



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto del cuidado parental y la temperatura
sobre el estrés oxidante en chinches acuáticas
gigantes de la especie *Abedus ovatus*
(Hemiptera: Belostomatidae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cesar Eduardo Aparicio Moreno

Directores

Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza
Dr. Roberto Edmundo Munguía Steyer

Tlaxcala, Tlax

Diciembre, 2023



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto del cuidado parental y la temperatura
sobre el estrés oxidante en chinches acuáticas
gigantes de la especie *Abedus ovatus*
(Hemiptera: Belostomatidae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cesar Eduardo Aparicio Moreno

Directores

Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza

Dr. Roberto Edmundo Munguía Steyer

Comité tutorial

Dr. Jorge Israel Ayala Berdón

Dra. Juana Alba Luis Díaz

Dr. Víctor Emmanuel Argáez Márquez

Dr. Isaac González Santoyo

Tlaxcala, Tlax

Diciembre, 2023

Financiamiento

La realización de este proyecto de tesis fue posible gracias al apoyo del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201720 “Modulación de la inversión parental precigótica y postcigótica y respuesta inmunológica en los insectos *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Abedus ovatus* (Hemiptera: Belostomatidae), otorgado al Dr. Roberto Edmundo Munguía Steyer. Así como también a la beca con número de apoyo 800528 proporcionada al estudiante con No. CVU 1148976 otorgada por el CONACYT. La Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrada en el Padrón de Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **César Eduardo Aparicio Moreno** 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 “**Efecto del cuidado parental y la temperatura sobre el estrés oxidante en chinches acuáticas gigantes de la especie *Abedus ovatus* (Hemiptera: Belostomatidae)**”.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX. DICIEMBRE 1 DE 2023

DR. VÍCTOR EMMANUEL ARGAEZ MÁRQUEZ

DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA

DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ

DR. JORGE ISRAEL AYALA BERDÓN

DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO



CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por el estudiante **CESAR EDUARDO APARICIO MORENO** titulada “**Efecto del cuidado parental y la temperatura sobre el estrés oxidante en chinches acuáticas gigantes de la especie *Abedus ovatus* (Hemiptera: Belostomatidae)**” para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**.

El documento de la tesis de **CESAR EDUARDO APARICIO MORENO** fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de noviembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes, 7%. Los textos detectados con similitud corresponden a lenguaje técnico frecuentemente usado en el área y a elementos característicos de la escritura de reportes científicos (tesis y artículos). Por lo anterior, confirmo que el estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE,

Tlaxcala, Tlax., a noviembre 29 de 2023.

BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA

Directora de tesis



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

Agradecimientos

Al posgrado de Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx por el apoyo y permitirme continuar con mi desarrollo profesional dentro de esta institución.

Al CONACYT por la beca otorgada con número de apoyo 800528 al estudiante con No. CVU 1148976 y al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN201720 “Modulación de la inversión parental precigótica y postcigótica y respuesta inmunológica en los insectos *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Abedus ovatus* (Hemiptera: Belostomatidae), otorgado al Dr. Roberto Edmundo Munguía Steyer.

A la Dra. Bibiana Montoya, por su profesionalismo, esfuerzo, dedicación más allá de sus responsabilidades, por compartir sus conocimientos y su imprescindible ayuda en laboratorio y sobre todo por su paciencia y motivación constante a lo largo del desarrollo de esta tesis. Gracias.

Al Dr. Roberto Munguía por su profesionalismo, esfuerzo, paciencia y por compartir sus conocimientos a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Jorge Israel Ayala Berdón, Dra. Juana Alba Luis Díaz y al Dr. Isaac González Santoyo por sus valiosos comentarios y observaciones a lo largo de la realización de este proyecto. Un agradecimiento muy especial al Dr. Víctor Emmanuel Argáez Márquez por sus comentarios, observaciones y su imprescindible ayuda en campo y laboratorio, también gracias, Vic, por las charlas dentro y fuera de lo académico.

Agradecimientos a título personal

A mis padres, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida, su amor y paciencia. Gracias por ser mis más grandes modelos de responsabilidad, esfuerzo y entereza.

A mi hermana por su apoyo y siempre estar al pendiente.

A Dayana, por tu cariño, apoyo, ayuda, motivación y por hacer más bello este y todos los demás aspectos de la vida. Gracias por estar presente y por permitirnos seguir creciendo juntos.

A mis amigos, Alonso, Giovan, Ariana, Luis, Kevin, Elisa, Daniela y Denisse, por siempre estar ahí y hacer más llevadero y liviano todo.

A Frida y Ray, por abrirme las puertas de su hogar y de su familia.

A Adriana y Karla del Laboratorio de Ecología Evolutiva de Artrópodos, por su valiosa ayuda en laboratorio y en campo.

Finalmente, a Alexandra Elbakyan por sacrificar su libertad y seguridad en su labor hacia el acceso al conocimiento libre y justo para todos.

RESUMEN

Además de los costos mediados por disyuntivas en asignación de recursos, también se ha propuesto que los costos de la reproducción pueden ocurrir debido a daños somáticos directos. Por ejemplo, debido al estrés y daño oxidante que puede surgir de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) dada por un alto consumo energético y actividad metabólica que ocurre durante los procesos reproductivos. Un estado de estrés oxidante ocurre cuando los ROS sobrepasan las defensas antioxidantes del organismo y los mecanismos reparadores del daño que se define como la pérdida de función de una biomolécula por pérdida de electrones. Los estudios que han puesto a prueba la hipótesis del costo oxidante de la reproducción han encontrado resultados mixtos y se han realizado principalmente en hembras de aves y mamíferos. Por lo anterior se ha resaltado la importancia de utilizar otros grupos taxonómicos y machos para poner a prueba esta hipótesis en los distintos aspectos de la reproducción. Como el cuidado parental, cuya actividad física podría aumentar la producción de ROS que incurra en daño y estrés oxidante. De igual forma, se ha observado que la temperatura puede influir en la intensidad del cuidado parental que proveen los padres, también por sí misma la temperatura aumenta la tasa metabólica. En esta tesis se realizaron dos estudios que evaluaron si existe un costo oxidante asociado al cuidado paterno exclusivo como un aspecto de la reproducción y la exposición a altas temperaturas en la chinche acuática *Abedus ovatus*. En el estudio correlacional donde comparamos los niveles de lipoperoxidación y capacidad antioxidante total (TAC por sus siglas en inglés) en hemolinfa de machos con cuidado parental reciente y cuidado parental prolongado, encontramos que los machos que cargan más huevos presentan mayores niveles de lipoperoxidación. Sin embargo, no encontramos un efecto del grado de desarrollo y número de los huevos en TAC. Por otra parte, en el estudio experimental, donde manipulamos experimentalmente el tamaño de puesta de los machos parentales y que fueron sometidos aleatoriamente a 2 tratamientos de temperatura desde el inicio hasta el final del cuidado no encontramos un efecto de estas variables en los niveles de lipoperoxidación. También evaluamos los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) y la proporción de estos (GSSG/GSSH) y encontramos mayores niveles de GSSG y GSH en individuos sometidos a mayores temperaturas. Así la proporción GSSG/GSH no se vio afectada por nuestros tratamientos. Las discrepancias entre nuestros estudios podrían indicar que en condiciones de vida libre el cuidado parental puede representar costos oxidantes en los individuos, sin embargo, es importante considerar diversos factores ambientales tanto bióticos y abióticos que podría tener un efecto más relevante en el estatus redox de los individuos.

Palabras claves: Estrés oxidante, cuidado parental, altas temperaturas, lipoperoxidación, glutatión

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Estrés oxidante	2
Cuidado parental	5
Temperatura y estrés oxidante.....	5
Sistema de estudio.....	6
OBJETIVO GENERAL	9
Objetivo específico estudio correlacional	9
Objetivo específico estudio experimental	9
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	10
MÉTODOS ESTUDIO CORRELACIONAL	11
Muestreo de individuos y sitio de estudio.....	11
Toma de muestras.....	12
Determinación de niveles de lipoperoxidación	12
Capacidad antioxidante total (TAC)	12
Análisis estadísticos (número de huevos en las puestas de los machos).....	13
Análisis estadísticos (lipoperoxidación).....	13
Análisis estadísticos (TAC).....	14
RESULTADOS ESTUDIO CORRELACIONAL	15
Comparación de tamaño de puestas de los machos parentales	15
Lipoperoxidación	16
Capacidad antioxidante total (TAC)	19
MÉTODOS ESTUDIO EXPERIMENTAL	21
Muestreo de individuos y sitio de estudio.....	21
Diseño experimental.....	22

Determinación de niveles de lipoperoxidación	22
Proporción glutatión oxidado / glutatión reducido (GSSG/GSH).....	23
Análisis estadístico (tratamientos de temperatura).....	23
Análisis estadísticos (lipoperoxidación).....	23
Análisis estadísticos (GSSG/GSH)	24
GSH:	24
GSSG:.....	24
Proporción GSSG/GSH:	24
RESULTADOS ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	25
Tratamientos de temperatura.....	25
Lipoperoxidación	26
Glutatión reducido (GSH).....	28
Glutatión oxidado (GSSG).....	31
Proporción GSSG/GSH	34
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS	42

INTRODUCCIÓN

El concepto ‘historia de vida’ hace referencia a los patrones de maduración (tasa de crecimiento, edad a la madurez sexual, tamaño corporal, longevidad etc.) y reproducción (número y tamaño de las crías al nacer) que explican las distintas estrategias que utilizan los organismos en la optimización de su adecuación entendida como su supervivencia y éxito reproductivo (Stearns, 1992). Por lo regular, estos patrones se encuentran asociados de forma negativa, por lo que se ha propuesto que existen disyuntivas entre ellos (Stearns, 1992; Flatt y Heyland, 2011). Estas disyuntivas entre atributos de historia de vida son ilustradas, por ejemplo, por la relación negativa frecuentemente hallada entre el número de crías y el tamaño de éstas (Stearns, 1992; Flatt y Heyland, 2011), o cuando un esfuerzo reproductivo elevado que clásicamente se define como los recursos (tiempo, energía y riesgos) que se invierten en la reproducción y cuidado de la progenie (Stearns, 1992), resulta en una reducción en la supervivencia y la fecundidad futura del individuo (Partridge *et al.*, 1987; Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Reznick *et al.*, 2000). De igual forma generalmente se asume que el alto costo de mantener las defensas inmunológicas ante patógenos resulta en una disyuntiva entre otros procesos que demandan muchos recursos y nutrientes como el crecimiento, la reproducción y la termorregulación en grupos animales como vertebrados e insectos (Lochmiller y Deerenber, 2000; Schwenke *et al.*, 2016). La ocurrencia de las disyuntivas entre atributos de historia de vida ha sido explicada tradicionalmente por la existencia de un conflicto en la asignación de recursos energéticos entre los atributos (Stearns, 1992). Se ha propuesto que este conflicto surge por el hecho de que los recursos energéticos de los que disponen los organismos son limitados (Stearns, 1992). Por este motivo, cuando hay un aumento en la inversión de recursos energéticos en algún rasgo de historia de vida, estos recursos ya no están disponibles para ser utilizados en otros rasgos (Kaitala, 1991; Stearns, 1992; Reznick *et al.*, 2000; Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Flatt y Heyland, 2011).

Los trabajos que han puesto a prueba la hipótesis de la existencia de una disyuntiva en la asignación de recursos entre atributos de historia de vida tradicionalmente han manipulado la producción de huevos por vía de la disponibilidad de sitios de oviposición, o el estado nutricional de los individuos por medio de la cantidad de alimento consumido. Estos estudios han demostrado que una disminución en la producción de huevos genera un aumento en la supervivencia de la madre (Stearns, 1992; Tatar, 1995; Flatt y Heyland, 2011), lo cual proporciona evidencia a favor

de la ocurrencia de un conflicto en asignación de recursos entre la reproducción y la supervivencia (Tatar, 1995; Boggs, 2009). De igual forma, se ha encontrado una reducción en las reservas energéticas (p.ej. lípidos, glucógeno, etc.) asociada al esfuerzo reproductivo en diversos grupos animales como mamíferos, artrópodos y peces (Clutton-Brock, 1991; Munguía-Steyer *et al.*, 2019). Sin embargo, los costos asociados al esfuerzo reproductivo pueden ser observados incluso cuando hay abundancia de recursos alimenticios (Tatar, 1995). Por lo tanto, se ha propuesto que además de la ocurrencia de un posible conflicto en asignación de recursos, podría existir un daño somático directo asociado a los mecanismos fisiológicos involucrados en la reproducción (de Jong y van Noordwijk, 1992; van Noordwijk y de Jong, 1986; Tatar, 1995). Aunque los costos de la reproducción han sido ampliamente documentados en distintos grupos animales como aves, mamíferos y peces, los mecanismos fisiológicos que los subyacen no han sido esclarecidos aún (Harshman y Zera, 2007; Speakman y Garratt, 2014; Blount *et al.*, 2016).

Además del aumento en la mortalidad asociada a algunas conductas reproductivas (p.ej. el cuidado parental) debido a la mayor exposición de los individuos a patógenos, parásitos y depredadores (Trivers, 1972; Barnard y Behnke, 1990; Gilbert y Manica., 2010; Klug y Bonsall, 2014; Requena *et al.*, 2014), se ha propuesto que ciertos factores como el aumento en la producción de hormonas que acompañan a algunos procesos reproductivos podrían ser un mecanismo fisiológico vinculado a los costos de la reproducción, por vía de un aumento en la mortalidad. Por ejemplo, se ha observado que un incremento en los niveles de estrógeno reduce la función inmunitaria de los linfocitos T lo cual podría disminuir la probabilidad de supervivencia de los individuos (Da Silva, 1999).

