



Universidad Autónoma de Tlaxcala

División de Ciencias Biológicas

**Efectos de la Respuesta Inmune Celular sobre Algunos  
Componentes de la Adecuación en el Grillo Común  
*Acheta domesticus* Linnaeus (Insecta: Orthoptera)**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
Biólogo **Jorge Canales Lazcano**

Comité Tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Carlos Cordero Macedo

Dr. Alejandro Córdoba Aguilar

Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez

Dr. Humberto Lanz Mendoza

Dr. Amando Bautista Ortega

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que el **Biól. Jorge Canales Lazcano** 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: **“Efectos de la respuesta inmune celular sobre algunos componentes de la adecuación en el grillo común *Acheta domesticus* Linnaeus (Insecta: Orthoptera)”**


Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

TLAXCALA, TLAX., AGOSTO 6 DE 2007

  
Dra. Margarita Martínez Gómez

  
Dr. Carlos Cordero Macedo

  
Dr. Alejandro Córdoba Aguilar

  
Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez

  
Dr. Humberto Lanz Mendoza

  
Dr. Amando Bautista Ortega

## Agradecimientos

Agradezco a todas las personas e instituciones que de forma directa o indirecta se involucraron en este proyecto.

Al Dr. Alejandro Córdoba Aguilar, quien asesoró este trabajo, entendiendo en todo momento las necesidades de sus alumnos brindando siempre su apoyo y guía adecuada. Gracias por el respaldo incondicional y hacerme parte de tu equipo de trabajo, el cual se mantiene como una familia.

Al Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez, codirector de este trabajo, por la paciencia y disponibilidad para resolver mis dudas.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Margarita Martínez Gómez, Dr. Carlos Cordero Macedo, Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez, quienes de forma profesional evaluaron este trabajo marcando el rumbo adecuado del proyecto y tuvieron disponibilidad para viajar en cada examen.

A los Drs. Humberto Lanz Mendoza y Amando Bautista Ortega por revisar el trabajo y sus atinados comentarios durante el examen cerrado.

Al Dr. Jorge Alberto Contreras, gran amigo incondicional tanto en el ámbito académico como personal, por tantas carencias y logros que compartimos hombro a hombro, así como la guía al explorar lugares remotos. Por una verdadera amistad que se forjó en poco tiempo.

Al Dr. Raúl Ortiz, Dra. Consuelo Cuevas, Dr. Juan Márquez, amigos y consejeros de mucho tiempo. Gracias por su amistad y el apoyo moral para continuar en esto.

A mi amigo Jesús Guillermo Jiménez Cortés, por su amistad y por permitirme apoyarlo en su tesis, gran amigo.

A mis compañeros y amigos de la maestría, Víctor, Marisol, Germán, Martha, Mirna, Isela y Tlachi. Por todos los momentos divertidos y el apoyo que siempre encontré en ustedes.

A mis compañeros y amigos todos, del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos sin hacer una mención personal dado que son muchos; agradezco todo el compañerismo y amistad que hizo muy agradable el trabajo en el laboratorio.

A Germán Mendoza, mi gran amigo Víctor Águila y su familia por hospedarme en su casas.

A mis amigos de toda la vida: Ingrid Vania, María de Jesús, Luis, Imelda, Gloria, Eréndira y Paola. Sé que siempre cuento con ellos.

## **Dedicatoria**

**Dedico este trabajo a mi familia: mi abuela Sabina, mi madre Juana, mis hermanos Ricardo, Humberto, Jesús y Raúl, mis sobrinos Ricardo, Miguel, Karina, Alondra, Guadalupe y Alan Eduardo.**

**Agradezco su apoyo incondicional y su comprensión por esta forma "rebelde" de llevar mi vida. Porque de forma involuntaria se han involucrado en mi intención de adquirir una formación completa. Espero nos mantengamos tan**

## Resumen

La teoría de la inversión diferencial de recursos indica que cuando dos o más funciones utilizan el mismo recurso, el organismo entrará en un dilema afectando potencialmente tales funciones. En este proyecto, usando el grillo común, se puso a prueba esta teoría con tres funciones: la respuesta inmune, la producción de exoesqueleto y la producción de huevos. El recurso en dilema para estas funciones puede ser la melanina la cual participa en la encapsulación de agentes extraños, la fabricación de las capas del exoesqueleto y la cubierta de los huevos. La idea general fue someter animales a retos inmunes artificiales, vía inserción de un implante de nylon (renovándose cada siete días), y así evaluar: a) si ambos sexos desarrollaron un tamaño menor o el exoesqueleto tiene menor área en la última muda; b) si las hembras produjeron menos huevos o estos fueron de menor tamaño. Adicionalmente, también se registro si las hembras con reto inmune sufrieron una menor supervivencia. Cada experimento tuvo los siguientes grupos: animales control (sin manipulación), animales con un implante, con dos implantes, con simulación de un implante (sólo un daño físico; testigo uno) y con simulación de dos implantes (dos daños físicos; testigo dos). Los resultados obtenidos mostraron que: a) los animales con dos implantes alcanzan un menor tamaño que los otros grupos; b) los grupos testigo aumentaron el área del exoesqueleto; c) los grupos testigo y de dos implantes mostraron una reducción en el número de huevos puestos; d) el grupo de dos implantes tuvo un tamaño mayor de huevos que el resto de los grupos; y, e) las hembras de dos implantes sobrevivieron menos que el grupo de un implante y el control, mientras que los testigos se mantienen con valores intermedios. La reducción del tamaño corporal en ambos sexos puede afectar negativamente las oportunidades de cópula en machos y la fecundidad en hembras (lo cual se ve con los resultados de huevos). El aumento del área del exoesqueleto a partir de los retos puede interpretarse como una especie de preparación inmunológica ante futuros ataques. Es interesante que los retos afectan el número de huevos producidos aunque el tamaño de estos se hace más grande. Resultados previos, sugieren que el tamaño mayor de huevos favorece mayor supervivencia. Probablemente, los animales "apuesten" por un mayor tamaño de huevos a expensas de una disminución en el número de estos.

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Sistema Inmune .....	2
1.2 Producción de Exoesqueleto .....	3
1.3 Corion de los Huevos .....	4
1.4 Biología del Grillo Común <i>Acheta domesticus</i> .....	5
<b>2. Antecedentes</b> .....	8
<b>3. Justificación</b> .....	9
<b>4. Hipótesis</b> .....	9
<b>5. Objetivo General</b> .....	9
5.1 Objetivos particulares .....	9
<b>6. Metodología</b> .....	10
6.1 Diseño Experimental .....	10
6.1.1 Cría y Mantenimiento de Grillos .....	10
6.1.2 Inserción del Implante .....	10
6.1.3 Respuesta Inmune en Función del Tiempo .....	11
6.1.4 Comparación entre Sexos .....	11
6.2 Respuesta Inmune y Producción de Exoesqueleto .....	12
6.2.1 Medición de Melanina Depositada en el Implante .....	12
6.2.2 Tamaño Corporal del Grillo Adulto .....	13
6.2.3 Área del Exoesqueleto .....	13
6.3 Respuesta Inmune, Producción de Huevos y Supervivencia en Hembras .....	14
6.3.1 Producción de Huevos .....	15
6.3.2 Tamaño de los Huevos .....	15
6.3.3 Supervivencia .....	15
<b>7. Resultados</b> .....	16

7.1.1 Respuesta Inmune en Función del Tiempo .....	16
7.1.2 Comparación entre Sexos .....	16
<b>7.2 Respuesta Inmune y Producción de Exoesqueleto .....</b>	<b>17</b>
7.2.1 Tamaño Final del Grillo adulto .....	17
7.2.2 Área del Exoesqueleto .....	18
<b>7.3 Reto Inmune, Producción de Huevos y Supervivencia .....</b>	<b>20</b>
7.3.1 Número de Huevos .....	20
7.3.2 Tamaño de los Huevos .....	21
7.3.3 Supervivencia .....	21
<b>8. Discusión .....</b>	<b>25</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>31</b>
<b>10. Perspectivas .....</b>	<b>32</b>
<b>11. Referencias .....</b>	<b>34</b>
<b>12. Publicaciones .....</b>	<b>43</b>

## 1. Introducción

A menudo los recursos captados por los organismos no son suficientes para satisfacer óptimamente las necesidades vinculadas con los eventos de crecimiento, supervivencia y reproducción, por lo cual podrían enfrentar dilemas en la asignación de recursos (Stearns 1992). Según la teoría de la distribución diferencial de recursos, los organismos tienen la flexibilidad de invertir estos según distintas prioridades de uso (Williams 1966, Levins 1968, Roff 1982, Clutton-Brock 1983, Stearns 1992), llegando incluso a sacrificar algunas funciones o características (Clutton-Brock 1983, Begon y cols. 1990). Un ejemplo comúnmente documentado es el decremento en la longevidad como consecuencia de una mayor inversión en la fecundidad (ver algunos casos en Roff 1982, Stearns 1992). Sin embargo la inversión diferencial se puede dar de manera sutil, con sacrificios en funciones o estructuras particulares; por ejemplo el pez *Xiphophorus helleri*, al desarrollarse en ambientes con baja disponibilidad de alimento sacrifica el largo del cuerpo para invertir de manera alternativa en desarrollar una cola más grande la cual funciona como un carácter sexual secundario (Basolo 1998). Esto es adaptativo para el animal ya que ambos caracteres -cola larga y longitud del cuerpo- son favorecidos por las hembras en la elección de los machos; al tener una cola larga el animal parece más grande lo cual es menos costoso para el macho que tener un cuerpo más largo. Así mismo el vínculo entre funciones puede tener una base genética con genes o grupos de ellos que aparecen correlacionados, y a mayor expresión fenotípica de un carácter se afecta negativamente el fenotipo de otros genes (Zera y Harshman 2001). Un ejemplo de esto se ha visto en la mosca *Drosophila melanogaster* donde se seleccionó artificialmente una línea que resistiera el ataque de un parasitoide. Esta línea resistente, sin embargo, posee una menor habilidad competitiva por alimento (Fellowes y cols. 1998).

Recurriendo a estas ideas, en este proyecto se exploró la probabilidad de que la melanina sea un agente limitante en un posible dilema de administración de recursos entre el sistema inmune, producción del exoesqueleto y producción de huevos en el grillo común *Acheta domesticus*. La melanina es elaborada a partir de la fenilalanina un aminoácido que el insecto no es capaz de producir y que sólo es obtenido a través del alimento (Siva-Jothy 2000, Zografou y cols. 2001, Klowden 2000). El hecho de que la melanina sea continua y fuertemente utilizada para estas tres funciones (ver abajo) (Zografou y cols. 2001, Kim y



cols. 2005, Schmid-Hempel 2005). Hace de esto un buen candidato para poner a prueba la teoría de la asignación diferencial de recursos, ya que están directamente vinculadas con la adecuación del organismo y son constantes las demandas de melanina durante los diferentes estadios de desarrollo de los insectos.

