



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Fenotipificación y caracterización de las fibras
del músculo de vuelo durante el último estadio
larval de la libélula territorial *Hetaerina
vulnerata*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Rafael Hernández Bañuelos

**Director
Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses**

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Fenotipificación y caracterización de las fibras
del músculo de vuelo durante el último estadio
larval de la libélula territorial *Hetaerina
vulnerata*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Rafael Hernández Bañuelos

Comité Tutorial

Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses

Dr. Alejandro Córdoba Aguilar

Dr. Amando Bautista Ortega

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018

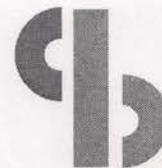
Esta tesis se realizó bajo la coordinación del Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses. La asesoría del Dr. Amando Bautista Ortega y el Dr. Alejandro Córdoba Aguilar. La asistencia y el apoyo brindado por la Dra. Kenia López García fue crucial para la realización de este proyecto.

La fase de laboratorio se realizó en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México y la recolección de datos en el laboratorio de biología de la Universidad de las Américas Puebla. Para su desarrollo y realización se contó con el financiamiento de CONACYT (589810) y del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La Maestría en Ciencias Biológicas forma parte del Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



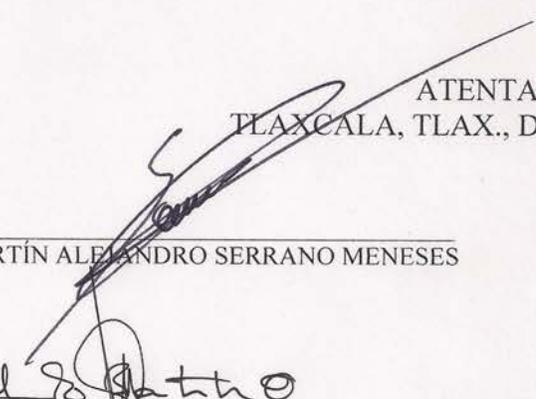
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Rafael Hernández Bañuelos** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es Fenotipificación y caracterización de las fibras del músculo de vuelo durante el último estadio larval de la libélula territorial *Hetaerina vulnerata*.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., DICIEMBRE 6 DE 2017



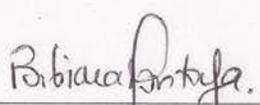
DR. MARTÍN ALEJANDRO SERRANO MENESES



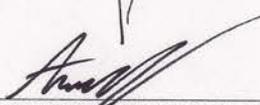
DRA. KENIA LÓPEZ GARCÍA



DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA



DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA



DR. ALEJANDRO ARIAS DEL RAZO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC), Universidad Autónoma de Tlaxcala por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca durante la maestría (589810).

A los miembros del comité tutorial Dr. Martín Alejandro Serrano Meneses, Dr. Alejandro Córdoba Aguilar y Dr. Amando Bautista Ortega por sus valiosos aportes para la realización de mi tesis.

Agradecimientos a título personal

A mi familia por el apoyo constante durante todo este trayecto.

Al Dr. Martín Serrano Meneses por la asesoría, consejos y por dejarme ser parte de su equipo de trabajo.

Especialmente a la Dra. Kenia López García, quien desde un principio me asesoro y siempre estuvo dispuesta apoyarme en cualquier duda, ya que sin su apoyo y trabajo este proyecto no hubiera sido posible.

Al Dr. Amando Bautista y el Dr. Alejandro Córdoba Aguilar por formar parte de mi comité tutorial y asesorarme durante mi proceso académico. Asimismo, le agradezco a los jurados Dra. Bibiana Montoya Loaiza y Dr. Alejandro Arias del Razo por haber aceptado y realizar la corrección de mi tesis de la mejor manera.

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, directora, docentes y administrativos por la enseñanza académica y profesional que me ofrecieron.

A Jennifer Ramírez Delgado por todo el apoyo en campo y laboratorio, y la disponibilidad para resolver tantas dudas que me surgieron a lo largo de la tesis.

A mis compañeros de cubículo Aldo Carrillo y Miguel Domínguez por sus consejos y en especial a Belgica Porras por sus “regaños” constantes que me ayudaron a terminar la maestría.

A Viridiana Muñoz López por todo el apoyo y consejos que me brindo durante toda la maestría.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

Dedicatoria

Le dedico esta tesis y mi nuevo grado
a mis padres, a mi hermana
y a mi hijo.

Resumen

El vuelo de los insectos es una actividad que exige un alto costo energético, para cumplir con estas exigencias metabólicas los insectos voladores han desarrollado un músculo del vuelo, músculo estriado, que satisface estas necesidades. Las fibras musculares que adosan las alas pueden clasificarse en sensibles o resistentes a la fatiga dependiendo del metabolismo (oxidativo, glucolítico o ambos) que utilizan para obtener la energía durante el vuelo. Además del tipo de metabolismo, el tipo de proteínas determinan el comportamiento que cada individuo exhibirá. En los machos del odonato *Hetaerina vulnerata* pueden observarse dos tácticas reproductivas alternativas: territorial y no territorial. Al comparar entre tácticas los músculos del vuelo de adultos machos de *H. vulnerata*, se encontraron diferencias significativas en el área transversal de las fibras, dónde los músculos anteriores tienen valores mayores que los músculos posteriores y cuya diferencia es mayor en machos territoriales. Debido a que se desconoce el origen de tal variación, y sabiendo que el desarrollo larval es el periodo más largo en el ciclo de vida de los odonatos capaz de influenciar en rasgos que impactan directamente la adecuación del adulto, este trabajo busca un posible origen ontogénico observable en el músculo del vuelo de las larvas de *H. vulnerata* durante su último estadio de desarrollo. Para lograr esto se caracterizaron los tipos de fibras de los músculos que adosan las alas en larvas de machos (n=15) y de hembras (n=11), para ser utilizadas como control, de *H. vulnerata*. Se hizo una disección del tórax y se congeló con isopentano y hielo seco. Posteriormente se hicieron cortes seriados de 10 µm de grosor en un criostato (Leica CM 1850) a -25°C. Se analizó la histología (H-E), el metabolismo (NADH-TR) y el tipo de actividad enzimática de la ATPasa (ATPasa básica) de las fibras musculares del sintórax. La musculatura, tanto en machos como en hembras, presenta las características previamente observadas en el adulto. Los músculos del vuelo tienen una disposición radial de las fibras con un núcleo en el centro y sarcosomas desarrollados. Utilizando las medianas se pudieron diferenciar dos grupos de machos. Los resultados muestran una diferencia significativa en las larvas de machos entre los músculos anteriores y los posteriores, siendo el área transversal de las fibras musculares anteriores mayor al de las posteriores, tal como ocurre en los adultos maduros. En las hembras no se observaron diferencias significativas. Los resultados del metabolismo no fueron totalmente oxidativos como se encontró en los

adultos. De las 15 larva macho diez de ellos presentaron fibras con un metabolismo predominantemente oxidativo y cinco tiene fibras con metabolismo glucolítico. El análisis del tipo de fibra dio como resultado cinco machos con fibras predominantemente lentas, tres machos con fibras intermedias y siete machos con fibras rápidas. En el caso de las hembras diez tenían fibras rápidas y una tenia fibras lentas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Ecología de Odonata.....	12
1.2. Larvas de Odonata.....	13
1.3. Desarrollo larval.....	15
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Músculo del tórax de la larva.....	18
2.2. Músculo esquelético	19
2.3. Músculo del vuelo en Odonata	20
2.4. Especie de estudio	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
4.1 Predicciones.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2. Objetivos específicos.....	28
6. METODOLOGÍA.....	29
6.1 Área de estudio.....	29
6.2 Fase de campo.....	29
6.2.1 Captura de larvas de <i>Hetaerina vulnerata</i>	29
6.3 Manipulación d los individuos en el laboratorio y disección del tórax.....	30
6.4 Fase de laboratorio.....	32
6.4.1 Caracterización histológica.....	32
6.4.1.1 Tinción Hematoxilina-Eosina.....	32
6.4.2 Caracterización histoquímica.....	33
6.4.2.1 Técnica ATPasa básica (pH 9.4)	33
6.4.2.2 Técnica NADH-TR.....	33

6.5 Pruebas piloto.....	34
6.5.1 Músculo del sintórax de larva de <i>Hetaerina vulnerata</i> en estadios intermedios del desarrollo larval.....	34
6.6 Colecta de datos.....	35
6.7 Análisis de datos.....	38
7. RESULTADOS.....	39
7.1 Características morfológicas de las larvas de <i>Hetaerina vulnerata</i>	39
7.2 Comparación entre machos.....	39
7.3 Características histológicas de los músculos del tórax.....	40
7.3.1 Área transversal de las fibras.....	42
7.4 Caracterización histoquímica	43
7.4.1 Determinación del metabolismo de las fibras: Histoquímica para NADH-TR.....	43
7.4.2 Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa miofibrillar de las fibras: Histoquímica para ATPasa básica (pH 9.4)	47
8. DISCUSIÓN.....	50
9. CONCLUSIONES.....	56
10. PERSPECTIVAS.....	57
11. REFERENCIAS.....	58

1. Introducción

1.1 Ecología de Odonata

Los odonatos son un antiguo orden de insectos con pocos cambios en los últimos 300 millones de años que incluyen alrededor de 6,000 especies descritas que se distribuyen en todo el mundo, excepto en regiones polares (Corbet 1999, Bomphery y cols. 2016). Este orden está conformado principalmente por dos grupos; Anisoptera, también conocidos como libélulas verdaderas, y Zygoptera, llamados caballitos del diablo (Corbet 1999, Bybee 2005). Los anisópteros son de apariencia robusta con alas desiguales (posteriores más grandes que las anteriores) y en reposo las disponen perpendiculares al cuerpo mientras que los zigópteros presentan cuerpos más delicados con las alas anteriores y posteriores muy similares entre sí las cuales mantienen juntas, paralelas al cuerpo en reposo. Sin embargo, ambos grupos son conocidos comúnmente como “libélulas” (Samways 2008).

Los odonatos juegan un papel sumamente importante en los distintos hábitats acuáticos y terrestres, sus larvas por ejemplo se alimentan de una gran variedad de invertebrados entre ellos mosquitos y larvas de pequeñas moscas, mientras que los adultos limitan la población de otros insectos que pueden ser dañinos para el ecosistema. También son bioindicadores que nos informan sobre la salud y diversidad de los hábitats acuáticos que habitan (Mazzacano y cols. 2014). Los odonatos además dependen de cuerpos de agua para su reproducción debido a que en su mayoría las larvas de éstos son acuáticas, razón por la cual los adultos suelen observarse en estas masas de agua listas para la reproducción (Samways 2008). Este orden se compone de insectos hemimetábolos (también conocida como metamorfosis incompleta) donde la larva muda en promedio 10 veces, dependiendo de la especie (Corbet 1999), y en la última muda la larva sale del agua para que ocurra la metamorfosis a un estado adulto terrestre y capaz de volar. Los adultos jóvenes, conocidos como tenerales, que emergen se alejan de los cuerpos de agua para forrajear e incrementar su masa corporal, desarrollar caracteres sexuales y madurar los huevos en el caso de las hembras (Stoks y Córdoba-Aguilar 2012).

Una vez que los adultos alcanzan la madurez sexual los machos pasan la mayor parte del tiempo en los sitios de reproducción esperando a las hembras. Las hembras por otro lado visitan

estos sitios de reproducción solamente por periodos cortos para aparearse y ovipositar. Debido a esta diferencia en el comportamiento en los sitios de reproducción se suele observar un pronunciado sesgo hacia machos (Suhonen y cols. 2008).

1.2 Larvas de Odonata

Las larvas de Odonata muestran una gran diversidad en cuanto a forma y comportamiento. Esta diversidad ha permitido a diferentes especies adaptarse y ocupar un amplio rango de hábitats inclusive dentro de un mismo cuerpo de agua. Sin embargo, las larvas de libélula pueden ser reconocidas fácilmente gracias a ciertas características morfológicas como lo son el labium prensil y extensible que se pliega debajo de la cabeza mientras la larva esta en reposo (Figura 1). Las larvas de algunas familias como el caso de Coenagrionidae presentan una gran dificultad para diferenciar entre especies inclusive en el estadio final. Larvas de machos y hembras en el mismo estadio pueden diferir en el tamaño (Cobet 1999).

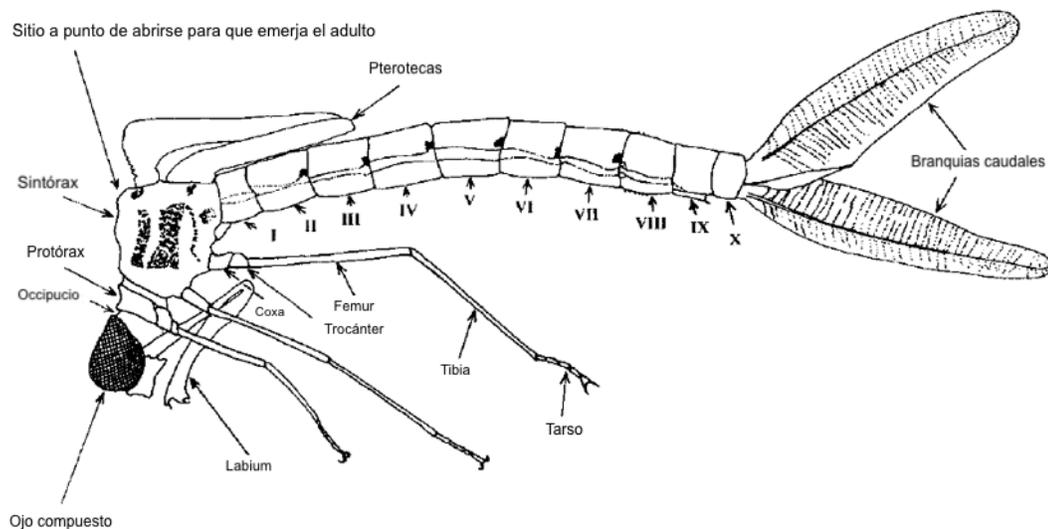


Figura 1. Principales estructuras anatómicas de la larva del zigóptero *Lestes pictus* en su último estadio. Tomado de Heckman 2008.

Así como es fácil diferenciar a los adultos de los dos subórdenes de Odonata también es sencillo distinguir entre larvas de Anisoptera o Zygoptera. La forma general de la larva de

Zygoptera tiende a ser delgada y alargada a diferencia de las larvas de Anisoptera que suelen tener mayores variaciones corporales, principalmente del abdomen que es un buen rasgo para reconocer distintos taxa (Heckman 2008). Las larvas de anisópteros son robustos con un abdomen ancho y terminan con tres espinas que rodean la cámara branquial rectal interna (Figura 2a). Las larvas de zigópteros, en cambio, poseen cuerpos delgados y alargados que terminan en tres branquias caudales (Figura 2b) (Ramírez 2010, Mazzcano y cols. 2014). La exposición de las láminas branquiales en los zigópteros los hace más susceptibles a cambios en la calidad del agua. Son especialmente sensibles a la concentración del oxígeno y a la cantidad de materia fina suspendida en el agua. Su superficie de respiración externa hace a las larvas de Zygoptera ideales para vivir en aguas lólicas, frías y bien oxigenadas. Las larvas de Anisoptera al tener cámaras respiratorias cerradas responden mejor a ambientes con sustancias dañinas que puedan bloquear el intercambio de gases durante la respiración (Heckman 2008).



Figura 2. Larva de Anisoptera (a) y larva de Zygoptera (b).
Tomado de Mazzacano y cols. 2014.

Existe una gran variedad de formas en las larvas lo cual corresponde con la capacidad que tienen de habitar sitios específicos. Muchas larvas están bien adaptadas para arrastrarse a lo largo del fondo de estanques o lagos poco profundos mientras que otras están equipadas con espinas u otros accesorios que les permiten ocultarse entre plantas sumergidas en el agua. De esta manera es posible inferir el tipo de nicho que habita una larva al observar las estructuras del cuerpo y de las patas (Heckman 2006).

