



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

INVERSIÓN TERMINAL EN MACHOS DE *Hetaerina americana* (ODONATA: CALOPTERYGIDAE): PAPEL DE LA HORMONA JUVENIL EN LA CONDUCTA Y LA FISIOLÓGÍA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RODRIGO JUAN SOTO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DANIEL MATÍAS GONZÁLEZ TOKMAN



2014



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A el proyecto PAPITT IN 222312. Esta investigación fue realizada gracias al apoyo económico otorgado por el mismo.

DEDICATORIA

A mi mamá, porque fue gracias a su influencia que yo decidí dedicarme a la ciencia. También (y sobre todo) por ser chef, maestra, psicóloga, médico, enfermera, terapeuta, secretaria, experta en maquetas de último segundo y tareas de último momento, geógrafa, chofer, guardaespaldas y madre de tiempo completo, sin pedir nada a cambio.

A mi papá, por apoyarme económicamente y por el tiempo dedicado.

A Víctor, por ser un buen hermano y estar ahí cuando lo necesito (y también cuando no), por compartir su tiempo conmigo y ser mi compañero de juegos y de diversión.

A Grecia, porque a pesar de todas las peleas y discusiones, siempre puedo contar con ella.

A Daniel González Tokman, por sus enseñanzas (tanto las académicas como las que no lo son tanto), por sus consejos, por las asesorías, las correcciones, las ideas, las explicaciones, pero sobre todo por ser un excelente tutor y amigo.

A mis sinodales, Claudia Patricia Órnelas García, Alejandro Córdoba Aguilar, Carlos Rafael Cordero Macedo y José Hugo Aguilar Díaz, por los comentarios, correcciones e ideas para mi tesis.

A Fernanda Baena Díaz, Daniel González Tokman, Isaac González Santoyo y Ángela Nava Bolaños por la ayuda y los consejos durante el trabajo en campo.

A Roberto Munguía Steyer y Guillermo Jiménez Cortés, por su ayuda con la estadística, la computadora y el espectrofotómetro.

A Alex Córdoba Aguilar por permitirme utilizar los espacios e instrumentos del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos

A mis amigos Alejandro, América, Andrea, Ángel, Angelita, Angie, Arturo, Axel, Belem, Brenda, Carmen, Caro, Claudio, Chac, Cit, Coral, Cristóbal, Crono, Daniel, Diana García, Diana Robledo, Diana Trujillo, Diego, Diego Morales, Eli, Elsa, Emili, Erick, Fer, Fernando, Gaby, Germán, Greta, Gris, Gus, Gustavo, Hanen, Isa, Itzel, Iván, Jorge, Juan, Juanito, Julio, Karla, Kenya, Lau, Laura, Maricruz, Marco, Marel, May, Maye, Melissa, Miguel, Monse, Moni, Naye, Paco, Pau, Paulina, Rafa, Raúl, Robert, Ross, Rox, Sandra, Shama, Silvana, Tadeo, Toño, Xochitl, Val, Yocelyn y Yuri, gracias por los buenos momentos.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Material y métodos.....	11
Resultados.....	20
Discusión.....	25
Bibliografía.....	31

RESUMEN

La reproducción es un proceso costoso, por lo que en condiciones poco favorables, los animales pueden adoptar dos estrategias: (1) posponerla hasta que las condiciones les resulten más favorables, o (2) invertir más recursos en la reproducción actual, que probablemente será la última, aún si esto implica que el animal muera. A esto se le conoce como inversión terminal y ocurre cuando los individuos son viejos o perciben un alto riesgo de morir. La teoría de la inversión terminal está fundamentada principalmente por estudios en hembras, en animales de vida larga y en condiciones de laboratorio, por lo que hay pocos estudios sobre inversión terminal en machos de vida corta en condiciones naturales. Este estudio es el primero en evaluar el papel que juegan las hormonas, en particular la hormona juvenil (HJ), sobre aspectos conductuales y fisiológicos del proceso de inversión terminal, analizando las conductas sexuales y distintos aspectos fisiológicos de machos de la libélula territorial *Hetaerina americana*, una especie que presenta inversión terminal. Manipulando machos jóvenes y viejos con un tratamiento análogo de HJ, se evaluó el efecto de la edad y el tratamiento sobre la conducta territorial, la respuesta inmune, las reservas de grasa y la masa muscular. Los resultados contrastan con estudios previos que indican que ocurre inversión terminal pues no reflejan que la HJ afecte la condición fisiológica ni la conducta de los machos, así como tampoco parece haber diferencias asociadas a la edad que indiquen que ocurre inversión terminal. Se requieren más estudios que evalúen el papel de las hormonas en la inversión terminal.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso costoso, por lo que, en los animales iteroparos (que tienen más de un evento reproductivo a lo largo de su vida) invertir mucho en los primeros eventos reproductivos puede afectar negativamente las reproducciones subsecuentes (Clutton-Brock 1984; Zera & Harshman 2001; Velando et. al. 2006; González-Tokman et. al. 2013a). Por esto, muchos animales optimizan su inversión a cada evento reproductivo de acuerdo a sus probabilidades de reproducirse en el futuro (Roff 1992; Stearns 1992;), por lo que cuando los animales perciben que las condiciones presentes no son buenas para la reproducción, pueden optar por posponerla hasta que las condiciones les resulten más favorables (McNamara et al. 2009). Por otra parte, cuando el organismo percibe que la probabilidad para reproducirse en el futuro disminuyen debido a una disminución en las probabilidades de supervivencia, invertirá más recursos en la reproducción actual, la que probablemente será la última, aún si esto implica que el animal muera (Williams 1966; Clutton-Brock 1984; McNamara et al. 2009). Esta última estrategia es conocida como inversión terminal.

Un individuo de una cierta edad y sexo posee un *valor reproductivo*, que se define como la probabilidad de tener un éxito reproductivo en el futuro (Williams 1966). Además de esto también existe un *valor reproductivo residual*, esto es, la relación entre los recursos que el organismo pudiera poseer en el próximo evento

reproductivo y la probabilidad de que dicho individuo sobreviva hasta el próximo evento reproductivo (Williams 1966; Pianka & Parker 1975).

La teoría de la inversión terminal propone que los animales incrementan su esfuerzo reproductivo cuando su riesgo de mortandad aumenta y sus probabilidades de reproducción disminuyen, lo cual puede suceder cuando los animales son viejos o su estado de salud está deteriorado (Clutton-Brock 1984; Velando et. al. 2006; González-Tokman et. al. 2013a). La teoría de la inversión terminal posee dos supuestos principales: (1) que la inversión en reproducción en el presente compromete las reproducciones en el futuro, y (2) que los animales poseen la capacidad de percibir su esperanza de vida, lo que les permite regular sus eventos reproductivos (Nielsen & Hofman 2011). Por esto, al percibir condiciones fisiológicas adversas, los animales jóvenes (con alto valor reproductivo residual) preferirán invertir en mantener su estado físico que invertir en reproducción, mientras que los organismos senescentes (con bajo valor reproductivo residual) preferirán invertir sus recursos en la reproducción (Forbes 1993). Como resultado de esto, los animales viejos y enfermos pueden incrementar su esfuerzo reproductivo (Adamo 1999; Velando et. al. 2006) y en consecuencia ver comprometida su condición fisiológica (González-Tokman et. al. 2013a, b).