Estrés oxidante

Debido al alto consumo energético que implica la reproducción, puede haber daños asociados a la acumulación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno -ROS- por sus siglas en inglés y nitrógeno) que en su mayoría son un subproducto derivado de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) en la mitocondria, durante la transformación de nutrientes en energía (Loft *et al.*, 1994; Alonso-Álvarez *et al.*, 2004; Blount *et al.*, 2016). La alta reactividad de las ROS radica en su capacidad de aceptar electrones, lo cual genera moléculas inestables como el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), los cuales son producidos en todos los tipos celulares (Collin, 2019). Dentro de la mitocondria, el

anión superóxido es la especie reactiva predominante, que en su mayoría es transformada en peróxido de hidrógeno a través de la acción de la enzima superóxido dismutasa que forma parte de las defensas antioxidantes (Lambert y Brand, 2009). Las defensas antioxidantes se dividen en dos tipos: endógenas y exógenas (Armstrong y Stratton, 2016). Los antioxidantes endógenos, como el glutatión, son producidos por el cuerpo y desempeñan un papel crucial en la protección contra el estrés oxidante. El glutatión funciona como un antioxidante multifuncional, neutralizando radicales libres funcionando como donador de electrones para los radicales libres y participando en procesos de detoxificación. Además, el glutatión actúa como sustrato de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la glutatión transferasa (Armstrong y Stratton, 2016). Por otro lado, los antioxidantes exógenos se obtienen a través de la dieta. Algunos ejemplos de antioxidantes exógenos son la vitamina C, la vitamina E. y los carotenoides. Estos antioxidantes también desempeñan un papel importante en la protección celular contra el daño oxidante (Armstrong y Stratton, 2016). Por ejemplo, la vitamina E elimina los radicales peroxilo provenientes de la lipoperoxidación al donar un hidrógeno lo que detiene la reacción en cadena de los radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1996)

La producción de ROS es necesaria para el funcionamiento normal de las células, ya que las ROS están involucradas en la señalización y la homeostasis celular (Finkel y Holbrook, 2000; Dickinson y Chang, 2011; Sies y Jones, 2020; Juan *et al.*, 2021). Sin embargo, cuando la producción de ROS excede la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidante para hacer frente a estos, se genera un estado conocido como estrés oxidante (Sies y Jones, 2020; Juan *et al.*, 2021). Cuando este desbalance se prolonga en el tiempo, puede ocasionar daño a lípidos, afectando la funcionalidad de la membrana celular (Halliwell y Chirico, 1993), a las proteínas, modificando su estructura y función (Brand *et al.*, 2004) y al ADN, favoreciendo la ocurrencia de mutaciones y procesos cancerígenos (Hemnani y Parihar, 1998). Por lo tanto, el daño oxidante puede definirse como la pérdida de función de la biomolécula debido a modificaciones químicas no enzimáticas (pérdida de electrones) que pueden derivar en un mal funcionamiento de las células y en su posterior muerte (Monaghan *et al.*, 2009; Lambert y Brand, 2009). Por este motivo, la acumulación de daño producido por un incremento en los ROS no neutralizados, se ha vinculado a la aceleración de la senescencia (Beckman y Ames, 1998; Beaulieu *et al.*, 2015), que se define como la disminución del éxito reproductivo y el aumento en la probabilidad de muerte asociados

positivamente a la edad del organismo (Harman, 1983; Dowling y Simmons, 2009; Selman *et al.*, 2012).

La idea de que existe un costo oxidante de la reproducción ha sido evaluada por múltiples estudios durante los últimos 20 años. La estimación del estrés oxidante, inicialmente, fue realizada midiendo la capacidad antioxidante total (TAC) que principalmente detecta los antioxidantes de origen dietario o la actividad de antioxidantes endógenos específicos, bajo el supuesto de que una disminución en estos parámetros, por sí misma, podría indicar que existe un costo oxidante asociado a la reproducción (Monaghan *et al.*, 2009; Blount *et al.*, 2016). No obstante, este supuesto no sería suficiente para determinar estos costos. Ya que, aunque una sobreproducción de ROS sea acompañada de un aumento de las defensas antioxidantes endógenas podría ser insuficiente para mitigar los efectos negativos de la sobreproducción de ROS, por lo cual se generaría un estado de estrés oxidante en el individuo con subsecuente daño en biomoléculas. (Monaghan *et al.*, 2009; Blount *et al.*, 2016). Por este motivo, se ha resaltado la importancia de medir directamente el daño oxidante a biomoléculas en estudios que buscan evaluar la hipótesis del costo oxidante de la reproducción (Blount *et al.*, 2016). Sin embargo, los resultados de los estudios que han incorporado esta medición han sido mixtos. Se ha observado que a un mayor esfuerzo parental corresponden niveles de daño oxidante más elevados en algunas biomoléculas y en algunos órganos metabólicamente activos, mientras que en otros no (Xu *et al.*, 2014; Jan *et al.*, 2014; Blount *et al.*, 2016). Adicionalmente, al comparar los niveles de daño oxidante presentes en individuos reproductivos contra los niveles presentados por individuos no reproductivos, se ha encontrado que contrario a lo esperado, los individuos reproductivos presentan niveles menores de daño oxidante que los individuos no reproductivos (Costantini *et al.*, 2014; Wegmann *et al.*, 2015; Blount *et al.*, 2016).

El esfuerzo reproductivo de los individuos tiene diversos componentes, que incluyen desde la producción y exhibición de caracteres sexuales secundarios hasta la provisión de cuidados parentales a la progenie (Moller y Lope, 1994). Sin embargo, la magnitud de los costos asociados a cada componente puede ser difícil de evaluar en especies donde un sexo invierte más que el otro en más de uno de estos componentes. De hecho, existe una asimetría en cómo machos y hembras invierten sus recursos energéticos en estos componentes (Clutton-Brock y Vincent, 1991; Lessells, 2012). Generalmente, las hembras invierten más en la producción de gametos y en el cuidado de

las crías, mientras que, los machos invierten en mayor medida en ornamentos, conductas de cortejo y en competir por acceso a parejas contra otros machos. No obstante, existe un amplio número de especies en donde el macho también provee cuidados parentales a las crías de forma exclusiva o en conjunto con la hembra (Ridley, 1978; Tallamy, 2001; Clutton-Brock, 2019).

Cuidado parental

Uno de los aspectos de la reproducción que puede generar costos para los individuos es el cuidado parental, que puede definirse como cualquier conducta realizada por los padres que aumenta la adecuación de la progenie (Trivers, 1972; Clutton-Brock, 1991; Klug *et al.*, 2013). Estos cuidados pueden ocurrir en la etapa precigótica como en la producción de gametos y la preparación de nidos, y en la postcigótica, como el cuidado de los huevos y la alimentación de las crías (Trivers, 1972; Clutton-Brock, 1991; Moreno *et al.*, 2010; Trumbo, 2017). Los costos para los padres ocasionados por realizar conductas de cuidado parental pueden resultar en una reducción en supervivencia y la reproducción futura, debido al desgaste fisiológico (Magrath y Komdeur, 2003; Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Klug y Bonsall, 2014; Munguía-Steyer *et al.*, 2019). Por ejemplo, cuidar a la progenie puede involucrar un aumento en la actividad física de los padres (Crowl y Alexander, 1989; Clutton-Brock, 1991), incrementando su demanda metabólica, y en consecuencia, la producción de radicales libres (Powers y Jackson, 2008; Metcalfe y Alonso-Alvarez, 2010). Entonces, un aumento en la actividad física asociado a los cuidados parentales podría causar estrés oxidante (Metcalfe y Alonso-Alvarez, 2010; Wilson *et al.*, 2012).

Temperatura y estrés oxidante

También, se ha observado que la temperatura puede influir en el balance oxidante de los animales, lo que implica cambios en la producción de ROS y en la actividad antioxidante. Uno de los efectos observados a temperaturas elevadas, es un aumento en la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares causado por ROS (Almroth *et al.*, 2015). Las altas temperaturas pueden aumentar la producción de ROS y superar la capacidad de defensas antioxidantes de los organismos, lo que puede inducir un daño oxidante (Franklin *et al.* 2007; Lalouette, *et al.*, 2011). Por ejemplo, en estudios realizados en peces, se ha demostrado que un aumento en la temperatura del agua en la que habitan los individuos puede aumentar el daño oxidante a lípidos (Almroth *et al.*, 2015; Vinagre *et al.*, 2012) y la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión

peroxidasa (Almroth *et al.*, 2015) y la catalasa (Vinagre *et al.*, 2012). Sin embargo, también se ha observado una disminución en la actividad de algunas enzimas que también forman parte del sistema antioxidante, lo que puede comprometer la capacidad de los organismos para neutralizar a los radicales libres (Hawker y Jenner, 1993). Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar factores como el impacto de la temperatura en el equilibrio oxidante de los organismos en etapas metabólicamente demandantes como el crecimiento o la reproducción. De igual forma, estudiar especies que presentan cuidado paterno nos permitiría esclarecer si el cuidado parental postcigótico representa costos oxidantes independientes de los acarreados por las fases previas de la reproducción como en la producción de caracteres sexuales secundarios, la competencia con conespecíficos, territorialidad principalmente en machos. Sin embargo, a diferencia de las hembras, los machos no pagan costos tan altos vinculados a las fases precigóticas de la reproducción como la producción de gametos (Hayward y Gillooly, 2011). Si la fase postcigótica de la reproducción es costosa en términos oxidantes, esperaríamos ver un aumento en los marcadores de estrés oxidante en los machos que realizan cuidado paternal, los cuales serían mayores en aquellos machos expuestos a altas temperaturas.

Por lo anterior en este trabajo ponemos a prueba la hipótesis de costo oxidante del cuidado paterno como un aspecto de la reproducción, y de la exposición a altas temperaturas en una chinche acuática que presenta cuidado paternal exclusivo. Para este fin realizamos dos estudios. El primero fue un estudio correlacional en el cual evaluamos si hay una asociación entre el tiempo de cuidado parental y los niveles de daño oxidante a lípidos (lipoperoxidación) y la capacidad antioxidante total (TAC por sus siglas en inglés). El segundo, fue un estudio experimental en donde modificamos el esfuerzo parental de los machos manipulando el número de huevos que cargaban en sus puestas y la temperatura del agua en la que hacían sus actividades parentales.

Sistema de estudio

Nuestro sistema de estudio es la especie *Abedus ovatus* que pertenece a la subfamilia Belostomatinae. Uno de los aspectos más relevantes de estos insectos es que presentan cuidado parental realizado exclusivamente por el macho. Esta forma de cuidado parental es la más rara en la naturaleza (Ridley, 1978; Clutton-Brock, 1991). La familia Belostomatidae, representa el 99% de todos los insectos que realizan cuidado paterno exclusivo (Smith, 1997). En estos insectos el cuidado paterno es obligado. Las conductas parentales realizadas por los machos de esta familia

de insectos involucran el transporte, hidratación y ventilación de los huevos (Smith, 1976, 1997; Ichikawa, 1988; Munguía-Steyer y Macías-Ordóñez, 2007). En las especies del género *Abedus*, no existe dimorfismo sexual por lo cual los machos no presentan costos energéticos asociados al desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Las hembras colocan sus huevos sobre el dorso de los machos quienes cargan la puesta hasta el momento de la eclosión (Smith, 1997). Al considerar el grado de desarrollo de los huevos de la puesta que cargan los machos se puede estimar el tiempo de cuidados parentales que han realizado (Smith, 1976; Munguía-Steyer *et al.*, 2008). El grado de desarrollo de los huevos puede determinarse a partir de su coloración y forma. Los huevos que han sido colocados recientemente son esféricos y negros (figura 1a) y huevos en estadios avanzados de desarrollo y próximos a la eclosión, son de coloración grisácea y cilíndricos (figura 1b) (Madhavan, 1974; Smith, 1976; Munguía-Steyer *et al.*, 2008).

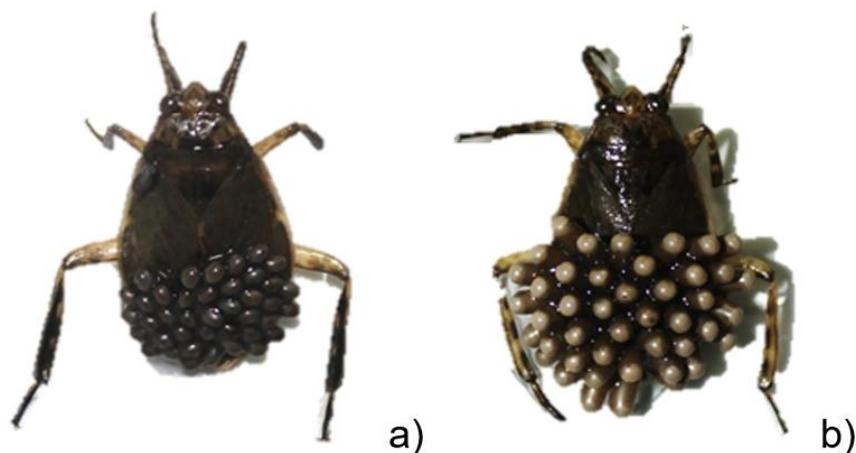


Figura 1. Macho de *A. ovatus* con puesta de huevos recién colocada (a) y con puesta próxima a la eclosión (b).

Las chinches acuáticas gigantes de la especie *A. ovatus* se desarrollan en ambientes subacuáticos de baja profundidad y lénticos, colectan aire atmosférico mediante apéndices retráctiles que poseen pelos hidrófobos que les permiten sumergir una burbuja de aire dentro del agua, lo que permite a estas chinches permanecer bajo el agua varios minutos. Son depredadores, se alimentan generalmente de otros insectos como grillos, abejas, larvas de libélulas y hasta peces pequeños (Smith, 1997; Ohba, 2019). Las chinches de esta subfamilia se alimentan mediante una probóscide en forma de aguja que insertan a su presa, liberando enzimas proteolíticas que les

permiten digerir a su presa y después succionarla (Swart *et al.*, 2006; Ohba, 2019). La reproducción en estos insectos ocurre mediante fecundación interna, realizando cópulas repetidas intercaladas con la colocación de huevos sobre el dorso de los machos, proceso que se repite varias veces durante todo el evento reproductivo, que puede durar horas. En cada evento de oviposición la hembra puede poner de 2 a 3 huevos (Smith, 1976) y se ha observado que en condiciones de laboratorio una sola hembra puede colocar hasta 70 huevos (Aparicio-Moreno, datos no publicados).

Una de las conductas más conspicuas y relevantes del cuidado parental en estas chinches acuáticas, consiste en realizar movimientos de ventilación mediante flexiones periódicas con sus patas traseras. Estos movimientos facilitan la difusión activa del oxígeno a los embriones (Smith, 1997, Munguía-Steyer *et al.* 2008). La frecuencia e intensidad de los movimientos realizados por los machos se incrementa con altas temperaturas y a medida que los embriones crecen e incrementan sus requerimientos metabólicos (Munguía-Steyer, datos no publicados). También, se ha observado que machos con puestas de huevos más numerosas aumentan la frecuencia de estos movimientos, lo cual lleva a un decremento en sus reservas energéticas, que sugiere que hay un costo asociado a la realización de esta conducta (Munguía-Steyer *et al.*, 2019). La relación entre la temperatura y la frecuencia de los movimientos de ventilación también ha sido observada en otros ectotermos acuáticos (Dick *et al.*, 1998; Gillooly *et al.*, 2001; Lissaker *et al.*, 2003). Asimismo, se ha observado que un incremento en la temperatura ambiental puede tener un efecto positivo sobre la tasa metabólica, lo cual, en consecuencia, podría llevar a un estado de estrés oxidante (Metcalf y Alonso-Alvarez, 2010). Por lo anterior, las chinches acuáticas del género *Abedus* son un excelente modelo para explorar la hipótesis del daño oxidante a biomoléculas como un costo próximo de la reproducción. Adicionalmente, hasta ahora, no hay estudios que evalúen si el estrés oxidante es un costo del cuidado parental realizado exclusivamente por los machos, en general, y aún menos en artrópodos en particular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe un costo oxidante asociado al cuidado parental, y si este incrementa con la exposición a altas temperaturas.

Objetivo específico estudio correlacional

Evaluar los niveles de estrés oxidante en los machos de las chinches acuáticas del género *Abedus* en diferentes etapas del cuidado parental (con cuidado parental reciente y prolongado) y con diferentes tamaños de puesta.

Objetivo específico estudio experimental

Evaluar los efectos de la exposición a altas temperaturas en los niveles de estrés oxidante en machos parentales de *A. ovatus* con diferentes tamaños de puesta al final del cuidado parental (eclosión de los huevos).

HIPÓTESIS (estudio correlacional)

Existe un costo oxidante asociado al esfuerzo parental en machos de las chinches acuáticas del género *Abedus*.