### **1.1 Sistema Inmune**

El sistema inmune de los insectos es innato. A mayor escala se puede dividir en un primer nivel de defensa llamado “pasivo”, dado por el tegumento que solo funciona como barrera física, y un segundo nivel llamado “activo” constituido por la hemolinfa y la producción de citotoxinas en el área atacada (Lavine y Strand 2002). El nivel activo se da en la hemolinfa y no se basa en un mecanismo antígeno-anticuerpo, por lo tanto carece de una memoria inmunológica como ocurre en vertebrados. Sin embargo, puede reconocer y eliminar eficientemente agentes y tejidos extraños que hacen contacto con la hemolinfa, mediante dos tipos de respuesta, celular y humoral (Maramorosch y Shope 1975). La respuesta celular se desencadena contra agentes infecciosos de gran tamaño (p. ej. metazoarios) y es llevada a cabo por los hemocitos circulantes en la hemolinfa (Gillespie y Kanost 1997). Los componentes del sistema inmune celular son variados: los granulocitos al encontrar un agente extraño, lo fagocitan mientras secretan enzimas hidrolíticas que sirven para romper la membrana de las células de los patógenos, en dípteros los lamelocitos reconocen al patógeno (las moléculas que pueden ser reconocidas son los lipopolisacáridos, peptidoglicanos y  $\beta$ 1-3 glucanos); las enzimas proteasas activan a la enzima profenoloxidasa y esta, a su vez, a la fenoloxidasa (Tzou y cols. 2002, Cerenius y Söderhäll 2004, Nappi y Christensen 2005). La fenoloxidasa convierte los fenoles en quinonas y, mediante una reacción no enzimática, las quinonas son convertidas a melanina (Tzou y cols. 2002, Cerenius y Söderhäll 2004, Nappi y Christensen 2005). La melanina se adhiere a la pared de los patógenos para formar una cápsula, la cual aísla e impide el desarrollo del patógeno (Söderhäll y Cerenius 1998, Cerenius y Söderhäll 2004, Christensen y cols. 2005), y finalmente, durante la melanogénesis se producen intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno que son muy tóxicos para los patógenos y que podrían ser la causa principal de la muerte de estos por melanogénesis (Lanz-Mendoza y cols. 2002, Christensen y cols. 2005, Nappi y Christensen, 2005).

La respuesta humoral produce péptidos antimicrobianos que atacan bacterias gram-negativas, gram-positivas y hongos (Hetru y cols. 1998, Steiner 2004). Los péptidos se producen en el núcleo de la células del cuerpo graso mediante una señal que recibe de los receptores de membrana activados (Hultmark 2003, Hetru y cols. 2003). La función de los péptidos es desestabilizar la membrana celular mediante el desplazamiento de lípidos (Zasloff 2002).

Los costos de respuesta inmune no son triviales. Estos pueden ser de dos tipos: La manutención del sistema inmune (la maquinaria puesta para responder ante una acción patógena) sin importar si es atacado o no y el desencadenamiento de la respuesta una vez que se enfrente a un agente potencialmente patógeno (Schmid-Hempel 2003, Rolff y Siva-Jothy 2003, Schmid-Hempel 2005). Los costos de desencadenar la respuesta se entienden como la necesidad de producir elementos de defensa (péptidos y producción ) a partir de un recurso limitado y necesario para otras funciones vitales. En el caso de la respuesta celular se propone que puede ser la melanina elaborada a partir de la fenilalanina (Siva-Jothy 2000, Zografou y cols. 2001) mientras que para la humoral es la grasa, ya que la principal fuente de producción de péptidos son los cuerpos grasos (Hetru y cols. 2003).

## **1.2 Producción de Exoesqueleto**

Todos los insectos presentan un exoesqueleto de constitución dura, insoluble e hidrofóbica (Kramer y cols. 2001). Esta estructura es de gran tamaño puesto que comprende toda la superficie del animal además de las tráqueas respiratorias, el tracto digestivo y el ducto reproductor (Wigglesworth 1972). Su principal función es conformar una barrera que evite la desecación por pérdida de agua, la penetración de organismos patógenos, la entrada de elementos químicos del medio ambiente así como insecticidas. Al mismo tiempo juega un papel estructural, al determinar el tamaño de los insectos y servir de sitio de anclaje para los músculos (Klowden 2002, Andersen 2003). La cutícula de los insectos está compuesta por proteínas, lípidos y quitina (Klowden 2002). Las proteínas y la quitina interactúan para dar la resistencia y dureza que requiere la función mecánica del exoesqueleto. Los lípidos proveen protección a las capas superficiales, al ser la primera barrera en contacto con el medio ambiente. Otros componentes de la cutícula son los fenoles, los cuales están generalmente involucrados en las reacciones de melanización dentro de la procutícula, que estabiliza la matriz de proteínas (Klowden 2002).

La producción del nuevo exoesqueleto inicia en el momento en que las células epidérmicas se separan del viejo exoesqueleto. El crecimiento puede continuar hasta el momento en que el exoesqueleto adquiere su dureza y resistencia características que conllevan a garantizar la protección a los órganos internos, a este proceso se le denomina esclerotización o melanización (Klowden 2002, Andersen 2003). Los precursores de la esclerotización se derivan del aminoácido tirosina en tres pasos enzimáticos; Primero la tirosina es hidroxilada para convertirla en DOPA la cual es descarboxilada a dopamina seguido por la acilación del grupo amino de la dopamina para formar las catecolaminas (N-acetil dopamina "NADA", N-β-alanil-dopamina). Una vez que las catecolaminas son liberadas en la cutícula son oxidadas por la fenoloxidasa para formar quinonas (Andersen y cols. 1996, Klowden 2002).

Los costos de producir un nuevo exoesqueleto son altos y continuos: se puede considerar que es la principal inversión de los insectos ya que en algunos grupos comprende aproximadamente la mitad de su peso seco (Klowden 2002). No tan solo esto, la producción del exoesqueleto se da varias veces en la vida del animal lo cual supone un gasto enorme de melanina en la vida (Borror y cols. 1992).

### **1.3 Corion de los Huevos**

Este es la capa externa de los huevos, las funciones vitales en que participa son: protección mecánica, regulación de la fertilización por medio del micrópilo, permite el intercambio de gases tanto al aire libre como en el agua, protege de la evaporación, en algunos casos pueden absorber agua del medio ambiente y permite la salida de la larva al termino de la embriogénesis (Margaritis 1985, Wheeler 2003). En términos prácticos el corion es la membrana que funge como barrera que separa el vitelo del medio ambiente. Está compuesto de distintas capas, las cuales son secretadas por el epitelio folicular dentro de las ovariolas una vez que empieza la vitelogénesis (Klowden 2002). La primera capa es una membrana inerte no celular que funciona como envoltura del vitelo, la siguiente capa es una delgada capa llamada capa externa, sobre la cual se depositan varias capas del corion. Dichas capas son el endocorion sub dividido en dos capas: endocorion interno y endocorion externo, y el exocorion capa compuesta de carbohidratos y proteínas (Klowden 2002).

Después de la oviposición los huevos sufren cambios en su apariencia física, aumentan la resistencia a detergentes y componentes corrosivos, así mismo en la fuerza y resistencia mecánica mediante procesos similares a los que suceden en la esclerotización del exoesqueleto. Durante la esclerotización del corion participan dos enzimas la peroxidasa y la fenoloxidasa, encargadas de estabilizar la matriz de proteínas para obtener las propiedades físicas de la capa protectora. La peroxidasa cataliza la formación de ditirosina a través de residuos de tirosina en proteínas estructurales; se sabe que también participa en la melanización del corion ya que es capaz de oxidar dopa y dopaquinona. Sin embargo, es difícil determinar qué tanto contribuye en la melanización. La profenoloxidasa es la encargada de desencadenar el proceso de melanización mediante la oxidación de dopa y dopaquinona en la melanización del exoesqueleto. En la mayoría de los casos esto se detecta por el cambio de color que se percibe en los huevos (Li y cols. 1996, Kim y cols. 2005, Li y Li 2006). Nuevamente, al igual que con el exoesqueleto, la melanina es fuertemente utilizada.

En este trabajo, utilizando la lógica de que la melanina puede ser utilizada para la respuesta inmune celular, la producción de exoesqueleto y de huevos (muy probablemente, el corion), se puso a prueba la idea de que el uso de recursos para la respuesta inmune puede afectar las otras dos funciones. Para los retos inmunes se ha utilizado la inserción de un implante de nylon lo cual promueve la melanización por parte del grillo. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada de manera reciente en estudios de ecología y evolución de la respuesta inmune (revisado por Schmid-Hempel 2005).

#### **1.4 Biología del Grillo Común *Acheta domesticus***

La especie de estudio grillo común *A. domesticus* provee ventajas para poner a prueba la hipótesis de este proyecto. Estos animales son omnívoros y su crecimiento y producción de huevos está fuertemente influenciado por las vitaminas y minerales contenidos en la dieta (Woodring y cols. 1979). En las poblaciones naturales los adultos viven menos de cuarenta días (Murtaugh y Denlinger 1985) aunque en cautiverio los adultos viven en promedio 60 días, llegando en algunos casos a 70 siendo aún reproductivamente activos. El desarrollo ninfal dura de 40 a 50 días y cada estadio aproximadamente ocho días (Woodring y cols. 1988, Murtaugh y Denlinger 1985). Sin embargo, el tiempo de desarrollo es afectado por

las condiciones del cultivo y de los ciclos de luz (Nowosielski y Patton 1965), por ello es común observar diferencias en los tiempos entre distintos estudios con esta especie.

Poco después de llegar a la madurez comienza la producción de huevos (después de haber mudado los huevos son ovulados). La vitelogenénesis termina aproximadamente a los cuatro días después de la muda y a los siete los ovarios se llenan con huevos maduros. La cópula desencadena el mecanismo fisiológico para la oviposición. Aquí copula, después de este estímulo, las hembras tardan entre tres o cinco días para oviponer, aunque en caso de ser hembras de más de dos semanas de edad solo tardan 24 hrs. En promedio ponen de 25 a 30 huevos por día pero esta tasa disminuye después de los 60 días y continúa más allá de los 70 días (Murtaugh y Denlinger 1985). Para el crecimiento de los ovarios o para madurar los huevos no se requiere de la presencia de los machos (Woodring y cols. 1979), una vez que la hembra ovula, la producción de huevos continúa hasta la máxima capacidad de carga de la hembra (400 a 100 huevos) y al llegar a este límite la oogénesis se detiene (Woodring y cols. 1988). Esto debido a que la puesta de huevos no inicia sin el previo estímulo del macho. Sin embargo, un solo espermatóforo es suficiente para estimular la oviposición (de forma continua y constante) durante 60 días. No obstante el número de cópulas no tiene efecto sobre el número de huevos que se producen antes de llegar a los 60 días de edad (Murtaugh y Denlinger 1985). Otro factor a considerar como efecto sobre la oviposición es la disponibilidad de sustrato; las hembras retienen los huevos fecundados hasta encontrar el sustrato adecuado para su desarrollo (Murtaugh y Denlinger 1985).

El grillo común vive en grupos, donde ambos sexos constantemente están compitiendo por alimento y espacio (Nosil 2002). Los machos defienden territorios en cavidades donde las hembras llegan a copular con ellos y en las contiendas por pareja los machos más grandes y residentes del territorio son los ganadores (Hack 1997). Para atraer a las hembras los machos producen estridulaciones con las alas y las hembras los localizan por fonotaxis (Gray 1997). Las hembras eligen a los machos en función de las señales acústicas que emiten las cuales son un carácter que refleja la calidad del macho (Gray 1997) ya que el tamaño del macho está positivamente correlacionado con el número de pulsos por estridulación (Kiflawi y Gray 2000). Así mismo el número de pulsos se correlaciona con la cantidad de hemocitos, fungiendo como indicador de una alta capacidad para encapsular a los macropatógenos (Ryder y Siva-Jothy 2000). Algunos de los organismos patógenos que más comúnmente atacan a *A. domesticus* son los

protozoarios *Gregarina macrocephala*, *Gregarina ovata*, *Crithidia léger* (Schittner y McGhee 1970); los nematodos *Steinernema scapterisci* (Nguyen y Smart 1992), *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora* (Gaugler y Cui 1994); y el hongo *Metarhizium anisopliae* (Ginsbery 2002).