La teoría de la inversión terminal está fundamentada principalmente por estudios en hembras, tanto en vertebrados (Hoffman et. al. 2010; Weladji et. al. 2010), como en invertebrados (Adamo 1999; Javois & Tammaru 2004; Creighton, Heflin & Belk

2009). Se sabe que las hembras senescentes o con retos inmunes incrementan la inversión en la reproducción o en el cuidado parental respecto a las hembras jóvenes o más sanas (Adamo 1999; Javois & Tammaru 2004; Creighton, Heflin & Belk 2009; Hoffman et. al. 2010; Weladji et. al. 2010). Por ejemplo, se manipularon el riesgo de depredación y la disponibilidad de alimento en hembras de la polilla *Scotopteryx chenopodiata* para simular condiciones que funcionan como indicadores de reducción de la esperanza da vida (Javois & Tammaru 2004). Las modificaciones incluían simulación de depredación, y privación de alimento. También se midió la correlación entre la oviposición y la mortalidad. Se observó que al aumentar los riesgos de depredación y mortalidad en las hembras, éstas incrementaban la cantidad de huevos que ovipositaban, sin embargo, al disminuir la cantidad de alimento, se reducía drásticamente la cantidad de huevos ovopositados (Javois & Tammaru 2004).

En los machos, la teoría de inversión terminal ha sido estudiada experimentalmente en animales de vida larga (Velandó et al. 2006). En el bobo de patas azules, *Sula nebouxii*, se obtuvieron datos de una población durante 15 años, lo que permitió observar que los individuos incrementaban su éxito reproductivo durante los primeros 10 años reproductivos, y después éste se reducía hasta que el animal moría. Para determinar si los bobos presentaban inversión terminal al ver comprometida su supervivencia, se infectó a un grupo de machos con una inyección intraperitoneal de 0.1 mg de LPS (lipopolisacáridos) (LPS de *Escherichia*

coli, serotipo 055 :B5) lo cual genera costos inmunológicos en el individuo y puede ser un indicador de deterioro de la salud. Se observó que los machos jóvenes que presentaban los síntomas de enfermedad reducían sus esfuerzos reproductivos, mientras que los machos viejos aumentaron considerablemente el esfuerzo en la reproducción y el cuidado parental, siendo esto una prueba de que la inversión terminal ocurre (Velandó et al. 2006).

En especies en las que los machos no contribuyen al cuidado parental, la inversión terminal se puede detectar por un incremento en la inversión a caracteres y conductas sexuales (González-Tokman et. al. 2013a). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre inversión terminal en machos ha sido realizada en el laboratorio y ha fallado en detectar los cambios en la condición de los machos, tal vez porque los animales no han enfrentado las presiones selectivas que actúan en la naturaleza (Velandó et al. 2006; González-Tokman et. al. 2013a). En condiciones naturales, la inversión terminal en machos ha sido estudiada en un vertebrado (el bobo de patas azules, *Sula nebouxii*; Velandó et. al., 2006) y un invertebrado (la libélula *Hetaerina americana*; González-Tokman et. al. 2013a). Ambos estudios coinciden en que en condiciones que comprometen la probabilidad de reproducción futura y la supervivencia, los machos más jóvenes optaran por esperar a que las condiciones resulten más favorables, mientras que los animales senescentes optarán por aumentar la asignación de recursos a aquellas conductas y funciones relacionadas con la reproducción.

Una de las causas del deterioro fisiológico que acumulan los individuos viejos, y que puede desencadenar la inversión terminal, es la activación del sistema inmune (González-Tokman et. al. 2013b). Esto se debe a que activar y mantener la respuesta inmune es energéticamente costoso dado que los requerimientos metabólicos de las células inmunológicas son muy altos e invertir en el sistema inmune implica reducir los recursos a otras funciones (Sheldon & Verhulst, 1996). En una ausencia o variación en la obtención de recursos, dos rasgos relacionados en un compromiso estarán correlacionados negativamente (Lochmiller & Derenberg 2000; Zera & Harshman 2001). Por ejemplo, si los recursos internos destinados a la reproducción actual limitan los recursos disponibles para una reproducción futura, existirá un compromiso entre la reproducción presente y futura por razones fisiológicas (Zera & Harshman 2001). En la naturaleza, los recursos suelen ser escasos, por lo que cuando un mismo recurso está destinado a dos funciones distintas, se pueden apreciar compromisos evidentes (Kotiaho, 2001). Esto resalta la importancia de realizar estudios sobre el tema en condiciones naturales. Los compromisos ocurren cuando un incremento en la inversión de un componente de adecuación provoca una reducción en la inversión en otro componente (Flatt & Heyland 2008). La idea de la inversión terminal involucra dos compromisos clásicos en las historias de vida: supervivencia vs reproducción y reproducción presente vs reproducción futura (Stearns 1992; Sheldon & Verhulst 1996; Zera & Harshman 2001; Flatt & Heyland 2008).

Los compromisos son resultado de una competencia entre distintas funciones del organismo por un recurso interno limitado (Zera & Harshman 2001). La importancia de la energía y los nutrientes en el mantenimiento del sistema inmune se debe a que durante una infección se acelera el metabolismo para una mayor producción de anticuerpos (Lochmiller & Derenberg 2000). A pesar de que los insectos no poseen anticuerpos, sí poseen otras estrategias de inmunidad como la encapsulación, melanización, actividad de fenoloxidasa y hemocitos con capacidad de fagocitosis (Cotter et. al. 2004), que son costosas de producir (Flatt & Heyland 2008).

La plasticidad en la respuesta a los compromisos está determinada por reglas de prioridad, que dominan la asignación de recursos a distintos procesos en el organismo (Zera & Harshman 2001). Esta asignación de recursos está mediada tanto por componentes genéticos (Flatt & Heyland 2008), como por hormonas (Zera & Harshman 2001; Flatt et. al. 2005). El presente trabajo se enfocó en la regulación hormonal de los compromisos en los machos.

Las hormonas son mediadoras clave en la comunicación entre factores ambientales y el estado interno de los individuos, y por lo tanto sujetos de investigación de la plasticidad en la respuesta a señales exógenas (Flatt et. al. 2005; Flatt & Kawecki 2007; González-Tokman et. al. 2012). Un caso particular es el compromiso mediado por hormonas que existe entre la reproducción y la respuesta inmune. Este compromiso ocurre debido a que las hormonas encargadas de la asignación de

recursos para la reproducción generan una disminución en la asignación de recursos a las funciones del sistema inmune (Sheldon & Verhulst 1996). Esta asignación de recursos está mediada por hormonas sexuales: la testosterona en vertebrados (Folstad & Karter 1992) y la hormona juvenil en insectos (Rantala et al. 2003; Rolff & Siva-Jothy 2003; Flatt et al. 2005). De acuerdo con esta idea, las hormonas sexuales favorecen la reproducción a costa de la respuesta inmune. Esta idea es conocida como hipótesis de la desventaja en la inmunocompetencia (HDI) y fue propuesta originalmente para los vertebrados (Folstad & Karter 1992). De acuerdo con la HDI, cuando los animales poseen niveles hormonales que incrementan la función sexual presentan una inmunosupresión (Folstad & Karter 1992). Por ejemplo en el marsupial *Phascogale calura* se ha observado que ocurre una fuerte inmunodepresión en los machos cuando hay un incremento en los niveles de testosterona (y corticosteroides) durante el esfuerzo reproductivo (Bradley 1987). A pesar de ser una hipótesis muy relevante en biología evolutiva, las evidencias de la HDI son variadas: incrementar los niveles de testosterona no siempre genera una inmunosupresión, y no siempre incrementa la actividad sexual, por lo que alterar los niveles hormonales no necesariamente generará una inmunosupresión o modificará la actividad sexual (Roberts et al. 2004).