PREDICCIONES (estudio correlacional)

- Los niveles de daño oxidante a lípidos (lipoperoxidación) serán mayores en los machos con cuidado parental prolongado y con una puesta de mayor tamaño.
- La capacidad antioxidante total (TAC por sus siglas en inglés) será menor en los machos con cuidado parental prolongado y con una puesta de mayor tamaño.

HIPÓTESIS (estudio experimental)

Un aumento en la temperatura ambiental incrementa el costo oxidante del cuidado paterno en los machos de las chinches acuáticas del género *Abedus*.

PREDICCIONES (estudio experimental)

- Los niveles de daño en lípidos serán mayores en los machos parentales sometidos a mayores temperaturas y con puestas más grandes. Por lo tanto, habrá una interacción sinérgica entre las variables.
- La proporción glutatión oxidado/reducido (GSSG:GSH) será mayor en machos parentales sometidos a mayores temperaturas y con puestas más grandes. Por lo tanto, habrá una interacción sinérgica entre las variables.

MÉTODOS ESTUDIO CORRELACIONAL

Muestreo de individuos y sitio de estudio

Entre los meses de marzo a junio del 2022 realizamos 6 colectas en colectamos un total de 45 machos de chinches acuáticas de la especie *A. ovatus* (Tabla 1) que cargaban una puesta de huevos en diferentes estados de desarrollo (24 machos con huevos puestos recientemente y 21 machos con huevos desarrollados próximos a la eclosión) y con distinto número de huevos en sus puestas (promedio= 60, min= 29, max= 92, D.E.= 16.63). Caracterizamos a los huevos como recientes cuando son esféricos, pequeños y de color negro y los huevos desarrollados cuando son cilíndricos, más grandes y de colores grises. Realizamos las colectas una población localizada en el río Quetzalapan, ubicado en Chignahuapan, Puebla, México (19.859199° N, -97.993593° O) cerca de la carretera Zacatlán-Chignahuapan. Esta localidad se caracteriza por tener un clima semifrío subhúmedo con lluvias durante el verano. En invierno, la temperatura puede descender hasta -3°C y, en verano, puede aumentar a 20°C. La vegetación está caracterizada por bosques de coníferas como asociaciones de pino y oyamel (INEGI, 2009).

Tabla 1. Fecha en la que se realizó cada colecta de individuos y número de individuos colectados para el estudio correlacional.

Número de colecta	Fecha	Individuos colectados
1	25 marzo 2022	9
2	12 mayo 2022	4
3	20 mayo 2022	9
4	26 junio 2022	13
5	8 julio 2022	5
6	23 julio 2022	5

Toma de muestras

Para evaluar los niveles de daño oxidante en lípidos y capacidad antioxidante total (TAC) de los machos con diferentes estadios parentales, se extrajeron aproximadamente 70 μ L hemolinfa *in situ*, de cada uno de los machos parentales capturados. Para esto, cortamos un apéndice del tercer par en la división del fémur y la tibia, dejamos gotear la hemolinfa en tubos eppendorf con 40 μ l de EDTA (0.5g/ml de agua) para evitar que se coagulara. La muestra de hemolinfa fue almacenada en nitrógeno líquido durante el trabajo de campo y el transporte al laboratorio. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta la realización de los análisis de laboratorio.

Determinación de niveles de lipoperoxidación

El nivel de daño oxidante en lípidos (lipoperoxidación) en hemolinfa fue estimado utilizando la técnica de TBARS. Este es un ensayo colorimétrico que detecta los niveles de malondialdehído (MDA), que es el principal producto de la oxidación de lípidos (Feldman, 2004). Tomamos un volumen de 20 μ l de la muestra de hemolinfa preservada en EDTA (0.5g/ml) y le agregamos 80 μ l de agua desionizada para tener un volumen final de 100 μ l. Posteriormente, para precipitar las proteínas, agregamos 100 μ l de ácido tricloro acético (TCA 10% v/v) y se mezcló por inversión para homogeneizar la solución. Centrifugamos la muestra a 3000 g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C . Después recuperamos 180 μ l del sobrenadante, agregamos 100 μ l de ácido tiobarbitúrico (0.375% de TBA y 2% de ácido acético) a cada muestra e incubamos en baño maría a 92°C durante 45 minutos. Finalizado el periodo de incubación, se llevaron las muestras a -20°C por 5 min con la finalidad de detener la reacción. Una vez transcurrido el tiempo de refrigeración, transferimos 120 μ l de la reacción por duplicado a cada pozo de la placa de ELISA, para finalmente leer la fluorescencia de las muestras a 530/25 nm de excitación y 590/35 nm de emisión. La lipoperoxidación se reporta como MDA $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ de hemolinfa.

Capacidad antioxidante total (TAC)

Para determinar los niveles de TAC en la muestra de hemolinfa de los machos parentales utilizamos el kit comercial QuantiChrom™ Antioxidant Assay Kit (DTAC-100) de BioAssays Systems utilizando 10 μ l de la muestra de hemolinfa colectada en campo. Este ensayo evalúa principalmente la capacidad de los antioxidantes dietarios (vitaminas, carotenoides, etc.) de

transformar a los iones Cu^{+2} a su forma reducida Cu^{+} que genera una reacción colorimétrica que puede ser medida a 570 nm de absorción. Esta técnica en particular es más sensible a los antioxidantes de origen dietarios. La capacidad antioxidante total se reporta como equivalentes de Trolox $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$.

Análisis estadísticos (número de huevos en las puestas de los machos)

Para determinar que no existieran diferencias significativas entre el número de huevos que los machos parentales con huevos recientes y huevos desarrollados cargaban realizamos una prueba de t con corrección de Welch debido a la heterogeneidad de varianza entre nuestros dos grupos de machos parentales.

Análisis estadísticos (lipoperoxidación)

Realizamos una inspección visual de los residuales de los datos con la finalidad de observar si se ajustan a una distribución normal. Posteriormente hicimos una transformación logarítmica de los valores de lipoperoxidación para que los residuales del modelo tuvieran una distribución normal. Para analizar si existe una asociación entre los niveles de estrés oxidante medido como lipoperoxidación con el esfuerzo parental, realizamos modelos lineales mixtos (Tabla 2) que incluyeron como variables predictoras el número de huevos que los machos cargaban al momento de la captura y el estadio de desarrollo de estos. Como variable de respuesta del modelo incluimos los niveles de lipoperoxidación en hemolinfa. Incluimos como variable aleatoria la identidad de la visita al sitio de estudio (Tabla 1) en la que se colectó a cada macho, ya que puede haber correlaciones entre los individuos colectados en cada visita debido a la diferencia en las condiciones ambientales asociadas a cada temporada de colecta. Posteriormente realizamos selección de modelos con AICc que se utiliza para evitar que exista un sobreajuste al seleccionar modelos más complejos de manera incorrecta por la cantidad pequeña de datos (Song *et al.*, 2017). En el caso de que el modelo nulo fuera el que tuvo mayor soporte en esta prueba de AICc y las consiguientes se asume que ninguna variable predictora tuvo un efecto sobre nuestros marcadores de estrés oxidantes, ya que el modelo nulo no incluye ningún predictor. Corregimos la heterocedasticidad encontrada en los datos utilizando la función varPower (Pinheiro, 2000) en cada modelo construido. Finalmente, en el caso en el que no hubiera un modelo con mayor soporte se utilizó inferencia multimodelo para calcular el efecto de la variable que se incluyera en los

modelos con grado de soporte parecido ($\Delta AICc < 2$) sobre los niveles de lipoperoxidación. El tamaño de efecto se calcula a partir de los valores predichos producto de los promedios ponderados de los pesos que presentó cada modelo con un $\Delta AICc$ menor a 2 (Anderson y Burnham 2002; Burnham *et al.*, 2011). Al utilizar el promedio de modelos ponderados, las estimaciones de parámetros o predicciones resultantes son más robustas, ya que reducen el sesgo en la selección de modelos y tienen en cuenta la incertidumbre asociada a dicha selección (Johnson y Omland, 2004).

Análisis estadísticos (TAC)

Realizamos una inspección visual de los residuales de los datos con la finalidad de observar si se ajustan a una distribución normal. Después hicimos una transformación logarítmica de los valores de TAC y removimos dos de los datos, ya que presentaron distancias de Cook mayores a 1.5, lo cual indica que esas observaciones tienen una influencia significativa en la estimación de los coeficientes del modelo (Dhakal, 2017). Para analizar si existe una asociación entre los niveles de estrés oxidante medido como TAC con el esfuerzo parental, realizamos modelos lineales mixtos (Tabla 3) para cada marcador de estrés oxidante que incluyeron como variables predictoras el número de huevos que los machos cargaban al momento de la captura y el estadio de desarrollo de estos. Como variable de respuesta del modelo incluimos los niveles de TAC en hemolinfa (Tabla 3). Incluimos como variable aleatoria la identidad de la visita al sitio de estudio.

RESULTADOS ESTUDIO CORRELACIONAL

Comparación de tamaño de puestas de los machos parentales

Al comparar la cantidad de huevos que cargaban los machos parentales con huevos recientes y con desarrollo avanzado, no encontramos diferencias significativas (Figura 2) ($t = -1.95$, $GL = 41.79$, $P = 0.06$). Los machos con huevos en estadio reciente de desarrollo tuvieron una mediana de 56 huevos ($DS = 19.44$, $min = 15$, $max = 85$) y los que tenían huevos en estadio de desarrollo avanzado tuvieron una mediana de 66 huevos ($DS = 14.20$, $min = 40$, $max = 92$).

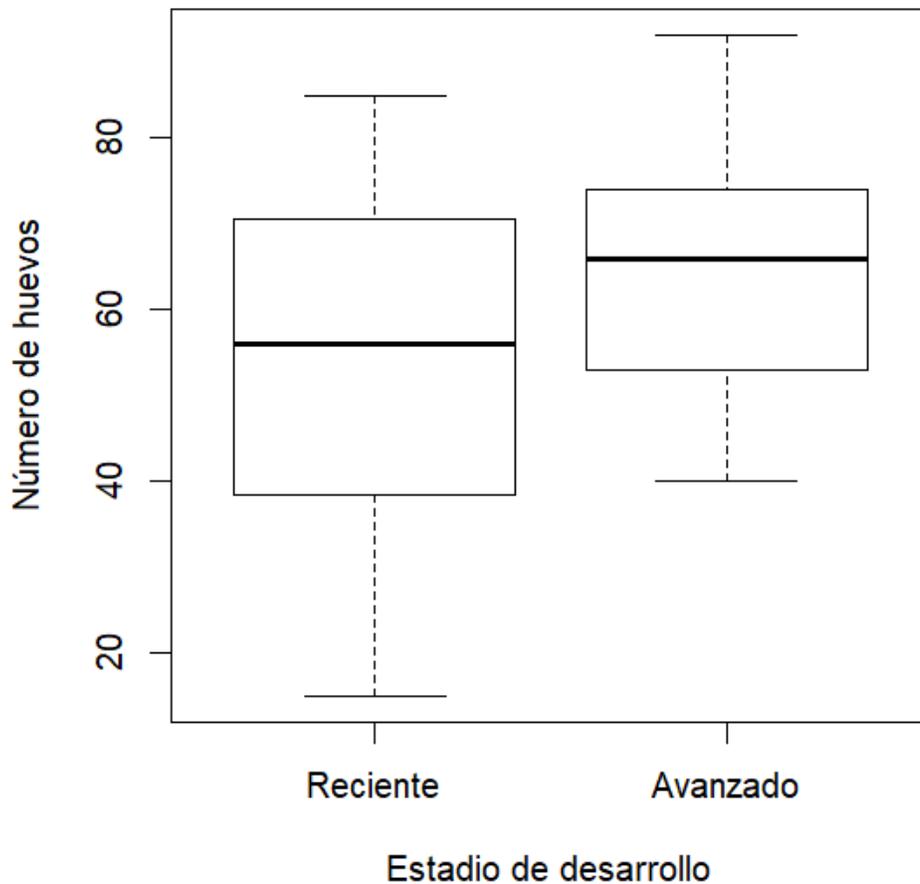


Figura 2. Comparación del número de huevos de los machos parentales con huevos en estadio reciente y avanzado de desarrollo.

Lipoperoxidación (Inferencia estadística y selección de modelos)

Al construir los distintos modelos que incluyen diferentes combinaciones de variables predictoras y realizar la selección de modelos encontramos que tres modelos presentaron un nivel de apoyo semejante (Tabla 2). Dado que no existe un modelo que sea evidentemente mejor que los otros y que en los tres se encuentra considerado el tamaño de puesta como variable predictora, realizamos inferencias multimodelo para calcular el efecto del tamaño de la puesta sobre los niveles de lipoperoxidación.

Tabla 2. Selección de modelos con AICc para lipoperoxidación asociada al esfuerzo parental ponderado por todos los modelos del estudio correlacional (GD= grado de desarrollo de los huevos, TP= Tamaño de la puesta).

Variables del modelo	Coeficientes de las variables predictoras			AICc	Δ AICc	Peso
	(Intercepto)	GD	TP			
GD +TP + GD x TP	0.71	1.19	0.01	70.36	0.00	0.43
TP	0.74	-	0.01	71.05	0.69	0.31
GD + TP	0.78	0.24	<0.01	71.40	1.04	0.26
Nulo	1.47	-	-	80.24	9.89	<0.01
GD	1.37	0.20	-	81.13	10.77	<0.01

Encontramos que existe una relación positiva entre el número de huevos que los machos cargan en sus puestas y los niveles de lipoperoxidación en hemolinfa. Los valores predichos ponderados muestran que los machos con mayor número de huevos presentan mayores niveles de daño oxidante en lípidos (Figura 4) (Estimado del modelo ponderado para el estadio 1= 0.011, IC95%= 0.004, 0.017 y para el estadio 3= 0.012. IC95%= 0.005, 0.018). Sin embargo, no encontramos una asociación entre el tiempo de cuidado parental sobre los niveles de lipoperoxidación.

