairn, 2006). Posiblemente, las diferencias en el sistema inmune observadas en hembras y machos se deban al resultado de la exposición a diferentes patógenos durante sus historias de vida (French, 2007). Sin embargo, también podrían deberse al balance entre los costos y beneficios generados por el mantenimiento de las diferentes rutas metabólicas asociadas al sistema inmune y el costo de la reproducción para cada sexo (Rantala, 2005). Ya que, si las hembras invierten en un sistema inmune más eficiente pueden incrementar de manera directa sus expectativas de vida y reducir las posibilidades de una muerte pre-reproductiva. Por lo tanto, las hembras tendrían más

tiempo para completar la maduración de sus huevos y realizar un mayor número de oviposiciones antes de morir (Roff, 2002). Por otro lado, los machos tienden a sacrificar la actividad inmune e invertir más en la expresión de sus atributos bajo selección sexual, pues así incrementan su probabilidad de dejar un mayor número de descendientes (Adamo, 2001).

Lo cual en parte, concuerda con lo reportado en este trabajo, en donde las hembras invierten más en la inmunidad (lisozima), mientras solo los machos en buenas condiciones pueden sustentar una mayor producción de esta enzima. Como observación personal, las hembras viven en promedio tres meses más que los machos y estos mueren semanas después de aparearse.

En el análisis realizado solo a los machos, se determinó estos responden de manera diferencial al aporte nutrimental de la dieta (Familia*Dieta), en donde algunas familias produjeron una mayor cantidad de lisozima al estar bajo una mejor dieta, sin embargo, también se observa que algunas familias responden de manera contraria a lo esperado. Lo cual sugiere que para la mayor parte de los machos la producción de lisozima puede ser altamente costosa y que su producción depende en mayor medida de condiciones ambientales (favorables) en las que se desarrollen.

En un estudio similar realizado en *G. sigillatus* se reporta que; los grillos presentan un relación inversamente proporcional entre la actividad lítica y el tamaño de los regalos nupciales (Gershman, 2010). Lo cual confirma que la producción de lisozima es costosa y presenta trade-off's entre diferentes parámetros de la adecuación, por lo cual solo aquellos machos con los recursos suficientes podrán invertir en un buen sistema inmune (lisozima). Debido al alto costo de la reproducción, en *Allonemobius socius*, los machos decrecen su actividad lítica y sus niveles de encapsulación (FO) al entrar en su etapa reproductiva (Fedorka, 2004). Asimismo, en *Gryllus texensis*, en donde los machos decrecen su inmunidad al ser sexualmente activos, sin embargo las hembras incrementan su producción de FO. (Adamo, 2001),

posiblemente para evitar una infección parasitaria ó de transmisión sexual. De manera contraria a lo reportado en este trabajo, en *Gryllus bimaculatus* no se encontraron diferencias entre sexos y los parámetros de actividad inmune de encapsulación (FO) ó la actividad lítica; asimismo, se reporta que los grillos de mayor tamaño tienen un rango menor de encapsulación(FO) (Rantala, 2005). Posiblemente en *G. sigillatus*, al ser una especie más gregaria sea benéfico el invertir más en la producción de FO, la cual se asocia a organismos más grandes, pues el riesgo de adquirir una infección ó ser parasitado se incrementa en comunidades de mayor tamaño. Contrario a *G. bimaculatus*, en donde los machos son más territoriales y su distribución es menos gregaria.

Las diferencias genéticas observadas en la producción de proteína y lisozima en *G. sigillatus* generan las condiciones para que ambos atributos puedan evolucionar por selección natural, asimismo, el balance entre los costos/beneficios generados por la reproducción y el mantenimiento del sistema inmune determinará las diferencias en las historias de vida de cada sexo (Judge, 2007). Por lo tanto, la dirección que tome la evolución del dimorfismo sexual a nivel morfológico y fisiológico puede esta mediada por diferentes presiones selectivas. En donde una parte significativa de esta diferenciación puede tener su origen únicamente en la selección sexual (Craig, 2009).