## 2. Antecedentes

Estudios de posibles compromisos entre la función inmune y otras funciones donde la melanina puede ser el centro del dilema son escasos. En el grillo *Grillus bimaculatus*, la encapsulación por melanina correlacionó negativamente con el tamaño y tiempo de desarrollo en ambos sexos (Rantala y Roff 2005). Aunque en este estudio se sugiere que la melanina es el centro del conflicto, no se discute el posible mecanismo. Esta falla, de no tratar de entender el mecanismo, es de hecho muy común en la literatura (Zera y Harshman 2001, Zuk y Stoehr 2002). Sin embargo, un caso muy particular donde el mecanismo se trató de dilucidar es el estudio experimental de Zografou y cols (2001) donde se demostró, mediante un inhibidor del tirosina, que la deficiencia de este aminoácido conlleva a una mal formación del corion lo cual directamente afectaría la asignación de melanina en los huevos, algo que también se ha sugerido para el exoesqueleto (Andersen y cols. 1996). Una última fuente de información ha surgido de estudios con *Drosophila melanogaster*. En esta mosca, las líneas seleccionadas genéticamente para tener una mejor respuesta ante parasitoides presentaron una menor habilidad competitiva por el alimento y una de las posibles causas planteadas es que al asignar más melanina a la respuesta inmune, la mosca tarda más en esclerotizar el aparato bucal (Fellowes y cols. 1998).

### **3. Justificación**

Dado que el compromiso de asignación de recursos es la esencia en el entendimiento de la evolución de las historias de vida, en este trabajo se investigó si en *A. domesticus*, la asignación de recursos a la respuesta inmune limita la expresión de otras funciones.

### **4. Hipótesis**

Los grillos (*Acheta domesticus*) que asignen melanina para desencadenar la respuesta inmune celular afectarán negativamente la producción de exoesqueleto en ambos sexos y número o tamaño de huevos así como supervivencia en las hembras.

### **5. Objetivo General**

Investigar si en el grillo común (*Acheta domesticus*) la elaboración de respuesta celular vía melanización afecta negativamente la producción de exoesqueleto en ambos sexos mientras que en hembras adultas se compromete el número y/o tamaño de los huevos.

#### **5.1 Objetivos particulares**

- 1 Determinar si el uso de la melanina en la respuesta inmune celular durante el desarrollo afecta negativamente la producción de exoesqueleto en ambos sexos. Visto esto en términos de un menor tamaño del animal o menor área del exoesqueleto.
- 2 Determinar si el uso de melanina en la respuesta inmune celular tiene como consecuencia una reducción el número y/o tamaño de los huevos en las hembras y menor supervivencia.



## 6. Metodología

### 6.1 Diseño Experimental

En términos generales el diseño experimental consistió en dirigir la inversión de melanina hacia la respuesta inmune, mediante la inserción de un número variable de implantes de nylon en el cuerpo del animal y esperar efectos negativos en términos de producción de exoesqueleto (en ambos sexos), número y/o tamaño de los huevos en hembras adultas.

#### 6.1.1 Cría y Mantenimiento de Grillos

Los grillos se obtuvieron del vivario de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala (Universidad Nacional Autónoma de México). Para cada nueva colonia experimental se tomaron huevos de un sólo día de puesta utilizando sustrato de oviposición *Peat moss* (sustrato para terrarios). Los huevos permanecieron en condiciones de temperatura de  $26 \pm 2$  °C con periodos de luz/oscuridad de 12 horas, manteniendo el sustrato con humedad constante hasta la eclosión. El tiempo de eclosión fue de aproximadamente dos semanas bajo estas condiciones.

Cada nueva colonia se mantuvo en condiciones de laboratorio, en cajas de madera (1 m x 1 m x 1m) con una lámpara de 40 watts y contenedores de cartón, para huevos de gallina, que servían como refugio. Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de luz y temperatura que los huevos, con una dieta *ad libitum* de agua y alimento balanceado (*Purina* para pollos y alimento para tortugas en proporciones de 50% y 50%). En general estas son las características para el buen mantenimiento de estos animales en cautiverio (R. Cueva del Castillo, com. pers.).

#### 6.1.2 Inserción del Implante

La inserción del implante se realizó usando pinzas de disección, colocándolo en la membrana intersegmental de los tergitos del segundo y tercer segmento abdominal orientado de forma paralela al exoesqueleto para evitar daño a órganos internos (Fig. 1). El implante era un pequeño filamento de nylon transparente de 1.5 mm. de largo y 0.3 mm. de diámetro que simula la presencia de un patógeno desencadenando la respuesta inmune melanótica vía formación de una cápsula (ver Rolff y Siva-Jothy 2003, Nappi y Christensen 2005). Durante el tiempo de la infección artificial, el implante se rodea de

melanina como parte de la respuesta celular (Rantala y cols. 2002). Previo a la inserción, el implante fue desinfectado en etanol al 100%, con el fin de evitar infecciones por micropatógenos.



Fig. 1. Implante insertado en el tercer segmento abdominal en un individuo del grillo común *Acheta domesticus*.

#### 6.1.3 Respuesta Inmune en Función del Tiempo

Previo a los tratamientos, se estimó el tiempo en que la respuesta por melanización se completa. Esto permitió establecer el tiempo mínimo necesario que el implante debe permanecer dentro del grillo y el momento en que el animal detiene la aportación de melanina al implante. Con este fin, se dividieron seis grupos de 10 individuos (cinco hembras y cinco machos cada grupo) con diferentes tiempos de reto inmunológico. En el primer grupo el implante se dejó dentro del animal por seis horas mientras que en los siguientes grupos el implante se dejó por seis horas más de forma aditiva hasta llegar a 36 horas (grupos de 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas).

#### 6.1.4 Comparación entre Sexos

Se investigaron posibles diferencias sexuales en cuanto a la cantidad de melanina que se deposita en el implante. Esto como una consideración para el experimento de los efectos de la respuesta sobre el exoesqueleto donde se utilizaron ambos sexos. Para ello, se usaron grupos de diez hembras y diez machos adultos de dos semanas de edad, a los cuales se les insertó un implante de nylon. El implante permaneció dentro del grillo por treinta horas, para posteriormente medir el área de melanina que recubre el implante.

## **6.2 Respuesta Inmune y Producción de Exoesqueleto**

En este primer experimento se utilizaron grillos que fueron mantenidos en el laboratorio desde huevos. Una vez que estos animales alcanzaron la cuarta muda se colocaron de forma individual en recipientes de plástico (95.4 x 80.1 mm) Para evitar la competencia intraespecífica que pueda afectar el desarrollo, con dietas *ad libitum* y condiciones de luz y temperatura controlada hasta alcanzar la quinta muda. De estos animales se eligieron para el experimento aquellos organismos de talla media, para evitar diferencias de tamaño entre grupos.

Los animales se dividieron de forma aleatoria en cinco grupos de 32 individuos los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones que antes. Un grupo fue designado como control, al cual no se le realizó ningún tipo de manipulación. Dos grupos más recibieron el tratamiento que consistió en la inserción de un implante y dos implantes respectivamente. El implante se recambió cada siete días, con la idea de mantener un reto inmunológico constante. Los dos grupos de grillos restantes fungieron como testigos de manipulación para los grupos con implante, en cada caso se infligió el daño físico causado por una o dos inserciones pero el implante se retiró evitando así la encapsulación del mismo (esta manipulación, al igual que los grupos con implante dentro, se realizó cada siete días). El experimento inició en la quinta muda, continuó durante la sexta muda y finalizó cinco días después de haber llegado a la séptima o última muda que es cuando el animal ya es adulto. El tiempo aproximado que los animales experimentales tuvieron el implante dentro fue de 22 días.

Se midió el área de melanina que rodea al implante como parámetro del costo infligido por los tratamientos y se calculó el efecto de éste sobre el tamaño final del grillo y el área de exoesqueleto fabricado.

### 6.2.1 Medición de Melanina depositada en el Implante

Una vez que se ha completado la respuesta inmune (30 horas como mínimo ver resultados de tiempo para completar la respuesta inmune) el implante se retiró cuidadosamente y se fijó en etanol al 70%. La cubierta de melanina se cuantificó en milímetros cuadrados, utilizando un programa para medir imágenes (Image Tool ® 3.0) (Fig. 2). Para esto, el implante fue previamente fotografiado utilizando una cámara digital (OLYMPUS C-5050)

instalada en un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZH10 -1.5X-). Se mantuvo siempre la misma distancia de acercamiento al implante por el microscopio para evitar diferencias en tamaño entre fotografías.



Fig. 2. Capas de melanina depositada sobre el implante después de 32 hrs. Visto al microscopio estereoscópico (1.5X).

#### 6.2.2 Tamaño Corporal del Grillo Adulto

Como una posible forma de respuesta a los retos, se midió el tamaño de los animales al finalizar el experimento. El tamaño se obtuvo tomando el largo total, que va de la parte anterior de la cabeza a la parte posterior del último segmento abdominal, así como el ancho el cual se toma del segundo segmento del tórax. Estas medidas fueron tomadas una vez finalizado el experimento y que los grillos habían sido preservados en alcohol al 70%. Estas dos medidas se tomaron para saber si difieren y con base a esto definir, cuál de las dos usar para las comparaciones posteriores.

#### 6.2.3 Área del Exoesqueleto

Las mediciones del área de exoesqueleto se realizaron con base en el método propuesto por Neville (1983). Se cortó el primer par de patas (desde la base de la coxa) de cada animal, y se colocaron en etanol al 70%. Éste funciona como conservador y fijador eliminando el agua contenida en los tejidos. Las estructuras se colocaron en un crioprotector (solución de sacarosa al 30%) para evitar la ruptura de los tejidos al momento de congelarlos. Se

realizaron cortes transversales de la región media del fémur, de 10 micras de grosor utilizando un criostato a una temperatura de entre -27 a -30°C. Una vez obtenidos los cortes, se midió el área del exoesqueleto en milímetros cuadrados con el programa Image Tool ® Versión 3.0. Previo a esto se fotografiaron los cortes utilizando una cámara digital (OLYMPUS C-5050 zoom) en un microscopio óptico (OLYMPUS SZH10 -1.5X-) con un aumento de 10X (Fig. 3).

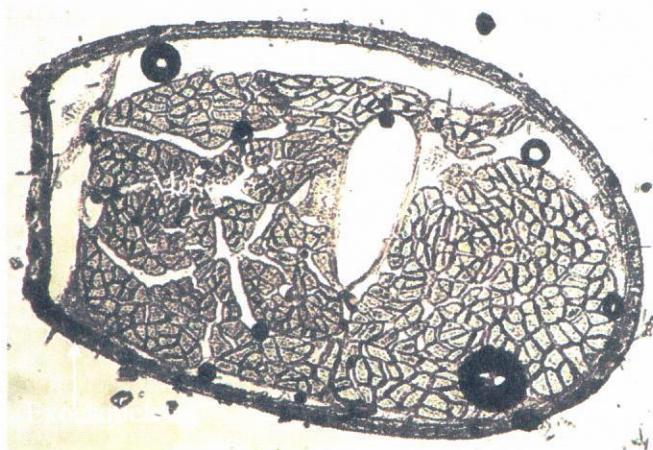


Fig. 3. Corte transversal de la pata anterior con 10 micras de grosor. Donde se indica el musculo y el exoesqueleto de esta estructura. Visto al microscopio óptico (10X).

### 6.3 Respuesta Inmune, Producción de huevos y Supervivencia en Hembras

En este segundo experimento al igual que en el anterior, los grillos se separaron de forma individual en el cuarto estadio. El experimento inició a las dos semanas de haber llegado a la madurez, tiempo en el que el animal presenta conducta sexual normal (Murray y Cade 1995).

Previo a la manipulación experimental y ya como adultas (a las dos semanas), cada una de las hembras vírgenes se colocó por separado con un macho durante cuatro días. En este tiempo se observó que las hembras hubieran copulado al menos una vez; esto es importante ya que la cópula induce la oviposición durante los siguientes 60 días (Margaritis 1985). Las hembras, ya sin macho, se distribuyeron de forma aleatoria en cinco grupos de 20 hembras y a cada grupo se le asignó un tratamiento de la misma manera que el primer experimento: control, inserción de un implante, dos implantes y los testigos de

manipulación para los grupos con implante, recambiando el implante cada siete días durante tres semanas.