Una vez que el alimento del huevo se termina la larva de vida libre busca alimentarse de otros animales. Todas las larvas de Odonata son depredadoras, como lo sugiere la presencia del labium prensil extensible utilizado para capturar a su presa (Corbet 1999). En estadios tempranos, suelen alimentarse de microorganismos como los protozoarios. En posteriores estadios, su presa comúnmente son invertebrados acuáticos y juveniles de peces. A su vez las larvas suelen ser depredados por peces de mayor tamaño. Para escapar de sus depredadores los zigópteros ondulan el abdomen lateralmente y utilizan las branquias caudales como remos. Los anisópteros expulsan chorros de agua por el recto, acción que los impulsa hacia adelante y les permite alejarse rápidamente (Ramírez 2010). Las larvas capturan a sus presas vivas y para esto pueden utilizar el modo de emboscada que consiste en mantenerse inmóviles esperando que la presa se acerque, el modo de caza en donde caminan o nadan buscando alimento. La larva utiliza distintos mecanismos para la detección de la presa. Entre estos mecanismos se encuentran receptores visuales, mecanorreceptores y quimiorreceptores (Corbet 1999).

La vida de la larva puede durar meses o años dependiendo de la especie (Anholt 2008), mientras que la vida del adulto se mide en semanas y en pocos casos en meses. La esperanza de vida adulta para Anisoptera es de 11.5 días con una longevidad máxima de 64 días. En Zygoptera el promedio es de 7.6 días con longevidad máxima de 77 días (Córdero-Rivera y Stoks 2008).

1.3 Desarrollo larval

Cuando la larva se acerca a la metamorfosis se observa un cambio en su color y comportamiento (Tillyard 1917). En preparación para la formación del exoesqueleto del imago se observa una rápida proliferación de las células hipodermales lo cual provoca que la larva adquiera una apariencia rígida e hinchada. Una vez que el labium comienza a retraerse la larva deja de

alimentarse, las branquias dentro del recto se degeneran perdiendo su capacidad respiratoria y ocurre una apertura de los espirales torácicos (Whedon 1929). Esto hace que la larva a punto de emerger salga a la superficie a respirar (Mazzacano y cols. 2014) comúnmente trepando algún tronco, roca u otro objeto cercano que le permita sobresalir del agua (Tillyard 1917, Corbet 1999).

La transición de la larva acuática al adulto aéreo no implica cambios morfológicos ni funcionales muy profundos en todos los sistemas. Los teneales recién emergidos conservan todas o en parte las estructuras de la larva (Whedon 1929). Algunos sistemas como la cadena nerviosa, el corazón, los túbulos de Malpighi y las gónadas no presentan cambios muy notorios durante la transición, pues su desarrollo es progresivo desde el embrión hasta el adulto. Sin embargo, se esperan cambios histológicos en los ganglios nerviosos, la atrofia de ramas nerviosas y la formación de nuevas ramas que se ajustan a la reorganización del canal alimentario y del sistema muscular. Los cambios más significativos ocurren en el integumento, la musculatura de la cabeza y el abdomen el canal alimentario, la grasa corporal y el sistema traqueal (Snodgrass 1954).

La estructura del tórax larval parece ser una adaptación funcional para beneficio del adulto que no sufre muchos cambios durante la metamorfosis. La principal modificación al pasar de larva a imago es una inclinación más pronunciada de los segmentos que sostienen las alas. La posición que alcanzan las alas con esta inclinación permite un mejor equilibrio entre el peso de la cabeza y tórax contra el peso del abdomen. Cabe mencionar que las larvas usan activamente las patas para la locomoción mientras que el adulto las utiliza para atrapar a las presas durante el vuelo (Snodgrass 1954).

En el tórax deben formarse nuevos músculos que equiparán las alas, el desarrollo de estos nuevos músculos es lento y ocurre gradualmente de estadio en estadio durante el crecimiento de la larva (Büsse y Hörnschemeyer 2013). Los pesados músculos del abdomen relacionados con la respiración y la locomoción se reducen notoriamente. Sin embargo, la degeneración de estos músculos en el abdomen no ocurre durante el último estadio de la larva previo a la transformación, sino, durante las primeras horas posteriores a la emergencia (Whedon 1929). Estudios morfológicos realizados en *Anax junius* con comparaciones en *Libellula* y *Sympetrum* demuestran que los músculos del abdomen en larvas en el último estadio

presentan poca o ninguna degeneración de estos músculos, el suministro traqueal es completo y las ramificaciones nerviosas aún se conectan con todos los músculos (Snodgrass 1954). En el adulto las capas internas más pesadas de los músculos abdominales que poseían las larvas se degeneran una vez que ocurre la transformación, solo se conservan funcionales las capas externas más ligeras. Después de emerger estos músculos mantienen su apariencia normal y al poco tiempo se tornan amarillentos y granulares para desaparecer paulatinamente. Este proceso avanza gradualmente desde el primer segmento del abdomen hasta el último segmento y el tiempo que toma dependerá de la especie (Whedon 1929).

Un factor importante a tomar en cuenta en el desarrollo larval es la disponibilidad del alimento. En los odonatos el crecimiento está restringido al estado larval por lo cual deben maximizar su ingesta de alimento durante esta etapa para maximizar su adecuación como adultos (Plaistow y Siva-Jothy 1999). Estudios en *Hetaerina americana* donde se trabajó con un grupo de larvas con una dieta rica (cada individuo fue alimentado con 5 presas de *Artemia salina*) y un grupo con una dieta pobre (dos presas de *A. salina*) muestran que las larvas que se alimentaron con una dieta abundante alcanzan como adultos tamaños corporales superiores y una mayor actividad de la fenoloxidasa (indicador de la respuesta inmune en insectos) (Jiménez-Cortés y cols. 2012). Además, el desarrollo larval se retrasa cuando el alimento es escaso (Corbet 1999). Un experimento similar se realizó con *Calopteryx splendens xanthostoma*, zigóptero territorial cuyo éxito reproductivo en machos depende de las reservas de grasa y tamaño corporal, dónde Plaistow y Siva-Jothy (1999) encontraron que las larvas criadas con una dieta rica emergieron como teneales más grandes, con mayor masa muscular del vuelo y mayor contenido de grasa comparados con teneales criados como larvas en una dieta pobre.

2. Antecedentes

2.1 Músculos del tórax de la larva

En estudios morfológicos de la musculatura del tórax de larvas de anisópteros se identificaron 71 músculos, de los cuales 19 músculos se encuentran en el protórax, 26 en el mesotórax y 27 en el metatórax. En el protórax no se encuentran músculos que se acoplen a la envoltura alar, pero hay músculos dorso-ventrales muy fuertes en las larvas cuya función esta posiblemente relacionada con el movimiento de las patas. En Odonata el mesotórax y metatórax se unen en una sola unidad funcional conocida como sintórax (Büsse y Hörnschemeyer 2013). El sintórax, también llamado pterotórax, generalmente es más alargado en los zigópteros mientras que en los anisópteros suele ser más compacto (Heckman 2008). Es en esta área dónde se desarrollan las alas durante la ontogénesis (Büsse y Hörnschemeyer 2013).

El desarrollo ontogénico de la morfología torácica en Odonata no ha sido estudiado profundamente. Existen reportes de la aparición de la envoltura alar en el tercer o cuarto estadio con una musculatura del vuelo muy reducida. En sus estudios morfológicos Maloeuf (1935) menciona que las larvas de odonatos tienen músculos cervicales y de las patas más largos y en mayor número que los adultos. El pterotórax de zigópteros adultos ha sido estudiado a detalle, sin embargo, la musculatura del sintórax en larvas hasta el momento ha recibido poco interés (Büsse y Hörnschemeyer 2013).

Los músculos torácicos en las larvas de Anisoptera no aumentan ni disminuyen en número desde el primer estadio hasta la transformación final en adultos. Estos músculos únicamente incrementan el número de fibras a medida que la larva crece. Se pueden identificar dos tipos de músculos en el tórax de las larvas; el músculo estriado funcional con diámetro amplio y el músculo no estriado ni funcional con un diámetro angosto que crece más en diámetro durante la última transformación y que eventualmente constituye el músculo del vuelo en los adultos. Ambos músculos conservan sus puntos de unión durante todo el desarrollo, sin embargo, las estructuras del esqueleto donde se insertan sí sufren cambios significativos (Maloeuf 1935, Büsse y Hörnschemeyer 2013).

La morfología de los músculos funcionales y no funcionales (futuros músculos del vuelo y algunos músculos del cuello) en las larvas de anisópteros es similar. Ambos músculos son de un blanco amarillento muy claro siendo los no funcionales más densos. Cuando el labium comienza a retraerse días antes de la ecdisis final, los músculos adosados a las alas se vuelven los músculos más conspicuos del tórax. Una fibra del músculo del vuelo durante este estadio presenta un diámetro aproximado de 16μ mientras que una fibra del mismo músculo en el adulto tiene un diámetro de 350μ . Los músculos del vuelo en los adultos presentan una clara inclinación, a diferencia de los músculos adosados a las alas en la larva que se ubican en posición casi vertical (Maloeuf 1935).

2.2 Músculo esquelético

El mecanismo general del músculo en los insectos y las proteínas que lo componen son similares al mecanismo y las proteínas bien estudiados en los vertebrados (Bullard y Pastore 2011). El músculo del vuelo de los insectos sincrónicos como es el caso de las libélulas es anatómicamente análogo al músculo esquelético de los vertebrados, mientras que el músculo del vuelo de los insectos asincrónicos, como son las moscas y las abejas, tienen mayor similitud al músculo cardíaco de los vertebrados (Heinrich 2006). La principal función del tejido muscular esquelético es la locomoción. Al igual que el músculo cardíaco sus miofibrillas tienen estriaciones transversales. Las unidades estructurales de este tejido, llamadas fibras musculares, son células multinucleadas, estriadas y largas. Una fibra muscular se forma durante el desarrollo por la fusión de células musculares individuales pequeñas llamadas mioblastos. Si se realiza un corte transversal la fibra muscular madura presenta una forma poligonal que permite el acomodo de un número mayor de fibras dentro de un fascículo (Larios-Escalante 1998) (Figura 4). El músculo esquelético tiene una abundante irrigación sanguínea y cada una de sus fibras suelen estar cerca de varios capilares (Kierszenbaum y Tres 2012).

En general, una fibra muscular está formada por subunidades de disposición longitudinal llamadas miofibrillas (Figura 4). Las miofibrillas a su vez están compuestas por haces de miofilamentos, que son los elementos contráctiles del músculo y están constituidos por polímeros filamentosos individuales de miosina II (filamento grueso), de actina y de sus

proteínas asociadas (filamentos finos). Los haces de miofilamentos están rodeados por un retículo endoplasmático liso llamado retículo sarcoplasmático que forma una malla tubular alrededor de los elementos contráctiles. Entre las miofibrillas y en asociación con el retículo sarcoplasmático hay mitocondrias y depósitos de glucógeno (Ross y cols. 2008).

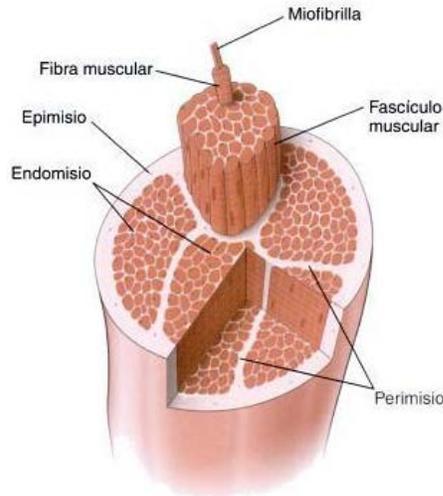


Figura 4. Organización general del músculo esquelético.
Tomada de Ross y cols. 2008.

Una de las características más importantes del músculo esquelético es su plasticidad, propiedad que le permite modificar sus características morfológicas y sus propiedades funcionales. Estas capacidades permiten que el músculo esquelético pueda ser entrenado y se adapte para desarrollar las actividades específicas que el individuo requiera. Dependiendo del ambiente en el cual se encuentre el individuo, el músculo puede realizar actividades que requieran sostener la tensión durante tiempos prolongados o contraerse rápidamente por tiempos cortos (Segura-Alegría y cols. 2013).

2.3 Músculo del vuelo en Odonata

Un animal con la capacidad de realizar un vuelo activo requiere de tres características esenciales: un motor ligero, alas capaces de generar suficiente fuerza aerodinámica y un sistema de control (Dickinson 2006). Las alas de los insectos, en comparación con otros animales voladores,

poseen áreas pequeñas. Esto hace que el tipo de vuelo sea distinto, ya que las propiedades del aire bajo estas condiciones exigen un mecanismo aerodinámico peculiar. Para poder emprender el vuelo y superar la fuerza de gravedad, los insectos deben mover sus alas en ángulos muy largos a través del aire para generar un vórtice de alta presión debajo de ellos que les permita elevarse. Los valores de Reynolds (Re) correspondientes a este tipo de alas caen en el rango intermedio ($10 < \text{Re} < 10,000$) donde las fuerzas de viscosidad del aire dominan. Debido a que los insectos tienen alas planas y carecen de forma aerodinámica, a medida que el área del ala disminuye la frecuencia de aleteo debe aumentar (Dickinson 2006). Números de Reynolds bajos sumado a la ineficiencia de la conversión de energía, sólo un 10% de la energía química usada para el vuelo se transforma en energía mecánica, hacen que el vuelo requiera enormes cantidades de energía (Klowden 2007).

Los insectos voladores requieren músculos del vuelo que constituyen mínimo entre el 12 al 16% de la masa total y al aumentar este porcentaje también aumenta el rendimiento del vuelo (Marden 2000). Además, estos músculos consumen en promedio desde 3 hasta 30 veces más oxígeno que los músculos encargados de la locomoción en insectos terrestres a la misma temperatura corporal (Harrison y Roberts 2000). La importancia de este alto consumo de oxígeno es notable en libélulas como *Erythemis simplicicollis* en la cual condiciones ambientales de hipoxia moderada disminuyen la eficiencia del vuelo y ambientes de hiperoxia incrementan la tasa metabólica y mejoran la eficiencia del vuelo (Harrison y Lighton 1998). En el orden Odonata los músculos del vuelo conservan un arreglo radial de las miofibrillas laminares hacia el centro dónde se encuentra un único núcleo. Los músculos del vuelo de los odonatos presentan una relación sincrónica entre la estimulación del nervio motor y la contracción muscular (Smith 1966). Los odonatos poseen una característica única entre los insectos alados, los músculos del vuelo se encuentran unidos directamente a las alas y no al tórax, lo cual permite operar cada ala independientemente y por lo tanto un mejor control del vuelo (Heinrich 2006). Estos músculos se encuentran ubicados en el tórax y se dividen en los músculos elevadores que impulsan el ala hacia arriba y los músculos depresores que la impulsan hacia abajo. Los músculos depresores se encuentran de manera anterior y lateral de los músculos elevadores (Figura 5) (Hatch 1966).

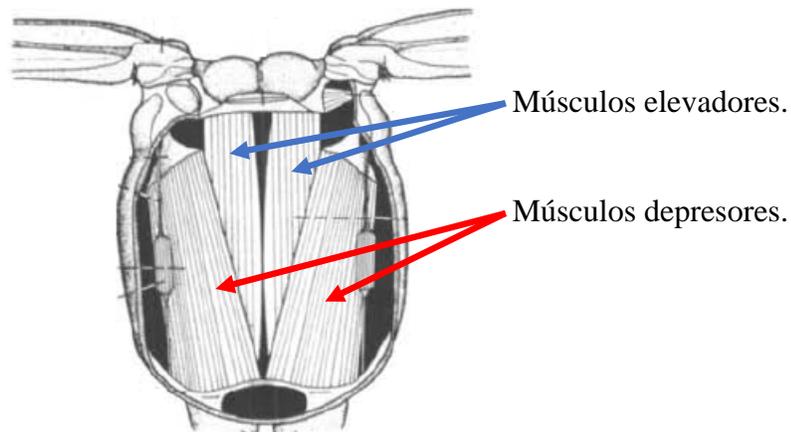


Figura 5. Vista anterior de un corte transversal del tórax. Tomado de Hatch 1966.