Fenol oxidasa

En el caso de la Fenol Oxidasa únicamente se determinó que los organismos más grandes (tórax) de ambos sexos producen niveles más altos de esta enzima; el hecho de que no existan diferencias en la mayoría de los parámetros estimados (Dieta y Sexo) para esta enzima, puede indicar que es una vía metabólica de gran importancia para la supervivencia de los grillos y por ello no tiene variación en su respuesta inmune. Asimismo se ha reportado que la producción de FO tiene un alto coeficiente de heredabilidad en *G. sigillatus* (Gershman, 2010) y en *spodoptera littoralis* (Cotter,

2002). Aunado a esto, la vía de la fenol oxidasa tiene funciones múltiples, ya que interviene en la defensa inmune (humoral y celular) y en la melanización de la cutícula, asimismo, es de gran importancia en la encapsulación de parásitos a nivel cuticular y del tracto digestivo (Cotter, 2002).

VIII. Referencias:

- Adamo, S. 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and females *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour*, 62: 417- 425.
- Adamo, S. 2003. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of insect physiology*. 50: 209 - 216.
- Adamo, S. 2004. How should behavioral ecologist interpret measurements of immunity?. *Animal behavior*. 68: 1443 – 1449.
- Adamo, S., Parson, M. 2006. The emergency life- history stage and immunity in the cricket , *Gryllus texensis*. *Animal Behaviour*. 72: 235 - 244.
- Adamo, S. et al. 2009. Illness – induced anorexia may reduce trade – offs between digestion and immune function. *Animal behaviour*, 30: 1-8.
- Andersson, M. 1994: *Sexual Selection*. Princeton University, Press, New Jersey.
- Arnqvist, G & Rowe, L. 2005. *Sexual conflicts*. Princenton University Pess, New Jersey.
- Brown, W. D.& Kuns, M. 2000. Female choice and the consistency of courtship feeding in Black-horned tree crickets *Oecanthus nigricornis* Walker (Orthoptera:*Gryllidae*: *Oecanthinae*). *Ethology*, 106: 543-557.
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. 1998, Role of the prophenoloxidase- activating system in invertebrate immunity. University of Uppsala. 10:23-28
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126.
- Champagnon, J. & Cueva del Castillo R. 2008. Female Mate Choice, Calling Song and Genetic Variance in the Cricket, *Gryllodes sigillatus*. *Ethology*, 114: 223–230.

- Chapman, T., Arnqvist, G., Bangham, J., Rowe, L. 2003. Sexual conflict. Trends in ecology and evolution. 18:41- 47.
- Contreras, J., Lanz, H., Cordoba, A. 2007. The expression of sexual selected trait correlates with different immune defense components and survival in males of the American rubyspot. Journal of Insect Physiology. 53: 612 - 621.
- Cotter, S. C., Kruuk, L. E. B. & Wilson K. 2004. Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune System. Journal of Evolutionary Biology, 17: 421-429.
- Cotter, S. C & Wilson, K. 2002. Heritability of immune function in the caterpillar, *Spodoptera littoralis*. Heredity, 88: 229 – 234.
- Cotton, S & Kevin, F. 2004. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis?. Royal society of London. 271: 771-783.
- Craig, R., Blanckenhorn, W., Teder, T. 2009. Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insect: from physiology to evolution. Annual review of entomology. 55: 227-245.
- Darwin, C. 1859. El origen de las especies por medio de la selección natural. Alinza editores, España.
- Darwin, C. 1871. The descent of man and selection in relation to sex. John Murray, London, United Kingdom.
- French, S., De Nardo, D., Moore, M. 2007. Trade-offs between the reproductive and immune System: facultative response to resources or obligate response to reproduction?. The American Naturalist. 170: 79 - 89.
- Grafen, A. 1990. Biological signals as Handicaps. J. Theor. Biol. 144: 517-546.
- Fedorka, K., Mousseau, T. 2002. Nuptial gifts and the evolution of male body size. Evolution. 56: 590 - 596.