#### 6.3.1 Producción de Huevos

Se obtuvieron huevos durante las tres semanas que duró el experimento. Para este fin, los días uno y cuatro después de haber insertado cada implante, se colocó sustrato de oviposición durante 24 horas, obteniendo así los huevos producidos previo a la disponibilidad de sustrato. El sustrato no permaneció disponible por más de 24 horas para evitar la proliferación de hongos (obs. pers.). Conforme se obtuvieron los huevos, estos se preservaron en etanol al 70% para posteriormente realizar un conteo de los huevos puestos por individuo en cada semana. Se comparó el número total de huevos producidos entre tratamientos así como el número de huevos producidos por semana, para poder considerar el efecto del implante con respecto al tiempo.

#### 6.3.2 Tamaño de los Huevos

El tamaño promedio de los huevos se estimó solo para la primera y segunda semana, dado que el efecto acumulado de los implantes se observó hasta el final del tratamiento. Entonces se tomaron muestras de 10 huevos por individuo de cada semana, se fotografiaron utilizando una cámara digital (OLYMPUS C-5050 zoom) instalada en un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZH10) y se midió el área de cada huevo con el programa Image Tool® versión 3.0. Se compararon las áreas entre tratamientos con respecto al control por semana y de forma pareada entre las semanas dos y tres.

#### 6.3.3 Supervivencia

Una vez que se insertó el primer implante, se inició un registro de supervivencia cada tercer día hasta el último día de la manipulación experimental. Se comparó el mínimo de días de vida entre tratamientos.

## 7. Resultados

### 7.1.1 Respuesta Inmune en Función del Tiempo

La cantidad de melanina que se depositó en la superficie del implante aumentó con el tiempo pero se estandarizó al final (Fig. 4). Los grupos de menos horas con el implante difirieron de aquellos que tuvieron más tiempo ( $F_{5,54} = 4.21$   $p = 0.002$ ), en donde los grupos de seis, 12, 18 y 24 horas formaron un conjunto similar (prueba de Post hoc de Fisher  $p > 0.05$ ) mientras que los de 30 y 36 formaron un conjunto diferente del anterior (prueba de Post hoc de Fisher  $p < 0.05$ ). Así mismo los grupos de 24 y 30 horas fueron similares (prueba de Post hoc de Fisher  $p > 0.05$ ). Estos resultados sugirieron que después de 24 horas no hay cambios mayores; es decir el proceso de melanización se ha completado.

### 7.1.2 Comparación entre Sexos

La cantidad de melanina depositada en el implante fue similar para machos y hembras ( $U = 42$   $p = 0.57$ ; Fig. 5).

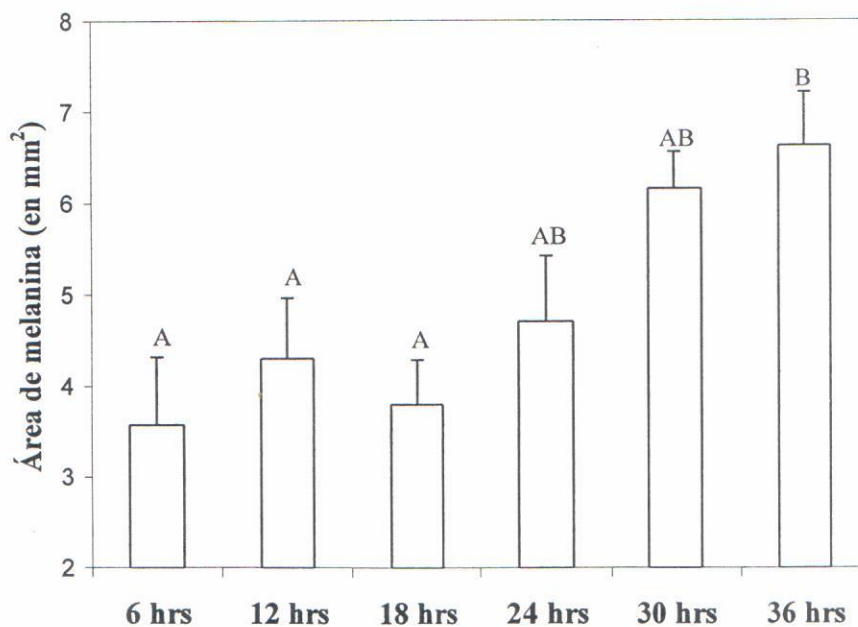


Fig. 4. Respuesta inmune en función del tiempo (media y error estándar). Las letras similares indican que no hay diferencias estadísticas, Por ende las letras diferentes señalan diferencias estadísticas (N = 10 para cada grupo).

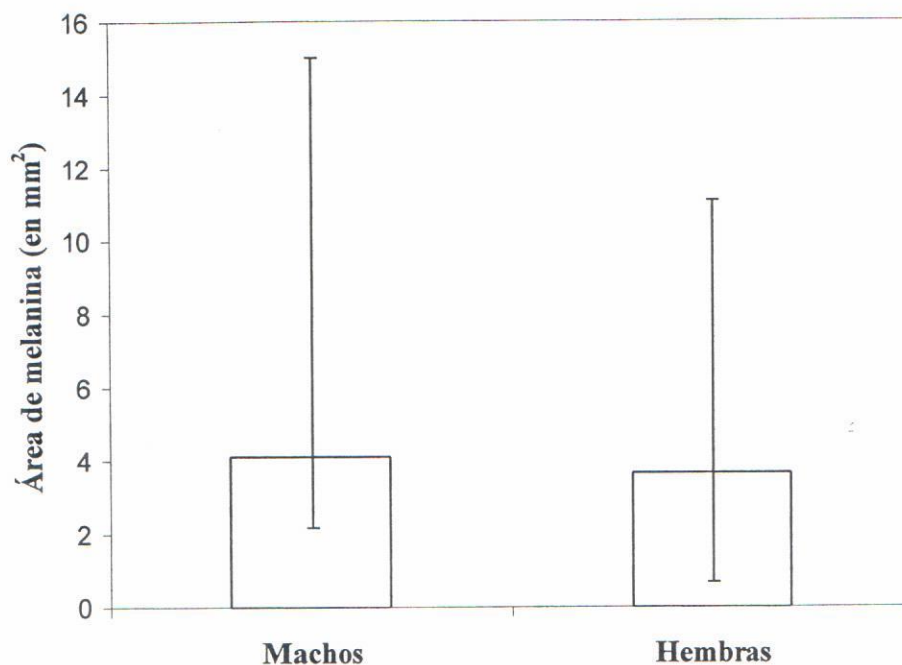


Fig. 5. Comparación de respuesta inmune entre sexos después de 30 horas. Las barras representan la mediana y los bigotes el máximo y el mínimo (N = 10 por cada grupo).

## 7.2 Respuesta Inmune y Producción de Exoesqueleto

La cantidad de melanina depositada en la superficie del nylon difirió si se tuvo uno o dos implantes ( $U = 1$ ,  $p = 0.0006$ ), donde el tratamiento con dos implantes presentó mayor cantidad de melanina (Fig. 6).

### 7.2.1 Tamaño Final del Grillo adulto

El largo del cuerpo está directamente correlacionado con el ancho ( $N = 71$ ,  $r = 0.68$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 7). Con base en este resultado utilicé el largo como medida de talla corporal.

El tratamiento experimental tuvo un efecto significativo en el tamaño que alcanzaron los adultos ( $F_{4,78} = 2.93$ ,  $p = 0.03$ ): en el grupo de dos implantes el tamaño fue significativamente menor comparado con el grupo control y los testigos (prueba de Post hoc de Fisher  $p < 0.05$ ). No obstante, el tratamiento de un implante solamente marcó una tendencia a reducir el tamaño (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.07$ ; Fig. 8).



### 7.2.2 Área del Exoesqueleto

El efecto en el área de exoesqueleto producido fue positivo para algunos grupos experimentales ( $F_{4,72} = 3.12$ ,  $p = 0.02$ ): los grupos testigo tuvieron mayor área con respecto al control (prueba de Post hoc de Fisher  $p < 0.05$ ); el aumento fue más claro en el grupo de un implante (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.005$ ); y el grupo de dos implantes tuvo un área similar al del grupo control (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.8$ ; Fig. 9).

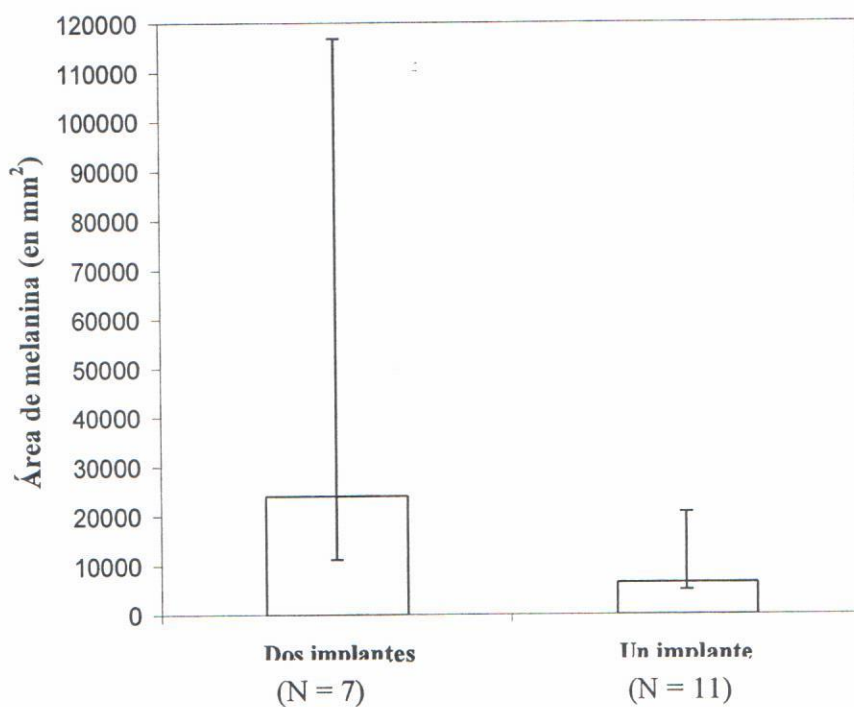


Fig. 6. Cantidad de melanina depositada según el número de implantes. Las barras representan la mediana y los bigotes el máximo y el mínimo.

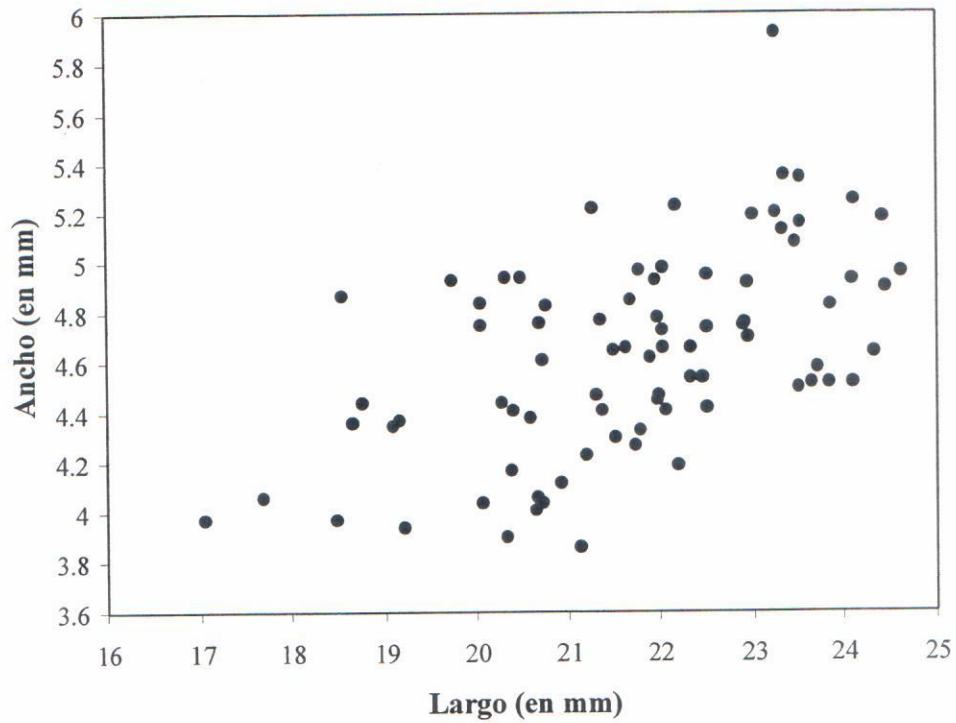


Fig. 7. Relación entre el ancho y largo del cuerpo en el grillo.