En los odonatos la territorialidad y el éxito reproductivo se ven afectados por el desempeño contráctil de los músculos del vuelo (Marden y Cobb 2004). Al igual que en los demás insectos, la contracción de los músculos del vuelo es dependiente de la temperatura (Heinrich 2006). Dentro de estos músculos se almacenan las reservas de grasa y determinan cuanto tiempo podrá volar el macho territorial durante la contienda (Álvarez y cols. 2013). Las especies de este orden en la edad adulta dependen completamente de su habilidad de vuelo para realizar todas sus actividades; capturar sus presas, mantener un territorio, copular y defender a las hembras durante la oviposición (Marden 2008).

Uno de los factores que más influyen sobre el desempeño aéreo es la relación entre el músculo de vuelo y la masa corporal total. El porcentaje ideal en insectos que dependen de este carácter va de los 55 a 65% de la masa corporal con un mínimo del 12-16% en insectos que utilizan poco esta habilidad. Los machos territoriales presentan una proporción mayor que los machos no territoriales que se encuentran volando constantemente en busca de hembras. Pequeños pesos extras agregados al cuerpo de machos territoriales disminuyeron su territorialidad y con ello su éxito reproductivo (Marden 2000).

Entre zigópteros y anisópteros también encontramos diferencias en la mecánica del vuelo. Cada uno se ha adaptado a condiciones distintas desarrollando una forma de alas, una estructura torácica y una cinemática del aleteo diferentes. Los anisópteros vuelan más rápido y con mayor aceleración en espacios más amplios mientras que los zigópteros vuelan a menores

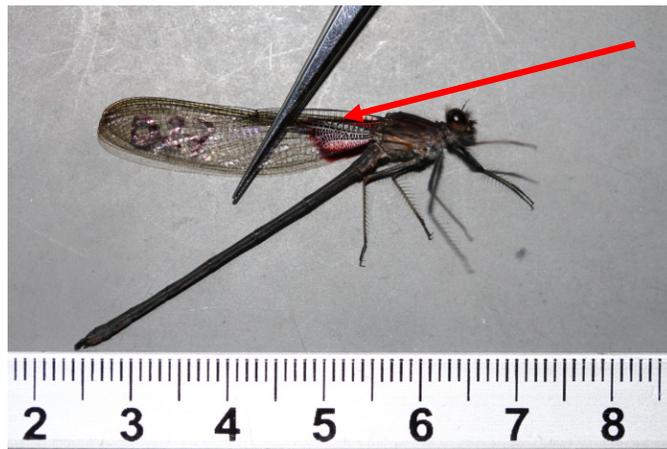
velocidades a través de la vegetación (Wakeling y Ellington 1997 a). Además, el suborden Zygoptera presenta un mecanismo no existente en Anisoptera conocido como “clap and fling”. Durante este mecanismo las alas anteriores alcanzan la posición más dorsal juntando sus superficies para luego separarse repentinamente girando alrededor de sus bordes posteriores para comenzar el descenso. A medida que las alas se separan, un flujo de aire en el espacio abierto crea circulación alrededor de cada ala generando una elevación mejorada del aleteo (Wakeling y Ellington 1997 b).

2.4 Especie de estudio

La familia Calopterygidae posee 16 géneros con un aproximado de 161 especies. Poco se sabe sobre la duración del periodo larval. Las especies de esta familia ocupan zonas con climas de templados a tropicales por lo cual existen variaciones interespecíficas entre la duración del estado larval (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005). Los machos desarrollan alas con patrones de pigmentación específicos justo después de emerger. Estos patrones son distintos dependiendo de la especie (Serrano-Meneses y cols. 2008). La mayoría de los machos de esta familia pueden distinguirse por la ausencia del pterostigma y las hembras presentan manchas blancas llamadas pseudoestigmas en lugar del pterostigma (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005). Los caballitos del diablo machos del género *Hetaerina* (Hagen in Selys) presentan una mancha pigmentada de color rojo en la base de sus alas (Figura 3) considerada un carácter sexual que se mantiene mediante la competencia entre machos por territorios y no es el resultado de la elección femenina o de la competencia directa por hembras (Grether 1996). El tamaño final de esta mancha alar se alcanza aproximadamente 14 días después de emerger que es cuando el macho alcanza la madurez sexual y ya no cambia su tamaño (Álvarez y col. 2013).

A diferencia de otras especies de calopterígididos, en el género *Hetaerina* no existe ningún tipo de cortejo aparente por parte de los machos que simplemente toman a las hembras que llegan a los sitios reproductivos (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005). Los machos territoriales defienden territorios entre las 10 y 14 horas, periodo del día durante el cual las hembras se acercan para aparearse y ovipositar (Córdoba-Aguilar 2014).

En *H. americana* los machos territoriales presentan mayor pigmentación alar junto con respuestas inmunes más altas y mayor reserva de grasa que los machos no territoriales (Contreras-Garduño y cols. 2006). Los machos territoriales son más grandes que los machos no territoriales (Raihani y cols. 2008). Se ha reportado que los machos territoriales tienen una mancha alar más grande y con mayor pigmentación que los machos no territoriales, sin embargo, un estudio no encontró diferencias en la pigmentación alar entre tácticas (Suhonen y cols. 2008). En cuanto a la edad no existe diferencia entre los machos territoriales y no territoriales (Raihani y cols. 2008), sin embargo, son los machos de mediana edad los más territoriales con los valores más altos de grasa y quienes participan en más contiendas (Contreras-Garduño y cols. 2008). No se encontró diferencia en la cantidad de masa muscular de los músculos totales del tórax entre los machos territoriales y no territoriales, pero los machos que cambian entre tácticas poseen los valores más bajos de masa muscular (Serrano-Meneses y cols. 2007 y Raihani y cols. 2008).



Mancha alar.

Figura 3. Fotografía de *Hetaerina vulnerata*.

Ramírez-Delgado (2016) evaluó las características histológicas e histoquímicas de los músculos del vuelo en machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata*. No encontró diferencias entre los dos tipos de táctica, ambos presentaron fibras lentas e intermedias con un metabolismo oxidativo. Las diferencias que se encontraron en los machos territoriales es que poseen fibras musculares con áreas mayores en comparación con los machos no territoriales lo cual permitiría a los machos territoriales generar más fuerza durante la contracción muscular.

Se desconoce si esta diferencia es exclusiva de los adultos o tiene un origen ontogénico y está presente en las larvas.

3. Justificación

Entre las tácticas reproductivas alternativas empleadas por los machos adultos de *Hetaerina vulnerata* existen diferencias fenotípicas en las fibras que conforman los músculos asociados al vuelo. En breve, los machos territoriales se caracterizan por tener fibras musculares con áreas mayores en comparación con los machos no territoriales. Esto muy probablemente les permite generar una cantidad de fuerza mayor y por ende ser mejores en la defensa de territorios, que se traduce en un mayor éxito de apareamiento. Sin embargo, se desconoce si la diferenciación en las características de las fibras musculares entre las tácticas ocurre en la etapa adulta, o si estas diferencias son evidentes desde la última etapa larval. Debido a la falta de estudios sobre los músculos del tórax en larvas de zigópteros (Büsse y Hörnschemeyer 2013) y sabiendo que es la etapa larval el periodo más largo en el ciclo de vida de las libélulas (Corbet 1999), es necesario un análisis que describa la morfología de la musculatura torácica en la larva de estos organismos.

4. Hipótesis

- Existe una diferencia en las características histológicas e histoquímicas en los músculos del vuelo en las larvas de machos de *Hetaerina vulnerata*.
- Existe una diferencia en las características histoquímicas en los músculos del vuelo entre los machos y hembras de *H. vulnerata*.

4.1 Predicciones

- Existirán diferencias significativas entre las larvas analizadas de manera que podrán identificarse dos grupos; un grupo que podrían dar origen a adultos territoriales tendrán fibras musculares con áreas mayores en comparación con un segundo grupo de larvas, posibles adultos no territoriales.
- Se espera que las fibras musculares de las hembras sean similares a las de los machos no territoriales, ya que el principal requerimiento de las hembras es la maduración los órganos sexuales y para esto necesitan más tiempo de forrajeo para obtener más recursos y por consiguiente más resistencia a la fatiga.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar las características histológicas y el fenotipo de las fibras musculares del músculo de vuelo en larvas de machos y hembras de *Hetaerina vulnerata* en su último estadio larval.

5.2 Objetivos específicos

En larvas macho de *H. vulnerata* en su última etapa de desarrollo:

- Evaluar las características histológicas de los músculos de vuelo.
- Caracterizar y cuantificar la proporción de fibras glucolíticas y oxidativas.
- Caracterizar y cuantificar la proporción de fibras rápidas, intermedias y lentas.

Realizar los mismos análisis en las larvas hembra de *H. vulnerata* en su último estado larval con el objetivo de utilizar los datos como control.

6. Metodología

6.1 Área de estudio

La colecta de muestras se realizó en una sección de 300m de un arroyo ubicado en la localidad de San Tadeo Huiloapan, Tlaxcala, México (19°23'42" N, 98°15'36" O, aproximadamente a una elevación de 2450 m.s.n.m.) (Figura 6).



Figura 6. Arroyo de San Tadeo Huiloapan, Tlaxcala, México.

6.2 Fase de campo

6.2.1 Captura de larvas de *Hetaerina vulnerata*

La colecta directa de insectos acuáticos se realiza con el uso de redes acuáticas o redes de bentos compuestas por un mango rígido y una red plástica de malla fina. En la técnica se coloca la red en contra de la corriente y después se agita el sustrato debajo del agua provocando que los organismos que se encuentran ocultos sean arrastrados por la corriente hacia la red. Cuando se trabaja en cuerpos acuáticos sin corriente el proceso consiste en sacudir la red en el fondo y agitar la vegetación acuática (Márquez-Luna 2005). Existen numerosos métodos para la colecta de larvas ya sea de Zygoptera o Anisoptera. El tipo y forma de red deberán ser seleccionados en base a hábitat y características de la larva, así como el estadio del desarrollo que se desea coleccionar. La efectividad de los diferentes métodos de colecta es influenciada por la temporada del año, el tipo de sustrato (Corbet 1999).

Las larvas de zigópteros suelen habitar vegetación sumergida, donde se camuflan muy bien, o se ocultan debajo de grandes rocas. La colecta de larvas vivas puede realizarse barriendo hábitats acuáticos con un salabardo. Se debe tener cuidado al capturar y transferir a las larvas de zigópteros ya que estas son más delicadas que las larvas de anisópteros y pueden perder las láminas caudales al ser manipuladas. Nunca deben agarrarse con pinzas de metal porque suelen lastimarse y/o morir. Se recomienda transportar los especímenes en botellas con agua agregando un poco de musgo húmedo o algún otro tipo de vegetación que mantengan alta la humedad (Heckman 2008).

Se capturaron 26 larvas de *H. vulnerata* en el mes de marzo de 2017. La captura se realizó colocando una red para acuario (25cm x 15cm) contracorriente y después se movió el sustrato, así como rocas y hojarasca, para que los organismos que se encontraban debajo de éste fueran llevados por la corriente hacia la red. Se seleccionaron las larvas de la especie *H. vulnerata* de entre las larvas de otras especies y se regresaron al arroyo los demás organismos. De entre las larvas de *H. vulnerata* se realizó una nueva selección de los individuos en su último estadio en base a sus características morfológicas descritas en la literatura (Tillyard 1917, Snodgrass 1954, Corbet 1999) (coloración más oscura, apariencia hinchada y labium retraído). Las larvas se transportaron en botellas de vidrio de aproximadamente 400ml que contenían agua del mismo arroyo y un poco vegetación obtenida a orillas del río.

6.3 Manipulación de los individuos en el laboratorio y disección del tórax

Las larvas fueron observadas sobre una caja de petri bajo un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-140 N2GG) para determinar el sexo. La determinación del sexo de las larvas se realizó observando la parte ventral de los segmentos 8 a 10 del abdomen, aquí se ubican los órganos genitales, llamados gonapófisis (Pessacq y Muzón 2012) (Figura 7). En la hembra puede observarse claramente con la ayuda de una lupa o microscopio el ovipositor (Figura 7b). De los 26 organismos capturados 15 fueron machos y 11 hembras. Se tomaron fotografías dorsales y ventrales de las larvas sobre una hoja milimétrica para posteriormente tomar medidas morfológicas del largo total del individuo y de las dimensiones del tórax (Figura 8). Se disminuyó la temperatura de los individuos en una hielera con hielo seco, con el objetivo de

disminuir el metabolismo y facilitar la disección del tórax. Al mantener a los organismos vivos durante la disección se previene la muerte celular y la degradación de las proteínas que conforman el músculo esquelético. Posteriormente el tórax se secó con una toalla de papel para quitar el exceso de agua y evitar el daño al tejido por la formación de cristales de hielo. Después se congeló en isopentano (crioprotector) reduciendo la temperatura con hielo seco. El tórax congelado fue almacenado a -80°C en un ultracongelador hasta su procesamiento.

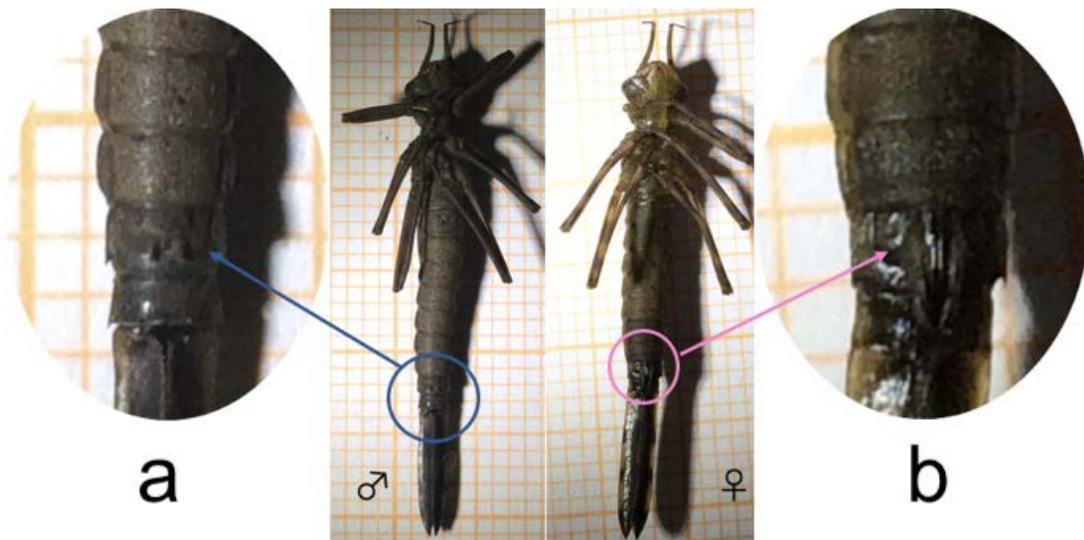


Figura 7. Larva en último estadio de *Hetaerina vulnerata*. (a) Últimos segmentos abdominales del macho. (b) Últimos segmentos abdominales de la hembra.