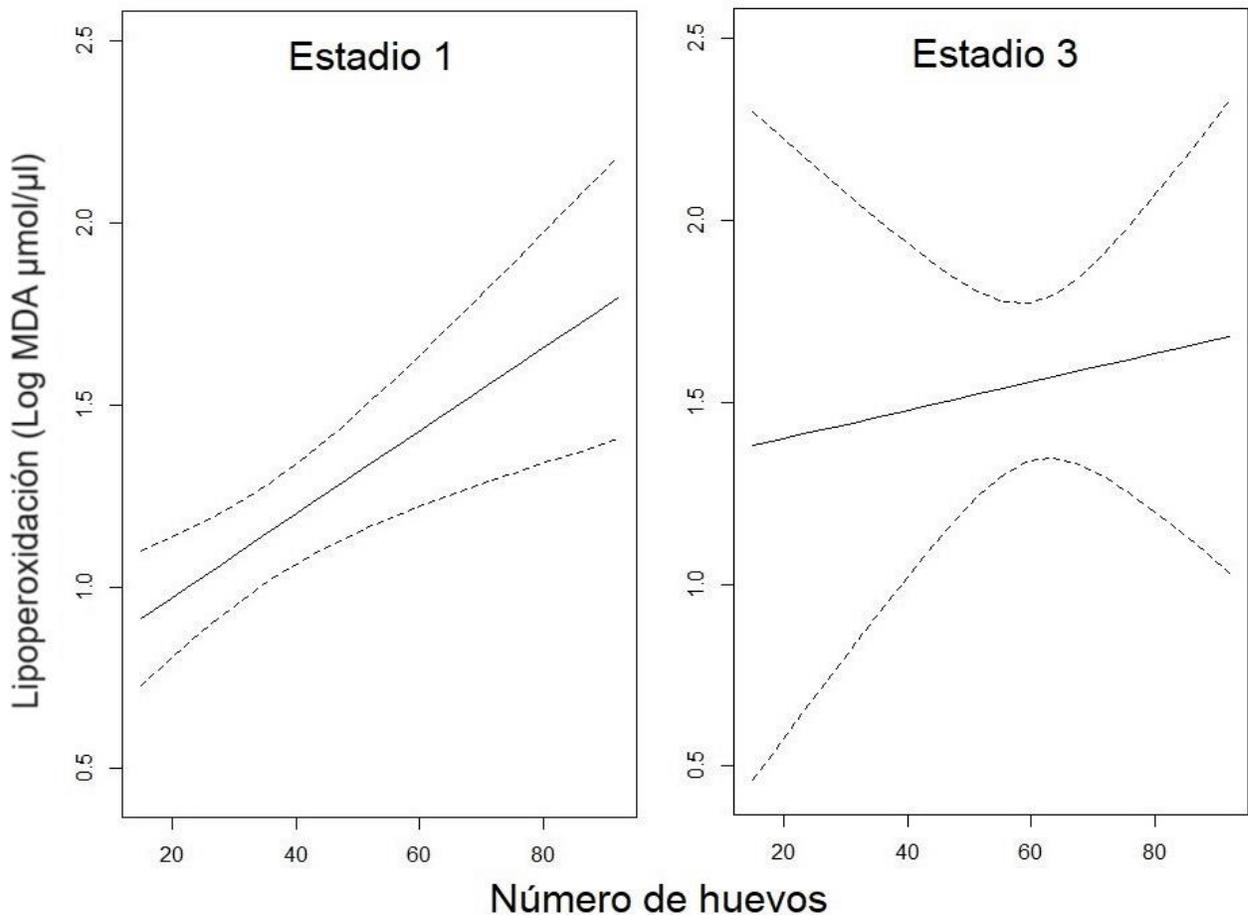


Figura 4. Niveles de lipoperoxidación en hemolinfa de los machos parentales con diferente número de huevos en sus puestas y huevos en distintos grados de desarrollo.

Capacidad antioxidante total (TAC) (Estadística descriptiva)

Los machos parentales que cargaban huevos recientes presentaron niveles, en promedio ligeramente más altos de TAC (Log equivalentes de TROLOX $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 6.66, DS= 0.3, min= 5.89, max= 7.21), comparados con los machos con huevos desarrollados (Figura 5) (Log equivalentes de TROLOX $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 6.47, DS= 0.27, min= 5.82, max= 7.13).

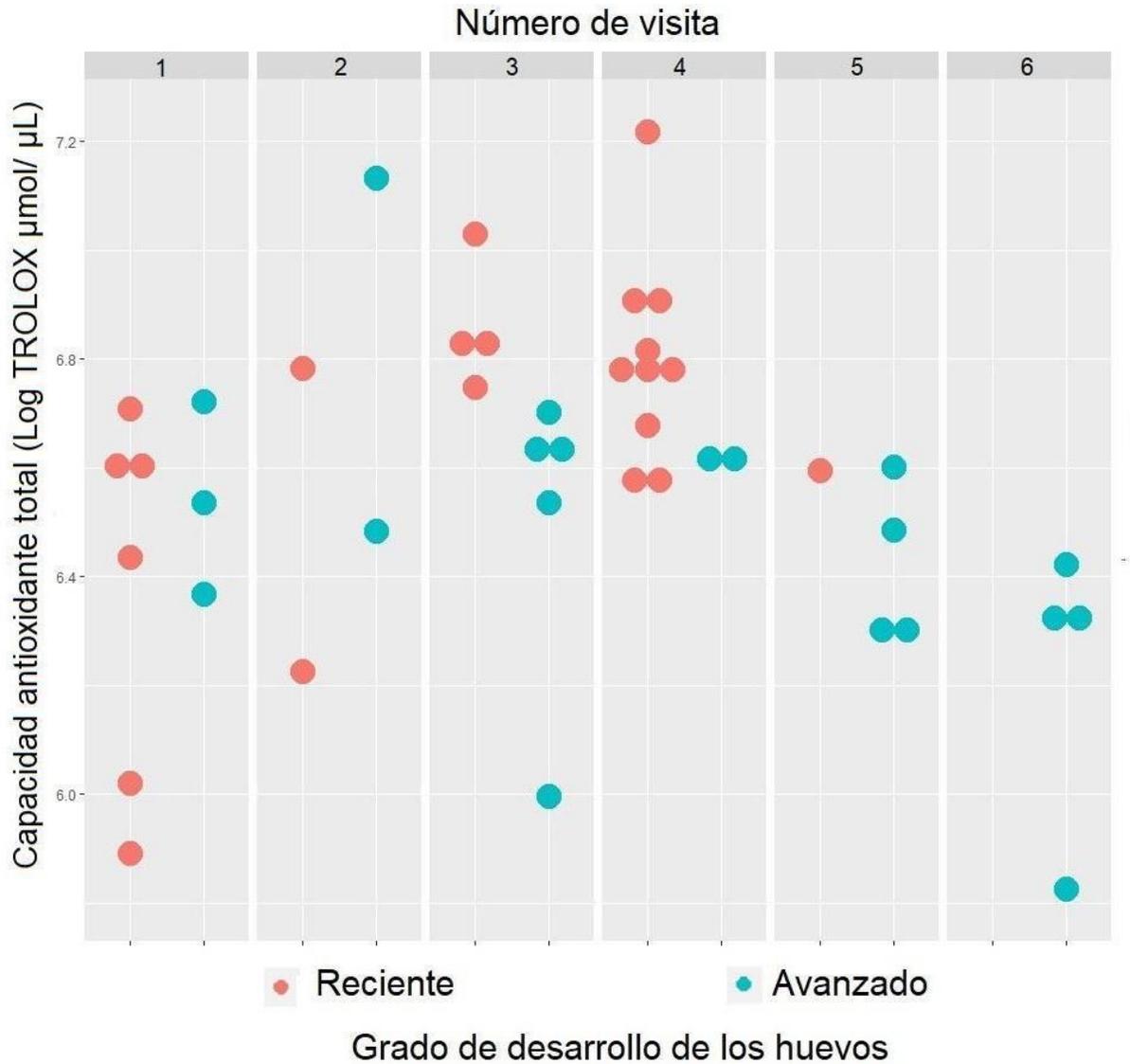


Figura 5. Capacidad antioxidante total en hemolinfa de los machos parentales con huevos en distintos grados de desarrollo. Cada columna representa el número de visita en el que se colectó a cada uno de los individuos.

Capacidad antioxidante total (TAC) (Inferencia estadística y selección de modelos)

En el análisis de selección de modelos con AICc para los niveles de TAC obtuvimos que el modelo nulo fue el que tuvo mayor soporte estadístico (Tabla 3). Por lo cual, no encontramos evidencia estadística de que exista una asociación entre el estadio de desarrollo o el número de huevos que los machos parentales cargan con los niveles de TAC (Figura 5).

Tabla 3. Valores predichos del modelo global de TAC asociado al esfuerzo parental ponderado por todos los modelos (GD= grado de desarrollo de los huevos, TP= Tamaño de la puesta).

Variables del modelo	Coeficientes de las variables predictoras			AICc	Δ AICc	Peso
	(Intercepto)	GD	TP			
Nulo	6.50	-	-	43.93	0.00	0.54
GD	6.59	-0.11	-	45.57	1.64	0.24
TP	6.52	-	<0.01	46.47	2.54	0.15
GD + TP	6.55	-0.12	<0.01	48.21	4.29	0.06
GD + TP + GD x TP	6.56	-0.14	<0.01	51.05	7.12	0.02

MÉTODOS ESTUDIO EXPERIMENTAL

Muestreo de individuos y sitio de estudio

Para el estudio experimental, entre los meses de junio a diciembre del 2022 colectamos machos de chinches acuáticas de la especie *A. ovatus* que tuvieran el dorso completamente cubierto de huevos puestos recientemente. Las colectas se realizaron en el río de la población de San Miguel Tenango ubicado a las afueras del municipio de Zacatlán, Puebla, México (19.910391°N, -97.944618° O). Esta localidad se caracteriza por tener un clima semifrío subhúmedo con lluvias durante el verano. En invierno, la temperatura puede descender hasta -3°C y, en verano, puede aumentar a 20°C. La vegetación está caracterizada por bosques de coníferas como asociaciones de pino y oyamel (INEGI, 2009). En total colectamos 71 individuos parentales distribuidos en 6 colectas diferentes (Tabla 4) que posteriormente fueron trasladados al laboratorio de ecología evolutiva en la FES Iztacala.

Tabla 4. Fecha en la que se realizó cada colecta de individuos y número de individuos colectados.

Número de colecta	Fecha	Individuos colectados
1	28 junio 2022	18
2	24 julio 2022	10
3	12 agosto 2022	8
4	22 septiembre 2022	12
5	9 noviembre 2022	10
6	4 diciembre 2022	13

Diseño experimental

Para determinar si además del esfuerzo parental, un incremento en la temperatura ambiental aumenta los niveles de lipoperoxidación y afecta el balance entre el glutatión oxidado (GSSG) y el glutatión reducido (GSH) en los machos durante el cuidado parental, utilizamos un diseño experimental de 2 factores. El primer factor, correspondió al esfuerzo parental, que fue manipulado en los machos parentales colectados con huevos recientes y con el dorso completamente cubierto de huevos. Las manipulaciones se hicieron de la siguiente forma: a un primer grupo de machos les removimos por completo la puesta, dejando el dorso completamente descubierto. A un segundo grupo le removimos aproximadamente la mitad de los huevos dejando un 50% del dorso libre. Finalmente, al tercer grupo le removimos una cantidad pequeña de huevos dejando cubierto por lo menos un 80% del dorso. De este modo producimos experimentalmente machos en tres condiciones parentales: a) sin huevos, b) con una puesta pequeña y, c) con una puesta grande. El segundo factor fue la temperatura a la que fueron sometidos los machos. Un grupo estuvo expuesto a temperatura ambiente del agua dentro del laboratorio (promedio = 21.53, min= 18.41, max= 22.69, DE= 1.20 °C), mientras que, el segundo grupo estuvo expuesto a una temperatura aproximadamente 4°C superior (promedio = 25.90, min= 24.48, max= 26.79, DE= 1.01 °C). Esta diferencia de 4°C puede observarse de forma natural en el habitat de estos insectos, ya que las hemos registrado temperaturas entre los 13°C y los 22°C (Aparicio-Moreno, datos no publicados), sin embargo, las fluctuaciones entre estos valores son muy constantes a diferencia de nuestro experimento en donde constantemente están a altas temperaturas. Para lo anterior utilizamos calentadores comerciales y monitoreamos la temperatura con registradores subacuáticos de la marca HOBO (UTBI-001) lo que nos permitió corroborar que la temperatura se mantuviera elevada durante todo el experimento. De esta forma, colocamos a un grupo de machos con distintos estados parentales (sin huevos, puesta pequeña y puesta grande) a temperatura ambiente y al otro grupo en temperatura elevada simultáneamente, dando lugar a 6 grupos experimentales. Los individuos fueron colocados de forma aleatoria en peceras de 20 litros divididas en 3 compartimientos diferentes.

Determinación de niveles de lipoperoxidación

Utilizamos la técnica TBARS para determinar los niveles de lipoperoxidación en la hemolinfa de los machos (ver descripción en el apartado del estudio correlacional).

Proporción glutatión oxidado / glutatión reducido (GSSG/GSH)

En la hemolinfa extraída de los machos incluidos en el experimento cuantificamos los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), para finalmente estimar la proporción GSSG/GSH. Cuando existe un estado de estrés oxidante ocurre cuando hay un incremento de GSSG y/o una disminución de GSH, que puede usarse como un biomarcador de estrés oxidante (Rodríguez-Martínez y Galván 2019). Para lo anterior, utilizamos el kit comercial Quantification kit for oxidized and reduced glutathione, Sigma-Aldrich (38185). Para la preparación de la muestra de hemolinfa utilizamos el protocolo para plasma con modificaciones. Al volumen final de la muestra de hemolinfa añadimos el mismo volumen de ácido sulfosalicílico (SSA) al 10%. Después centrifugamos a 8000 g durante 10 minutos a 4°C. Después de centrifugar, transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y agregamos agua desionizada hasta reducir la concentración de SSA de 10% al 0.5%. Tomamos 80 µl de esta solución y adicionamos 80 µl de solución buffer para tener un volumen final de 160 µl (este procedimiento se hizo por duplicado). Posteriormente, incubamos la placa a 37°C durante 1 hora. Adicionamos 20 µl de la solución de trabajo en todos los pozos de la placa. Después incubamos de nuevo a 37°C durante 10 minutos. Finalmente realizamos la lectura de absorbancia a 405nm.

Análisis estadístico (tratamientos de temperatura)

Para determinar que nuestros tratamientos de temperatura fueron significativamente diferentes a lo largo del experimento realizamos ANOVA de medidas repetidas.

Análisis estadísticos (lipoperoxidación)

Hicimos una transformación a logaritmo natural de las cuantificaciones de lipoperoxidación para conseguir una distribución normal de los residuales posterior a realizar una inspección visual de los mismos. Para analizar si existe una asociación entre los niveles de estrés oxidante medido como lipoperoxidación con el tamaño de la puesta de los machos y la temperatura, realizamos modelos lineales mixtos (Tabla 5) que incluyen como variables predictoras el tamaño de la puesta de los machos y el tratamiento de temperatura al que se les asignó y la interacción entre estas dos variables. Como variables de respuesta incluimos los niveles de lipoperoxidación. Incluimos como variable aleatoria la identidad de la visita al sitio de estudio en la que se colectó a

cada macho. Posteriormente realizamos selección de modelos con AICc e inferencia multimodelo (Burnham *et al.*, 2011).

Análisis estadísticos (GSSG/GSH)

GSH:

Para analizar los valores de GSH de los machos parentales sometidos a distinta temperatura y con diferentes tamaños de puesta, hicimos una transformación a logaritmo natural de las cuantificaciones de GSH posterior a la inspección visual del ajuste a la normalidad de los residuales de los datos. Posteriormente realizamos modelos lineales mixtos que incluyen como variables predictoras el tamaño de la puesta de los machos y el tratamiento de temperatura al que se les asignó y la interacción entre estas dos variables. Como variables de respuesta incluimos los niveles de GSH, corregimos la heterocedasticidad encontrada en los valores utilizando la función varIdent en cada modelo (Tabla 6). Incluimos como variable aleatoria la identidad de la visita al sitio de estudio en la que se colectó a cada macho. Posteriormente realizamos selección de modelos con AICc e inferencia multimodelo (Burnham *et al.*, 2011).