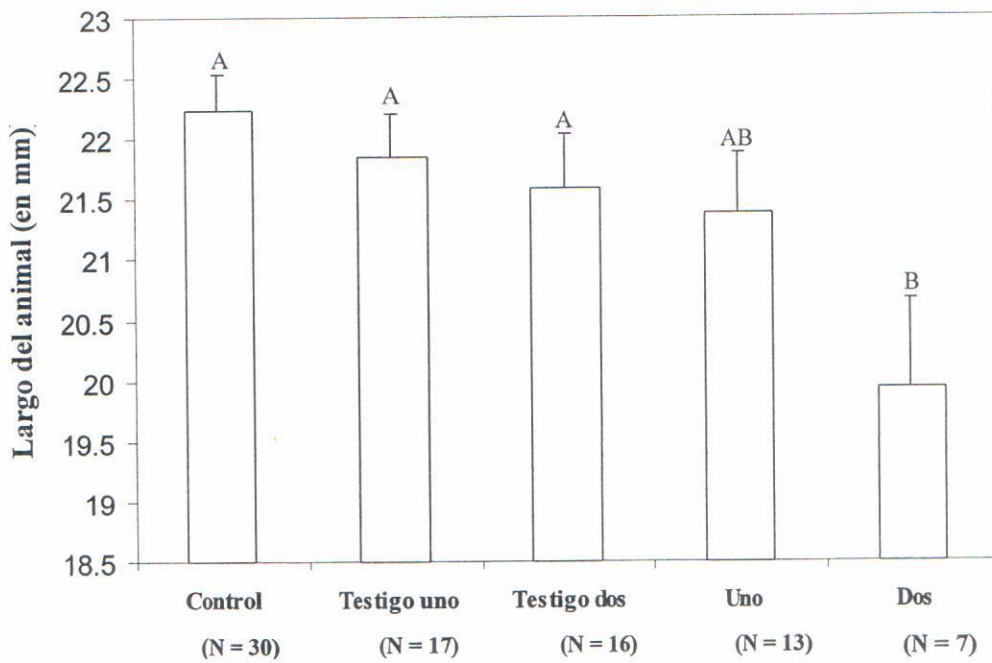


Fig. 8. Comparación entre tratamientos del tamaño del adulto. Las letras similares y diferentes muestran ausencia y presencia de diferencias significativas respectivamente.

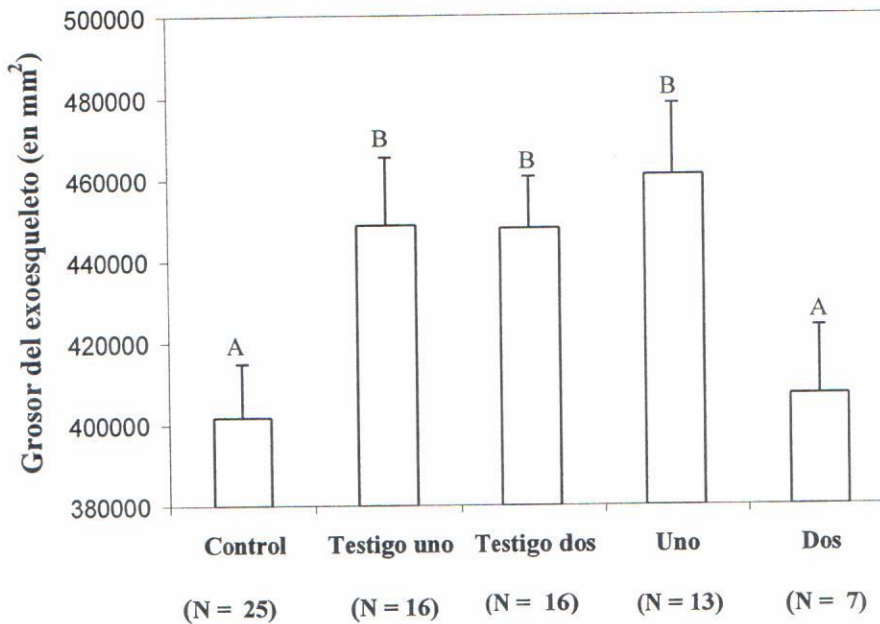


Fig. 9. Área del exoesqueleto en los grillos adultos. Las letras similares y diferentes muestran ausencia y presencia de diferencias significativas respectivamente.

### 7.3 Reto Inmune, Producción de Huevos y Supervivencia

#### 7.3.1 Número de Huevos

Hubo diferencias entre tratamientos del número de huevos puestos durante las tres semanas ( $F_{4,95} = 4.14$ ,  $p = 0.004$ ; Fig. 10). El grupo de un implante no presentó disminución en número de huevos (prueba de Post hoc de  $p = 0.81$ ). Los grupos testigo y dos implantes mostraron una reducción del número de huevos con respecto al grupo control (prueba de Post hoc de Fisher  $p < 0.05$ ). Esto es lo que se observó tomando el número total de huevos (Fig. 10).

Al analizar el número de huevos por semana, mediante un análisis de medidas repetidas, se detectó que las diferencias entre tratamientos se dieron hasta la tercera semana (Fig. 11), en donde no fue el tratamiento ( $F_{4,80} = 2.28$ ,  $p = 0.07$ ), ni el tiempo ( $F_{2,80} = 0.66$ ,  $p = 0.51$ ) lo que determinó las diferencias, sino la interacción de ambas variables ( $F_{8,80} = 3.33$ ,  $p = 0.002$ ).

Para la tercera semana, el grupo de un implante no disminuyó en número de huevos (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.3992$ ; Fig. 12); los grupos testigo y de dos implantes

ovipositaron menos huevos con respecto al grupo control (prueba de Post hoc de Fisher  $p < 0.05$ ), siendo el grupo testigo de dos implantes el que presentó el menor número de huevos (Fig. 12).

### 7.3.2 Tamaño de los Huevos

El tamaño de los huevos no presentó diferencias entre tratamientos en la segunda ( $F_{4,47} = 1.02$ ,  $p = 0.41$ ) y tercera semana ( $F_{4,37} = 2.20$ ,  $p = 0.09$ ). Sin embargo, los huevos producidos en la segunda semana no tuvieron el mismo tamaño que en la tercera semana por lo menos en un grupo ( $F_{9,81} = 2.29$ ,  $p = 0.02$ ; Fig. 13); la comparación pareada entre tratamientos de la segunda y tercera semana no mostró diferencia con respecto a sus controles (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.10$ ), ni entre los tratamientos de un implante (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.08$ ). El grupo de dos implantes tiene huevos de mayor tamaño en la tercera semana con respecto a la segunda (prueba de Post hoc de Fisher  $p = 0.02$ ) y entre los testigos no hubo diferencias significativas (prueba de Post hoc de Fisher  $p > 0.05$ ; Fig. 13).

### 7.3.3 Supervivencia

Los implantes tuvieron un efecto negativo en la supervivencia (Fig. 14). El tiempo que vivieron las hembras fue diferente entre los tratamientos ( $X^2 = 19.37$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0.00$ ). Los grillos de dos implantes murieron primero que los de un implante ( $X^2 = 6.917$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.00$ ), seguido de los testigos de dos y de un implante con valores intermedios (comparación entre testigo de un implante y testigo de dos implantes,  $X^2 = 1.131$ ; comparación entre testigo de un implante, de dos implantes y dos implantes,  $X^2 = 1.108$ ; comparación de toso estos grupos contra el de un implante,  $X^2 = 6.923$ ; todos  $p > 0.05$ ).

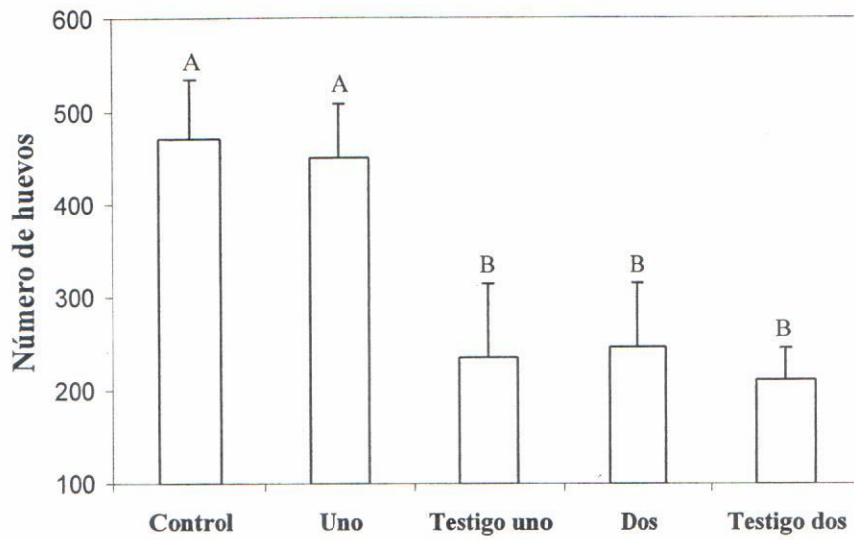


Fig. 10. Número de huevos producidos durante las tres semanas según el tratamiento experimental. Las letras similares y diferentes muestran ausencia y presencia de diferencias significativas respectivamente (N = 20 por cada grupo).

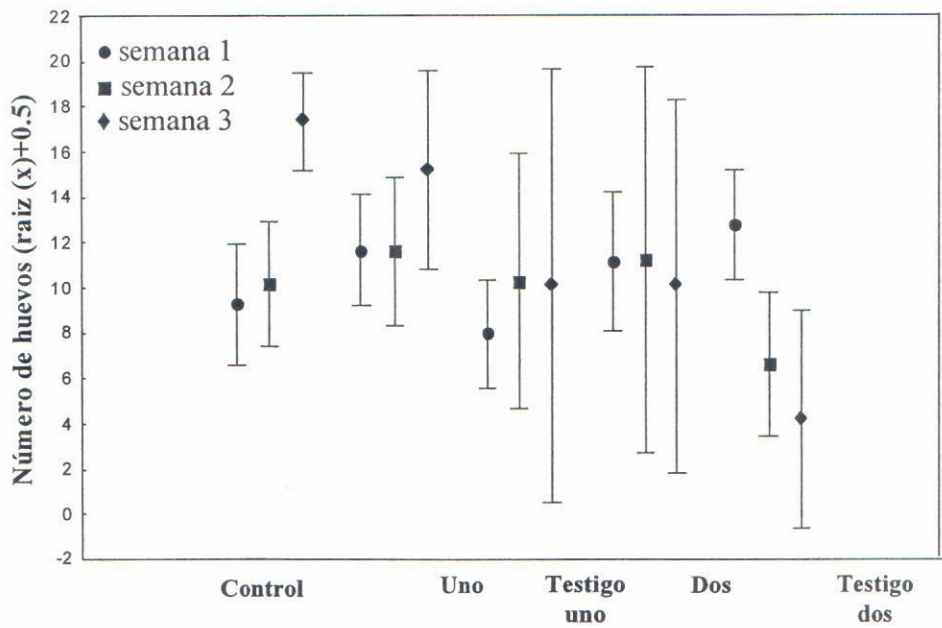


Fig. 11. Número de huevos producidos por semana según el tratamiento experimental.