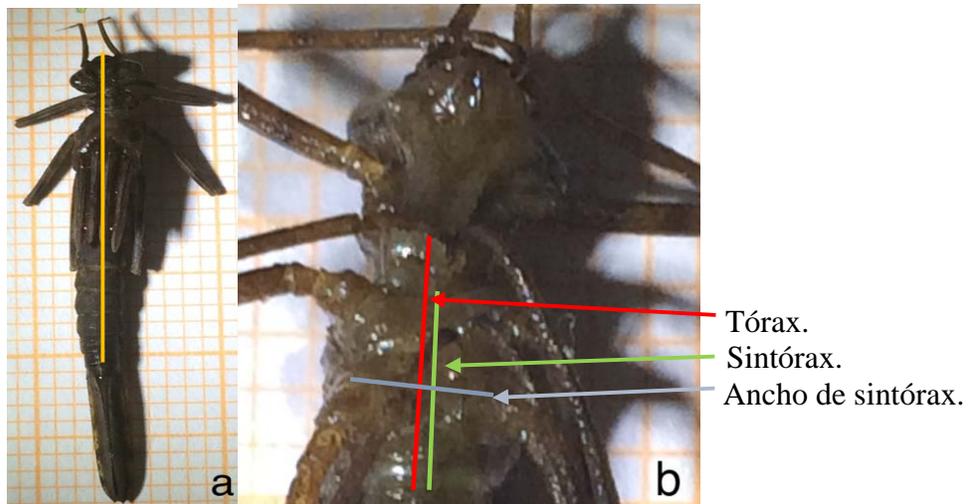


Figura 8. Mediciones tomadas de: (a) Vista dorsal de la larva, la línea muestra longitud del cuerpo sin incluir apéndices caudales y (b) Vista ventral del tórax y cabeza de la larva, las líneas muestran las mediciones de longitud del tórax, sintórax y ancho de sintórax.

6.4 Fase de laboratorio

Los cortes del tórax se realizaron de forma longitudinal con un grosor de 10 μ m, lo cual permitió un corte transversal de los músculos del vuelo que se ubican de manera dorso-ventral en el sintórax. Para los cortes se utilizó un criostato (Leica CM1850) a una temperatura de -25°C. Los cortes fueron montados en portaobjetos seriados (X^a, X^b, X^c; X= ID del músculo de cada individuo). La primera serie de cortes (X^a) fueron teñidos con las técnicas de Hematoxilina-Eosina para determinar las características histológicas de las fibras. Las dos series restantes (X^b y X^c) se tiñeron con las pruebas histoquímicas de ATPasa básica (pH 9.4) que permite identificar las fibras rápidas (coloración gris), intermedias (negras) y lentas (blancas) y la técnica de NADH-TR que permite diferenciar las fibras según su metabolismo en glucolíticas (incolores) y oxidativas (color azul intenso) respectivamente. Una vez realizadas las tinciones los cortes se dejaron secar y se cubrieron con un medio de montaje y un cubre objetos (López-García y cols. 2013).

6.4.1 Caracterización histológica

6.4.1.1 Tinción Hematoxilina-Eosina

Los portaobjetos con los cortes se colocaron en una cubeta para tinción de Coplin y se agregó la hematoxilina de Harris. Se dejó con este colorante durante 60min. Después se hicieron lavados con agua corriente, alcohol ácido al 1% (alcohol absoluto y ácido acético, 100:1), agua destilada, etanol amoniacal al 1% (alcohol absoluto y amoniaco, 100:1) y agua destilada. Posteriormente los cortes se colocaron en eosina durante 10 min. y se lavaron con agua destilada, etanol al 96%, etanol al 100%, etanol absoluto-xilol (1:1) y xileno. Finalmente, los tejidos teñidos se dejaron secar y se cubrieron con medio de montaje (resina-xilox, 1:1) y con un cubreobjetos.

6.4.2 Caracterización histoquímica

6.4.2.1 Técnica ATPasa básica (pH 9.4)

La tinción de la ATPasa se realizó con el procedimiento utilizado por Ramírez-Delgado (2016) quien estandarizó la técnica para realizarla en musculatura de Odonata. Se utilizó una cubeta para tinción Coplin donde se colocaron los portaobjetos con los cortes y se agregó la solución de pre-incubación [Base Tris 5.44mM y 18mM CaCl₂, pH 9.4] por 20 min a 22°C en baño maría. Se retiró la solución y se lavaron los cortes quince veces con agua destilada. Se incubaron por 60 min a 22°C con la solución de incubación de 0.17% (p/v) adenosina 5-trifosfato en una solución de preincubación. Se realizaron quince lavados con agua destilada y se colocaron durante 3 min en 2% (p/v) de CaCl₂ y después otros 3 min en una solución al 2% (p/v) de COCl₂. Los cortes fueron lavados con agua destilada quince veces y se colocaron en una solución al 10% (v/v) de (NH₄)₂SO₄ por un periodo de 3 min. Finalmente, los cortes fueron deshidratados con alcohol a concentraciones ascendentes al 70%, 80% y 90% durante 1.5 min en cada concentración. Finalmente, los tejidos teñidos se dejaron secar y se cubrieron con medio de montaje (resina-xilox, 1:1) y con un cubreobjetos.

6.4.2.2 Técnica NADH-TR

Se utilizó el procedimiento para tinción de NADH-TR utilizado por Ramírez-Delgado (2016). Los portaobjetos se colocaron en cubetas de Coplin y fueron incubados durante 6 min a 22°C en la solución NBT-NADH 1:1 (v/v) [2.4mM de nitroazul de tetrazolio en Buffer Tris 50mM, pH 7.6: 2.4mM de nicotidamina adenina dinucleótido en Buffer tris 50mM]. Se lavaron tres veces con agua desionizada. Se quitó el exceso de NBT con soluciones de acetona en concentraciones ascendentes al 30%, 60% y 90% y después descendentes (90%, 60% y 30%) durante 1 min en cada concentración. Finalmente, los tejidos teñidos se dejaron secar y se cubrieron con medio de montaje (resina-xilox, 1:1) y con un cubreobjetos.

6.5 Pruebas piloto

6.5.1 Músculo del sintórax de larva de *Hetaerina vulnerata* en estadios intermedios del desarrollo larval

Los adultos de *Hetaerina vulnerata* en la zona de estudio comienzan a emerger entre los meses de marzo y abril (observaciones personales, Ramírez-Delgado 2016), esto se debe a que las larvas se mantienen en estados intermedios durante los meses fríos (Corbet 1999). Por tal razón las primeras pruebas para estandarizar las técnicas en larvas de *H. vulnerata* se realizaron en larvas que se encontraban en estados intermedios de su desarrollo, capturadas durante los meses de octubre-diciembre de 2016. En estas larvas se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (Figura 9), la técnica ATPasa básica (pH 9.4) y NADH-TR (Figura 10). Los tres procedimientos funcionaron adecuadamente en la musculatura del tórax de estas larvas.

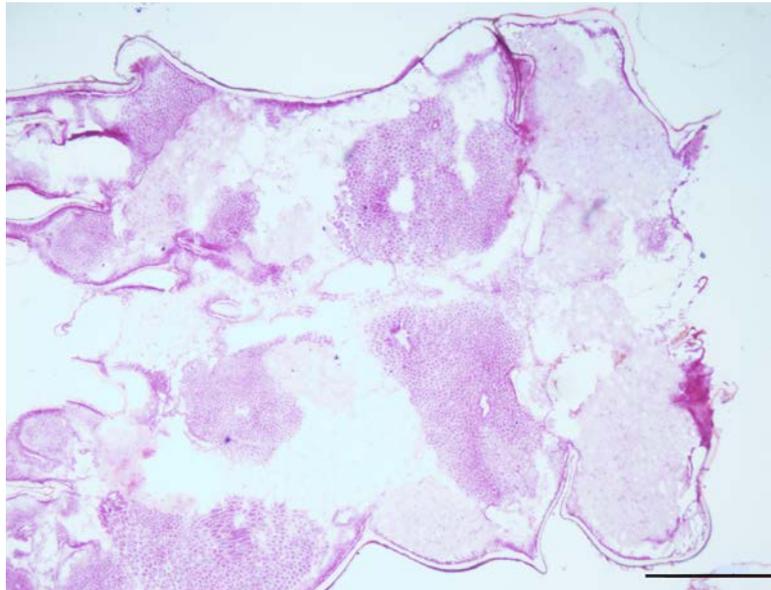


Figura 9. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina del tórax. Escala: 500 μ m.

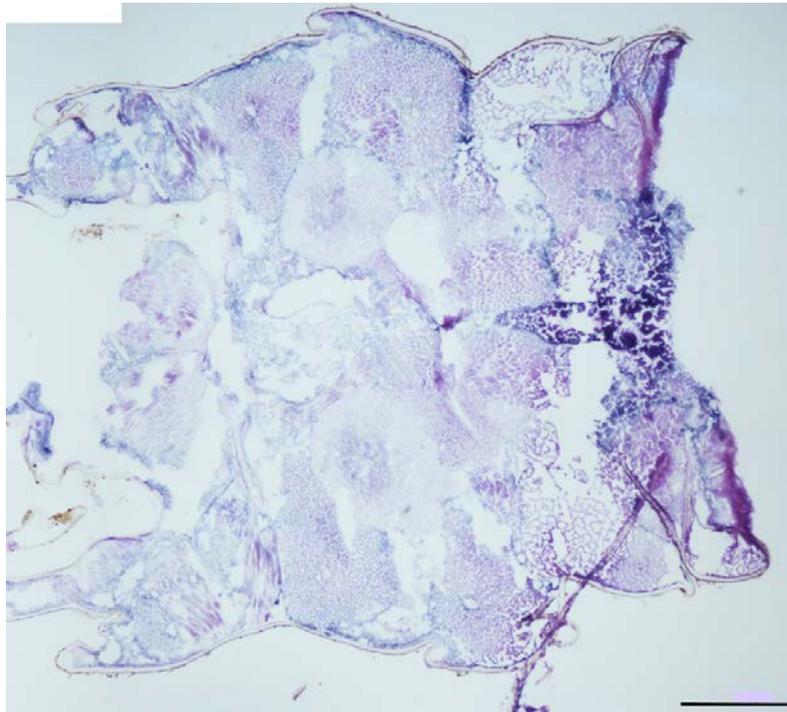


Figura 10. Caracterización del metabolismo con la histoquímica NADH-TR del tórax. Escala: 500 μ m.

6.6 Colecta de datos

Una vez obtenidos los cortes teñidos con las diferentes técnicas se tomaron microfotografías del tejido con una cámara (AxioCam erc 5s) acoplada a un microscopio compuesto (ZEISS Primo Star) a un aumento de 3.2x. Para la reconstrucción total de la musculatura del tórax se utilizó la aplicación automatizada de photomerge en Photoshop (versión 11.0 para Mac). En la imagen completa del sintórax se pudieron identificar los músculos que adosaban cada una de las cuatro alas (Figura 11).

La medición y cuantificación de las fibras musculares teñidas con la técnica de Hematoxilina-Eosina se realizó con microfotografías tomadas a 10x utilizando los mismos equipos. Para este análisis se tomaron ocho fotografías por cada individuo, cada fotografía correspondía a: dos músculos del ala anterior derecha, llamados anterior-anterior derecho (AAD) y anterior-posterior derecho (APD). Dos músculos del ala anterior izquierda, anterior-

anterior izquierdo (AAI) y anterior-posterior izquierdo (API). Dos músculos del ala posterior derecha, posterior-anterior derecho (PAD) y posterior-posterior derecho (PPD). Y dos músculos del ala izquierda, posterior-anterior izquierda (PAI) y posterior-posterior izquierda (PPI) (Figura 12). De cada músculo se seleccionaron 50 fibras musculares al azar utilizando una plantilla. Posteriormente se midió el área de cada fibra utilizando el programa ImageJ (versión 1.47v para Mac).

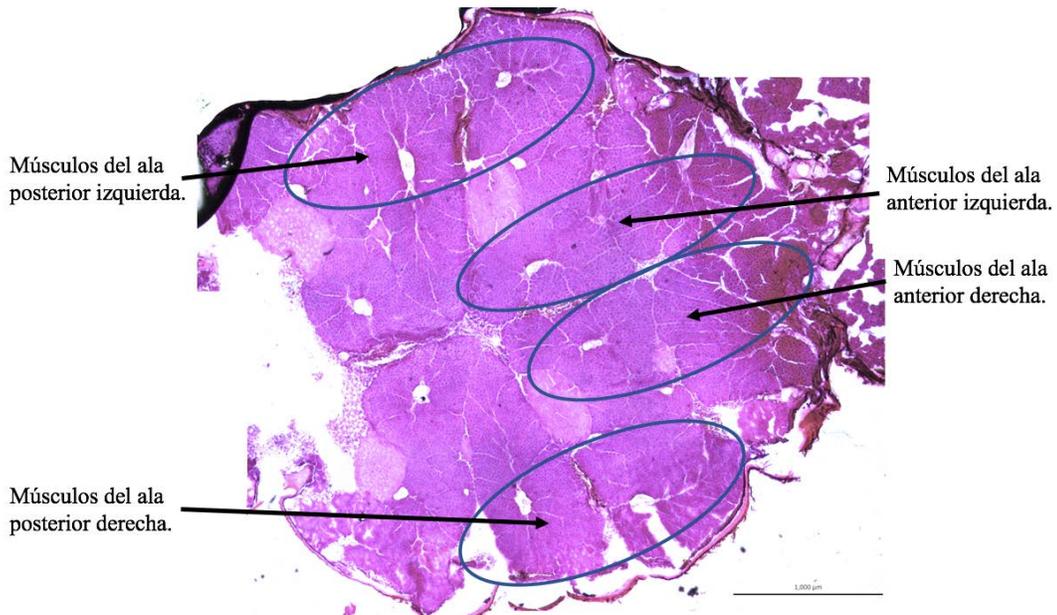


Figura 11. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. Reconstrucción de los músculos del sintórax. Corte transversal. Escala: 1,000μm.

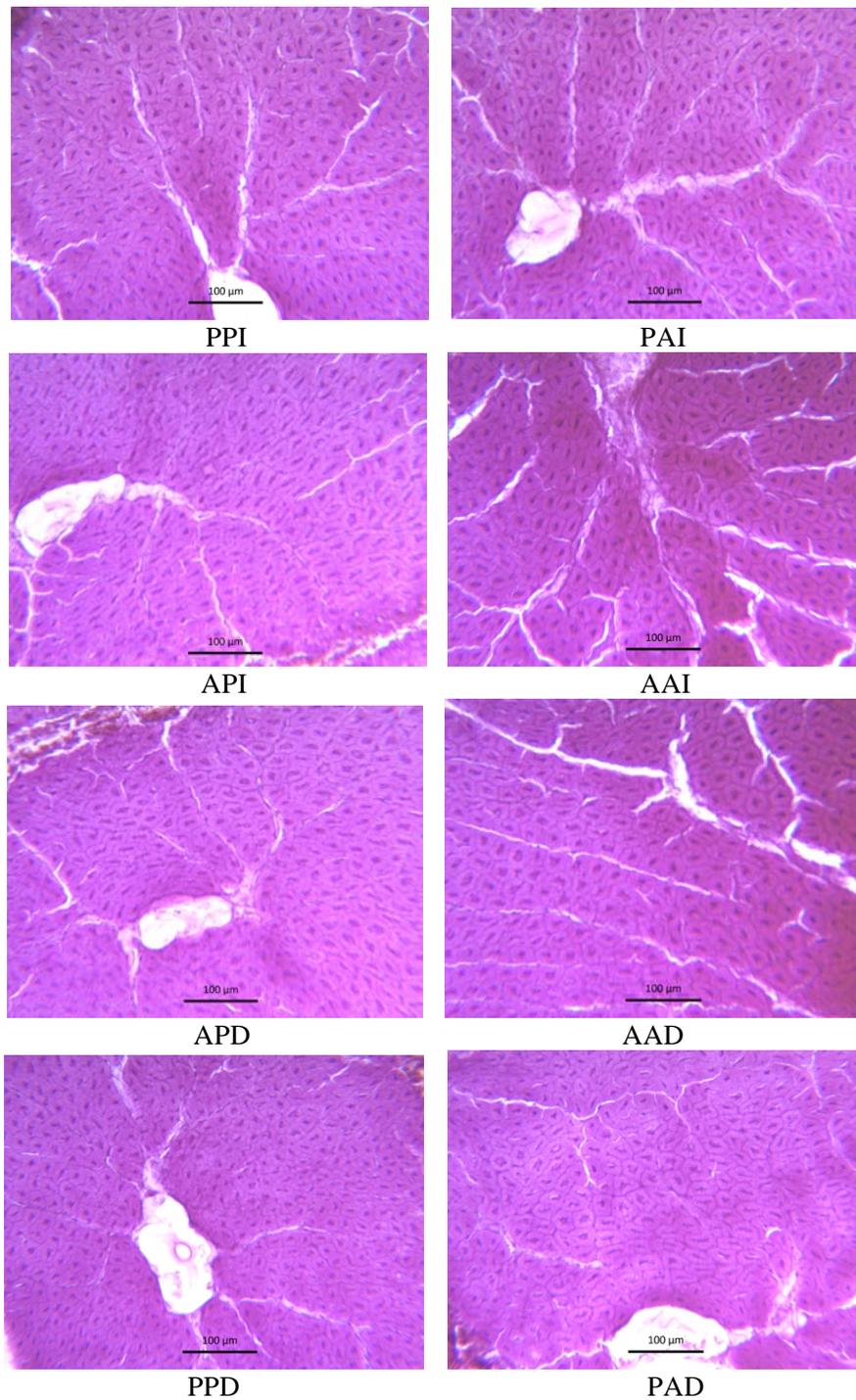


Figura 12. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. Corte transversal de ocho músculos adosados a las alas que corresponden al posterior-posterior izquierdo (PPI), posterior-anterior izquierdo (PAI), anterior-posterior izquierdo (API), anterior-anterior izquierdo (AAI), anterior-posterior derecho (APD), anterior-anterior derecho (AAD), posterior posterior derecho (PPD) y posterior-anterior derecho (PAD). Escala: 100µm.