En los insectos, el compromiso entre reproducción y respuesta inmune está mediado por la hormona juvenil (HJ) (Rolff & Siva-Jothy 2003; Flatt et al. 2005). La HJ afecta a un gran número de procesos del desarrollo larvario y de la etapa adulta

de los insectos: muda, metamorfosis, maduración sexual, producción de feromonas, comportamiento de cortejo y locomoción, regulación de la diapausa, migración, memoria y aprendizaje, función inmune y otras (revisado en Flatt et. al. 2005). En experimentos realizados con suplementos de HJ, se ha observado en *Anastrema suspensa*, (Flatt et. al. 2005) *Calopteryx virgo*, (Rantala & Roff 2005) *Drosophila melanogaster* y *Tenebrio molitor* (Contreras-Garduño et. al. 2009) que una aplicación tópica de metopreno (análogo de la HJ) aumenta la intensidad de las conductas sexuales y la producción de feromonas, pero disminuye la respuesta inmune. Este efecto dual de la HJ es similar a la testosterona en los vertebrados (Flatt et. al. 2005; Rantala & Roff 2005), por lo cual la HDI, mediada por HJ, podría aplicar también en los invertebrados.

Debido a que regula tantos procesos fisiológicos y conductuales, la HJ puede estar involucrada en la regulación de las estrategias reproductivas de los insectos. En particular, si bien se creía que la HJ tenía un efecto negativo en la supervivencia de los machos, y que éste efecto se incrementaba en condiciones de inversión terminal, ahora se sabe la HJ tiene un efecto negativo en la supervivencia de los machos jóvenes, pero a su vez, tiene un efecto positivo en la supervivencia de los machos viejos (González-Tokman 2013b). Sin embargo, no se sabe el efecto de la HJ en aspectos conductuales y fisiológicos del proceso de inversión terminal que pueden estar provocando tales efectos en la supervivencia de los individuos. En este estudio evalué el papel de la HJ en la inversión terminal, analizando las

conductas sexuales, la condición energética y la capacidad de respuesta inmune de un insecto de vida corta, la libélula territorial *Hetaerina americana*.

Se ha visto que los machos de *H. americana* no escatiman costos en la reproducción cuando son viejos, consumiendo así la totalidad de sus reservas energéticas (González-Tokman et. al. 2013a). También se ha visto que los animales que presentan un reto inmunológico (como la presencia de un agente ajeno al organismo) elevan su actividad territorial a pesar de ver deteriorada su condición física, lo cual es una evidencia directa de que ocurre inversión terminal (González-Tokman et. al. 2013a).

Este estudio es el primero en evaluar el papel que juega la hormona juvenil en aspectos conductuales y fisiológicos del proceso de inversión terminal. En particular se pusieron a prueba las siguientes predicciones: (1) la HJ favorece la inversión terminal, provocando un incremento en la actividad territorial pero una disminución en la condición fisiológica e inmunológica de los machos jóvenes y viejos; (2) como resultado de la inversión terminal, la disminución en la condición fisiológica e inmunológica será más drástica en machos viejos que en jóvenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujeto de estudio

Para determinar el papel de la HJ en la inversión terminal se utilizaron machos jóvenes y viejos de la libélula *Hetaerina americana* (Odonata: Calopterygidae). Esta especie presenta un sistema de apareamiento de tipo lek, en el que los machos pelean por territorios a las orillas de un río a los que las hembras acuden con el único propósito de aparearse (Córdoba-Aguilar et. al. 2009). El éxito en la obtención de cópulas está determinado por el éxito en la competencia entre machos y no por elección femenina (Grether 1996b). Existen tres tácticas de apareamiento en esta especie: la primera (y más efectiva) consiste en ser completamente territorial, la segunda en no defender territorios en lo absoluto, y la tercera en pasar de un estado territorial a uno no territorial dependiendo de las condiciones (Raihani et. al. 2008). Este sistema de competencia por defensa de territorios implica costos para los individuos, por lo que la territorialidad, expresada como ataques aéreos agresivos en contra de machos conespecíficos, se considera una expresión honesta de calidad de la condición energética e inmunológica de los individuos (Contreras-Garduño et. al. 2006, 2007, 2008).

Las reservas energéticas están presentes como reservas de grasa principalmente en el tórax (González-Tokman et. al. 2013a). Estas reservas funcionan como combustible durante los vuelos agresivos (Marden & Waage 1990), por lo que los machos territoriales suelen poseer una mayor reserva de grasa que los no

territoriales, así como más volumen muscular (Contreras-Garduño 2009). Los machos de *H. americana* llegan a tener hasta tres cópulas durante su vida (Serrano-Meneses et. al. 2007), por lo que son perfectos sujetos de estudio para la teoría de la inversión terminal (González-Tokman et. al. 2013a). Se sabe que los machos *H. americana* de alguna forma perciben las probabilidades de reproducción futura, y que asignan sus recursos con base a esto (González-Tokman et. al. 2013a).

Trabajo de campo

El estudio se realizó en tres zonas del río Tetlama en Xochitepec, Morelos, México (18 ° 46' 51'' N, 99 ° 13'53'' O, 1,109 msnm) en octubre y noviembre del 2012. Para capturar a los animales se utilizó una red para mariposas. Los individuos se capturaban entre las 11:00 a.m. y las 14:00 p.m., ya que era el momento en los machos presentaban mayor actividad territorial. Las observaciones conductuales también se realizaron en este intervalo de tiempo (ver abajo).

Para evaluar las predicciones del presente trabajo se utilizaron machos territoriales de diferentes categorías de edad. Se determinó que un individuo era territorial si al momento de la captura se le observaba cuidando de un territorio y, al presentar un macho intruso previamente capturado, reaccionaban agresivamente o si se les veía combatiendo contra otros machos por un territorio. Se capturaron dos grupos de individuos, uno de jóvenes y otro de viejos. Se consideraron cuatro categorías de edad: categoría 1: individuos recién emergidos (tenerales), los cuales poseen alas

flexibles, transparentes y sin daño, abdómenes flexibles y carecen de pigmentación total en abdomen y tórax; categoría 2: machos jóvenes, maduros sexualmente, que poseen una mayor pigmentación y sus alas solo son flexibles desde la parte media del ala hasta la punta; categoría 3: machos maduros que poseen alas que solo son flexibles en la punta y ya presentan pigmentación completa en las alas; categoría 4: viejos, machos que poseen alas totalmente rígidas y con signos de daño y pruinescencia en el tórax (Plaistow & Siva-Jothy 1996). Se consideró que los individuos jóvenes eran de categoría 2 y los viejos de categoría 4.

Tratamientos

Los machos jóvenes y viejos que pertenecían al grupo experimental recibieron un tratamiento tópico de ácido metoprénico, un análogo de hormona juvenil (HJ), aplicado con una micropipeta en la parte dorsal de la cabeza. En esta zona corporal, la HJ penetra rápidamente la cutícula cerca de la *corpora allata*, que es donde naturalmente se sintetiza la HJ (Flatt et. al. 2005; Contreras-Garduño et. al. 2009; González-Tokman et. al. 2012). De una disolución de 5 miligramos de metopreno en 0.1 mililitros de agua destilada (González-Tokman et. al. 2012), se tomó 1 μL y se diluyó en acetona en una relación 1:1000. El grupo experimental recibió 3 μL de la disolución que equivalían a 15 ng disueltos en 3 μL de acetona (González-Tokman et. al. 2012). Los machos del tratamiento control positivo recibieron una gota de 3 μL de acetona en la parte dorsal de la cabeza para

poder controlar que la acetona no estuviera modificando la conducta de los individuos. Para los análisis fisiológicos se utilizó un tercer grupo: machos territoriales sin manipular como control negativo. Como medida de tamaño corporal de todos los individuos se midió con un vernier la longitud del ala desde la inserción en el tórax hasta la punta ($\pm 0.01\text{mm}$). Una vez medidos y manipulados, los individuos fueron marcados con un número de tres dígitos hecho con un marcador indeleble en el ala anterior izquierda, para medir su conducta y su fisiología al día siguiente de la manipulación.