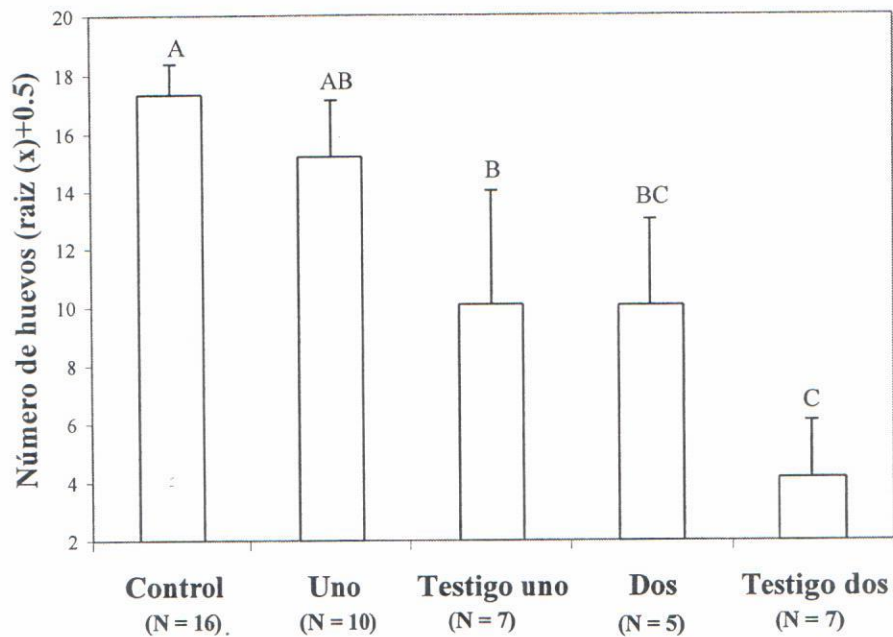


Fig. 12. Número de huevos producidos en la tercera semana según el tratamiento experimental. Las letras similares y diferentes muestran ausencia y presencia de diferencias significativas respectivamente.

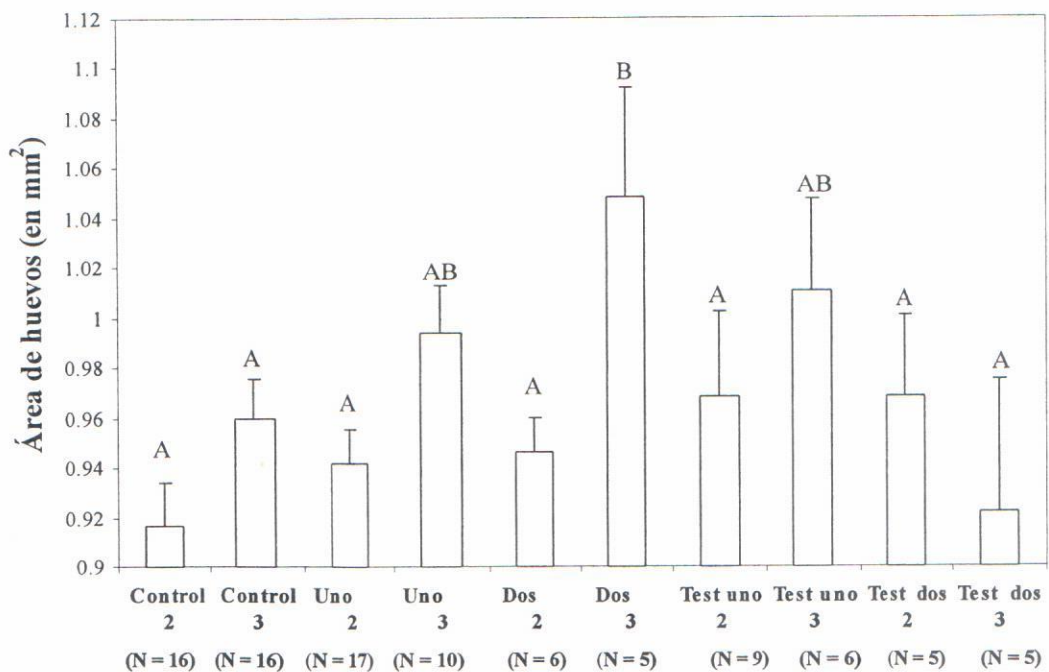


Fig. 13. Tamaño de huevos de la segunda semana y tercera semana según el tratamiento experimental. Los controles no difieren. Las letras similares y diferentes muestran ausencia y presencia de diferencias significativas respectivamente.

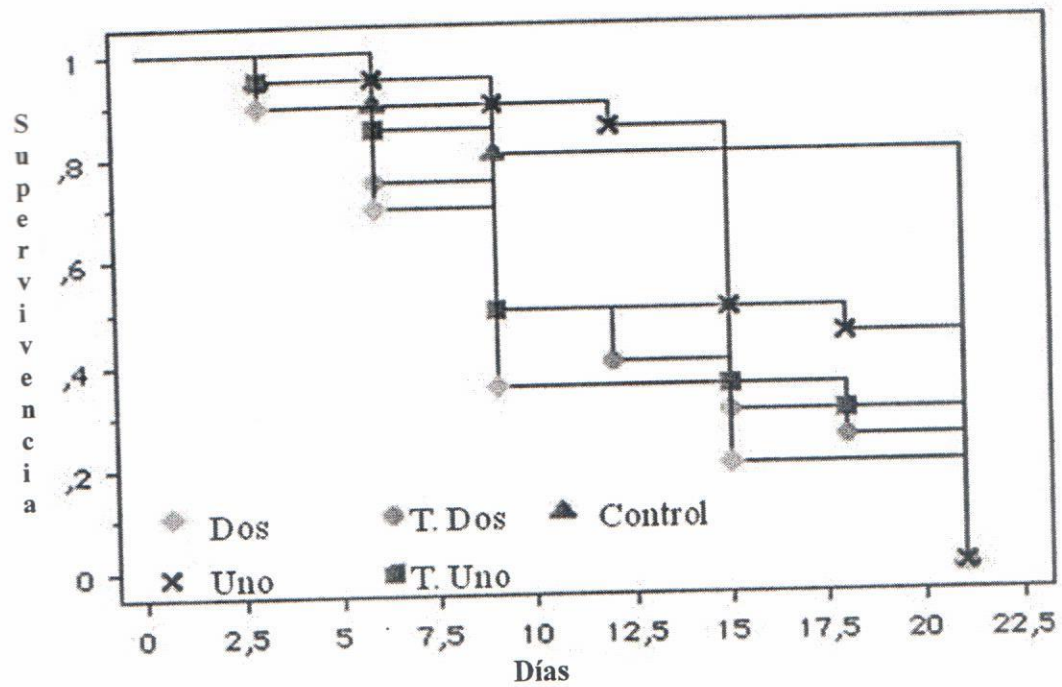


Fig. 14. Probabilidad de supervivencia con respecto al número de días por grupo según el tratamiento.

## 8. Discusión

Al momento de plantear que la respuesta inmune es costosa para los insectos, repetidamente se ha utilizado el argumento de un posible compromiso en asignación de recursos donde la melanina es el centro del dilema (Siva-Jothy 2000, Yourth y cols. 2003), dado que esta proteína es un recurso limitado (Siva-Jothy 2000) y demandado para varias funciones vitales importantes (Schmid-Hempel 2005, Zografou y cols. 2001). En esta tesis se puso a prueba la existencia de dicho compromiso entre una serie de funciones para las cuales la melanina se podría demandar en grandes cantidades y de forma regular durante la vida del animal. Para ello, se indujo la asignación de melanina a la defensa desencadenando de forma artificial y continuamente la respuesta inmune, y se esperó un efecto negativo en la producción de exoesqueleto y de huevos. Además, el efecto del tratamiento fue más intenso al retar al animal con dos implantes, nuestros resultados indicaron que hubo una doble deposición de melanina con los dos implantes. En otras palabras, someter con dos retos llevó a un dilema en la administración de recursos más evidente. Esta premisa básica, de verificar, si a mayor reto inmune se intensifica la inversión, no se había puesto a prueba en otros estudios. La importancia de esto radica en el hecho de que en muchos experimentos en este campo, no se obtienen dosis del reto y sus efectos. Esto tiene el inconveniente de usar probablemente dosis que hagan que el animal enfrente retos poco intensos y que oculte posibles dilemas de asignación de recursos. En el caso del presente trabajo, al menos permite ver, junto con los experimentos, que el aporte de melanina habría significado un gasto afectando las variables aquí documentadas.

De acuerdo con lo predicho, encontramos que la inversión en respuesta inmune a lo largo de dos mudas tiene un efecto negativo en el tamaño final que alcanza el grillo cuando adulto. Dicho efecto se observó claramente con dos implantes, ya que con un implante sólo se percibe una tendencia. Los grillos que tuvieron que asignar mayor cantidad de melanina para la respuesta inmune, redujeron su capacidad de alcanzar un tamaño adecuado, dado que el exoesqueleto fabricado determina el tamaño final que pueden alcanzar los individuos (Borror y cols. 1992). Las implicaciones y ventajas de llegar al estado adulto con tallas menores se dan principalmente en la competencia interespecífica, los grillos viven agregados de tal forma que constantemente están compitiendo por pareja, espacio y alimento. El efecto es distinto pero igualmente significativo para ambos sexos a juzgar por



este experimento y el que realicé donde los dos sexos aportan cantidades similares de melanina al implante. El tamaño de los adultos es una de las principales características que determinan quien será el vencedor en las contiendas entre machos por el acceso a las parejas (Hack 1997) y es un excelente indicador de condición para las hembras por estar correlacionado con la calidad del canto (estridulación), capacidad de competir por el alimento y defender territorios (Gray 1997, Nosil 2002, Savage y cols. 2005), así como con la capacidad de encapsular patógenos (Ryder y Siva-Jothy 2000). Por esta razón se entiende la fuerte selección a favor del tamaño en machos. Así mismo, las hembras también tienen que competir por alimento y sustrato de oviposición y se sabe que en condiciones de laboratorio el tamaño de la hembra adulta es un buen indicador de su fecundidad (Gray 1999). Por lo tanto, las ventajas de alcanzar un mayor tamaño son evidentes en ambos sexos.

Contrario a las predicciones, el área del exoesqueleto no se redujo. El tratamiento de un implante y los testigos lo aumentaron significativamente mientras que el de dos implantes produjo un área similar al control. Sin embargo, esto no necesariamente se contrapone con la idea del compromiso, ya que el grupo de dos implantes no aumenta el área del exoesqueleto a pesar de haber tenido el mismo estímulo que causó un mayor área en el resto de los tratamientos. Esto sugiere que al utilizar la melanina para desencadenar la respuesta inmune se reduce la disponibilidad de este recurso para fabricar el exoesqueleto, de tal manera que el tamaño es menor y no pueden aumentar el área del exoesqueleto, como medida para prevenir futuros ataques.