6.7 Análisis de datos

Se calculó el Coeficiente de Correlación Intraclase (ICC) buscando minimizar los errores de medición del área de las fibras musculares. Se midió por triplicado el área de 20 fibras y se realizó un análisis de repetibilidad (Wolak y cols. 2012) utilizando la función ICC en el paquete estadístico R (versión 3.4.2 para Macintosh).

La comparación de las medidas morfológicas (largo total del individuo, el largo y ancho del sintórax) entre las larvas de machos y hembras se realizó con pruebas de t de Student no pareadas.

Para saber si se podían formar grupos dentro de los machos, se calculó la mediana general del área transversal para los músculos de los 15 machos. Luego se calculó la mediana para cada macho y utilizando la prueba de rangos de Wilcoxon en el paquete estadístico R (versión 3.4.2 para Macintosh) se comparó la mediana de cada macho con la mediana general. Al saber que las medianas eran diferentes se formaron dos grupos: a) los machos con medianas superiores a la mediana general y b) machos con medianas inferiores a la mediana general. Se realizó una prueba de t de Student no pareada entre los dos grupos formados comparando el largo total para determinar que los machos con las medianas más grandes no se debieran a que se tratara de individuos de mayor tamaño.

En el análisis del área de las fibras musculares se utilizó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM). Este análisis fue utilizado debido a que cada individuo contribuye con más de una medida. Así, se utiliza un factor aleatorio para considerar la contribución de cada individuo. Los datos de los músculos anteriores (AAD, APD, AAI y API) y los músculos posteriores (PAD, PPD, PAI y PPI) fueron agrupados para facilitar la interpretación de los resultados. En el análisis, la identidad del individuo fue usada como un factor aleatorio, y el sexo del individuo y la posición de los músculos (anteriores y posteriores) fueron usados como factores fijos y el área de las fibras musculares fue la variable de respuesta.

7. Resultados

7.1 Características morfológicas de las larvas de *Hetaerina vulnerata*

Los análisis muestran que las características morfológicas de las larvas de *H. vulnerata* independientemente del sexo son similares. No se hallaron diferencias significativas en el largo total de la larva (Largo corporal, $t = 1.222$, g.l. = 21.692, $P = 0.235$), tampoco en el largo de sintórax (Largo sintórax, $t = 0.133$, g.l. = 22.754 $P = 0.859$) ni en el ancho del sintórax (Ancho sintórax, $t = 1.315$, g.l. = 23.948, $P = 0.201$).

7.2 Comparación entre machos

La comparación de las medianas permitió formar dos grupos (Figura 13). La prueba de rangos de Wilcoxon mostró que todas las medianas individuales diferían de la mediana general. En el primer grupo están los machos con medianas que superan la mediana general (larvas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 11). En el segundo grupo están los machos con medianas inferiores a la general (larvas 4, 9, 10, 12, 13 y 14).

Se utilizó el largo total de los machos para verificar que las diferencias en las medianas (tener áreas transversales más grandes o más chicas) no se debiera a diferencias en el tamaño de los machos. No se hallaron diferencias significativas en el largo total entre los dos grupos (Largo corporal, $t = 0.716$, g.l. = 12.999, $P = 0.486$). Lo cual demuestra que los machos del primer grupo no son más grandes que los machos del grupo dos.

Larva	Mediana	valor de V	valor de p	Mediana general = 427.525 Diferencia respecto a la mediana
1	742.831	80200	<0.001	>
2	756.893	80200	<0.001	>
3	657.823	80028	<0.001	>
4	344.2	7898	<0.001	<
5	497.7	62053	<0.001	>
6	505.3	68752	<0.001	>
7	508.3	68696	<0.001	>
8	452	51666	<0.001	>
9	373.8	23860	<0.001	<
10	311.42	18401	<0.001	<
11	532.2	69776	<0.001	>
12	303.7	6553	<0.001	<
13	302.06	9456	<0.001	<
14	100.41	0	<0.001	<
15	200.02	13	<0.001	<

Figura 13. Tabla donde se calcula la mediana de las áreas transversales de la musculatura total de cada larva y se compara contra la mediana general del área transversal de la musculatura de los 15 machos.

7.3 Características histológicas de los músculos del tórax

Las fibras musculares que adosan las alas en la larva de *Hetaerina vulnerata* durante su último estadio presentan una morfología similar a la descrita por Ramírez-Delgado (2016) en los adultos maduros. Las fibras se organizan en fascículos con un número distinto de fibras. Machos y hembras presentan las mismas características morfológicas al ser caracterizados con la tinción de Hematoxilina-Eosina tanto en músculos anteriores como en posteriores (Figura 14).

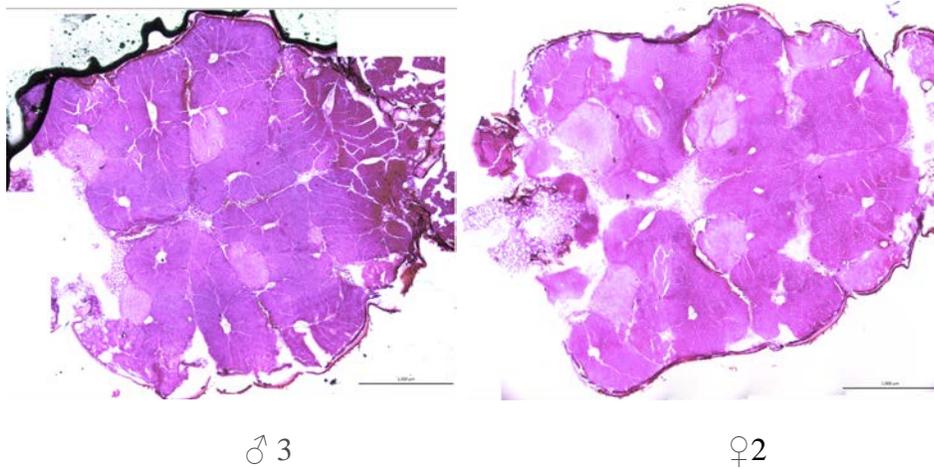


Figura 14. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. Reconstrucción de los músculos del sintórax del macho número tres y la hembra número dos. Corte transversal. Escala: 1,000 μ m.

Las fibras musculares que conforman los fascículos adosados a las alas presentan núcleos centrales con una disposición radial de los filamentos contráctiles gruesos (miosina) y finos (actina y sus proteínas asociadas). Los sarcosomas muy desarrollados se encuentran entre los filamentos de actina y miosina (Figura 15).

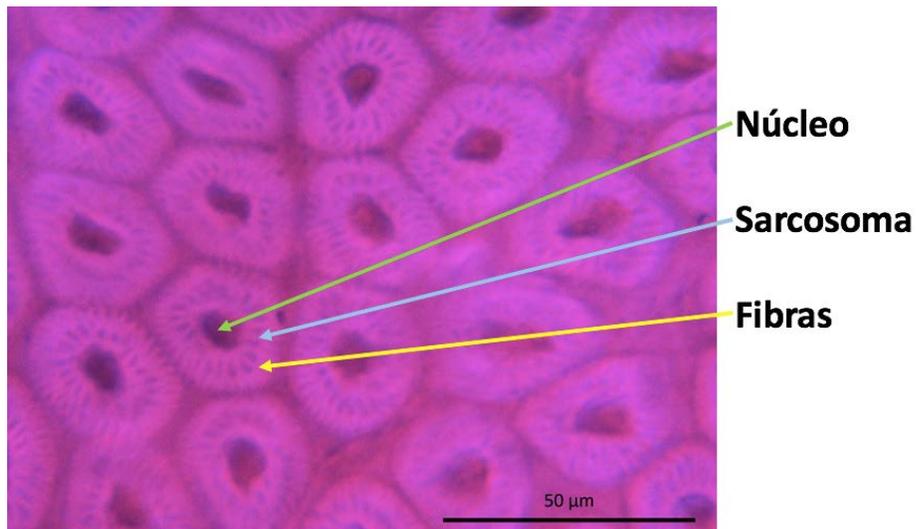


Figura 15. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. Fibras del músculo que adosa las alas. Escala: 50 μ m.

A diferencia de músculo que adosa las alas (Figura 15), el músculo de las patas tiene una morfología que asemeja al músculo esquelético de mamíferos dónde se observan fibras alargadas y poligonales con los núcleos en la periferia (Figura 16). Aquí no vemos la disposición radial típica del musculo alar en *H. vulnerata*.

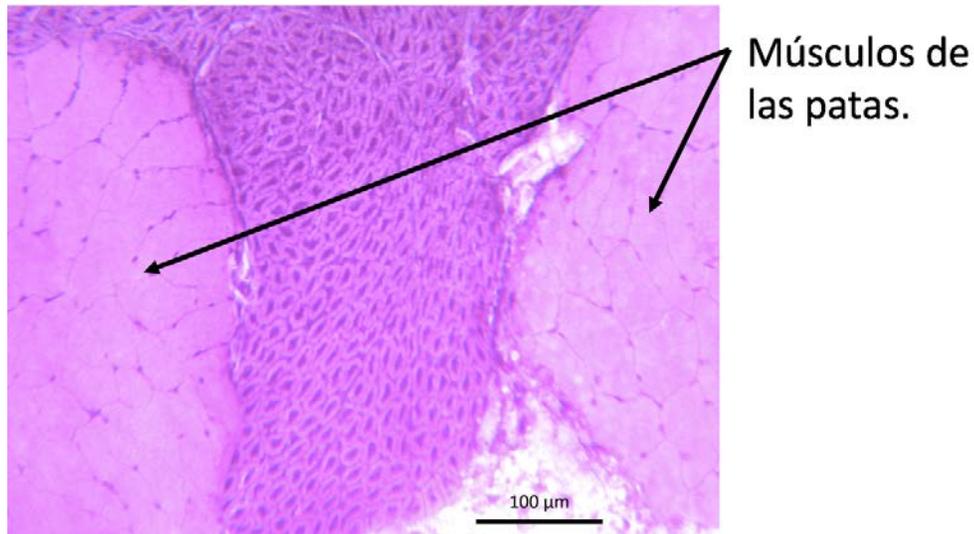


Figura 16. Caracterización histológica con la tinción Hematoxilina-Eosina. Fibras del músculo del sintórax. Clara diferencia entre músculo alar y de las patas. Escala: 100 μ m.

7.3.1 Área transversal de las fibras

El resultado del análisis del Coeficiente de Correlación Intraclass fue cercano a uno ($R = 0.985$), lo que sugiere una alta repetibilidad en la manera de obtener las medidas morfológicas. El MLGM muestra una interacción significativa entre la posición del músculo y el sexo de los individuos (Posición*Sexo: $\beta = 47.799$, E.E. = 4.821, g.l. = 10372, $P = 0.001$; Posición: $\beta = -95.506$, E.E. = 7.263, g.l. = 10372, $P = 0.001$; Sexo: $\beta = -92.729$, E.E. = 59.99, g.l. = 24, $P = 0.135$) (Figura 16). Al investigar las diferencias entre las áreas de las fibras por posición entre cada uno de los sexos se encontró que en los machos existían diferencias significativas siendo las áreas de las alas anteriores más grandes que las alas posteriores ($a = 525.647$, $\beta = -47.707$, EE = 3.153, $P = 0.001$) mientras que en las hembras no se encontraron diferencias significativas entre las áreas de las fibras anteriores y posteriores ($a = 432.918$, $\beta = 0.092$, EE = 3.635, $P = 0.979$).

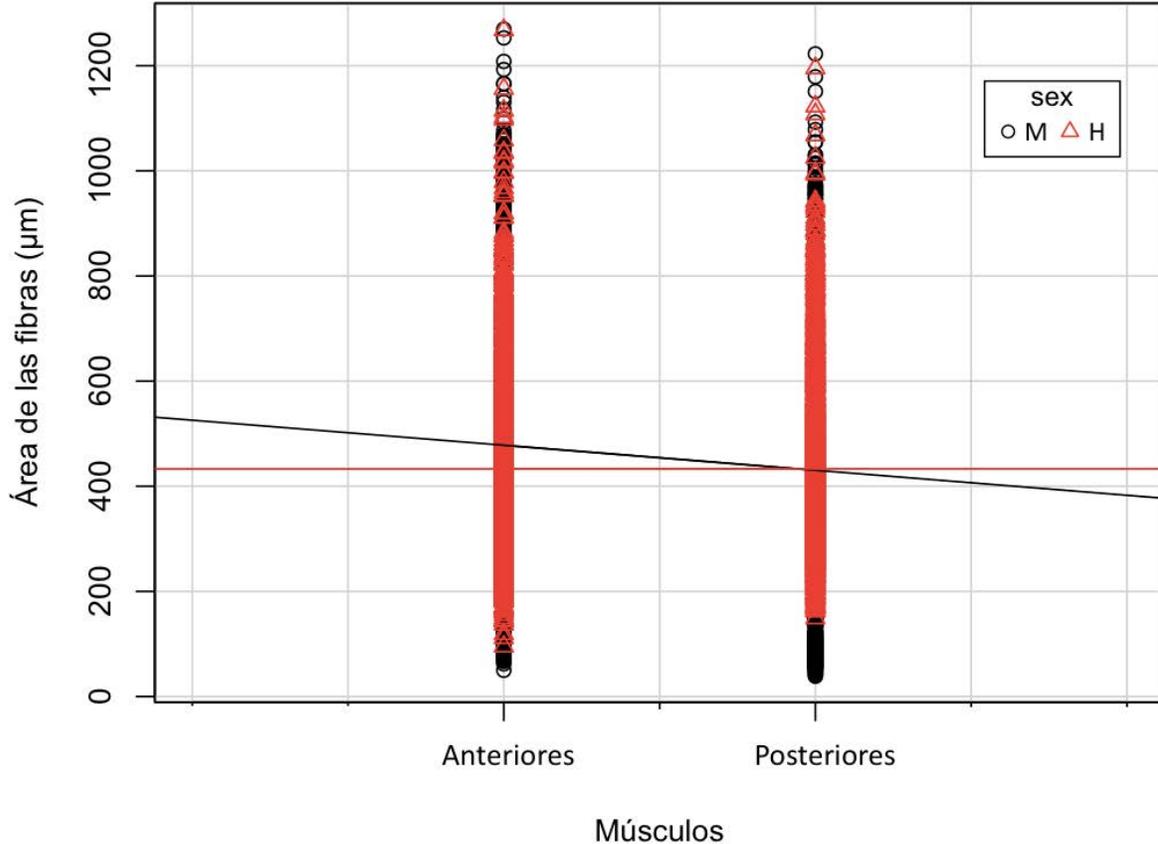


Figura 17. Área de las fibras de los músculos que adosan las alas en larvas de machos (círculos negros) y hembras (triángulos rojos) de *Hetaerina vulnerata* en relación a la posición anterior y posterior.