- Fedorka, K. et al. 2004. Immune suppression and the cost of reproduction in the ground cricket, *Allomobius socius*. *Evolution*, 58: 2478 - 2485.
- Gershman, S., Barnett, A. 2010. Give "til it hurts: trade-off's between immunity and male reproductive effort in the decorated cricket, *Gryllodes sigillatus*" . *J. Evol. Biol.* 23:829-839.
- Gillespie, P., Kanost, M. 1997. Biological Mediator Of Insect Immunity. *Annual, Rev of Entomology.* 42: 611 - 643.
- Hetru, C., Troxler, L., Hoffmann, J. 2003. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *Journal of infectious disease.* 187: 327 - 334.
- Hunt, J. Robert, B., Michael, D. & Smith, J.M. 2004. High-quality male field crickets invest heavily in sexual display but die young. *Nature*, 432: 23-30.
- Judge, K., Ting, J., Gwynne, D. 2007. Condition dependence of male life span and calling effort in a field Cricket. *Evolution.* 62: 862 - 868.
- Mc Kean, K. 2007. Sexual selection and immune function in *drosophila melanogaster*. *Evolution*, 62: 386 - 400.
- Mallard, S., Barnard, C. 2003. Competition, fluctuating asymmetry and sperm transfer in male gryllid cricket (*Gryllus bimacullatus* and *Gryllodes sigillatus*). *Behaviour and Ecology Sociobiology.* 53: 190 - 197.
- Malcolm. L. Mc Callum et al. 2007. Physiological tradeoffs between immunity and reproduction in the northern cricket frog (*Acris crepitans*). *Herpetologica*, 62: 269-274.
- Michael,T. & Skarstein, F. 1998. Towards a functional understanding of "good genes". *Ecology Letter*, 1:178-185.
- Rantala, M & Roff, D. 2005. An analysis of trade-offs in immune function, body size and development in the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional ecology*, 19: 323 – 330.

- Rolf, J. 2002. Bateman's principle and immunity. *Biological Sciences*. 269. 867 - 872.
- Rodriguez, R & Bretman, A. 2010. Natural and sexual selection in a wild population. *Science* 328, 1269.
- Sakaluk, S. K. 1985. Male crickets feed females to ensure complete sperm transfer. *Science*, 223: 609-610.
- Sakaluk, S. 1987: Reproductive behavior of the decorated field cricket, *Gryllodes supplicans* (Orthoptera: Gryllidae): calling schedules, spatial distribution and mating. *Behavior*, 100: 202—225. Feb.
- Schmid, P. 2002. Senescence of immune defence in *Bombus workers*. *Ecological Entomology*. 27: 138 - 144.
- Siva-Jothy, M., Skarstein, F. 1998. Towards a functional understanding of "good genes". *Ecology letters*. 1: 178 - 185.
- Schmind, P. 2003. Variation in immune defense as a question of evolutionary ecology. *Ecology and evolution*, review paper.
- Stoeher, A., Kokko, H. 2006. Sexual dimorphism in immunocompetence; what does life-history theory predict?. *Behavioral Ecology*. 17: 751 - 756.
- Walker, F. 1984. Tropical house Cricket, *Gryllodes sigillatus*. *Science*. 223: 609 - 610. Reviewed 2011.
- Wagner, W & Basolo, A. 2007. The relative importance of different direct benefits in the mate choices of a field cricket. *School of Biological Sciences. Evolution*, 61:617-62.
- Wilson, N., Dres, S., Starks, P. 2008 The ontogeny of immunity: Development of innate strength in the honey bee (*Apis mellifera*) . *Journal of insect Physiology*. 54: 1392 - 1399.