El área del exoesqueleto pudo haber aumentado como un reforzamiento de la primera línea de defensa, para impedir físicamente la entrada de patógenos (Andersen 2003). En el exoesqueleto, la melanina es un polímero que da rigidez a la cutícula durante la esclerotización y de esta dependerá la eficiencia evitar la penetración de ectoparásitos y patógenos (hongos, bacterias y parasitoides) (Hajek y St. Leger 1994, Wilson y cols. 2001). Ahora bien, los insectos tienen la capacidad de prevenir futuros ataques aumentando la inversión en algunos parámetros del sistema inmune como respuesta a estímulos anteriores, si una infección se repite la respuesta generada a partir de una infección similar es mejor en algunos o todos los parámetros (Rolff y Siva-Jothy 2003, Schmid-Hempel 2005, Jacot y cols. 2005). A este fenómeno se le conoce como "priming" inmunológico y puede generarse durante cualquier estadio del insecto y durar por días o incluso la fase de

adulto (Schmid-Hempel 2005). En el grillo *Gryllus campestris*, por ejemplo, a aquellos individuos que fueron infectados con patógenos vivos desde el penúltimo estadio, tuvieron una mayor actividad antibacteriana en la hemolinfa y concentración de profenoloxidasa en el estadio de adulto (Jacot y cols. 2005). En lo que se refiere a la melanización del exoesqueleto como prevención de futuros ataques se tiene que en el escarabajo *Tenebrio molitor* al encontrarse en colonias con alta densidad e incluso infectando experimentalmente a las larvas, los adultos presentan una mayor melanización del exoesqueleto confiriendo una mayor resistencia a bacterias y hongos entomopatógenos (Barnes y Siva-Jothy 2000, Moret y Siva-Jothy 2003). Así mismo en la mariposa *Spodoptera exempta*, las larvas que melanizan más la cutícula presentan mayor resistencia a hongos y parasitoides (Wilson y cols. 2001). Por tanto puede ser que el aumento en el área del exoesqueleto en el caso del presente estudio puede deberse a una especie de “priming” inmunológico. Esta inversión dirigida a aumentar el exoesqueleto, podría servir para evitar posibles ataques o reducir el impacto de estos en el futuro. Sin embargo la preparación inmunológica es costosa por demandar mayor asignación de recursos (Jacot y cols. 2005). Es posible que los grillos no puedan asignar más melanina, dado que durante las recurrentes infecciones los grillos utilizan melanina para desencadenar la respuesta inmune. Esta podría ser la explicación de porque los grillos con dos retos tuvieron un área de exoesqueleto similar al del grupo control.

En general se puede decir que tanto el tamaño como el área del exoesqueleto fueron afectados por los retos inmunológicos. Sin embargo dicha inversión puede seguir distintas estrategias. Quizás los animales pueden invertir más en área como prevención a futuros ataques, lo cual reduciría los costos por tener un menor tamaño coadyuvado por la inversión en el encapsulamiento.

Por otra parte, mi trabajo sugiere también otros costos para las hembras. Los implantes provocaron una reducción en el número de huevos que produjeron las hembras. Sin embargo, el efecto de asignar melanina a la encapsulación del implante no es claro, dado que los grupos testigo también mostraron una reducción en el número de huevos, incluso en el testigo de dos implantes la reducción es mayor que en el tratamiento. Considerando que los grupos testigo no enfrentaron el costo de melanización del implante y la reducción del número de huevos es distinta a la que se presenta en los tratamientos, propongo que el efecto observado en los grupos testigos lo generó un factor distinto a la

asignación de melanina al implante. Los posibles factores pueden ser el costo por cicatrización en el área dañada, mayor daño físico al hacer la manipulación o la infección por patógenos en la herida expuesta. Estos se discuten a continuación.

Primero, los grupos testigo podrían haber demandado mayor cantidad de fenilalanina para la cicatrización de la zona dañada, dado que el espacio es mayor sin el implante que sobresale al exoesqueleto y la cicatrización requiere de un tipo de fenoloxidasa (Ashida y Brey 1998, Cerenius y Söderhöl 2004). Sin embargo, los tratamientos también cicatrizan y además melanizan el implante, de tal manera que esto no explica un mayor efecto en los grupos testigo. Así mismo, dicho costo debería ser aun más evidente en el experimento de exoesqueleto (en exoesqueleto no hay un efecto negativo de los grupos testigo ver Fig. 8 y 9).

Segundo, la manipulación de los grupos testigo consistió en insertar y retirar el implante de la misma manera que en los grupos experimentales; el daño físico provocado en ambos casos consistió en romper el exoesqueleto y desgarrar el músculo, sin daño a órganos vitales (esto se percibe claramente en disecciones de organismos implantados) (obs. pers.). Tanto en los grupos testigo como en los tratamientos, el implante utilizado tiene las mismas características, por tanto el daño físico no puede ser mayor para alguno de los grupos.

Tercero, los grupos testigo quizás tuvieron mayor probabilidad de contaminación por micropatógenos ya que el proceso de coagulación requiere más tiempo por no tener el implante (en los experimentos con implante éste deja menor área expuesta). La infección por patógenos de pequeño tamaño (por ejemplo, bacterias) podría haber incrementado el reto inmune y de aquí sus costos desencadenando tanto la respuesta inmune celular (por el daño del implante) como humoral por los patógenos que penetran (Steiner 2004). Hay que destacar que los mecanismos de la respuesta humoral y celular son distintos, al generarse desencadenan distintas rutas fisiológicas (Gillespie y Kanost 1997), lo cual podría explicar que la disminución de huevos de los grupos testigo y tratamiento siguieran un patrón distinto. Sin embargo en un trabajo previo, Adamo (1999) estableció en esta misma especie que el número de huevos aumentaba cuando los grillos enfrentaron una infección bacteriana que les reduce significativamente las expectativas de vida, como estrategia ante una muerte inminente. Esto no se contrapone con la idea de los costos ya que la sobreproducción de huevos se da como estrategia de mayor asignación de recursos a una

implantes, sin embargo esto se puede descartar con los testigos de manipulación que presentan el mismo daño físico y no la misma tasa de mortalidad. Una causa más es la cuestión energética, por desencadenar reacciones enzimáticas constantes para la producción de melanina y producir huevos de mayor tamaño. La última causa a considerar es la autoinmunidad. El auto daño puede ser causado por intoxicación dado el gran número de compuestos tóxicos que se producen cuando se desencadena la cascada enzimática de la respuesta inmune o directamente por la respuesta inmune sobre los tejidos. En insectos este tema ha sido tratado en diferentes estudios teóricos (ver Vilmos y Kurucz 1998, Zuk y Stoehr 2002, Rolff y Siva-Jothy 2003, Schmid-Hempel 2005), sin embargo estudios específicos para entender el mecanismo y daño ocasionado por el sistema inmune son pocos (ver por ejemplo, De Gregorio y cols. 2002, Sadd y Siva-Jothy 2006).

Las muertes se dieron en un patrón distinto entre los grupos experimentales. Se puede ver que mueren primero los que tiene un mayor reto, después los grupos testigo seguidos de los que tiene un implante y sobreviven por mas días los del grupo control. Esto podría tener implicaciones en la interpretación de los resultados, dado que las comparaciones se dan entre los organismos que sobreviven a la manipulación experimental. No se puede descartar la posibilidad de que los datos del grupo con mayor reto solo reflejen la estrategia de los organismos resistentes, mientras que el resto de los grupos tienen mayor variación, por permitir la supervivencia de los organismos que no son tan resistentes.

De mis resultados, considero que la adecuación de las hembras si fue afectada por los tratamientos, como consecuencia directa del compromiso generado por el uso constante de melanina para desencadenar la respuesta inmune. Esto porque los efectos de los tratamientos son totalmente distintos a los generados en los grupos testigo. La estrategia para enfrentar el compromiso es interesante, ya que las hembras desencadenaron una mayor respuesta y aumentaron el tamaño de sus huevos para asegurar el éxito de la progenie. Estas ventajas vendrían a expensas del tiempo de vida y fecundidad de los grillos.

Los efectos observados en este trabajo se desarrollaron bajo una manipulación que permitió controlar distintas variables, de tal manera que en condiciones naturales el compromiso puede ser diferente, probablemente los efectos son más claros y evidentes, por vivir en condiciones de mayor competencia y menor disponibilidad de alimento.

## 9. Conclusiones

- 1- Después de 24 horas, los animales no aportaron más melanina al implante de nylon.
- 2- No hay diferencias entre sexos en el grado de melanización del implante.
- 3- Los animales con dos implantes depositaron más melanina que los de un implante.
- 4- El grupo de dos implantes tuvo un menor tamaño como adultos. Esto puede tener efectos negativos en ambos sexos. En los machos, pueden afectarse las oportunidades de cópula mientras que en las hembras se puede afectar la fecundidad.
- 5- Los grupos testigo engrosaron más el exoesqueleto seguido del grupo de un implante y al final (sin diferencias) el de dos implantes y el control. Esto se puede interpretar como una forma de anticipación inmunológica ante futuros ataques de naturaleza similar (entrada por el exoesqueleto).
- 6- Los grupos testigo de hembras y de dos implantes mostraron una reducción en el número de huevos puestos (detectados hasta la tercera semana) aunque sólo el grupo de dos implantes tuvo un tamaño menor de huevos comparado con los otros grupos. Estas diferencias sugieren que las hembras con dos implantes podrían responder de forma adaptativa si es que el tamaño de los huevos correlaciona con mayor probabilidad de supervivencia, lo cual es apoyado por estudios previos en esta misma especie.
- 7- Las hembras de dos implantes sobrevivieron menos seguido de las testigo de uno y dos implantes, grupo con un implante y control.
- 8- En general, ambos sexos “pagan” costos en factores de adecuación como resultado de elaborar una respuesta inmune vía melanización continua y regular.

## 10. Perspectivas

Los resultados obtenidos han dado pauta para hacer nuevos diseños experimentales para dar mayor sustento a las conclusiones de este proyecto así como responder nuevas interrogantes.

Aunque en principio el compromiso que encontramos podría aplicar a otros insectos, es decir, que el exoesqueleto y la producción de huevos son comprometidos por la respuesta inmune celular, sería conveniente hacer las mismas pruebas en especies de otros órdenes. De preferencia, se debería hacer esto con especies lo más distantes filogenéticamente. Esto ayudaría a saber si los resultados aquí mostrados suponen un principio general en insectos.

A diferencia de lo que se hizo en este estudio, se debería investigar la respuesta de las hembras que enfrenten un reto antes de llegar adultas. Esto para saber si la respuesta que se observó en este trabajo es similar si las hembras ya han tenido que enfrentar el compromiso durante el desarrollo. Para esto es necesario determinar los tiempos de producción de huevos y cuándo se detiene tal producción.

Los huevos de las hembras con dos implantes fueron más grandes y mi explicación es que estos huevos son de mayor "calidad". Esto podría comprobarse midiendo la supervivencia de las ninfas que vengan tanto de estos huevos como de otros de menor tamaño. Estos experimentos deberían hacerse en situaciones donde los animales enfrenten carencias alimenticias para simular condiciones de estrés.

En este trabajo se sugiere que podría existir preparación inmunológica ya que el individuo aumentó el área del exoesqueleto después de ser "infectado" artificialmente. Esto se debería poner a prueba de manera controlada incluyendo patógenos reales. La evidencia con otras especies de insectos sugiere que esta preparación existe pero no hay suficientes estudios.

Los individuos de dos implantes mueren antes que los otros grupos y una posible explicación es que el costo enfrentado sea el de autoinmunidad. Eso se debería evaluar

cuantificando los productos secundarios de la respuesta inmune que podrían ser tóxicos para el organismo. Algunos candidatos serían el óxido nítrico y radicales libres.

En mi trabajo sólo medí un parámetro de la respuesta inmune pero puede ser que otros parámetros también supongan compromisos. Algunos candidatos son la fenoloxidasa, enzimas hidrolíticas, óxido nítrico y número de hemocitos.

Así mismo, dado que aquí sólo se usaron retos artificiales, es necesario probar con patógenos vivos así como vías de infección distintas (por ejemplo, vía oral) para ver los efectos de desencadenar distintas rutas de la respuesta inmune.