7.4 Caracterización histoquímica

7.4.1 Determinación del metabolismo de las fibras: Histoquímica para NADH-TR

La caracterización del metabolismo con la histoquímica para NADH-TR muestra de nuevo la característica distribución radial de los músculos que adosan las alas (Figura 18). Los músculos adosados a las alas en larvas de machos y hembras de *Hetaerina vulnerata* presentaron un metabolismo variado. Algunos individuos tienen un metabolismo predominantemente oxidativo mientras otros son principalmente glucolítico y el resto parecen tener una combinación de ambos (Figura 19). Por otro lado, los músculos de las patas parecen presentar en la mayoría de las

larvas un metabolismo oxidativo lo cual hace difícil que se distingan en aquellos individuos con un metabolismo oxidativo. En las figuras 20 y 21 se presentan las imágenes reconstruidas de machos y hembras respectivamente.

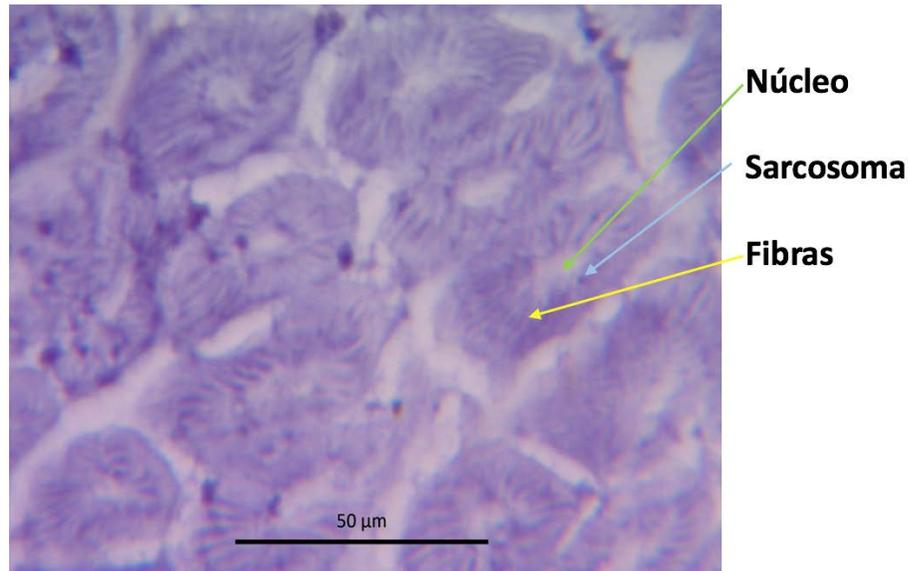


Figura 18. Caracterización del metabolismo de las fibras de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica para NADH-TR. Corte transversal del músculo de vuelo. Escala: 50 μm.

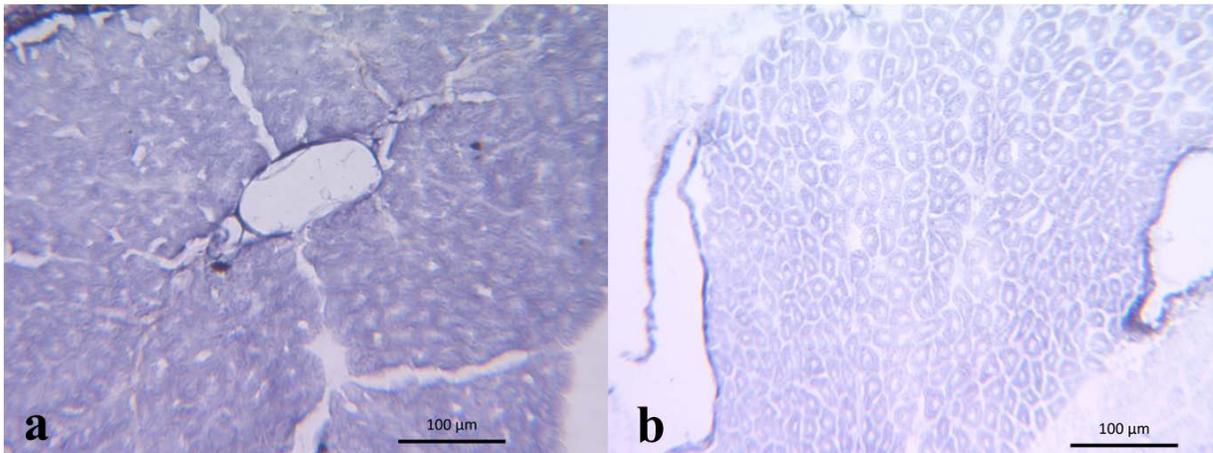


Figura 19. Caracterización del metabolismo de las fibras de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica para NADH-TR. Corte transversal del músculo de vuelo. (a) Fibras con metabolismo oxidativo. (b) fibras con metabolismo glucolítico. Escala: 100 μm.

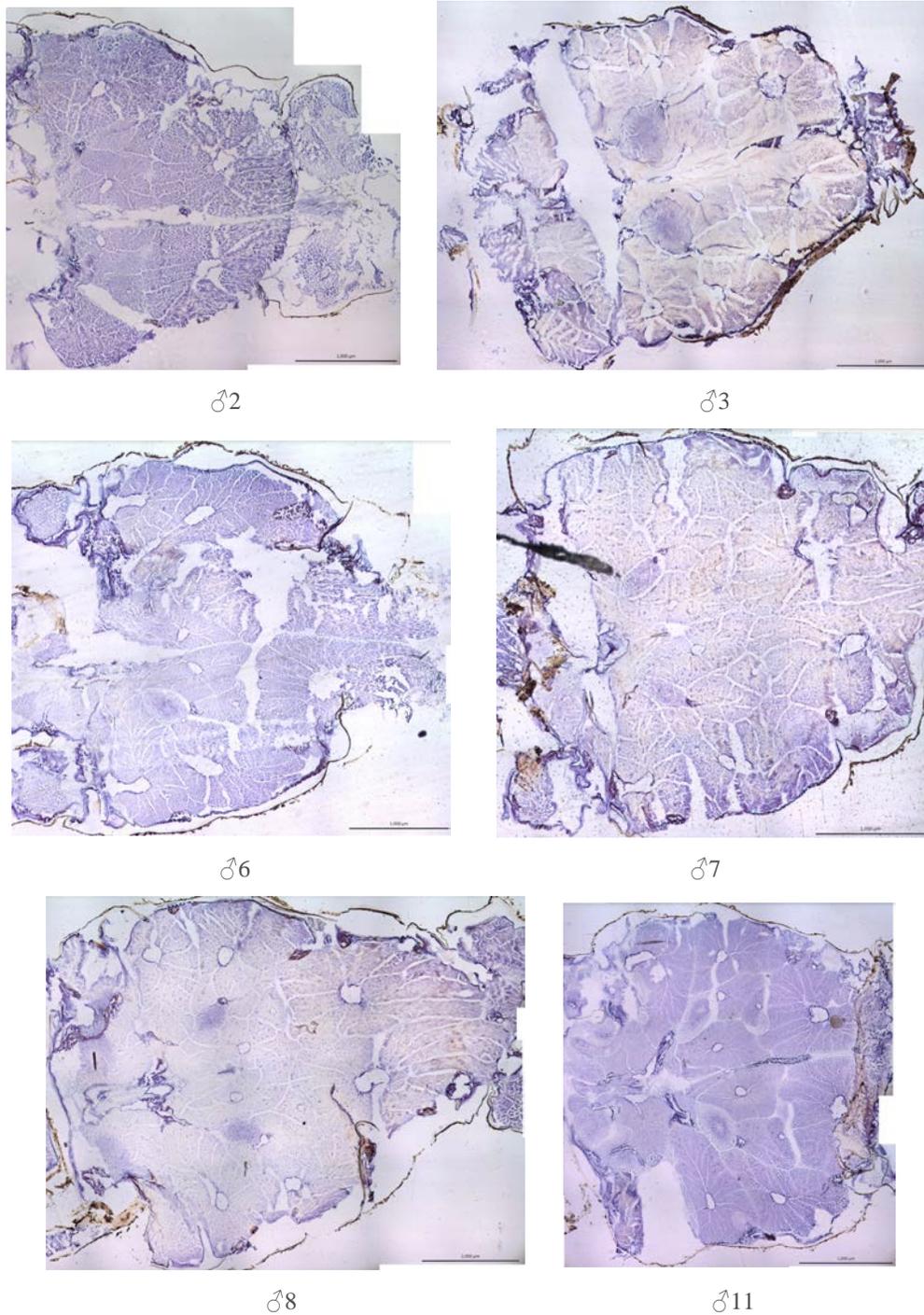


Figura 20. Caracterización del metabolismo de las fibras de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica para NADH-TR. Reconstrucción de los músculos del sintórax de machos. Corte transversal. Escala: 1,000µm.

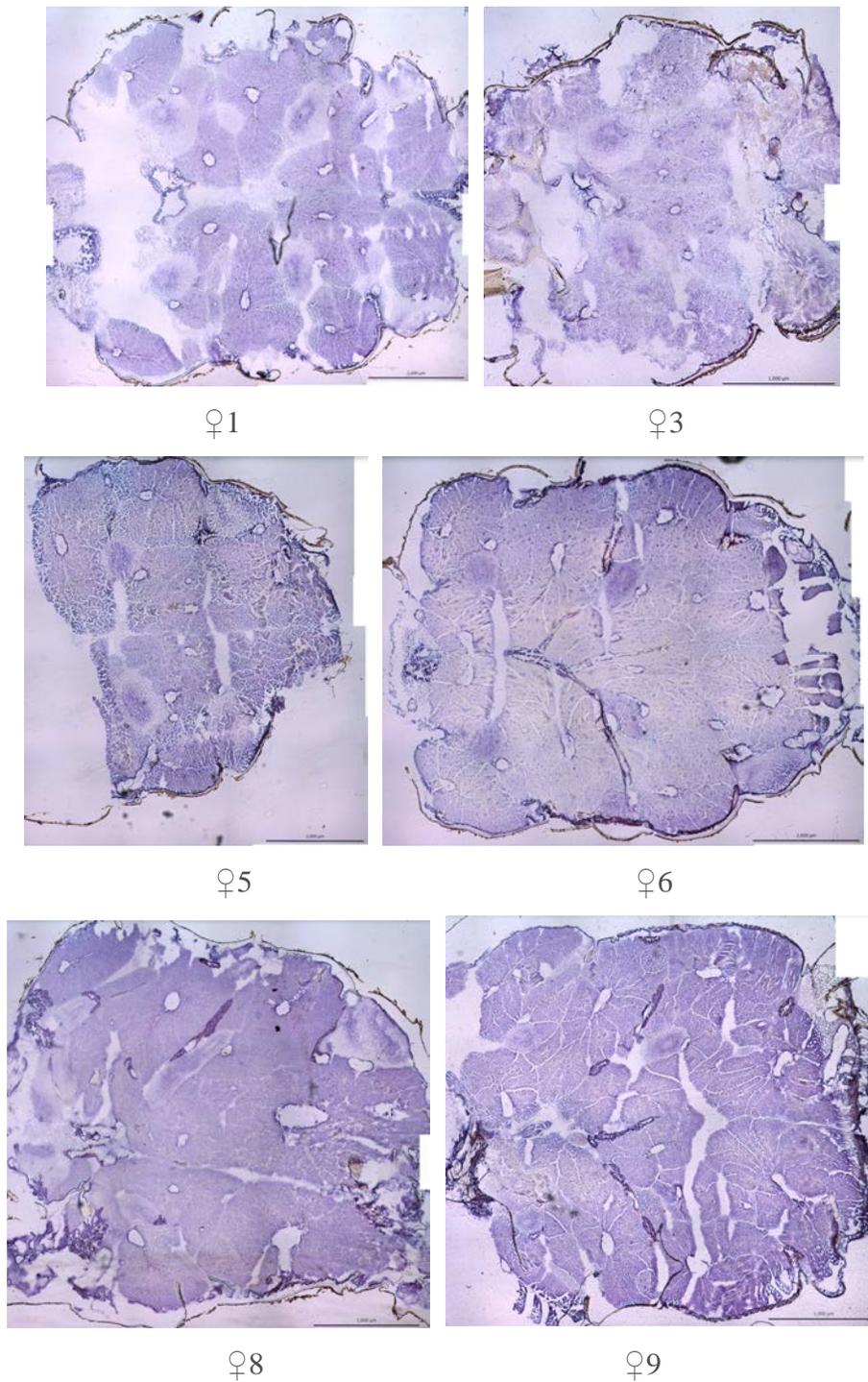


Figura 21. Caracterización del metabolismo de las fibras de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica para NADH-TR. Reconstrucción de los músculos del sintórax de hembras. Corte transversal. Escala: 1,000µm.

7.4.2 Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa miofibrilar de las fibras: Histoquímica para ATPasa básica (pH 9.4)

La actividad de la ATPasa miofibrilar en la musculatura del sintórax de la larva de *Hetaerina vulnerata* dio resultados variables entre machos y hembras con la presencia de los tres tipos de fibras (rápidas, intermedias y lentas) (Figura 22). Los machos fueron los que presentaron más variación entre individuos respecto a las fibras musculares que adosan las alas (Figura 23). De los 15 machos: cinco machos tenían predominantemente fibras lentas, tres machos fibras intermedias y siete machos fibras rápidas. Los músculos de las patas por otro lado fueron similares en todos los machos presentando fibras de tipo intermedio. En las hembras por otro lado no hubo tanta variación como en los machos al estudiar las fibras musculares que adosan las alas (Figura 24). De las 11 hembras diez tenían fibras rápidas y solamente una contenía fibras lentas. No se observaron fibras intermedias en las hembras. Las patas en las hembras poseían fibras de tipo rápido al igual que los músculos alares lo cual hacía que no se diferenciaron fácilmente y el sintórax se veía homogéneo en casi todas ellas.

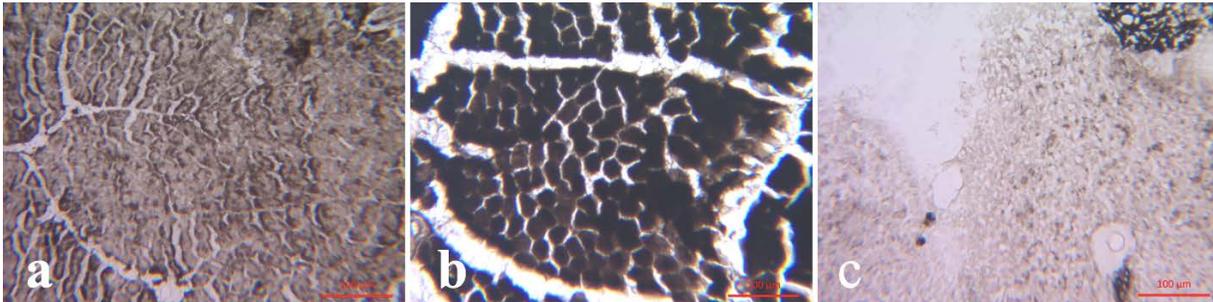
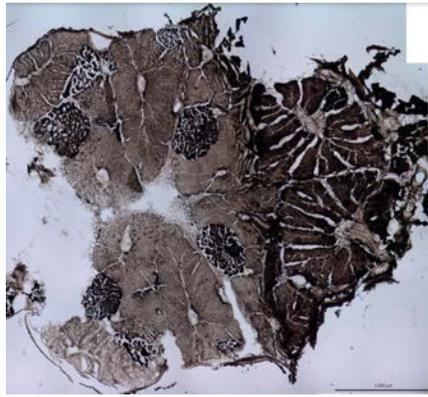


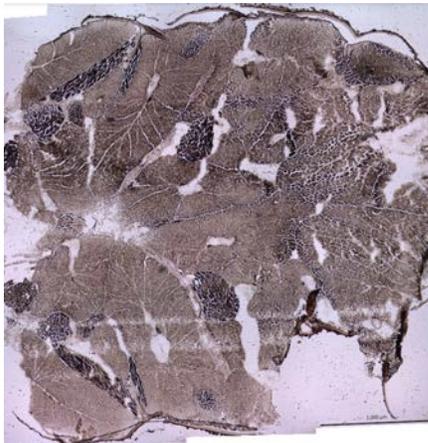
Figura 22. Caracterización de la actividad ATPasa miofibrilar de las fibras de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica de ATPasa básica (pH 9.4). (a) fibras rápidas, (b) fibras intermedias, (c) fibras lentas. Corte transversal. Escala: 100µm.