GSSG:

Para analizar los valores de GSSG de los machos parentales sometidos a distinta temperatura y con diferentes tamaños de puesta, realizamos el mismo procedimiento estadísticos que para GSH (ver párrafo anterior) únicamente cambiando la variable de respuesta por los valores de GSSG y dado a que un modelo tuvo mayor soporte que todos los demás (Tabla 7) no realizamos inferencia multimodelo.

Proporción GSSG/GSH:

Para analizar si existe una asociación entre los niveles de estrés oxidante medido como la proporción de GSSG/GSH con el tamaño de la puesta de los machos y la temperatura, realizamos el mismo procedimiento que para GSH, únicamente cambiando la variable de respuesta por el cociente los valores de GSSG entre los de GSH. Dado a que un modelo tuvo mayor soporte que todos los demás (Tabla 8) no realizamos inferencia multimodelo.

RESULTADOS ESTUDIO EXPERIMENTAL

Tratamientos de temperatura

Nuestro tratamiento de temperatura fue efectivo. Las temperaturas se mantuvieron significativamente diferentes a lo largo de todo el estudio (Figura 6), en los dos grupos, independientemente de la temporada en que se realizaron las colectas ($F= 3419.6$, $P < 0.01$, $GL= 1, 64$).

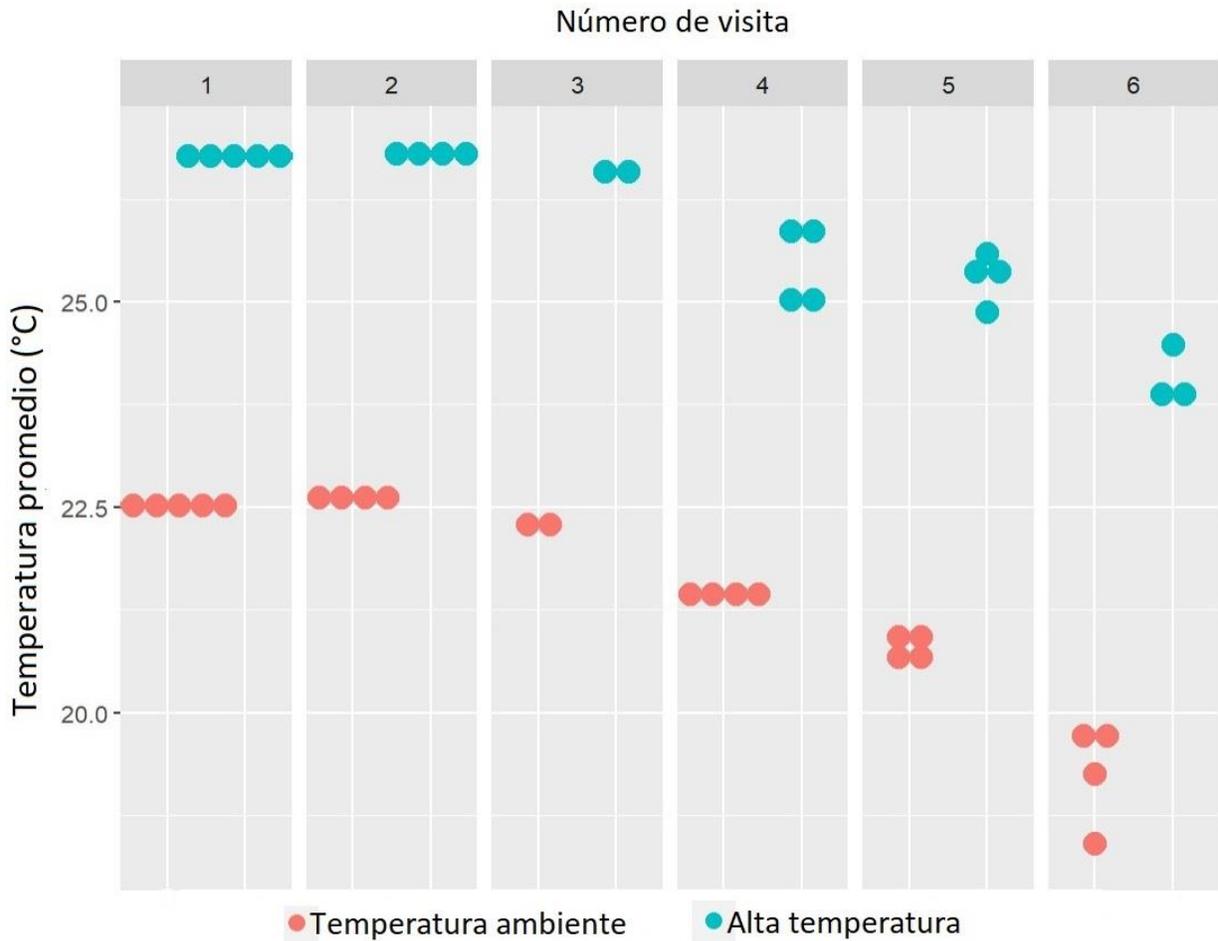


Figura 6. Diferencia en la temperatura del agua, entre los grupos experimentales en las 6 visitas de colecta y por cada individuo incluido en el experimento. Los puntos naranjas corresponden a los individuos sometidos a temperatura ambiente y los azules los que fueron sometidos a altas temperaturas.

Lipoperoxidación (estadística descriptiva)

En promedio los niveles de lipoperoxidación fueron ligeramente mayores en los individuos que se sometieron al tratamiento de temperatura ambiente con respecto a los que estaban en temperaturas elevadas (Figura 7) siendo más marcada esta diferencia en los machos con puestas pequeñas (Log MDA $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 34.66, DS= 26.95, min= 12.56, max= 101.53). Los individuos con valores menores de lipoperoxidación fueron los machos con puestas grandes sometidos a alta temperatura (Log MDA $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 20.03, DS= 2.67, min= 16.85, max= 24.52).

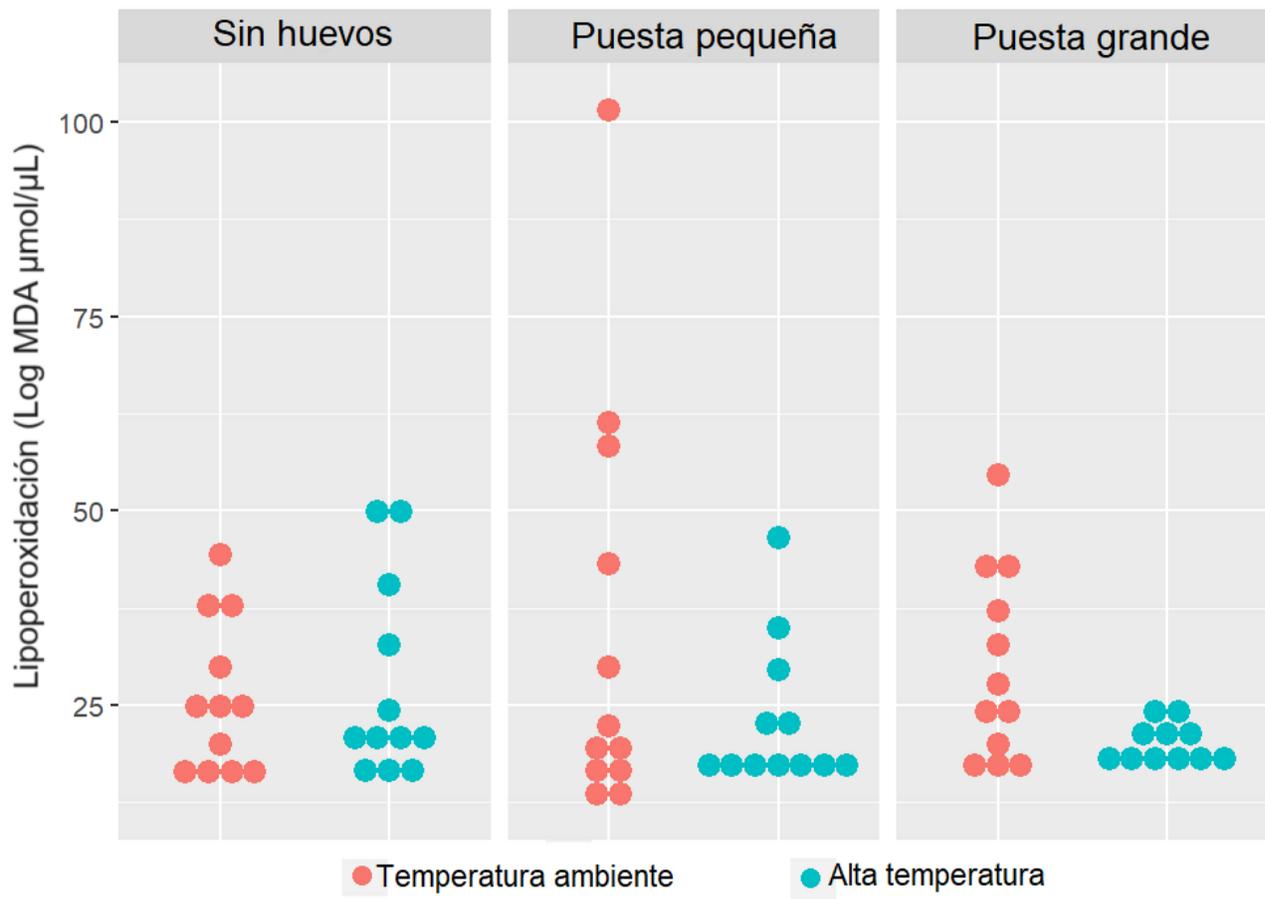


Figura 7. Valores de lipoperoxidación en machos con los tamaños de puesta manipulados experimentalmente (primera columna: machos sin puesta, segunda columna: puesta pequeña y tercera columna: puesta grande) los puntos naranjas corresponden a los individuos sometidos a temperatura ambiente y los azules a temperatura elevada.

Lipoperoxidación (Estadística inferencial)

Al construir los distintos modelos que incluyen diferentes combinaciones de variables predictoras y realizar la selección de modelos con AICc obtuvimos que el modelo nulo es el que tiene mayor soporte (Tabla 5), por lo cual no hay un efecto de nuestros tratamientos experimentales, temperatura y tamaño de puesta, en los niveles de lipoperoxidación de los machos de *A. ovatus*.

Tabla 5. Selección de modelos con AICc para lipoperoxidación asociada al tratamiento de temperatura (T) y el tamaño de la puesta de los machos (TP) en el estudio experimental.

Variables del modelo	Coeficientes de las variables predictoras			AICc	Δ AICc	Peso
	(Intercepto)	T	TP			
Nulo	3.10	-	-	81.6	0.00	0.72
T	3.18	-0.16	-	83.6	2.00	0.26
TP	3.07	-	0.04	91.4	9.7	<0.01
T + TP	3.15	-0.16	0.04	93.5	11.9	<0.01
T + TP + T x TP	3.23	-0.31	<0.01	98.4	16.8	<0.01

Glutación reducido (GSH estadística descriptiva)

En promedio encontramos valores de glutación reducido (GSH) mayores en los machos sin puesta de huevos sometidos a altas temperaturas (Log GSH $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 5.37, DE= 2.33, min= 2.81, max= 9.93). Por otra parte, los machos con puestas pequeñas sometidos a temperatura ambiente tuvieron en promedio valores menores de este marcador de estrés oxidante (Log GSH $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 3.38, DE= 1.41, min= 1.75, max= 6.34) (Figura 8).

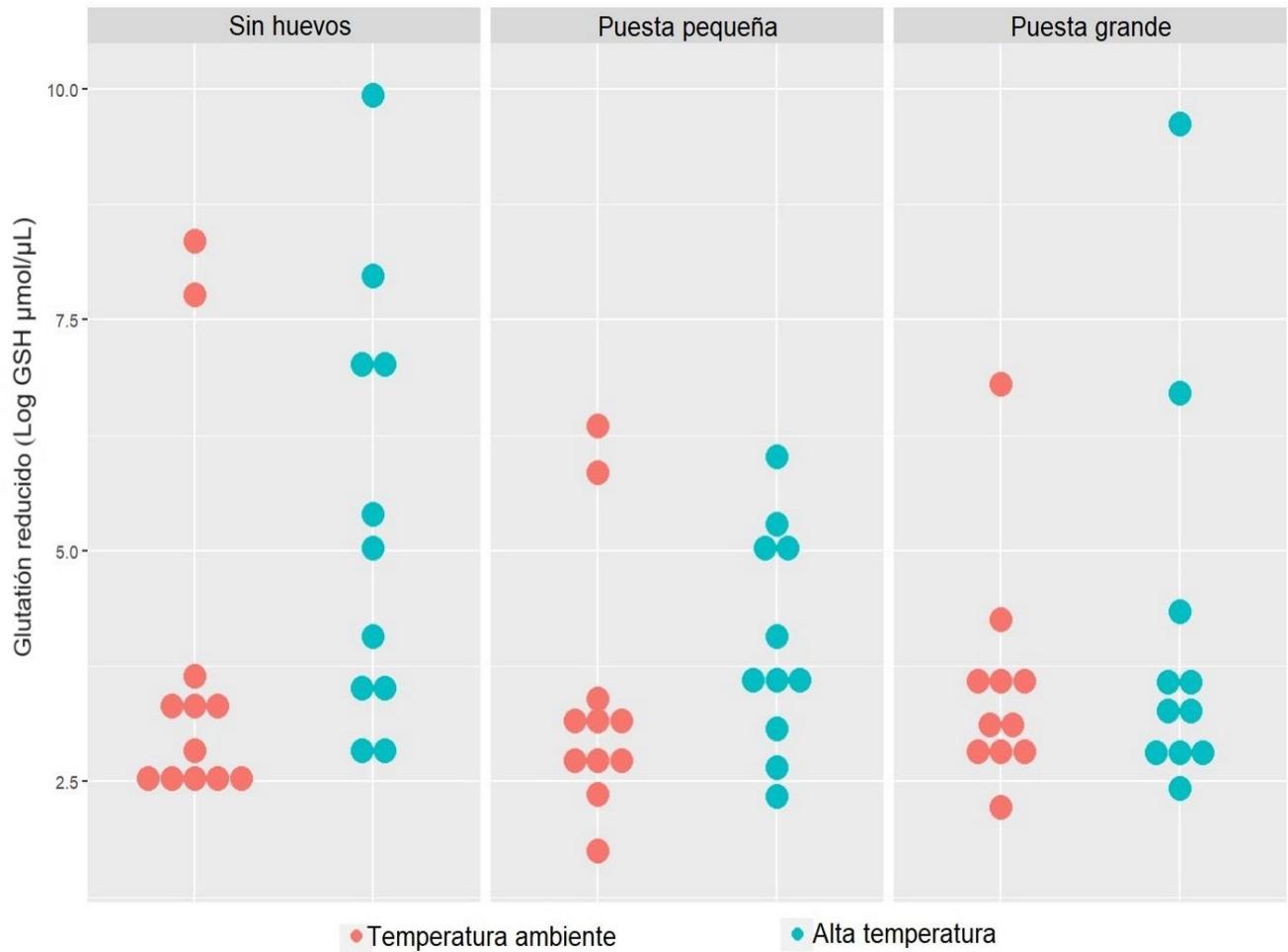


Figura 8. Valores glutación reducido (GSH) en machos sin puesta de huevos, con puesta pequeña y puesta grande sometidos a los tratamientos de temperatura ambiente y temperatura elevada.