Conducta

Para poder observar las alteraciones conductuales provocadas por el tratamiento, se hicieron intrusiones experimentales de un macho atado (que no fue marcado ni utilizado en el experimento) a un hilo transparente de 50 cm atado a una vara de unos 30 cm de largo y se acercó al territorio de los machos focales marcados (Anderson & Grether, 2010a, b; González-Tokman et. al. 2013a). Se consideró una intrusión como efectiva si el macho atado permaneció volando por diez segundos a menos de 50 cm del macho focal. En respuesta a las intrusiones experimentales, se midió la intensidad de la respuesta dependiendo de la conducta que presentaban: ataque (que dejara su puesto para agredir al macho intromisor), despliegue de alas (que le mostrara sus alas al macho intromisor sin dejar su puesto), huída (que abandonara el territorio) o que no realizara ninguna actividad. Esto permitió

simular las conductas de territorialidad que presentan en su ambiente natural y estimar si el incremento de HJ producía algún cambio en estas, así como observar las diferencias conductuales entre machos y jóvenes con y sin tratamiento (Anderson & Grether, 2010b; González-Tokman et. al. 2013a). Se realizaron 10 intrusiones con intervalos de 30 segundos entre cada una para cada macho marcado (González-Tokman et. al. 2013a). La cantidad de animales observados fue de 53 machos (jóvenes con metopreno N=12, jóvenes con acetona N=17, viejos con metopreno N=15 y viejos con acetona N=9)

Fisiología

Una vez observada la conducta que presentaban los machos, se recapturaron para tomar una muestra de hemolinfa y medir su respuesta inmunológica. Se recapturó un total de 34 machos (jóvenes metopreno N=14, jóvenes acetona N=9, viejos metopreno N=8, viejos acetona N=3), y se capturaron 20 machos como control negativo (jóvenes control negativo N=10, viejos control negativo N=10).

Para ver el efecto de la edad y el tratamiento en la respuesta inmune se utilizó la actividad de la enzima fenoloxidasasa (FO) como indicador de respuesta inmune. En diversas especies de insectos la actividad de la FO se reduce por el aumento de HJ (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2011). Esta enzima es parte de la respuesta inmune por melanización en los invertebrados y es fundamental en la respuesta contra muchos patógenos (Rolff & Siva-Jothy 2003; González-Santoyo & Córdoba-

Aguilar 2011). Los costos de producción y mantenimiento del sistema de la FO son muy altos. Esto se debe a dos razones: la primera es que el compuesto activo es la tirosina, la cual se obtiene de la fenilalanina, que solo se obtiene por el alimento (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2011); la segunda es que la melanina (el producto final de la cascada de la FO), es un compuesto rico en nitrógeno, que debe ser sintetizado a partir de proteínas (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2011). Si la producción de FO es dependiente de la dieta, los individuos en buena condición presentaran mayores niveles de FO (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2011). En particular, en machos de libélulas de la familia Calopterygidae, cuando se incrementan experimentalmente los niveles de HJ mediante un análogo (metopreno) se incrementa la conducta de agresión territorial de los machos a expensas de la actividad de la FO (Contreras-Garduño et. al. 2009). Sin embargo, se desconoce el papel de la HJ sobre la conducta y la fisiología en distintas etapas de la vida adulta de los insectos.

Para obtener la hemolinfa, primero se colocó a los individuos en refrigeración para que entraran en un estado de baja actividad. Después se procedió a perfundir a los individuos inyectando 200 μ L de PBS (Buffer de fosfatos) con una jeringa de insulina de 1.5ml en la zona ventral del tórax, en donde se ubica el segundo par de patas (González-Santoyo et. al. 2010). La mezcla de PBS y hemolinfa resultante se recuperaba de una pequeña incisión hecha en el último segmento abdominal. La

cantidad utilizada era de 5 gotas (alrededor de 100 μ l) (González-Santoyo et. al. 2010).

La actividad de la FO se midió en el espectrofotómetro, registrando la formación de dopamina a partir de L-dihidrofenilalanina (L-DOPA). Para medir la actividad de la FO las muestras se colocaron en una placa Microwell® de 96 pozos. Se utilizaron 16 pozos como control, en los que se colocó albumina en diferentes concentraciones conocidas de albumina que representaban los valores de una curva estándar (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 20 y 30 μ g de albumina/ml) para saber exactamente cuanta proteína había en cada pozo y así poder comparar con los pozos que poseían muestras de hemolinfa cuando se leyeran con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nanómetros (González-Santoyo et. al. 2010). Debido a que la concentración de las proteínas en la hemolinfa extraída de los individuos no era homogénea, la actividad de la FO no puede ser medida en relación al volumen de hemolinfa. Por esto, la concentración de proteínas se debe corregir (Contreras-Garduño et. al. 2007; González-Santoyo et. al. 2010; Moreno-García et. al. 2013). La cantidad de proteína en cada muestra se determinó usando una relación entre la absorbancia presentada por las cantidades conocidas de albúmina y las registradas en cada muestra. Después se tomó la disolución de hemolinfa y PBS equivalente de 10 μ g de proteína de cada individuo y se diluyó con un buffer A + B (con el compuesto A disuelto en B en una relación 10:1) hasta obtener una disolución de

100 μ l, a la que posteriormente se le agregó 100 μ l de L-DOPA. Después se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 490 nm.

La L-DOPA se preparó tomando 5 μ l y diluyéndolos en 3mg/ml de una solución PBS. La absorbancia de la FO era registrada cada 10 minutos, durante 1 hora utilizando el espectrofotómetro a 490 nm (González-Santoyo et. al. 2010). Una mezcla de 150 μ l de PBS y 50 μ l de L-DOPA fue utilizada como blanco. La actividad de la L-DOPA se expresa en unidades de absorbancia, esto es, el cambio en la absorbancia por minuto por mg de proteína (González-Santoyo et. al. 2010). Esto permitió conocer la concentración de FO de cada individuo, y así medir la variación en la respuesta inmune de los individuos de cada grupo, ya que una mayor cantidad de FO significa valores mayores de absorbancia, lo cual refleja la actividad inmunológica del individuo (González Santoyo & Córdoba-Aguilar 2011)

Después de tomar la muestra de hemolinfa, se procedió a medir los niveles de grasa y masa muscular en el tórax y abdomen de cada macho, los sitios corporales donde se aloja la mayor cantidad de grasa (Plaistow & Siva-Jothy 1996). La grasa se extrajo por inmersión en cloroformo durante 24 horas (Plaistow & Siva-Jothy 1996; Contreras-Garduño et. al., 2008). Se midió el peso seco del tórax y abdomen antes y después de la extracción. La diferencia de peso es la cantidad de grasa corporal (Plaistow & Siva-Jothy 1996; Contreras-Garduño et. al., 2008). La masa muscular se midió realizando una inmersión del tórax en hidróxido de potasio (0.8 M) por 48

h. La diferencia de masa antes y después de la extracción es la masa muscular total (Plaistow and Siva-Jothy 1996; Contreras-Garduño et. al., 2008).

Análisis estadísticos

Para determinar el efecto de la edad y el tratamiento sobre las distintas conductas se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM's). Para analizar las conductas de ataque y despliegue de alas se utilizó un GLM con distribución binomial negativa debido a la alta sobredispersión (2.3849 en la conducta de despliegue de alas y 3.835 en la conducta de ataque). En el caso de la conducta de huida se utilizó un GLM con distribución Poisson (baja sobredispersión; 0.8223). Los modelos iniciales ponían a prueba cada una de las conductas e incluían como variables independientes la talla, la edad y el tratamiento, además de todas sus interacciones de segundo y tercer grado. Para analizar las variables fisiológicas (grasa, músculo y FO) se utilizaron LM's (modelos lineales generales) con la edad, el tratamiento y la talla como variables independientes, además de todas las interacciones de segundo y tercer grado.