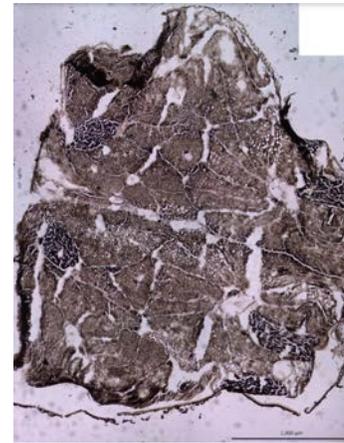
♂3



♂5



♂6



♂7

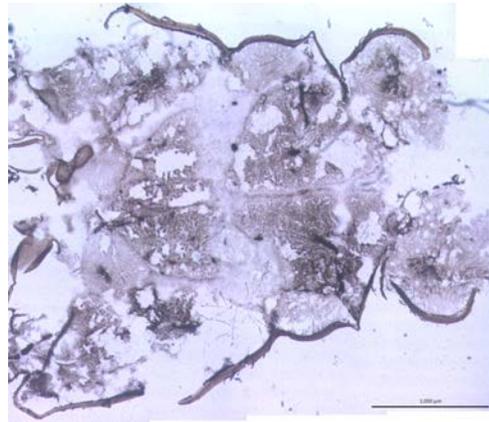


♂8

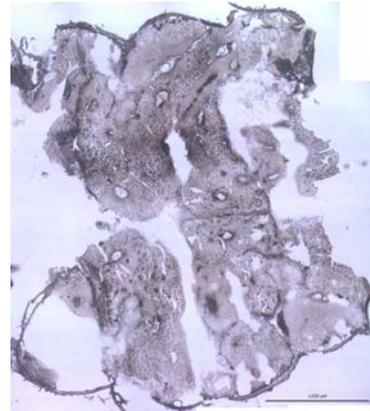


♂11

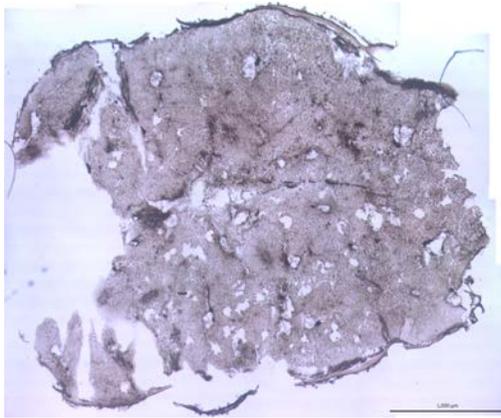
Figura 23. Reconstrucción de los músculos del sintórax de machos de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica para ATPasa. Corte transversal. Escala: 1,000 μ m.



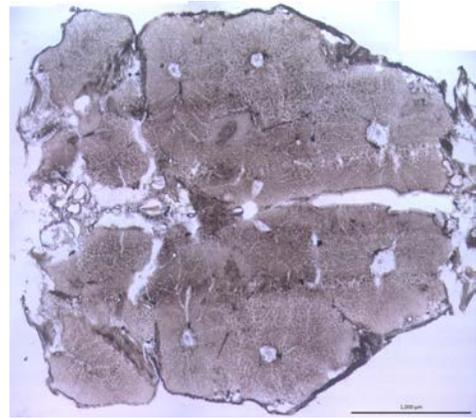
♀3



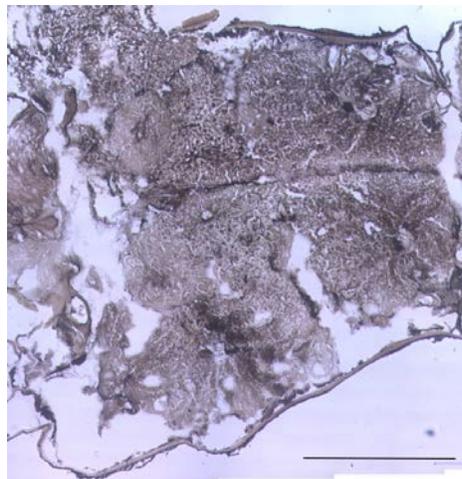
♀4



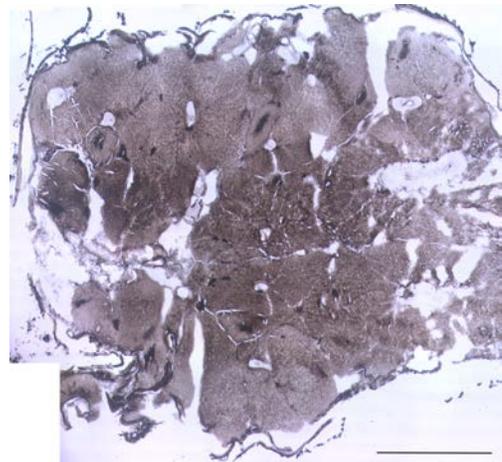
♀5



♀6



♀7



♀8

Figura 24. Reconstrucción de los músculos del sintórax de hembras de *Hetaerina vulnerata* con la histoquímica para ATPasa. Corte transversal. Escala: 1,000 μ m.

8. Discusión

El orden Odonata cuenta con diversas especies territoriales que son excelentes objetos de estudio para determinar las variaciones fenotípicas entre las diferentes tácticas empleadas por los machos para maximizar su éxito reproductivo (Suhonen y cols. 2008). El género *Hetaerina* es un buen ejemplo de esto, en la literatura se pueden encontrar estudios con *H. americana* que describen las variaciones entre tácticas (territorial y no territorial) en cuanto a edad (Raihani y cols. 2008), tamaño corporal (Serrano-Meneses y cols. 2007, Raihani y cols. 2008), ornamentos sexuales (Contreras-Garduño y cols. 2006, Raihani y cols. 2008), contenido de grasa (Contreras-Garduño y cols. 2006, Serrano-Meneses y cols. 2007, Raihani y cols. 2008) y masa muscular del vuelo (Serrano-Meneses y cols. 2007, Raihani y cols. 2008). Con lo cual podemos hacernos una idea de las ventajas y desventajas que implica cada táctica. El poseer un territorio da a los machos territoriales un número de copulas mayores en un corto plazo, pero les exige un mayor gasto energético y disminuye su supervivencia. En la especie *H. vulnerata* los análisis muestran diferencias en el tamaño de los machos territoriales y no territoriales (Ramírez-Delgado 2015) y variación en la musculatura del vuelo entre estas dos tácticas (Ramírez-Delgado 2016). Sin embargo, poco se ha ahondado en el origen de tales diferencias desde el punto de vista ontogénico. Se sabe que la etapa larval es el periodo más largo en el ciclo de vida de las libélulas (Corbet 1999), pero debido a la carencia de estudios en musculatura del tórax se desconoce si algunas diferencias medibles entre adultos territoriales y no territoriales están presentes desde las larvas. Si este fuera el caso no sería la primera vez que un carácter se conservan durante la metamorfosis. Un ejemplo se encuentra en el zigóptero *Lestes congener* donde larvas que tenían un comportamiento más activo comparado con sus conspecíficos dieron origen a adultos igualmente más activos (Brodin 2008).

La caracterización muscular del sintórax de las larvas muestra la presencia de una disposición tubular previamente descrita en adultos de *Aeshna sp.* desde 1961 por Smith y observada en machos territoriales y no territoriales de *H. vulnerata* Ramírez-Delgado (2016). Este tipo de organización coloca el núcleo en el centro rodeado de los filamentos de proteínas contráctiles radialmente y con sarcosomas muy desarrollados entre estas (Nation 2008). Estos resultados muestran que a pesar de que los músculos del vuelo aún no están en uso en la larva y

fueron clasificados por Maloeuf (1935) como musculo “no funcional” ya mantienen la distribución que se observa en el adulto. La imagen del sintórax se observa casi completamente llena de músculo con la disposición radial y pequeñas zonas con musculatura en paquetes cerrados similar al músculo esquelético de vertebrados que corresponden a las patas. Al mirar esta imagen surge la curiosidad de compararla con lo que estará ocurriendo en el teneral y el adulto maduro y comprobar si en el adulto hay numéricamente menos músculos como lo menciona Maloeuf (1935).

Es interesante también realizar una comparación entre la imagen de la larva en etapa intermedia que se trabajó en las pruebas piloto contra la larva en el estadio final. Se pueden describir músculos de las patas que ocupan zonas más grandes y músculos del vuelo pequeños. Estas observaciones concuerdan con lo que se menciona en la literatura. La mayoría de los músculos de las patas se reabsorben durante los últimos días de vida acuática (Maloeuf 1935) y el número de músculos del vuelo se mantiene constante durante el desarrollo larval, pero el número de fibras en los músculos individuales incrementa con el crecimiento de ésta (Snodgrass 1954).

Los análisis en el presente trabajo con respecto al área transversal de las fibras encontraron que el área de las fibras musculares anteriores alcanza valores mayores que el área de la musculatura posterior para el caso de las larvas de machos. Esto concuerdan con los resultados encontrados por Ramírez-Delgado (2016) donde también se mostraron diferencias significativas entre los músculos del vuelo que adosan las alas anteriores y posteriores, siendo el área transversal de las fibras de los músculos anteriores superior que el área de los músculos posteriores en los machos maduros de *H. vulnerata*. Lo cual confirma de nuevo caracteres que se mantienen entre la larva y el adulto. Se sabe que el movimiento de las alas posteriores y anteriores es independiente (Maloeuf 1935). Además, las alas anteriores desarrollan durante el vuelo movimientos laterales y frontales de la libélula, mientras que las posteriores se encargan de la elevación (Sato y Azuma 1997). Debido a esta evidencia se ha formulado la hipótesis de áreas mayores en los músculos anteriores para cubrir los requerimientos que exigen los movimientos propios de las alas anteriores dentro de los cuales se incluyen la mecánica del “clap and fling” (Ramírez-Delgado 2016).

En las hembras no se encontraron diferencias entre las fibras musculares anteriores y posteriores. Lo cual se esperaba pensando que las hembras de esta especie no mantienen territorios y por lo tanto no presentan los requerimientos que sí se exigen en los machos. Lamentablemente se carece de estudios realizados en musculatura de hembras adultas con los cuales se puedan comparar los resultados encontrados.

El análisis de las medianas del área transversal de los músculos del vuelo permitió formar dos grupos de machos. Aunque no existían diferencias de tamaño corporal en los dos grupos sí se observó una diferencia en el tamaño de las áreas trasversales de los músculos del vuelo. Sin embargo, sería prematuro decir que los machos con medianas más grandes darán origen a machos territoriales pues los resultados encontrados podrían depender de otros factores y sería imposible determinar si este grupo de machos hubieran presentado un comportamiento territorial. Además, estos resultados originan nuevas incógnitas como saber qué pasaría con esos grupos en la etapa teneral.

Existen cambios importantes en el desarrollo de la musculatura durante la etapa teneral. Trabajando con *Plathemis lydia*, Marden (1989) encontró diferencias entre el área transversal de las fibras musculares durante el desarrollo de los adultos. Los machos durante la emergencia tuvieron en promedio un diámetro de 20.2 μm y los territoriales un diámetro de 30.3 μm . En otro trabajo Marden y cols. (1998) observaron que en *Libellula puchella* ocurre un cambio en las proteínas estructurales de los músculos del vuelo, los adultos maduros poseen músculos más sensibles al calcio lo cual se logra al modificar la expresión de isoformas de troponina t (proteína que se encuentra en los filamentos delgados) y por consiguiente los adultos alcanzan velocidades de vuelo más altas, con mayor amplitud del aleteo y mayores frecuencias. Probablemente las diferencias presentes en las larvas se vuelvan más pronunciadas durante el desarrollo del teneral y se sume cambios importantes que eventualmente determinen la táctica que será utilizada durante la edad madura. Otro aspecto a resaltar es la alta plasticidad del músculo esquelético que le permite adaptarse a distintas condiciones que podrían modificar el área de las fibras dependiendo que la actividad física que el medio le exija (Ross y Pawlina 2008) y por consiguiente las diferencias entre territoriales y no territoriales a pesar de presentar un origen ontogénico sólo podrían determinarse hasta que la táctica es exhibida. Estas incógnitas hacen relevante llevar a cabo estudios de caracterización del músculo del vuelo en tenerales.

Antes de discutir sobre los resultados obtenidos con las técnicas de NADH-TR y ATPasa básica (pH 9.6) es importante recordar que los músculos que adosan las alas aún no están en uso durante el último estado larval. Sin embargo, estando en la última etapa larval próximos a emerger sería pertinente suponer que los músculos que adosan las alas se encuentran casi listos para emprender el vuelo tan pronto desplieguen las alas como tenrales.

El tipo de metabolismo en los músculos que adosan las alas en los machos fue variado en contraste con los resultados del metabolismo encontrado en machos adultos de *H. vulnerata* por Ramírez-Delgado (2016). En los adultos se encontró que todos los machos independientemente de la táctica utilizada presentaban un metabolismo oxidativo. Sin embargo, todos los individuos estudiados fueron únicamente de la temporada octubre-noviembre. Surge entonces la pregunta de si el metabolismo dependerá de la temporada o si las larvas con metabolismo predominantemente oxidativo estaban más cerca de emerger y, por lo tanto, más preparadas para comenzar el vuelo. Tendría sentido que aquellas con metabolismo oxidativo estuvieran más próximas a la metamorfosis pues se conocen los altos requerimientos del músculo que exige el vuelo y las ventajas que un metabolismo oxidativo ofrecen (Marden 2000).

Las larvas de hebras también tuvieron un metabolismo variado, pero más inclinado hacia el tipo oxidativo. Igualmente, se podría explicar por la cercanía a la emergencia, aunque no se tiene información del metabolismo del músculo del vuelo en hembras de *H. vulnerata* para poder hacer una discusión adecuada.

Un factor que no se ha estudiado es como afecta un metabolismo predominantemente oxidativo en la longevidad de los adultos de *H. vulnerata*. Se sabe que el oxígeno tiene una alta toxicidad, altos niveles de oxígeno pueden provocar muerte prematura de las células (Halliwell y Gutteridge 2015). Algunos insectos poseen un sistema respiratorio con ciclos discontinuos de intercambio de gases que regula los niveles de oxígeno y evita la sobre exposición cuando están en reposo (Klowden 2007). Sin embargo, durante el vuelo los insectos consumen una tasa de oxígeno de 50 a 100 veces mayor que en reposo (Beenackers y cols. 1984). En moscas se ha observado que evitar que vuelen incrementa su periodo de vida (Halliwell y Gutteridge 2015). Todo esto hace pensar que la toxicidad del oxígeno y la producción de radicales libres del metabolismo oxidativo en los individuos que se mantienen más tiempo en vuelo, machos no territoriales, debe tener resultados negativos en la longevidad lo que podría disminuir su ventaja

frente a los machos territoriales que se mantienen menos tiempo en vuelo. Otra posibilidad es que exista un sistema aún desconocido que proteja a esta especie de la toxicidad del oxígeno durante el vuelo.