Glutación reducido (GSH estadística inferencial)

Al construir los distintos modelos que incluyen diferentes combinaciones de variables predictoras y realizar la selección de modelos encontramos que tres modelos presentaron un nivel de apoyo semejante ($\Delta AIC < 2$) (Tabla 6). Dado que no existe un modelo que sea evidentemente mejor que los otros y que en los tres se encuentra considerado el tamaño de puesta como variable predictora, realizamos inferencias multimodelo para calcular el efecto del tamaño de la puesta sobre los niveles de GSH.

Tabla 6. Selección de modelos con AICc para los valores de GSH asociados al tratamiento de temperatura (T) y el tamaño de la puesta de los machos (TP).

Variables del modelo	Coeficientes de las variables predictoras			AICc	$\Delta AICc$	Peso
	(Intercepto)	T	TP			
T + TP	1.34	0.12	-0.16	44.8	0.0	0.45
T + TP + T x TP	1.23	0.37	-0.01	45.6	0.8	0.29
TP	1.40	-	-0.16	46.4	1.6	0.19
T	1.24	0.20	-	49.4	4.6	0.04
Nulo	1.33	-	-	54.8	10.0	<0.01

Encontramos una relación positiva (Valor predicho= 0.12, ES= 0.05, T= 2.08, P= 0.04) entre la temperatura y los niveles de GSH (Figura 9). Por otra parte, encontramos que los niveles de GSH son mayores en los machos que no cargaban una puesta de huevos (valor predicho= 1.38, ES= 0.15, t= 9.03, P <0.01) con respecto a los machos con tamaños de puesta pequeños y grandes.

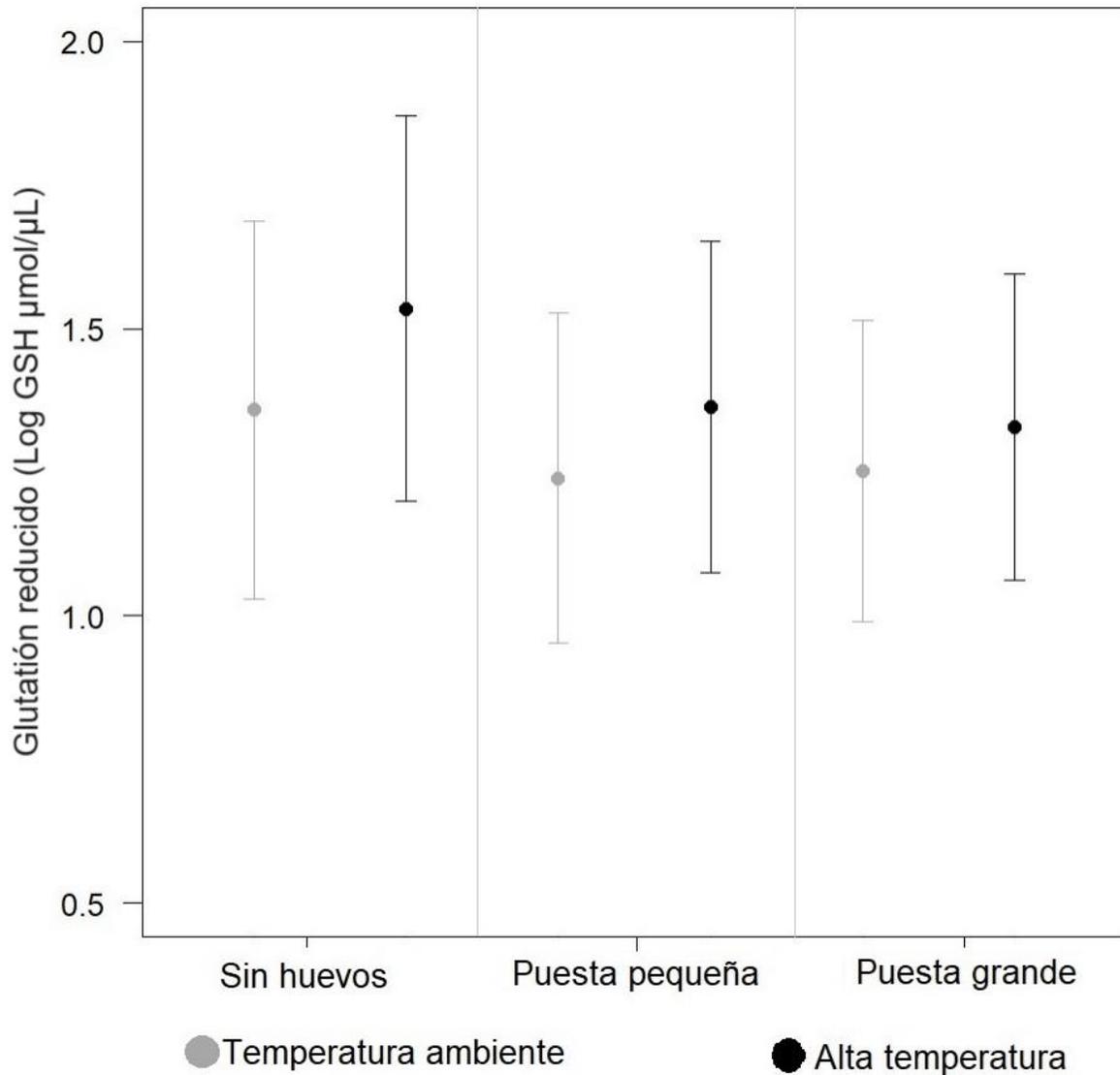


Figura 9. Valores predichos de GSH obtenidos a partir de la inferencia multimodelo que incluye el tamaño de puesta y el tratamiento de temperatura (temperatura ambiente en gris y alta temperatura en negro). Los valores son mayores en los individuos sometidos a mayores temperaturas y que no cargan una puesta de huevos. Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95%.

Glutación oxidado (GSSG estadística descriptiva)

En promedio encontramos valores de GSSG mayores en los machos sin puesta de huevos sometidos a altas temperaturas (Log GSSG $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 5.1, DE= 2.74, min= 2.58, max= 11.43). Por otra parte, los machos con puestas pequeñas sometidos a temperatura ambiente tuvieron en promedio valores menores de este marcador (Log GSSG $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ = 3.0, DE= 1.14, min= 2.17, max= 6.28) (Figura 10).

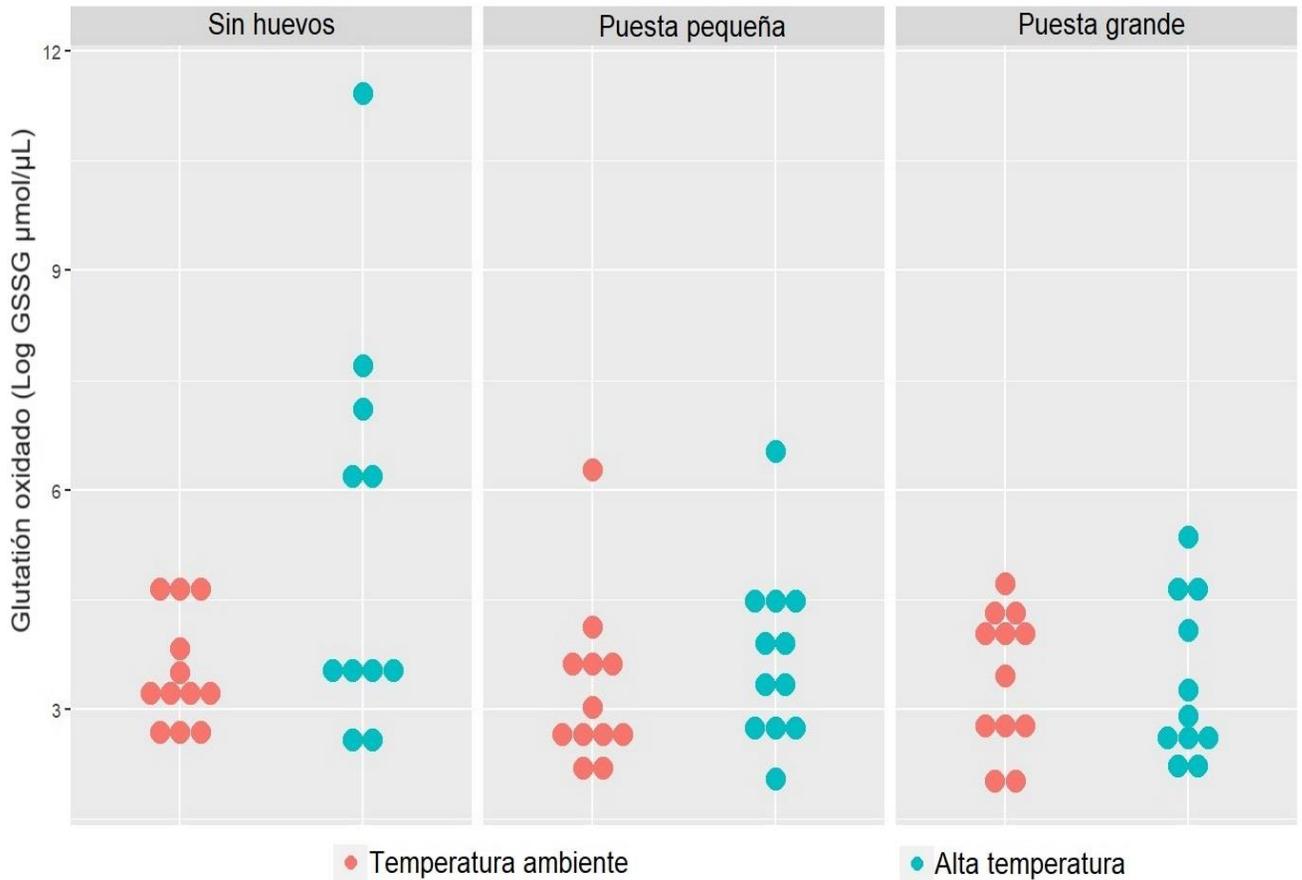


Figura 10. Valores glutación oxidado (GSSG) en machos sin puesta de huevos, con puesta pequeña y puesta grande sometidos a los tratamientos de temperatura ambiente y temperatura elevada.

Glutación oxidado (GSSG estadística inferencial)

Al construir los distintos modelos que incluyen las combinaciones de las variables predictoras (tamaño de puesta y temperatura) y realizar la selección de modelos con AICc obtuvimos que el modelo que incluye la temperatura tuvo un mayor soporte (Tabla 7).

Tabla 7. Selección de modelos con AICc para los valores de GSSG asociados al tratamiento de temperatura (T) y el tamaño de la puesta de los machos (TP).

Variables del modelo	Coeficientes de las variables predictoras			AICc	Δ AICc	Peso
	(Intercepto)	T	TP			
T	1.30	0.15	-	26.2	0.0	0.65
T + TP + T x TP	1.35	-0.01	-0.06	28.9	2.7	0.17
T + TP	1.29	0.15	-0.02	29.2	3.0	0.14
Nulo	1.42	-	-	33.9	7.7	0.01
TP	1.30	0.12	0.14	34.7	8.4	<0.01

Encontramos una relación positiva (Valor predicho= 0.14, ES= 0.06, T= 2.26, P= 0.02) entre la temperatura y los niveles de GSSG (Figura 11).

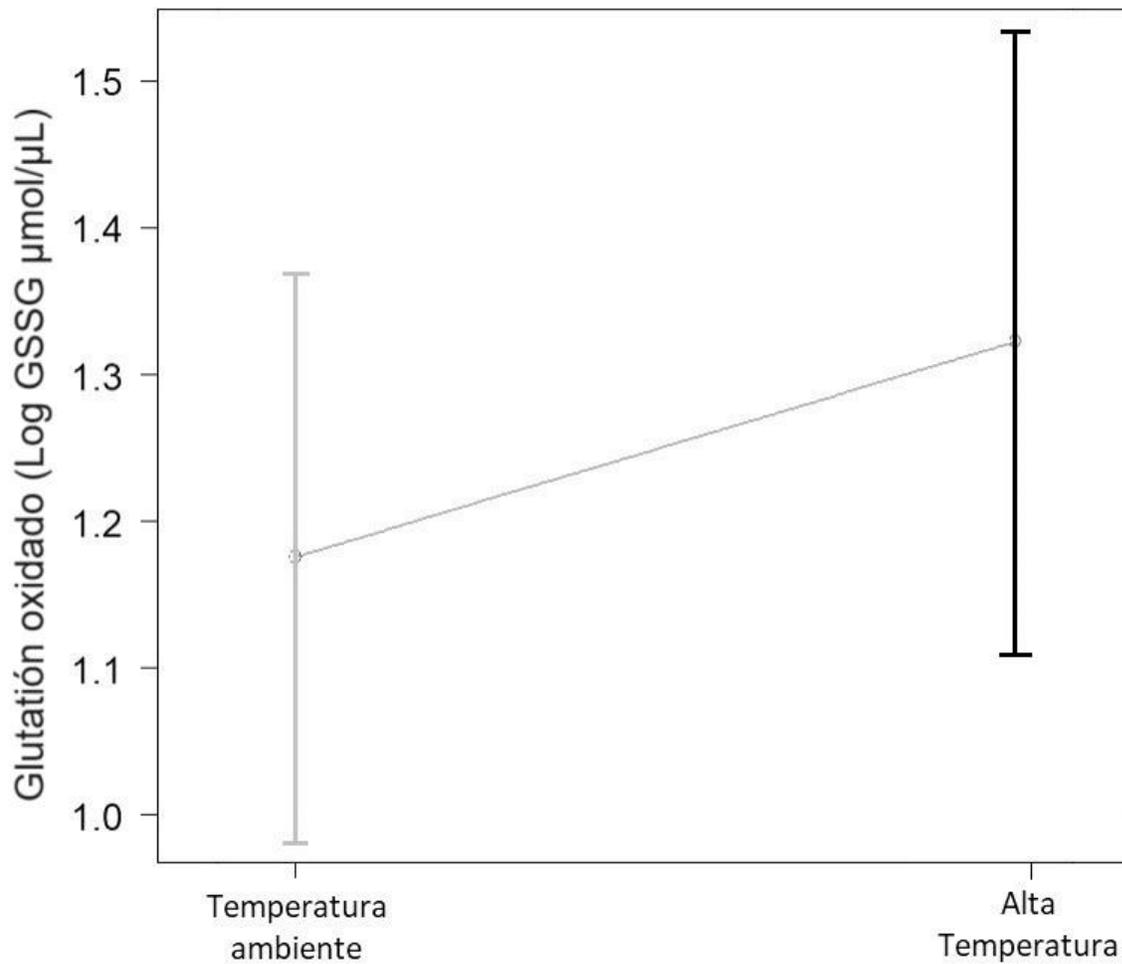


Figura 11. Relación de los valores esperados de GSSG con respecto a los tratamientos de temperatura ambiente y alta temperatura en machos de *A. ovatus*. Se puede observar que los niveles de GSSG son mayores a altas temperaturas. Las barras de error muestran los intervalos de confianza al 95%.

