



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Licenciatura en Biología Experimental

Costos en la memorización de pareja en hembras

PRESENTA:

MARCOS IBARRA GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE CONTRERAS GARDUÑO

ASESOR INTERNO
Dr. JUAN CARLOS TORRES GUZMÁN

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
OBJETIVO.....	22
HIPÓTESIS.....	22
Predicciones.....	22
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
Descripción de tratamientos.....	23
MÉTODO.....	25
1.- Obtención de pupas.....	25
2.- Tratamientos químicos.....	26
2.1.- Tratamiento con zebularina.....	26
2.2.- Tratamiento con metopreno.....	26
3.- Arena de conducta.....	26
3.1.- Identificación en la arena de conducta.....	27
4.- Encuentros.....	27
4.1.- Prueba de memoria y evocación de memoria.....	27
4.1.1.- Primer encuentro (memorización de macho pareja).....	28
4.1.2.- Segundo encuentro (prueba de evocación de memoria).....	28
4.1.3.- Tercer encuentro (prueba de evocación de memoria).....	29
5.- Obtención de muestras de cerebro y almacenamiento.....	29
6.-Análisis de antioxidantes y especies reactivas (RS).....	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	31
RESULTADOS.....	32

1.- Grupos control.....	32
1.1.- Supervivencia.....	32
1.2.- Moléculas Pro-oxidantes.....	32
1.2.1.- Anión Superóxido.....	32
1.2.2.- Peróxido de Hidrogeno.....	33
1.2.3.- Óxido Nítrico.....	34
1.3.- Antioxidantes.....	35
1.3.1.- Antioxidantes Totales.....	35
1.3.2.- Catalasa.....	35
1.3.3.- Glutación Peroxidasa.....	36
1.3.4.- Superóxido Dismutasa.....	37
1.4.- Reservas Energéticas (Triglicéridos).....	38
2.- Una cópula y un encuentro.....	39
2.1.- Supervivencia.....	39
2.2.- Moléculas Pro-oxidantes.....	40
2.2.1.- Anión Superóxido.....	40
2.2.2.- Peróxido de Hidrogeno.....	41
2.2.3.- Óxido Nítrico.....	42
2.3.- Antioxidantes.....	43
2.3.1.- Antioxidantes Totales.....	43
2.3.2.- Catalasa.....	44
2.3.3.- Glutación Peroxidasa.....	45
2.3.4.- Superóxido Dismutasa.....	46
2.4.- Reservas Energéticas (Triglicéridos).....	47
3.- Una cópula y 2 encuentros.....	48
3.1.- Supervivencia.....	48
3.2.- Moléculas Pro-oxidantes.....	49
3.2.1.- Anión Superóxido.....	49
3.2.2.- Peróxido de Hidrogeno.....	50
3.2.3.- Óxido Nítrico.....	51
3.3.- Antioxidantes.....	52
3.3.1.- Antioxidantes Totales.....	52
3.3.2.- Catalasa.....	53
3.3.3.- Glutación Peroxidasa.....	54
3.3.4.- Superóxido Dismutasa.....	55

3.4.- Reservas Energéticas (Triglicéridos).....	56
DISCUSIÓN.....	58
1.- Supervivencia.....	58
2.- Antioxidantes vs especies reactivas (RS).....	58
3.- Triglicéridos.....	59
4.-Estrés oxidante (pro-oxidantes).....	60
5.- Enzimas antioxidantes.....	62
CONCLUSIÓN.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
APÉNDICE.....	70
Tabla 1: fuentes naturales de antioxidantes y sus beneficios para la salud.....	71
Tabla 2: cuantificación de enzimas antioxidantes, ROS y reservas energéticas.....	76