A partir de los modelos globales con todas las interacciones, se seleccionó el mejor modelo con base a valores de Criterio de Información de Akaike (AIC). Este criterio tiene en cuenta los cambios en el ajuste y las diferencias en el número de parámetros entre dos modelos. Los mejores modelos son aquellos que presentan el menor valor de AIC.

Antes de correr modelos lineales, se probó el supuesto de homogeneidad de varianzas mediante pruebas de Fligner-Killeen (Crawley, 2007). También se revisó la presencia de *outliers* utilizando pruebas de distancia de Cook, en las que valores mayores a 0.5 indican la presencia de *outliers* (Crawley, 2007). Se detectaron dos *outliers* en un modelo (conducta de ataque dependiente de edad x tratamiento + talla) y uno solo para otro modelo (músculo dependiente de edad x tratamiento + talla), los cuales fueron eliminados de las pruebas. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team 2013, versión 2.12.2)

RESULTADOS

Conducta

La frecuencia de las conductas de ataque en respuesta a las intrusiones experimentales de machos no fue dependiente de la edad, el tratamiento hormonal o la talla, según el mejor modelo seleccionado por AIC.

El mejor modelo seleccionado por AIC indica que la conducta de huida fue dependiente de la talla (Huida~Talla), de manera que los individuos más grandes huyeron más frecuentemente ante las intrusiones experimentales que los individuos más pequeños (GLM Poisson: $gl=1$ $z= 3.58$ 3, $p= 0.0008$, $N=53$; Figura

1). La edad y el tratamiento hormonal no tuvieron efecto sobre la conducta de huída, por lo que fueron excluidas del análisis final.

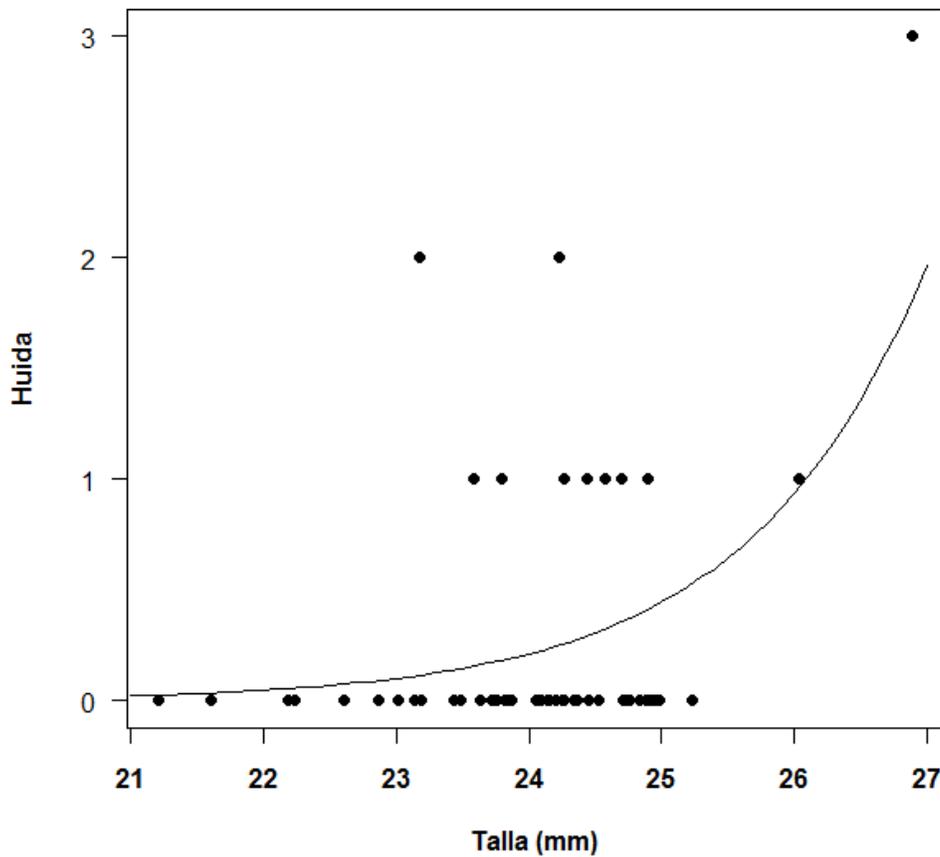


Figura 1. Relación entre la talla y la frecuencia en la conducta de huída en machos territoriales de la libélula *Hetaerina americana*

El mejor modelo seleccionado por AIC indica que la frecuencia en la conducta de despliegue de alas fue dependiente de la edad (Despliegue de alas~Edad), de manera que los individuos más jóvenes desplegaron más frecuentemente ante las

intrusiones experimentales que los individuos más viejos (GLM Binomial negativa : $gl=1$, $z=-1.981$, $p=0.048$, $N=53$; Figura 2). La talla y el tratamiento hormonal no tuvieron efecto sobre la conducta de despliegue de alas, por lo que fueron excluidas del análisis final.

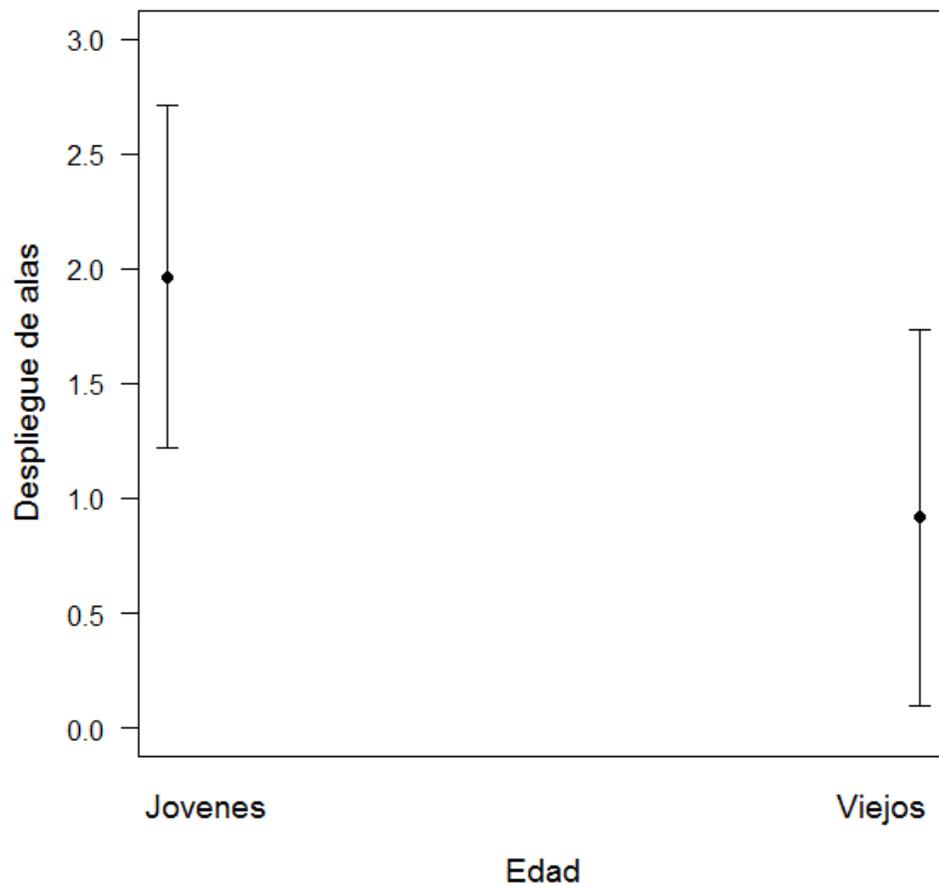


Figura 2. Efecto de la edad sobre la conducta de despliegue de alas en machos territoriales de *Hetaerina americana*