La actividad enzimática de la ATPasa miofibrilar en las fibras del músculo que adosa las alas fue muy variada en larvas de macho, clasificando a cinco machos con fibras lentas, tres machos con fibras intermedias y siete machos fibras rápidas. Comparando estos resultados con lo observado por Ramírez-Delgado (2016) en los machos adultos encontramos una variación en sus resultados que dependen de la fecha de colecta. Los individuos capturados en octubre tienen fibras lentas y los capturados en noviembre tienen fibras intermedias (Ramírez-Delgado 2016). Se requiere entonces aumentar el número de individuos tanto de larvas como de adultos maduros e incluir tenerales en diferentes temporadas para tener una idea más clara de la actividad enzimática en el músculo del vuelo de *H. vulnerata*, pues el tipo de fibras quizás tenga como factor determinante la temperatura.

Las larvas de hembras varían menos y contienen principalmente fibras de tipo rápido. Las hembras de especies territoriales tienen requerimientos distintos a los machos, puesto que no necesitan obtener y mantener un territorio, debido a esto las hembras invierten la mayoría de sus recursos en el crecimiento de los ovarios en vez de invertir en los músculos del vuelo (Marden 1989) debido a que no requieren resistir tanto a la fatiga durante el vuelo como en el caso de los machos. Sin embargo, de nuevo hacen falta más estudios de este tipo en hembras para poder hacer una comparación más adecuada.

El músculo de las patas en la larva, a diferencia del músculo que adosa las alas, sí es funcional y se encuentra activo durante casi todo el periodo larval. Además, durante los últimos estadios las larvas son más móviles y suelen buscar sus propios microhabitats (Buskirk y Sherman 1985). Por esta razón podrían ser más significativos los resultados sobre la histoquímica de las patas, pues estas observaciones aportan nueva información sobre las posibles actividades de estas dentro de su hábitat.

El músculo de las patas tanto en machos como en hembras tuvo un metabolismo principalmente oxidativo, con unos pocos individuos que diferían de este metabolismo. Esto podría ser resultado de una alta actividad de forrajeo en machos y hembras. La actividad enzimática de la ATPasa miofibrilar de los músculos de las patas mostró en 12 de los 15 machos

fibras de tipo intermedia y en hembras nueve de las 11 analizadas tuvieron fibras rápidas. Se ha predicho, para las larvas, que machos de especies territoriales forrajean durante más tiempo que las hebras para cumplir con las necesidades que una táctica territorial les exigiría una vez que lleguen a la edad madura. Estudios de Fuselier y cols. (2007) en larvas de machos y hembras de la libélula territorial *Anax junius* mostraron que los machos en efecto pasan más tiempo en el forrajeo y avanzan distancias más largas que las hembras. Si esto ocurriera en *H. vulnerata*, los resultados podrían explicarse por una actividad mayor en los machos para lo cual fibras intermedias que son más resistentes a la fatiga proporcionarían beneficios. En el caso de las hembras, que no requieren realizar tanta actividad como los machos, las fibras de tipo rápido que son sensibles a la fatiga serían adecuadas para satisfacer sus requerimientos.

Dentro de los aspectos ecológicos que podrían explicar la variación tanto del metabolismo como de la actividad enzimática observada en las patas se encuentra la formación de microhabitats con condiciones ligeramente distintas dentro del mismo arrollo, un factor determinante en la morfología de larvas de Odonata que las han llevado a ocupar un amplio rango de hábitats (Corbet 1999). Algunas condiciones que podrían modificar la actividad de las larvas y por ende el metabolismo y actividad enzimática en los músculos de las patas podemos mencionar la presencia de depredadores que pueden alterar la actividad de forrajeo (Corbet 1999, Brodin 2008, Stock y cols. 2008) e inclusive la morfología (Johansson y Mikolajewski 2008). A pesar de que no existen peces en este arrollo que puedan depredar las larvas de *H. vulnerata*, sí se encuentran larvas de Anisoptera que podrían ser el principal depredador de las larvas de Zygoptera.

Finalmente, otro dato que resultó interesante durante la realización del estudio fue encontrar un número mayor de machos que de hembras durante la colecta. Diversos estudios han mostrado anteriormente que al trabajar con el suborden Zygoptera los machos superan numéricamente a las hembras y lo contrario ocurre en Anisoptera (Corbet 1999) y estas observaciones concuerda con lo presentado en la literatura.

9. Conclusiones

- Es posible diferenciar entre machos, utilizando las medianas se pueden observar machos con áreas transversales más grandes que no difieren en el largo corporal.
- El área transversal de las fibras musculares que adosan las alas en las larvas de machos de *Hetaerina vulnerata* es mayor en los músculos anteriores que en los posteriores. Esta diferencia únicamente se observó en los machos, mientras que en las hembras no hubo diferencias significativas entre músculos anteriores y posteriores.
- Los resultados de la caracterización histoquímica muestran un metabolismo variado entre ambos sexos con una inclinación hacia el metabolismo oxidativo, más notorio en hembras.
- Mediante la actividad enzimática se observó más variación entre machos que entre hembras. Se pudo clasificar a siete machos con fibras rápidas, tres con fibras intermedias y cinco con fibras lentas. Las hembras presentaron en su mayoría fibras de tipo rápidas con excepción de una cuyas fibras eran de tipo lentas.

10. Perspectivas

- A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis, en futuros trabajos con larvas de *Hetaerina vulnerata* se sugiere ampliar el número de individuos analizados, así como el área o sitios de estudio con el objetivo de conocer si las variaciones encontradas dependen de condiciones exclusivas de la zona de colecta y si esa variación aumenta o se mantiene con un número mayor de especímenes.
- También evaluar estas mismas características histológicas e histoquímicas en distintas etapas del desarrollo larval podría aportar valiosos datos sobre la ontogenia de este peculiar organismo.
- Un tema que igualmente se debe considerarse para estudios próximos es la temporada de colecta. Las larvas que se trabajaron fueron aquellas que estaban a punto de emerger después haber sobrevivido los meses más fríos del año y sabiendo que estos organismos son muy dependientes de la temperatura se desconoce si larvas que se desarrollan en meses más cálidos tendrán cambios significativos en la musculatura del sintórax.
- Finalmente, sería interesante el análisis y descripción con estas técnicas de la musculatura total del sintórax en adultos de ambos sexos (tanto en tenerales como en adultos maduros), pues esta información podría dar una visión complementaria de este trabajo y estudios previos realizados en *Hetaerina vulnerata*.

11. Referencias

- Álvarez HA, Serrano-Meneses MA, Reyes-Márquez I, Jiménez-Cortés JG y Córdoba-Aguilar A. 2013. Allometry of a sexual trait in relation to diet experience and alternative mating tactics in two rubyspot damselflies (*Calopterygidae: Hetaerina*). *Biological Journal of the Linnean Society* 108: 521–533.
- Anholt BR. 2008. Fitness landscapes, mortality schedules, and mating systems. En: Córdoba-Aguilar A. 2008. *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford University Press. New York.
- Beenackers AMT, Van Der Horst DJ y Van Marrewijk WJA. 1984. Insect Flight Muscle Metabolism. *Insect Biochemistry* 14,3: 243-260.
- Bomphrey RJ, Nakata T, Henningsson P y Lin HT. 2016. Flight of the dragonflies and damselflies. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371.
- Brodin T. 2008. Behavioral syndrome over the boundaries of life-carryovers from larvae to adult damselfly. *Behavioral Ecology* 20: 30-37
- Bullard B y Pastore A. 2011. Regulating the contraction of insect flight muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 32: 303-313.
- Buskirk RE y Sherman KJ. 1985. The influence of larval ecology on oviposition and mating strategies in dragonflies. *Insect Behavioral Ecology* 68: 39-51.
- Büsse S y Hörnschemeyer T. 2013. The thorax musculature of Anisoptera (Insecta: Odonata) nymphs and its evolutionary relevance. *BMC Evolutionary Biology* 13:237

Bybee S. 2005. Dragonflies and Damselflies (Insecta: Odonata). UF/IFAS Featured Creatures. EENY-355

Contreras-Garduño J, Canales-Lazcano J y Córdoba-Aguilar A. 2006. Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the ruby spot damselfly, *Hetaerina americana*. Journal of Ethology 24: 165-173.

Corbet PS. 1962. A Biology of Dragonflies. H.F. & G. Witherby LTD. London.

Corbet PS. 1999. Dragonflies: Behavior and ecology of Odonata. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. Ithaca, New York.

Cordero-Rivera A y Stoks R. 2008. Mark-recapture studies and demography. En: Córdoba-Aguilar A. 2008. Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press. New York.

Córdoba-Aguilar A y Cordero-Rivera A. 2005. Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. Neotropical Entomology 34(6): 861-879.

Córdoba-Aguilar A y González-Tokman DM. 2014. The behavioral and physiological ecology of adult rubyspot damselflies (*Hetaerina*, Calopterygidae, Odonata). Advances in the Study of Behaviour 46: 311-341

Dickson M. 2006. Insect flight. Current Biology. 16:19 309-314.

Fuselier L, Decker P, Lunski J, Mastel T y Skolness S. 2007. Sex differences and the size at emergence are not linked to biased sex ratios in the common green darner, *Anax junius* (Odonata: Aeshnidae). Journal of Freshwater Ecology. 22: 107-117.

Grether GF. 1996. Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution*. 50: 1949-1957.

Gross MR. 1996. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends in Ecology & Evolution*. 11: 92-98.

Halliwell B and Gutteridge JMC. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.

Harrison JF y Lighton JRB. 1998. Oxygen-sensitive flight metabolism in the dragonfly *Erythemis simplicicollis*. *Journal of Experimental Biology*. 201: 1739-1744.

Harrison JF y Roberts SP. 2000. Flight Respiration and Energetics. *Annual Reviews Physiology*. 62: 179-205.

Hatch G. 1966. Structure and Mechanics of the Dragonfly Pterothorax. *Annals of the Entomological Society of America*. 59(4): 702–714.

Heckman C.W. 2006. *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata – Anisoptera*. Springer. USA.

Heckman C.W. 2008. *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata – Zygoptera*. Springer. USA.

Heinrich B. 2006. A naturalist's view of insect flight muscle. En: Vigoreaux JO. 2006. *Nature's Versatile Engine: Insect Flight Muscle Inside and Out*. Springer. New York.

Jiménez-Cortés J, Serrano-Meneses MA y 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.

Kierszenbaum AL y Tres LL. 2012. *Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica*. Elsevier. España.

Klowden MJ. 2007. *Physiological Systems in Insects*. University of Idaho. Academic Press.

Larios-Escalante A. 1998. *Estructura y función del músculo esquelético: propiedades mecánicas pasivas y contractilidad*. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima.

Maloef NSR. 1935. The postembryonic history of the somatic musculature of the dragonfly thorax. *J. Morph.* 58: 87-115.

Marden JH. 1989. Bodybuilding dragonflies: cost and benefits of maximizing flight muscle. *Physiological Zoology* 62: 505-521.

Marden JH, Fitzhugh GH y Wolf MR. 1998. From molecules to mating success: Integrative biology of muscle maturation in dragonfly. *American Zoologist* 38: 528-544.

Marden JH. 2000. Variability in the size, composition, and function of insect flight muscles. *Annual Review of Physiology* 62: 157-178.

Marden JH. 2008. Dragonfly flight performance: a model system for biomechanics, physiological genetics, and animal competitive behaviour. En: Córdoba-Aguilar A. 2008. *Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research*. Oxford University Press. New York.

Marden JH y Cobb JR. 2004. Territorial and mating success of dragonflies that vary in muscle power output and presence of gregarine gut parasites. *Animal Behaviour*. 68: 657-665.

Márquez Luna J. 2005. Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín sociedad Entomológica Aragonesa*. 37: 385-408.

Mazzcano C, Paulson D y Abbott J. 2014. Backyard Ponds. Guidelines for Creating & Managing Habitat for Dragonflies & Damselflies. Ed. The Migratory Dragonfly Partnership. Oregon, United States of America.

Nation JL. 2008. Insect Physiology and Biochemistry. CRC press.

Oliveira RF, Taborsky M y Brockmann H J. 2008. Alternative Reproductive Tactics: An Integrative Approach. Cambridge University Press, New York.

Pessacq P y Muzón J. 2004. Description of the Final Stadium of *Hetaerina rosea* Selys (Zygoptera: Calopterygidae). Studies on Neotropical Fauna and Environment. 39:3, 239-242.

Plaistow S y Siva-Jothy MT. 1999. The ontogenetic switch between odonate life history stages: effects on fitness when time and food are limited. Animal Behaviour 58: 659-667.

Raihani G, Serrano-Meneses MA y Córdoba-Aguilar A. 2008. Male mating tactics in the American rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. Animal Behaviour 75: 1851-1860.

Ramírez A. 2010. Capítulo 5. Odonata. Revista de Biología Tropical. 58: 97-136.

Ramirez-Delgado J, López-García K, Lara C y Serrano-Meneses MA. 2015. Wing Pigmentation in Males of a Territorial Damselfly: Alternative Reproductive Tactics, Allometry and Mating Success. J. Insect Behav 28: 569-5

Ramírez-Delgado J. 2016. Caracterización de las fibras del músculo de vuelo en machos territoriales y no territoriales de *Hetaerina vulnerata*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autonoma de Tlaxcala.

Ross MH y Pawlina W. 2008. Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Ed. Panamericana. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina.

Samways MJ. 2008. Dragonflies and Damselflies of South Africa. Ed. Pensoft Publishers. Bulgaria.

Segura-Alegría B, Jiménez-Estrada I y Corona-Quintanilla DL. 2013. "Músculo". En: Cruz Gómez Y y Eguibar Cuenca JR. 2013. Aparato urogenital. De la biología a la fisiopatología. Primera edición. Universidad Autónoma de Tlaxcala. p 35-53.

Serrano-Meneses M A, Córdoba-Aguilar A, Méndez V, Layen S J y Székely T. 2007. Sexual size dimorphism in the American Rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Animal Behavior* 73: 987-997.

Serrano-Meneses MA, Sánchez-Rojas G y Córdoba-Aguilar A. 2008. Sexual selection as the possible underlying force in calopterygid wing pigmentation: comparative evidence with *Hetaerina* and *Calopteryx* (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 37(3): 221-233.

Smith DS 1961. The organization of the flight muscle in a dragonfly, *Aeshna sp.* (Odonata). *J. Biophys Biochem Cytol* 11:119-145.

Smith DS. 1966. The organization of flight muscle fibers in the Odonata. *The Journal of Cell Biology* 28:109-126.

Snodgrass RE. 1954. The Dragonfly Larva. *Smithsonian Miscellaneous Collections*. 123: 2

Stoks R y Córdoba-Aguilar A. 2012. Evolutionary Ecology of Odonata: A Complex Life Cycle Perspective. *Annual Review of Entomology* 57: 249-265.

Suhonen J, Rantala MJ y Honkavaara J. 2008. Territoriality in odonates. En: Córdoba-Aguilar, A. 2008. Dragonflies and Damselflies: Model Organisms for Ecological and Evolutionary Research. Oxford University Press. New York.

Tillyard RJ. 1917. The Biology of Dragonflies. Cambridge University Press. London.

Wakeling JM y Ellington CP. 1997 a. Dragonfly flight. II. Velocities, accelerations and kinematics of flapping flight. The Journal of Experimental Biology 200: 557-582.

Wakeling JM y Ellington CP. 1997 b. Dragonfly flight. III. Lift and power requirements. The Journal of Experimental Biology 200: 583-600.

Whedon AD. 1929. Muscular reorganization in the Odonata during metamorphosis. Bio. Bull 56(3): 177-193.

Wolak ME, Fairbairn DJ y Paulsen YR. 2012. Guidelines for estimating repeatability. Methods Ecol Evol 3: 129-137.