Se carece de conocimiento básico que permita evaluar mejor la respuesta observada sobre el implante. Por ejemplo, sería conveniente determinar el tipo de células que participan; así, se podría conocer el costo de las distintas células incluyendo aquellas que no necesariamente forman la cápsula.

## 11. Referencias

- Adamo SA. 1999. Evidence for adaptative changes in eggs lying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Anim. Behav.* 57:117-124.
- Andersen S O. 2003. Exoskeleton. En: *Encyclopedia of Insects*. Resh VH y Cardé RT (eds). Editorial. Academic Press, San Diego. pp. 387-390.
- Andersen SO, Peter MG y Roepstorff P. 1996. Cuticular Sclerotization in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 689-705.
- Ashida M y Brey PT. 1998. Recent advances in research in the insect phenoloxidase cascade. En: *Molecular Mechanism of Immune Response in Insects*. Brey PT y Hultmark D (eds). Editorial. Chapman and Hall. London.
- Barnes A y Siva-Jothy MT. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. B.* 267: 177-182.
- Basolo A. 1998. Shift in investment between sexually selected traits: tarnishing of the silver spoon. *Anim. Behav.* 55: 665-671.
- Begon M, Harper JL y Townsend CR. 1990. *Ecology. Individuals, Populations and Communities*. Editorial Blackwell. Boston.
- Borror DJ, Triplehorn CA y Johnson NF. 1992. *An introduction to the study of insects*. Editorial Saunders college Publishing. New York.



- Braby FM. 1994. The significance of egg size variation in butterflies in relation to hostplant quality. *Oikos*. 71: 119-129.
- De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM y Lemaitre B. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *Embo. J.* 21: 2568-2579.
- Cerenius L y Soderhall K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116-126.
- Christensen BM, Jianyong L, Cheng CC y Nappi AJ. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends. Parasitol.* 21: 192-199.
- Clutton-Brock TH. 1983. The cost of reproduction to red deer hinds. *J. Anim. Ecol.* 52: 367-384.
- Czesar ME y Fox CW. 2003. Evolutionary ecology of egg size and number in a seed beetle: genetic trade-off differs between environments. *Evolution.* 57: 1121-1132.
- Fellowes MD, Kraaijeveld AR y Godfray HC. 1998. Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster* *Proc. R. Soc. Lond.* 265: 1553-1558.
- Fischer K, Zwaan JB y Brakefield MP. 2002. How does egg size relate to body size in butterflies?. *Oecologia.* 131: 375-379.
- Gray DA. 1997. Female house crickets, *Acheta domesticus*, prefer the chirps of large males. *Anim. Behav.* 54: 1553-1562.

- Gray DA. 1999. Intrinsic factors affecting female choice in house crickets: time cost, female age, nutritional condition, body size, and size-relative reproductive investment. *J. Insect Behav.* 12: 691-700.
- Gillespie JP y Kanost MR. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
- Hack MA. 1997. Assessment strategies in the contests of male crickets, *Acheta domesticus* (L.) *Anim. Behav.* 53: 733-747.
- Hetru C, Hoffmann D, y Bulet P. 1998. Antimicrobial peptides from insects. En *Molecular mechanism of immune response in insects*. Brey PT y Hultmark (eds). Editorial. Chapman and hall. pp. 40-46.
- Hetru C, Troxler L y Hoffmann JA. 2003. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J. Infect. Dis.* 187: S327-S334.
- Hultmark D 2003. *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 12-19.
- Jacot A, Scheuber H, Kurtz J y Brinkhof M. 2005. Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets *Gryllus Campestris*. *Proc. R. Soc. B.* 272: 63-69.
- Kasule FK. 1991. Associations of fecundity with adult size in the cotton stainer bug *Dysdercus fasciatus*. *Heredity.* 66: 281-286

- Kiflawi M y Gray DA. 2000. Size-dependent response to conspecific mating calls by male crickets. *Proc. R. Soc. B.* 267: 2157-2161.
- Kim SR, Yao R, Han Q, Christensen BM y Li J. 2005. Identification and molecular characterization of a prophenoloxidase involved in *Aedes aegypti* chorion melanization. *Insect Mol. Biol.* 14: 185-194.
- Klowden MJ. 2002. *Physiological Systems in Insects*. Editorial Academic press. London.
- Kramer KJ, Kanost MR, Hopkins LT, Jiang H, Zhu CY, Xu R, Kerwin JL. y Turecek F. 2001. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron* 57:385-392.
- Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez, Ku-López M, Rodríguez MC, Herrera-Ortíz A y Rodríguez MH. 2002. Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berguei ookinetes*. *J. Parasitol.* 88: 702-706.
- Lavine MD y Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Levins R. 1968. *Evolution in a Changing Environment*. Editorial Princeton University Press. New Jersey.
- Li J, Hodgeman BA y Christensen BM. 1996. Involvement of peroxidase in Chorion hardening in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26. 309- 317.
- Li SJ y Li J. 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 36: 954-964.

- Maramorosch K y Shope RK. 1975 Invertebrate Immunity. Mechanism of Invertebrate Vector-Parasite Relations. Editorial Academic Press. New York.
- Margaritis LH. 1985. Comparative study of the eggshell of the fruit flies *Dacus oleae* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Trypetidae). Can. J. Zool. 63: 2194-2206.
- Moran LA. 2004. Egg size evolution in tropical American Arcid Bivalves: the comparative method and the fossil record. Evolution. 58: 2718-2733.
- Moret Y y Siva-Jothy MT. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proc. R. Soc. B. 270: 2475-2480.
- Murray AM y Cade WH. 1995. Differences in age structure among field crickets populations (Orthoptera: Grillidae): Possible influence of a sex-biased parasitoid. Can. J. Zool. 73: 1207-1213.
- Murtaugh MP y Delinger DL. 1985. Physiological regulation of long-term oviposition in the house cricket *Acheta domesticus*. J. Insect Physiol. 31: 611-617.
- Nappi AJ y Christensen BM. 2005. Melanogenesis and immune associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 35: 443-459.
- Neville AC. 1983. Daily cuticular growth layers an the teneral stage in adult insects. A review. J. Insect Physiol. 29: 211-219.

- Nguyen KB y Smart CG Jr. 1992. Life cycle of *Steinernema scapaterisci*. J. Nematol. 24: 160-169.
- Nosil P. 2002. Food fights house crickets, *Acheta domesticus*, and the effects of body size and hunger level. Can. J. Zool 80: 409-417.
- Nowosielski WJ y Patton LR. 1965. Life-tables for the house cricket, *Acheta domesticus* L., and the effect of intra-specific factors on longevity. J. Insect Physiol. 11: 201-209.
- Rantala MJ y Roff AD. 2005. An analysis of Trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. Funct. Ecol. 19: 323-330.
- Rantala MJ, Koskimaki J, Taskinen J, Tynkkynen K y Suhonen J. 2000. Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens*. Proc. R. Soc. Lond. B. 267: 2453-2457.
- Roff DA. 1982. The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis. Editorial Chapman and Hall. Nueva York.
- Rolff J. y Siva-Jothy MT. 2003. Invertebrate ecological immunology. Science. 301: 472-475.
- Ryder J y Siva-Jothy MT. 2000. Male Calling song Provides a reliable signal of immune function in a cricket. Proc. R. Soc. Lond. B. 267: 1171-1175.

- Sadd BM y Siva-Jothy MT. 2006. Self-harm caused by an insect's innate immunity. Proc. R. Soc. B. 273: 2571-2574.
- Savage K, Hunt J, Jennisons M y Brooks R. 2005. Male attractiveness covaries with fighting ability but with prior fight outcome in house crickets. Behav. Ecol. 16:196-200.
- Schenk K y Söndgerath D. 2005. Influence of egg clutches on larval parameters in nine libellulid species (Odonata). Ecol. Entomol. 30: 456-463.
- Schmid-Hempel. 2003. Variation in immune defense as a question of evolutionary ecology. Proc. R. Soc. Lond. B. 270: 357-366.
- Schmid-Hempel. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50: 529-551.
- Schmid-Hempel P. 2005. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. BioEssays. 27: 1026-1034.
- Schwarzkopf L, Blows MW, Caley MJ. 1999. Life-history consequences of divergent selection on egg size in *Drosophila melanogaster*. Am. Nat. 154: 333-340.
- Seko T y Nakasuji F. 2004. Effect of egg size variation on survival rate, development and fecundity of offspring in a migrant skipper. *Parnara guttata guttata* (Lepidoptera: Hesperidae). Appl. Entomol. Zool. 39: 171-176.
- Siva-Jothy MT. 2000. A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. Proc. R. Soc. Lond. B. 267: 2523-2527.

- Soderhall K y Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10:23-28.
- Stearns SC. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Editorial Oxford University Press. Oxford.
- Steiner H. 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol. rev.* 198: 83-96.
- Tzou P, De Gregorio E y Lemaitre B. 2002. How drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 102-110.
- Vilmos P y Kurucz E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 62: 59-66.
- Wheeler ED. 2003. Egg Coverings. En: *Encyclopedia of Insects*. Eds. Resh VH y Cardé RT. Academic Press. San Diego. Pp. 356-357.
- Wigglesworth VB. 1972. *The principles of insect physiology*. Editorial Chapman and Hall. London.
- Williams GC. 1966. Natural selection, the costs of reproduction and a refinement of the Lack's principle. *Am. Nat.* 100: 687-690.
- Wilson K, Cotter S, Reeson A y Pell J. 2001. Melanism and Disease resistance in Insects. *Ecol. Lett.* 4: 637-649.

- Woodring JP, Clifford CW y Beckman BR. 1979. Food utilization and metabolic efficiency in larval and adult house crickets. *J. Insect Physiol.* 25: 903-912.
- Woodring JP, Meier WO y Rose R. 1988. Effect of development, photoperiod, and stress on octopamine levels in the house cricket, *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* 34: 759-765.
- Yourth CP, Forbes M y Smith B. 2003 Immune expression in a damselfly is related to time of season, not to fluctuating asymmetry or host size. *Ecol. Entomol.* 27:123-128.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415: 389-395.
- Zera J y Harshman L. 2001. The Physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. System.* 32: 95-126.
- Zografou EN, Tsiropoulos GJ y Margaritis LH. 2001. Effect of phenylalanine and tyrosine analogues on *Bactrocera oleae* Gmelin. (Dipt. Tephritidae) reproductio. *J. Appl. Entomol.* 125: 365-369.
- Zuk M y Stoehr AM. 2002. Immune defense and host life history. *Am. Nat.* 160: s9s22.



## 12. Publicaciones



LA SOCIEDAD MEXICANA DE INMUNOLOGÍA, A.C.

y la

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

otorgan la presente constancia a

**Jorge Canales Lazcano**

por haber asistido al XVII Congreso Nacional de la  
Sociedad Mexicana de Inmunología, realizado en la  
Ciudad de Chihuahua del dos al cinco de mayo de 2006

Dr. César R. González Bonilla

Presidente SMI

M. en C. Jesús E. Sañez Sáenz

Director de la Facultad de Ciencias Químicas, UACH

Dr. Gilberto Erosa de la Vega

Presidente Comité Local UACH

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

EL INSTITUTO DE ECOLOGÍA



Otorga la presente

## CONSTANCIA

a: *Jorge Canales Lazcano*

Por su participación en el 3ER SIMPOSIO  
ESTUDIANTIL, con el trabajo:

"Compromisos en asignación de melanina para tres funciones  
en el grillo común, *Acheta domesticus*"

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "

Ciudad Universitaria, 25 de noviembre de 2005

Dr. Héctor Arita Watanabe  
Director

Dr. Julio Campo Alves  
Coordinador de Docencia y  
Formación de Recursos Humanos