Fisiología

Según los mejores modelos seleccionados por AIC, no se encontró un efecto de la edad o del tratamiento hormonal sobre la grasa, el músculo o la FO. El tamaño se relacionó positivamente con la cantidad de grasa ($p=0.042$, $R=1.592$ N=54; Figura 3), pero no con el músculo o la FO. Se esperaría que con mayor edad la cantidad de grasa fuera menor, pero no es así (Figura 4)

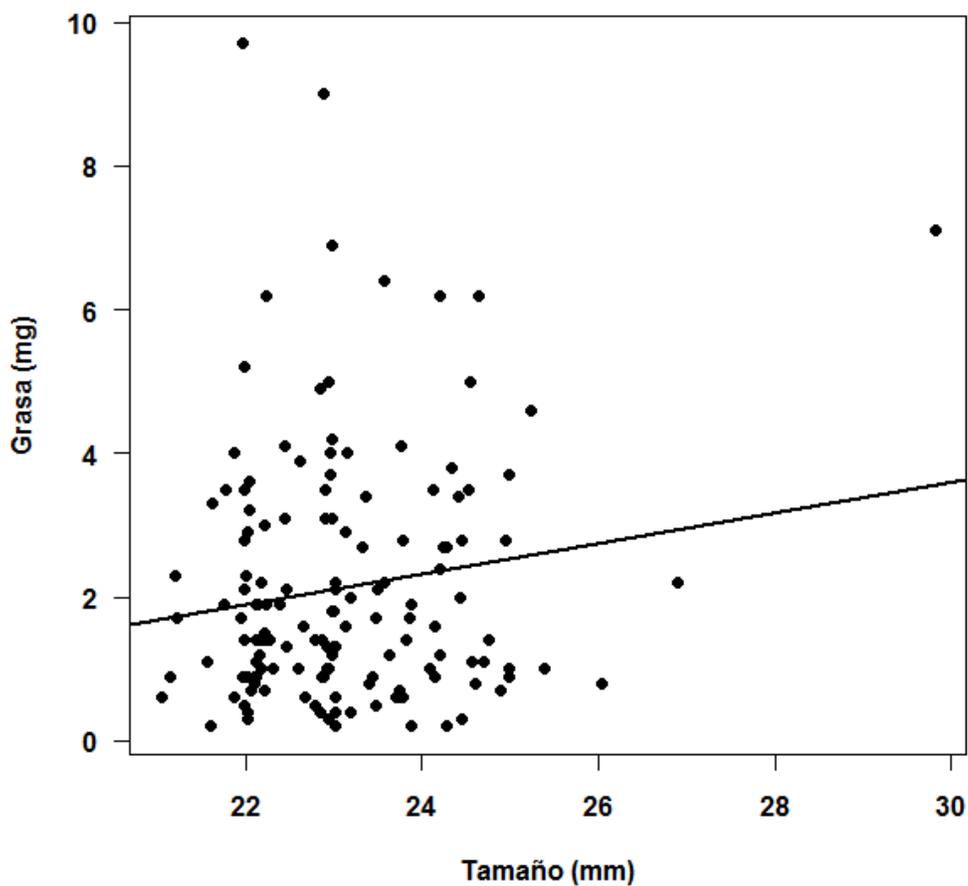


Figura 3. Relación entre la talla y la cantidad de reservas energéticas de machos territoriales de

Hetaerina americana

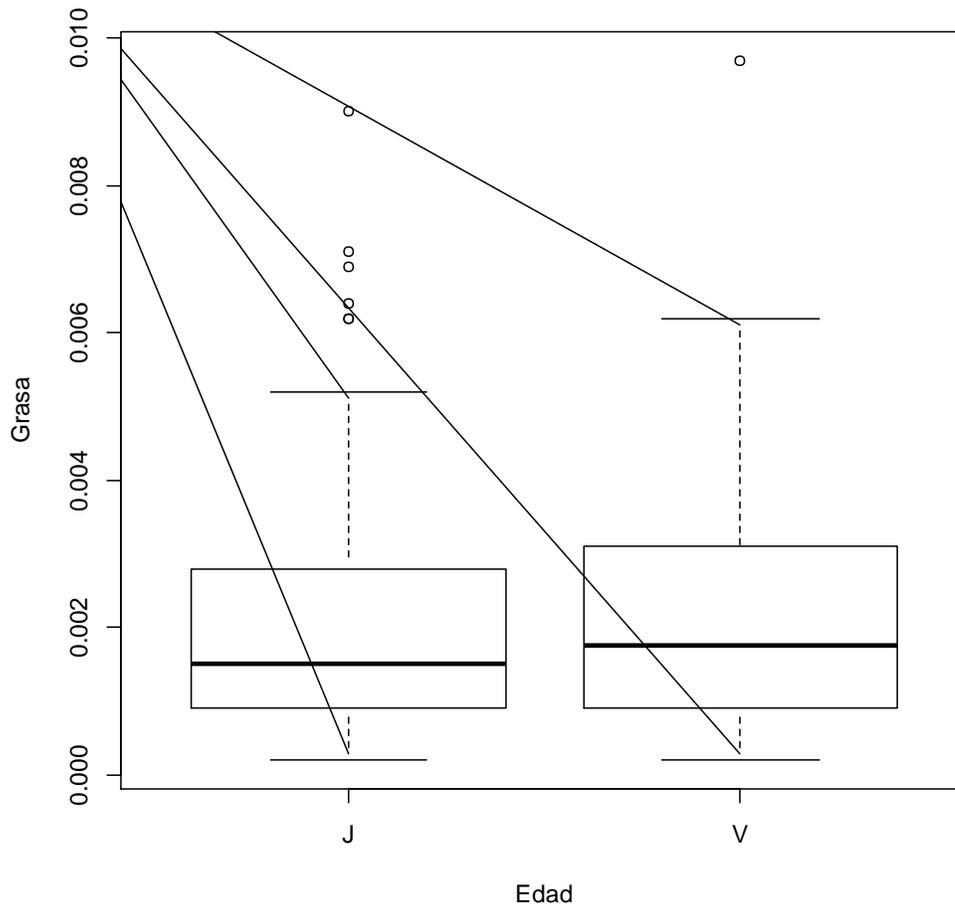


Figura 4. Relación entre la edad y la cantidad de grasa corporal en machos territoriales de *Hetaerina americana*

DISCUSIÓN

En este estudio se utilizaron machos de la libélula *H. americana* para poner a prueba la hipótesis de que la HJ es la responsable de mediar la asignación de recursos para la reproducción y el sistema inmune, modificando la fisiología y la conducta de los individuos dependiendo de su edad. Esto indicaría que las señales hormonales pueden asociarse con las probabilidades de reproducción futura en el modelo de estudio. Sin embargo, a diferencia de otros estudios (e. g. González-Tokman et. al. 2013a), en los que se ha sugerido que los machos de *H. americana* adoptan una estrategia de inversión terminal cuando ven reducidas sus probabilidades de reproducción futura, los presentes resultados no mostraron ninguna diferencia en la conducta y en la fisiología entre machos viejos y jóvenes, que a su vez reflejara la existencia de una inversión terminal. Tampoco se observaron diferencias entre los machos con y sin el tratamiento del análogo de la HJ. Debido a que no es posible determinar la cantidad exacta de HJ presente en los individuos ni en sus distintas etapas de vida, es altamente probable que la cantidad de análogo utilizada no fuera la adecuada, ya sea que no fuera suficiente para que existiera un efecto, o que por el contrario la cantidad fuera tan alta que el efecto se viera anulado, por lo que no se observarían diferencias entre los machos con y sin tratamiento. También es posible que el efecto del análogo requiera de más tiempo para actuar, por lo que medir las diferencias un día después tal vez sea demasiado prematuro para observar alguna diferencia, aunque en otros estudios

(González-Tokman et. al. 2013a,b) se han obtenido resultados satisfactorios después de 24 horas de actividad. También se debe considerar que toda manipulación generada a un individuo generará estrés, por lo que algunos individuos podrían ver desmejorada su condición, aún cuando estuvieran fisiológicamente aptos para competir por territorios y otros despliegues. Tampoco se debe descartar que los resultados obtenidos pudieran deberse a que los tamaños de muestras utilizados no fueran lo suficientemente grandes.