Proporción GSSG/GSH (Estadística inferencial)

Transformamos los datos de GSSG/GSH a logaritmo natural. Al realizar la selección de modelo con AICc el modelo nulo es el que tuvo un mayor soporte (Tabla 8). Por lo tanto, ninguna de nuestras variables predictoras tuvo un efecto sobre la proporción GSSG/GSH en machos de *A. ovatus*.

Tabla 8. Selección de modelos con AICc para los niveles de la proporción GSSG/GSH asociados a las variables predictoras que son el tratamiento de temperatura (T) y el tamaño de la puesta de los machos (TP).

Variables del modelo	Coeficientes de las variables predictoras			AICc	Δ AICc	Peso
	(Intercepto)	T	TP			
Nulo	1.12	-	-	-19.9	0.0	0.93
T	1.14	-0.04	-	-14.3	5.5	0.05
TP	1.14	-	-0.03	-7.4	12.5	<0.01
T + TP	1.16	-0.04	-0.03	-1.7	18.2	<0.01
T + TP + T x TP	1.16	-0.04	-0.02	24.1	44	<0.01

DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis fue determinar si existe un costo oxidante asociado al cuidado paterno y a la exposición a altas temperaturas en chinches acuáticas de la especie *Abedus ovatus*. Para esto realizamos dos estudios, uno correlacional y otro experimental. En el estudio correlacional, de acuerdo con lo que esperábamos, encontramos que los machos que cargan mayor cantidad de huevos tienen mayores niveles de lipoperoxidación. Por otra parte, no encontramos evidencia estadística que apoye la idea de que el esfuerzo parental, medido como el número de huevos y estadio de desarrollo de la puesta, tuviera algún efecto en los niveles de TAC de los machos parentales. Por otra parte, y a diferencia de lo encontrado en el estudio correlacional, no encontramos evidencia de que el esfuerzo parental y la temperatura tuviera un efecto en los niveles de lipoperoxidación en los machos parentales en nuestro estudio experimental. Sin embargo, encontramos mayores niveles de GSSG en individuos sometidos a mayores temperaturas. Los niveles de GSH también fueron mayores a altas temperaturas y en individuos con puestas más pequeñas. Hasta donde sabemos, este estudio es el primero que vincula el cuidado parental y el estrés oxidante en insectos con cuidado paterno exclusivo.

Según los resultados de nuestro estudio correlacional, cargar un mayor número de huevos se asocia con mayores niveles de lipoperoxidación. De igual forma, experimentos con *Drosophila melanogaster*, en los cuales se manipuló el esfuerzo reproductivo a través de la calidad de la dieta a modo de que las hembras produjeran más huevos, se observó que hay mayor daño oxidante en proteínas en aquellos individuos que producen más huevos (Wang *et al.*, 2001). En otros animales como en elefantes marinos (*Mirounga angustirostris*) conforme aumenta el tiempo dedicado a la crianza (cuidado reciente vs cuidado prolongado) se observaron mayores niveles de daño oxidante en lípidos y ADN, pero menor daño en proteínas y una mayor actividad antioxidante enzimática en machos. En hembras, únicamente se encontró una relación positiva entre los niveles de daño proteico y el esfuerzo parental (Sharick *et al.*, 2015). Estos resultados en su conjunto indican que existe un costo oxidante asociado a la reproducción en grupos animales como los artrópodos y algunos mamíferos. Sin embargo, en el ave *Plocepasser mahali* y el pez *Micropterus dolomieu* se encontró que en individuos parentales no hay un incremento en el daño oxidante asociado a el esfuerzo reproductivo, evaluado como lipoperoxidación y carbonilación de proteínas en sangre (Wilson *et al.*, 2012; Cram *et al.*, 2015). De igual forma, en un estudio correlacional realizado en el ave marina *Sula leucogaster*, no se encontró una asociación entre los niveles de lipoperoxidación

y la concentración de ROS medidos en sangre con el tamaño de la puesta o las actividades de cuidado parental (Montoya *et al.*, 2016).

Según los resultados de nuestro estudio correlacional, el tamaño de puesta o el tiempo de cuidado parental no se asocian con los niveles de capacidad antioxidante total. También se ha observado en aves, que un aumento en el esfuerzo reproductivo asociado al número de crías se traduce en una reducción en la capacidad del sistema antioxidante de resistir el daño vinculado a ROS, debido a una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004, Wiersma *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado que las defensas antioxidantes en sangre son menores en aves reproductivas que en no reproductivas (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004; Losdat *et al.* 2011). En años recientes, se ha propuesto la hipótesis del escudo oxidante de la reproducción como una de las razones por las cuales en algunas especies no se observa un mayor daño oxidante en individuos reproductivos con respecto a los no reproductivos. Esta hipótesis propone que cuando en una madre ocurre la transición de un estado no reproductivo al reproductivo, se desencadena una disminución en los niveles de daño oxidante en tejidos (Blount *et al.*, 2016). Un mecanismo por el cual se disminuye el daño oxidante, puede ser mediante el aumento de las defensas antioxidantes. En las hembras del ratón *Mus musculus domesticus* se han observado aumentos en la actividad de la enzima superóxido dismutasa al inicio de la reproducción (enzima del sistema antioxidante, SOD por sus siglas en inglés) que corresponde a menores niveles de oxidación lipídica y proteica (Garratt *et al.*, 2011, 2013). Un patrón similar se observó también en hembras lactantes del jerbo mongol (*Meriones unguiculatus*) y de otro ratón (*Lasiopodomys brandi*) quienes presentaron un aumento en TAC y en la actividad antioxidante de SOD en el hígado (Yang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Esto puede proteger a las madres y particularmente a los gametos y crías en desarrollo de daños causados por el incremento de ROS resultante del esfuerzo reproductivo (Blount *et al.*, 2016). Sin embargo, el momento en el cual el escudo oxidante se activa puede diferir entre los organismos de distintas taxa debido a las diferencias entre sus procesos reproductivos (Blount *et al.* 2016). En este sentido, y considerando que los niveles de TAC no son distintos en individuos con cuidado parental reciente y prolongado de *A. ovatus* es posible que las defensas antioxidantes de los machos parentales no aumenten al entrar en un estado reproductivo, por lo cual no serían suficientes para evitar el daño oxidante asociado a los cuidados parentales.

Un punto importante para considerar son las diferencias metodológicas utilizadas entre los distintos estudios que ponen a prueba la hipótesis del costo oxidante de la reproducción pueden ser las causantes de estas discrepancias en los resultados obtenidos (Speakman y Garratt, 2014; Blount *et al.*, 2016; Constantini, 2019). Se ha observado que los niveles de daño oxidante asociado al esfuerzo reproductivo pueden ser variables dependiendo del tejido donde se mida y el marcador utilizado. En hembras reproductivas se ha observado una disminución de daño oxidante en hígado, en corazón y en folículos ováricos (Jan *et al.*, 2014; Blount *et al.*, 2016). Dada la importancia de estos órganos durante el proceso reproductivo, se ha especulado que los individuos pueden realizar una protección preventiva contra la sobreproducción de ROS por un aumento en la tasa metabólica que acompaña a los procesos reproductivos. Por otra parte, al medir los niveles de estrés oxidante como carbonilación proteica en sangre, se ha encontrado que estos son mayores en individuos reproductivos (Blount *et al.*, 2016). En nuestro caso al medir los marcadores de estrés oxidante en la hemolinfa, que es el análogo de la sangre en vertebrados, evita que exista algún sesgo asociado al tejido u órgano en donde se evalúa el estrés oxidante, ya que se ha sugerido que medir distintos marcadores en sangre puede darnos una mejor idea de los costos oxidantes del esfuerzo reproductivo actual que el individuo esté realizando, a diferencia de los marcadores en órganos que podrían tener una protección contra daño oxidante (Blount *et al.*, 2016).

Es necesario hacer énfasis en las diferencias que encontramos en los niveles de lipoperoxidación entre nuestro estudio correlacional y experimental. Como se señaló anteriormente, únicamente parecían existir diferencias asociadas al tamaño de puesta en el estudio correlacional, en contraste a lo encontrado en el estudio experimental donde se manipuló la temperatura y el tamaño de la puesta en donde ninguno de los factores estudiados en esta tesis influyó en los niveles de lipoperoxidación en los machos parentales de *A. ovatus*. Estas discrepancias podrían deberse a que en condiciones naturales (estudio correlacional) hay mayor dificultad para conseguir alimento y la calidad de este es más variable. Sin embargo, no podemos descartar que existan otros factores que no evaluamos en este trabajo que pudieran influir en los niveles de lipoperoxidación en estos insectos.

El efecto de la calidad del alimento sobre el estatus redox ha sido observado en otros artrópodos como en *Daphnia magna* en donde se observó que al suministrarles una dieta de baja calidad compuesta de levadura presentaron una reducción del 50% de su capacidad antioxidante

al ser expuestos a sustancias húmicas con respecto a las que fueron alimentadas con alga verde (Steinberg *et al.*, 2010). El peso de la puesta de huevos puede incrementar esta dificultad o la capacidad de resistir la corriente constante del agua en los ríos donde las encontramos (Kight *et al.*, 1995). Por otra parte, en condiciones de laboratorio el alimento es constante y de calidad y las corrientes de agua no están presentes (estudio experimental) por lo cual la actividad física asociada al nado contracorriente puede ser menor. Los resultados de los estudios que realizamos podrían indicar que en condiciones de campo el tiempo de cuidado parental puede resultar más costoso en términos oxidantes que el número de huevos que los machos cargan.

Otros estudios han mostrado con frecuencia una relación directa entre la temperatura y la peroxidación lipídica (Hochachka y Somero, 2002; Kagawa y Mugiya, 2002). Se sabe que el aumento de la temperatura puede aumentar la tasa metabólica de los individuos por lo cual se generarían una mayor cantidad de ROS que aumentaría los niveles de peroxidación lipídica en los organismos (Hochachka y Somero, 2002; Lushchak y Bagnyukova, 2006). Las altas temperaturas también pueden desencadenar respuestas inflamatorias que pueden contribuir a un mayor daño por peroxidación lipídica (Kim *et al.*, 2017). Por otra parte, también se ha observado que existe una respuesta de tolerancia a altas temperaturas y resistencia a la peroxidación lipídica mediada por proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) (Wong *et al.*, 1998). Por ejemplo, los niveles de HSP en el cerebro de los peces dorados aumentan debido a un aumento de temperatura de 22 a 32 °C (Kim *et al.*, 2017; Constantini, 2019; Kagawa y Mugiya, 2002). En nuestro sistema de estudio sería importante evaluar los niveles de lipoperoxidación en puntos distintos de las etapas de estrés térmico, lo cual nos permitiría saber si existe una respuesta de tolerancia a las altas temperaturas. De igual forma, dado que existen de forma natural estas variaciones de temperatura en el hábitat natural de *A. ovatus*, es posible que estos insectos sean tolerantes a los cambios de temperatura. Sin embargo, en nuestro experimento se mantuvo una temperatura elevada constantemente.

Encontramos una asociación positiva entre la temperatura y los niveles de GSH y GSSG, pero la proporción GSSG/GSH no se vio afectada por la temperatura. El GSSG y el GSH son componentes críticos del sistema antioxidante. El GSH actúa como un potente antioxidante, neutralizando ROS reduciendo el daño oxidante en las células (Wu *et al.*, 2004). La acumulación de GSSG puede ser indicativa de un aumento en el estrés oxidante o una disminución en la

capacidad antioxidante. Los análisis de los niveles de GSSG y GSH por separado, nos permiten tener una visión más completa de si existe una respuesta antioxidante y cómo funciona ante un estrés térmico. El tamaño de puesta que cargan los machos únicamente tuvo un efecto sobre los niveles de GSH, siendo mayores en los machos sin huevos y a altas temperaturas. Lo anterior podría indicarnos que el cargar una mayor cantidad de huevos durante tiempo prolongado puede disminuir las defensas antioxidantes. Sin embargo, los niveles de GSSG no se vieron afectados por el tamaño de puesta ni la temperatura. Lo anterior podría indicar que existe una respuesta antioxidante ante el aumento de la temperatura incrementando los niveles de GSH a mayores temperaturas. Lo cual también podría explicar que no existan diferencias en los niveles de lipoperoxidación en nuestro estudio experimental. Se sabe que el cuidado paterno en estas chinches son una señal honesta de la condición de los machos, que se define como un rasgo que proporciona información preciosa acerca de la calidad y condición de los machos. Lo anterior debido a que las hembras prefieren copular con machos que ya llevan una puesta de huevos que con machos sin huevos (Aparicio-Moreno, datos no publicados, Ohba *et al.*, 2016, 2018) y dado que los machos que utilizamos en este estudio tenían el dorso completamente cubierto podemos asumir que su condición fisiológica y defensas antioxidantes fueron eficientes ante el aumento experimental de la temperatura.

No encontramos evidencia de que la temperatura y el tamaño de puesta de los machos parentales influya en la proporción GSSG/GSH. Si los niveles de GSSG y GSH suben en conjunto puede indicar que existe una respuesta antioxidante produciendo más GSH que compense el aumento en GSSG producido por el incremento en la liberación de ROS y, por lo tanto, la proporción de GSSG/GSH no diferiría entre nuestros tratamientos. Si hubiese un aumento en la proporción GSSG/GSH puede indicar un desequilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes produciendo un estado de estrés oxidante (Sentellas *et al.*, 2014). Esto significaría que hay una mayor acumulación de glutatión oxidado en relación con el glutatión reducido. El GSSG se forma cuando el GSH actúa como antioxidante y neutraliza especies reactivas de oxígeno y otros agentes oxidantes. Por otro lado, una proporción GSSG/GSH más baja indicaría que hay una proporción más alta de glutatión reducido en relación con el glutatión oxidado, lo que podría significar que la capacidad del individuo para neutralizar ROS y otros agentes oxidantes es suficiente. Sin embargo, es importante resaltar que la relevancia de la proporción GSSG/GSH como un marcador de estrés oxidante se ha discutido de manera crítica (Flohé, 2013). Ya que esta proporción únicamente nos

indicaría el balance redox de este componente en un momento específico y estacionario, que en su mayoría resulta de procesos enzimáticos que ocurren muy rápidamente en donde se degrada o regenera el GSH (Flohé, 2013).

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio experimental no encontramos evidencia de que exista daño oxidante asociado al cuidado paterno y las altas temperaturas. Por otra parte, en condiciones de vida libre, encontramos que existe daño oxidante asociado al cuidado paterno en chinches acuáticas de la especie *A. ovatus*. Dadas las discrepancias entre nuestros estudios no podemos concluir que exista un costo oxidante del cuidado paterno en chinches acuáticas. Futuros estudios que tengan en consideración otros mecanismos antioxidantes específicos, como el análisis de enzimas antioxidantes y, de igual forma otros factores ambientales que no fueron consideradas en esta tesis y que podrían ser más relevantes en el impacto del cuidado parental sobre el estatus fisiológico podrían ayudarnos a entender mejor la complejidad de los mecanismos fisiológicos involucrados en los costos de la reproducción.