Al evaluar la primera parte de la primera predicción (que la HJ favorece la inversión terminal, provocando un incremento en la actividad territorial en los machos), se obtuvieron resultados variados. En el caso de la conducta de ataque, no se encontraron diferencias entre los machos de distintas categorías de edad, distinto tratamiento ni diferente talla. Esto es contrario a lo predicho, ya que se esperaría que un aumento en los niveles de HJ en los machos provocara un incremento en la actividad territorial (observada como un aumento en la agresividad y ataque a machos intrusos) en machos con una mayor concentración de HJ, como sucede en otras libélulas de la misma familia (Contreras-Garduño et. al 2009) así como en machos de una categoría de edad mayor. Sin embargo, estas dos predicciones no deberían tomarse como falsas, ya que algunos factores que podrían haber influido son: una posible desmejora debido al estrés ocasionado por la manipulación, que el efecto del análogo sea retardado, que las concentraciones

de análogo utilizadas no fueran suficientes o que el tamaño de muestra utilizado no fuera lo suficientemente grande.

Por otro lado, los resultados mostraron que hay una correlación positiva entre los animales que huyen más y poseen una mayor talla. Si bien los machos territoriales no son significativamente más grandes que los machos no territoriales, la territorialidad y agresividad se relacionan positivamente con la talla (Serrano-Meneses et. al. 2007), además de que los machos territoriales poseen una mayor proporción de reservas de grasa y músculo que los no territoriales (Serrano-Meneses et. al. 2007), lo cual resulta paradójico, ya que se esperaría que estos machos fueran los que defendieran más los territorios.

Respecto al despliegue de alas, esta conducta se presenta en menor medida cuando los machos envejecen. En los odonatos, estos despliegues se consideran señales que machos y hembras utilizan contra cualquier individuo de cualquier sexo, de la misma o diferente especie (Corbet, 1999). Estos despliegues podrían utilizarse para prevenir de confrontaciones entre machos (Grether, 2011) o evitar confrontaciones con machos de especies diferentes del género *Hetaerina*, que son bastante similares (Anderson & Grether 2010). Quizá los machos más jóvenes despliegan más que los machos más viejos ya que posiblemente mostrar la mancha alar consiga rechazar a algunos machos con manchas más pequeñas. Esto podría deberse a que la mancha alar es una señal honesta de la condición de los individuos (Contreras-Garduño et. al., 2008; González-Santoyo et. al. 2014), por lo que los machos con manchas más

grandes serían machos con una mejor condición y una mayor habilidad de defender territorios (Grether 1996a,b; González-Santoyo et. al. 2014), al mostrar su mancha evitarían ser agredidos por otros machos y así disminuir el deterioro físico ocasionado por las peleas.

Al evaluar la segunda parte de la primera predicción (que la HJ favorece la inversión terminal, provocando una disminución en la condición fisiológica e inmunológica de los machos) se obtuvieron resultados diversos. En el caso de la respuesta inmune y la cantidad de músculo en los machos no se encontraron diferencias significativas entre los machos de distinta categoría de edad o tratamiento hormonal, así como tampoco se correlacionaban con la talla de los individuos. Esto es opuesto a la segunda predicción (que como resultado de la inversión terminal, el deterioro fisiológico será mayor en machos viejos que en jóvenes), aunque esto puede deberse a que se desconocía la condición de los machos durante el tiempo previo a el experimento, por lo que es posible que tuvieran un estado físico similar, ocasionado por un ambiente con suficientes recursos, por lo que aún con un deterioro físico ocasionado por el tratamiento, no se observaría una diferencia entre machos con distintos tratamientos y edades, y la respuesta inmune presentada por estos sería similar.

En el caso de la relación entre tamaño y grasa, se encontró que se relacionan positivamente. Los machos comienzan a crear reservas de grasa justo después de emerger, acumulando reservas que utilizarán durante la reproducción y las peleas

por territorios (Serrano-Meneses et. al. 2007). Es posible que una mayor talla antes de emerger les provea de mayores reservas de grasa y de la capacidad de producir y almacenar más músculo y grasa en los días posteriores a la eclosión (Serrano-Meneses et. al. 2007).

Debido a que el presente estudio se realizó en condiciones naturales, muchos factores no pudieron estar bajo control. Por ejemplo, los estudios realizados en el laboratorio, cuando se trabaja con animales salvajes, no se puede tener control sobre la edad exacta de los animales, por lo cual se tuvo que utilizar un sistema de categorías de edades. Tampoco se puede tener control sobre la alimentación, las confrontaciones naturales entre machos o el desgaste fisiológico provocado por las condiciones ambientales. Las cópulas pueden producir cambios en la condición y en la conducta que no pueden ser controlados. Estos factores podrían afectar los resultados obtenidos en el estudio, por lo que sería útil complementarlos con estudios en cautividad, o utilizara tamaños de muestra mayores.

La hipótesis de la inversión terminal ha sido poco estudiada en animales de vida corta, sobre todo en machos. También considero que se requieren más estudios de la hipótesis de la inversión terminal en individuos en condiciones naturales, lo cual podría aportar mucha más información que sustente a los ya realizados con individuos en cautiverio, ya que los estudios en cautiverio no reflejan las condiciones que enfrentan los organismos en su ambiente natural. La predominancia de estudios en hembras sobre estudios en machos podría estar

generando un sesgo en nuestra percepción de la inversión terminal, ya que es posible que se presente en los machos en igual medida que lo hace en las hembras. A pesar de que los resultados no mostraron evidencias contundentes de que la inversión terminal ocurra en los machos de *H. americana*, otros estudios (González-Tokman et. al. 2013a) obtuvieron resultados que sugieren que hay inversión terminal en los machos de *H. americana*, por lo que deberían realizarse más investigaciones que evalúen el papel que juegan las hormonas en la inversión terminal.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamo, S. A. 1999. Evidence for adaptative changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour* **57**, 117-124.
- Anderson, C. N., Grether, G. F. 2010a. Interespecific aggression and character displacement of competitor recognition in *Hetaerina Americana*. *Proceedings of the royal Society of London, Series B* **277**, 549-555.
- Anderson, C. N., Grether, G.F. 2010b.Character displacement in the fighting colours of *Hetaerina damselflies* . *Proceedings of the royal Society of London, Series B* **277**, 3669-3675.
- Bradley, A. J., 1987. Stress and mortality in the Red-tailed Phascogale, *Phascogale calura* (Marsupialia: Dasyuridae). *General and Comparative Endocrinology* **67**, 85-100.
- Bull, J. C., Ryabov, E. V., Prince, G., Mead, A., Cunjin Z., Baxter, L. A., Pell, J. K., Osborne, J. L., Chandler, D. 2012. A strong immune response in young adult honeybees masks their increased susceptibility to infection compared to older bees. *PLOS Pathogens* **8**, 1-11.
- Clutton-Brock, T. 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *The American Naturalist*, **123**, 212-229.
- Contreras-Garduño, J., Canales-Lazcano, J., 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.

- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Córdoba-Aguilar, A. 2007. The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and survival in males of the American rubyspot. *Journal of Insect Physiology* **53**, 612-621.
- Contreras-Garduño, J., Buzzato, B. A., Serrano-Meneses, M. A., Nájera-Cordero K., Córdoba-Aguilar, A. 2008. The size of the wing spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament. *Behavioral Ecology* **19**, 724-732 .
- Contreras-Garduño, J., Córdoba-Aguilar, A., Lanz-Mendoza, H., Cordero-Rivera, A. 2009. Territorial behaviour and immunity are mediated by juvenile hormone: the physiological basis of honest signalling? *Functional Ecology* **23**, 157-163.
- Corbet, P. S. 1999. *Dragonflies: Behaviour and Ecology of Odonata*. Cornell University Press. Nueva York, EUA.
- Córdoba-Aguilar, A., Raihani, G., Serrano-Meneses, M. A., Contreras-Garduño, J. 2009. The lek mating system of Hetaerina damselflies (Insecta: Calopterygidae). *Behaviour* **146**, 189-207.
- Cotter, S. C., Kruuk, L. E. B., Wilson, K. 2004. Cost of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune System. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 421-429.
- Crawley, M. J. 2007. *The R book*. John Wiley and sons Ltd. Londres. RU.

- Creighton, J. C., Heflin, N. D., Belk, M. C. 2009. Cost of reproduction, resource quality, and terminal investment in a burying beetle. *The American Naturalist* **174**, 673-648.
- Flatt, T., Heyland, A. 2008. *Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of life History Traits and Trade-Offs*. Oxford University Press. Londres. RU
- Flatt, T., Kawecki, T. J. 2007. Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **61**, 1980-1991.
- Flatt, T., Tu, M. P., Tatar, M. 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays* **27**, 999-110.
- Folstad, I., Karter, A. J. 1992. Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist* **139**, 603-620.
- Forbes, M. R. L. 1993. Parasitism and host reproduction effort. *Oikos* **67**, 444-450.
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A., González-Tokman, D. M., Lanz-Mendoza, H. 2010. Phenoloxidase activity and melanization do not always covary with sexual trait expression in *Hetaerina* damselflies (Odonata:Calopterygidae). *Behaviour* **147**, 1285-1307.

- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A. 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomología Experimentalis et Applicata* **142**, 1-16.
- González-Santoyo, I., González-Tokman, D. M., Munguía-Steyer, R. E., Córdoba-Aguilar, A. 2014. A mismatch between the perceived fighting signal and fighting ability reveals survival and physiological cost for bearers. *PlosOne* **9**, 1-12
- González-Tokman, D. M., Munguía-Steyer, R., González-Santoyo, I., Baena-Díaz F. S., Córdoba-Aguilar, A. 2012. Support for the immunocompetence handicap hypothesis in the wild: Hormonal manipulation decreases survival in sick damselflies. *Evolution* **66**, 3294-3301
- González-Tokman, D. M., González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A. 2013a. Mating success and energetic effects driven by terminal investment in territorial males of a short-lived invertebrate. *Functional Ecology* **27**, 739-747.
- González-Tokman, D. M., González-Santoyo, I., Munguía-Steyer, R., Córdoba-Aguilar, A. 2013b. Effect of juvenile hormone on senescence in males with terminal investment. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 2458-2466
- Grether, G. F. 1996a. Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* **50**, 1939-1948.
- Grether, G.F. 1996b. Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* **50**, 1949-1957.

- Grether, G. F. 2011. The neuroecology of competitor recognition. *Integrative and Comparative Biology* **51**, 807-818.
- Hamilton, W. D., Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites?. *Science* **218**, 384-387.
- Hoffman, C. L., Higman, J. P., Mass-Rivera, A., Ayala, J. E., Maestripieri, D. 2010. Terminal investment and senescence in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) on Cayo Santiago. *Behavioral Ecology* **25**, 972-978
- Javois, J., Tammaru, T. 2003. Reproductive decisions are sensitive to cues of life expectancy: the case of a moth. *Animal Behaviour* **68**, 249-255.
- Jiménez-Cortés, J. G., Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A. 2012. The effects of food shortage during larval development on adult body size, body mass, physiology and developmental time in a tropical damselfly. *Journal of Insect Physiology* **58**, 318-326.
- Kotiaho, J. S. 2001. Cost of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biological Reviews* **76**, 365-376.
- Lindström, K. M., Krakower, D., Lundström, J. O., Silverin, B. 2001. The effects of testosterone on a viral infection in greenfinches (*Carduelis chloris*): an experimental test of the immunocompetence- handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **208**, 207-211.
- Lochmiller, R. L., Deerenberg, C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**, 87-98.

- Marden, J. H., Waage, J. K. 1990. Escalated damselfly territorial contest are energetic wars of attrition. *Animal Behaviour* **39**, 954-959.
- McNamara, J. M., Houston, A. I., Barta, Z., Scheuerlein A., Fromhage, L. 2009. *Deterioration, death and the evolution of reproductive restraint in late life*. *Proceedings of the Royal Society* **276**, 4061-4066.
- Mougeot, F. S., Redpath, M., Piertney, S. B. 2006. Elevated spring testosterone increases parasite intensity in male red grouse. *Behavioral Ecology* **17**, 117-125.
- Moreno-García M, Córdoba-Aguilar A, Condé R, et al. 2013. Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues. *Bulletin of Entomological Research*. **10**, 127-39.
- Nielsen, M. I., Hofman, L. 2011. Terminal investment in multiple sexual signals: immune challenged males produce more attractive pheromones. *Functional Ecology* **26**, 20-28.
- Pianka, E. R., Parker, W. S. 1975. Age-specific reproductive tactics. *The American Naturalist* **109**, 453-464.
- Plaistow, S., Siva-Jothy, M. T. 1996. Energetic constraints and male mate-securing tactics in the damselfly *Calopteryx splendens xanthostoma* (Charpentier). *Proceedings of the Royal Society* **263**, 1233-1239.
- Raihani, G., Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A. 2008. Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. *Animal Behaviour* **75**, 1851-1860.

- Rantala, M. J., Roff, D. A. 2005. An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology* **19**, 323-330.
- Rantala, M. J., Vainikka, A., Kortet, R. 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **270**, 2257-2261.
- Roberts, M. L., Buchanan, K. L., Evans, M. R. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour* **68**, 227-239.
- Roff, D. 2002. *Life History Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, USA.
- Rolff, J., Siva-Jothy M. T. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science* **301**, 472-475.
- Serrano-Meneses, M., Córdoba-Aguilar, A., Méndez V., Layen, S., Székely, T. 2007. Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Animal Behaviour* **73**, 987-997.
- Sheldon, B. C., Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 317-321.
- Stearns, S.C. 1992. *The Evolution of Life History*. Oxford University Press. Oxford, RU.

- Velando, A., Drummond, H., Torres, R. 2006. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **273**, 1443-1448.
- Velando, A., Drummond, H., Torres, R. 2010. Senescing sexual ornaments recover after a sabbatical. *Biology letters* **6**, 194-196.
- Weladji, R. B., Holand, O. Gaillard, J. M., Yoccoz, N. G., Mysterud, A., Nieminem, M., Stenseth, N. C. 2010. Age-specific changes in different components of reproductive output in female reindeer: terminal allocation or senescence? *Oecologia* **162**, 261-271.
- Williams, G. 1966. Natural selection, the cost of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist* **100**, 687-690.
- Zera, A. J., Harshman, L. G. 2001. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annual Review of Ecological Systems* **32**, 95-126.