REFERENCIAS

- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., & Sorci, G. (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology letters*, 7(5), 363-368.
- Almroth, B. C., Asker, N., Wassmur, B., Rosengren, M., Jutfelt, F., Gräns, A., ... & Sturve, J. (2015). Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 468, 130-137.
- Anderson, D. R., & Burnham, K. P. (2002). Avoiding pitfalls when using information-theoretic methods. *The Journal of wildlife management*, 912-918.
- Armstrong, D., & Stratton, R. D. (Eds.). (2016). Oxidative stress and antioxidant protection: The science of free radical biology and disease. John Wiley & Sons.
- Barnard, C. J., & J. M. Behnke. (1990). Parasitism and host behaviour. Taylor and Francis, London, UK.
- Beaulieu, M., Geiger, R. E., Reim, E., Zielke, L & Fischer, K. (2015). Reproduction alters oxidative status when it is traded-off against longevity. *Evolution*, 69, 1786-1796.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*.
- Blount, J. D., Vitikainen, E. I., Stott, I., & Cant, M. A. (2016). Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews*, 91(2), 483-497.
- Boggs, C. L. (2009). Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*, 23(1), 27-37.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., ... & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755-767.
- Burnham, K. P., Anderson, D. R., & Huyvaert, K. P. (2011). AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behavioral ecology and sociobiology*, 65, 23-35.
- Clutton-Brock, T. H. (1991). *The Evolution of Parental Care*. Princeton University Press. NJ, USA. 352.
- Clutton-Brock, T. H. & Vincent, A. C. (1991). Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature*, 351(6321), 58-60.
- Clutton-Brock, T. H. (2019). Cooperative breeding. *Encyclopedia of Animal Behavior*, 31.
- Collin, F. (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2407.
- Costantini, D. (2019). Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. *Journal of Experimental Biology*, 222(13).
- Costantini, D., Casasole, G., & Eens, M. (2014). Does reproduction protect against oxidative stress? *The Journal of Experimental Biology*, 217(23), 4237-4243.

- Cram, D. L., Blount, J. D., York, J. E., & Young, A. J. (2015). Immune response in a wild bird is predicted by oxidative status, but does not cause oxidative stress. *PLoS One*, *10*(3), e0122421.
- Crowl, T. A., & Alexander Jr, J. E. (1989). Parental care and foraging ability in male water bugs (*Belostoma flumineum*). *Canadian Journal of Zoology*, *67*(2), 513-515.
- Da Silva, J. A. P. (1999). Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *876*(1), 102-118.
- Dhakal, C. P. (2017). Dealing with outliers and influential points while fitting regression. *Journal of Institute of Science and Technology*, *22*(1), 61-65.
- De Jong, G., & Van Noordwijk, A. J. (1992). Acquisition and allocation of resources: genetic (co) variances, selection, and life histories. *The American Naturalist*, *139*(4), 749-770.
- Dick, JT., Faloon, SE & Elwood, RW. (1998). Active brood care in an amphipod: influences of embryonic development, temperature and oxygen. *Animal Behaviour*, *56*, 663-672.
- Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature chemical biology*, *7*(8), 504.
- Dowling, D. K., & Simmons, L. W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1663), 1737-1745.
- Feldman, E. (2004). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. *AMDCC Protocols, Version*, *50*, 1.
- Finkel T. & N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*, 239–247.
- Flatt, T., & Heyland, A. (Eds.). (2011). *Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs*. OUP Oxford.
- Flohé, L. (2013). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1830*(5), 3139-3142.
- Franklin, C. E., Davison, W., & Seebacher, F. (2007). Antarctic fish can compensate for rising temperatures: thermal acclimation of cardiac performance in *Pagothenia borchgrevinki*. *Journal of Experimental Biology*, *210*(17), 3068-3074.
- Garratt, M., Vasilaki, A., Stockley, P., McArdle, F., Jackson, M., & Hurst, J. L. (2011). Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1708), 1098-1106.
- Garratt, M., Pichaud, N., King, E. D. A., & Brooks, R. C. (2013). Physiological adaptations to reproduction. I. Experimentally increasing litter size enhances aspects of antioxidant defence but does not cause oxidative damage in mice. *Journal of Experimental Biology*, *216*(15), 2879-2888.
- Gilbert, J. D., & Manica, A. (2010). Parental care trade-offs and life-history relationships in insects. *The American Naturalist*, *176*(2), 212-226.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., & Charnov, E. L. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*, *293*(5538), 2248-2251.

- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5), 715S-725S.
- Harman, D. (1983). Free radical theory of aging: consequences of mitochondrial aging. *Age*, 6(3), 86-94.
- Harshman, L. G., & Zera, A. J. (2007). The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(2), 80-86.
- Hawker, J. S., & Jenner, C. F. (1993). High temperature affects the activity of enzymes in the committed pathway of starch synthesis in developing wheat endosperm. *Functional Plant Biology*, 20(2), 197-209.
- Hayward, A., & Gillooly, J. F. (2011). The cost of sex: quantifying energetic investment in gamete production by males and females. *PLoS One*, 6(1), e16557.
- Hemnani, T. A. R. U. N. A., & Parihar, M. S. (1998). Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 42, 440-452.
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford university press.
- Ichikawa, N. (1988). Male brooding behaviour of the giant water bug *Lethocerus deyrollei* vuillefroy (Hemiptera: Belostomatidae). *Journal of Ethology*, 6(2), 121-127.
- Jan, M. H., Das, G. K., Khan, F. A., Singh, J., Bashir, S. T., Khan, S., Prasad, J. K., Mehrotra, S., Pathak, M. C., Singh, G. & Sarkar, M. (2014). Evaluation of follicular oxidant-antioxidant balance and oxidative damage during reproductive acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian Pacific Journal of Reproduction* (3), 35–40.
- Johnson, J. B., & Omland, K. S. (2004). Model selection in ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 19(2), 101-108.
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642.
- Kagawa, N., & Mugiya, Y. (2002). Brain HSP70 mRNA expression is linked with plasma cortisol levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a potential predator. *Zoological Science*, 19(7), 735-740.
- Kaitala, A. (1991). Phenotypic plasticity in reproductive behaviour of waterstriders: trade-offs between reproduction and longevity during food stress. *Functional Ecology*, 12-18.
- Kight, S. L., Sprague, J., Kruse, K. C., & Johnson, L. (1995). Are egg-bearing male water bugs, *Belostoma flumineum* Say (Hemiptera: Belostomatidae), impaired swimmers?. *Journal of the Kansas entomological society*, 468-470.
- Kim, J. H., Park, H. J., Kim, K. W., Hwang, I. K., Kim, D. H., Oh, C. W. & Kang, J. C. (2017). Growth performance, oxidative stress, and non-specific immune responses in juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria*, by changes of water temperature and salinity. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43, 1421-1431.
- Klug, H., Bonsall, MB., & Alonzo, SH. (2013). The origin of parental care in relation to male and female life history. *Ecology and Evolution*, 3, 779-791.

- Klug, H., & Bonsall, M. B. (2014). What are the benefits of parental care? The importance of parental effects on developmental rate. *Ecology and Evolution*, 4(12), 2330-2351.
- Lalouette, L., Williams, CM., Hervant, F., Sinclair, B. J & Renault, D. (2011). Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158, 229-234.
- Lambert, A.J., & Brand, M. D. (2009). Reactive oxygen species production by mitochondria. *Mitochondrial DNA*, 165-181.
- Lissaker, M., Kvarnemo, C & Svensson, O. (2003). Effects of a low oxygen environment on parental effort and filial cannibalism in the male sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Behavioral Ecology*, 14, 374-381.
- Lessells, C. M. (2012). Sexual conflict. *The evolution of parental care*, 150-170.
- Lochmiller, R. L., & Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88(1), 87-98.
- Loft, S., Astrup, A., Buemann, B., & Poulsen, H. E. (1994). Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *The FASEB journal*, 8(8), 534-537.
- Losdat, S., Helfenstein, F., Gaude, B., & Richner, H. (2011). Reproductive effort transiently reduces antioxidant capacity in a wild bird. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1218-1226.
- Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 30-35.
- Madhavan, MM. (1974). Structure and function of the hydropyle of the egg of the bug, *Sphaerodema molestum*. *Journal of Insect Physiology*, 20, 1341-1349.
- Magrath, MJ., & Komdeur, J. (2003). Is male care compromised by additional mating opportunity? *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 424-430.
- Metcalfe, N. B., & Alonso-Alvarez, C. (2010). Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*, 24(5), 984-996.
- Moller, A. P., & de Lope, F. (1994). Differential costs of a secondary sexual character: an experimental test of the handicap principle. *Evolution*, 48(5), 1676-1683.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12, 75-92.
- Montoya, B., Valverde, M., Rojas, E., & Torres, R. (2016). Oxidative stress during courtship affects male and female reproductive effort differentially in a wild bird with biparental care. *Journal of Experimental Biology*, 219(24), 3915-3926.

- Moreno, J., Lobato, E., González-Braojos, S., & Castañeda, RRD. (2010). Nest construction costs affect nestling growth: a field experiment in a cavity-nesting passerine. *Acta Ornithologica*, 45, 139-145.
- Munguía-Steyer, R., & Macías-Ordóñez, R. (2007). Is it risky to be a father? Survival assessment depending on sex and parental status in the water bug *Abedus breviceps* using multistate modelling. *Canadian Journal of Zoology*, 85(1), 49-55.
- Munguía-Steyer, R., Favila, EM & Macías-Ordóñez, R. (2008). Brood Pumping Modulation and the Benefits of Paternal Care in *Abedus breviceps* (Hemiptera: Belostomatidae). *Ethology*, 114, 693-700.
- Munguía-Steyer, R., González-García, E., Castaños, C. E & Córdoba-Aguilar, A. (2019). Costly parenting: physiological condition over time and season in males of the giant waterbug *Abedus dilatatus*. *Physiological Entomology*, 44, 236-244.
- Ohba, S. Y. (2019). Ecology of giant water bugs (Hemiptera: Heteroptera: Belostomatidae). *Entomological Science*, 22(1), 6-20.
- Ohba, S. Y., Matsuo, S., Huynh, T. T. T., & Kudo, S. I. (2018). Female mate preference for egg-caring males in the giant water bug *Diplonychus rusticus* (Heteroptera Belostomatidae). *Ethology Ecology & Evolution*, 30(5), 477-484.
- Ohba, S. Y., Okuda, N., & Kudo, S. I. (2016). Sexual selection of male parental care in giant water bugs. *Royal society open science*, 3(5), 150720.
- Partridge, L., Green, A., & Fowler, K. (1987). Effects of egg-production and of exposure to males on female survival in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 33(10), 745-749.
- Pinheiro, J. C., & Bates, D. M. (2000). Extending the basic linear mixed-effects model. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*, 201-270.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), 1243-1276.
- Requena, G. S., Munguía-Steyer, R., & Machado, G. (2014). Paternal care and sexual selection in arthropods. In *Sexual selection* (pp. 201-233). Academic Press.
- Reznick, D., Nunney, L., & Tessier, A. (2000). Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends in ecology & evolution*, 15(10), 421-425.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Ridley, M. (1978). Paternal care. *Animal Behaviour*, 26, 904-932.
- Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P., & Wolfner, M. F. (2016). Reproduction–immunity trade-offs in insects. *Annual review of entomology*, 61, 239-256.
- Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H., & Speakman, J. R. (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now?. *Trends in ecology & evolution*, 27(10), 570-577.

- Sentellas, S., Morales-Ibanez, O., Zanuy, M., & Albertí, J. J. (2014). GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 1006-1015.
- Sharick, J. T., Vazquez-Medina, J. P., Ortiz, R. M., & Crocker, D. E. (2015). Oxidative stress is a potential cost of breeding in male and female northern elephant seals. *Functional Ecology*, 29(3), 367-376.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(7), 363-383.
- Smith, R. L. (1976). Male brooding behavior of the water bug *Abedus herberti* (Hemiptera: Belostomatidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 69(4), 740-747.
- Smith, R. L. (1997). Evolution of paternal care in the giant water bugs (Heteroptera: Belostomatidae). In: Crespi, BJ & Choe, JC. (ed). *The Evolution of Social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press. UK. 116-149.
- Song, G., Dong, X., Wu, J., & Wang, Y. G. (2017). Blockwise AICc for model selection in generalized linear models. *Environmental Modeling & Assessment*, 22, 523-533.
- Speakman, J. R., & Garratt, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays*, 36(1), 93-106.
- Stearns, S. C. (1992). *The Evolution of Life Histories*. Oxford: Oxford University Press.
- Steinberg, C. E., Ouerghemmi, N., Herrmann, S., Bouchnak, R., Timofeyev, M. A., & Menzel, R. (2010). Stress by poor food quality and exposure to humic substances: *Daphnia magna* responds with oxidative stress, lifespan extension, but reduced offspring numbers. *Hydrobiologia*, 652, 223-236.
- Swart, C. C., Deaton, L. E., & Felgenhauer, B. E. (2006). The salivary gland and salivary enzymes of the giant waterbugs (Heteroptera; Belostomatidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(1), 114-122.
- Tallamy, D. W. (2001). Evolution of exclusive paternal care in arthropods. *Annual review of entomology*, 46(1), 139-165.
- Tatar, M., & Carey, J. R. (1995). Nutrition mediates reproductive trade-offs with age-specific mortality in the beetle *Callosobruchus maculatus*. *Ecology*, 76(7), 2066-2073.
- Tatar, M., Carey, J. R., & Vaupel, J. W. (1993). Long-term cost of reproduction with and without accelerated senescence in *Callosobruchus maculatus*: analysis of age-specific mortality. *Evolution*, 47(5), 1302-1312.
- Trivers, RL. (1972) Parental investment and sexual selection. In: Campbell, B. (ed) *Sexual Selection and the Descent of Man*. Aldine. New York. 136-179
- Trumbo, ST. (2017). Feeding upon and preserving a carcass: the function of pre-hatch parental care in a burying beetle. *Animal Behaviour*, 130, 241-249.
- Van Noordwijk, A. J., & de Jong, G. (1986). Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *The American Naturalist*, 128(1), 137-142.

- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., & Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological indicators*, 23, 274-279.
- Wang, Y., Salmon, A. B., & Harshman, L. G. (2001). A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*, 36(8), 1349-1359.
- Wegmann, M., Voegeli, B., & Richner, H. (2015). Oxidative status and reproductive effort of great tits in a handicapping experiment. *Behavioral Ecology*, 26(3), 747-754.
- Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J. R., & Verhulst, S. (2004). Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(suppl_5), S360-S363.
- Wilson, S. M., Gravel, M. A., Mackie, T. A., Willmore, W. G., & Cooke, S. J. (2012). Oxidative stress associated with paternal care in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 162(3), 212-218.
- Wong, H. R., Menendez, I. Y., Ryan, M. A., Denenberg, A. G., & Wispé, J. R. (1998). Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275(4), L836-L841.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492.
- Xu, Y. C., Yang, D. B., Speakman, J. R., & Wang, D. H. (2014). Oxidative stress in response to natural and experimentally elevated reproductive effort is tissue dependent. *Functional Ecology*, 28(2), 402-410.
- Yang, D. B., Xu, Y. C., Wang, D. H., & Speakman, J. R. (2013). Effects of reproduction on immunosuppression and oxidative damage, and hence support or otherwise for their roles as mechanisms underpinning life history trade-offs, are tissue and assay dependent. *Journal of Experimental Biology*, 216(22), 4242-4250.