RESUMEN

La memoria no solo es interesante desde el punto de vista de sus mecanismos, sino también por su importancia evolutiva. Por ejemplo, favorece el reconocimiento de alimento, y la elección de pareja. Las hembras del insecto *Tenebrio molitor* recuerdan a su primera pareja, y se ha detectado actividad de catalasa en sus cerebros. Esto supone que podrían estar enfrentando un reto oxidativo derivado de la actividad de recordar a su. Por lo tanto, es posible que a medida que las hembras recordaran más a su pareja (desde uno a tres re-encuentros con la pareja y un macho nuevo), vivirían menos, tendrían menos antioxidantes y triglicéridos, y más pro-oxidantes que las hembras control (vírgenes, sin contacto con la pareja después de copular o con re-encuentros, pero aplicándoles un amnésico para que olvidaran a la pareja). Con los resultados obtenidos en este trabajo y de acuerdo con nuestra hipótesis, las hembras que memorizaron a su pareja y evocaron esta memoria, presentaron niveles de especies reactivas de oxígeno que sobrepasaron la producción de antioxidantes, vivieron menos días y tuvieron menos reservas de triglicéridos; que las de los grupos control. Por lo tanto, proponemos que la memoria en la elección de pareja es costosa en términos de estrés oxidante y gasto de energía, disminuyendo su probabilidad de supervivencia.

INTRODUCCIÓN

Tanto vertebrados como invertebrados que presentan aprendizaje y memoria tienen circuitos neuronales que conforman una estructura llamada cerebro, en el cual se pueden diferenciar regiones principales que cooperan sinérgicamente para realizar actividades biológicas (Fig. 1) y el tamaño de regiones específicas varía entre especie de acuerdo a sus actividades. Por ejemplo, en aves, las especies de córvidos que almacenan alimento presentan un hipocampo relativamente más grande que las que no almacenan [1]. Adicionalmente se ha demostrado que actividades en las que el cerebro cumple un papel fundamental como el aprendizaje, favorecen la adecuación [2]. En un trabajo realizado por Hollis y Guillete en el 2011 [2] un grupo de antliones fue alimentado después de inducir vibraciones en la tierra y a otro grupo lo alimentaron indistintamente antes o después de causar la vibración. Encontraron que los antliones que aprendieron a atrapar a su presa después de inducida la vibración tenían menor latencia para pupar, mortalidad larval, y latencia de búsqueda de alimento. Sin embargo, aun con estos beneficios, no se sabe bien cuál es el costo de aprender ya que el cerebro demanda gran cantidad de energía durante los procesos de aprendizaje y memoria. Por ejemplo, en el pez guppy (*Poecilia reticulata*), los machos con cerebros más grandes tienen intestinos más pequeños, además las hembras que aprenden producen menos descendencia y sus hijos tienen cerebros pequeños. Esto sugiere la existencia de un compromiso entre el tamaño del cerebro y la fertilidad y estos compromisos podrían explicar la existencia de fenotipos con cerebros grandes o pequeños, con diferentes costos asociados en términos de adecuación [3] (Fig. 2). Sin embargo, este trabajo es correlativo y no se sabe específicamente si realmente la memoria y el aprendizaje

imponen costos a los animales y en caso de ser así, se desconoce el mecanismo implicado.

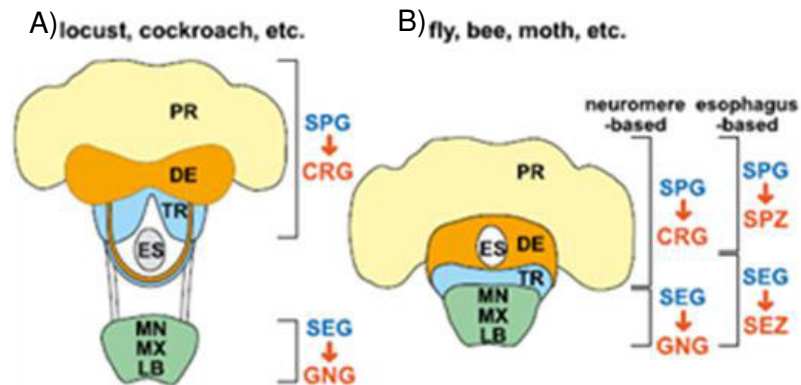
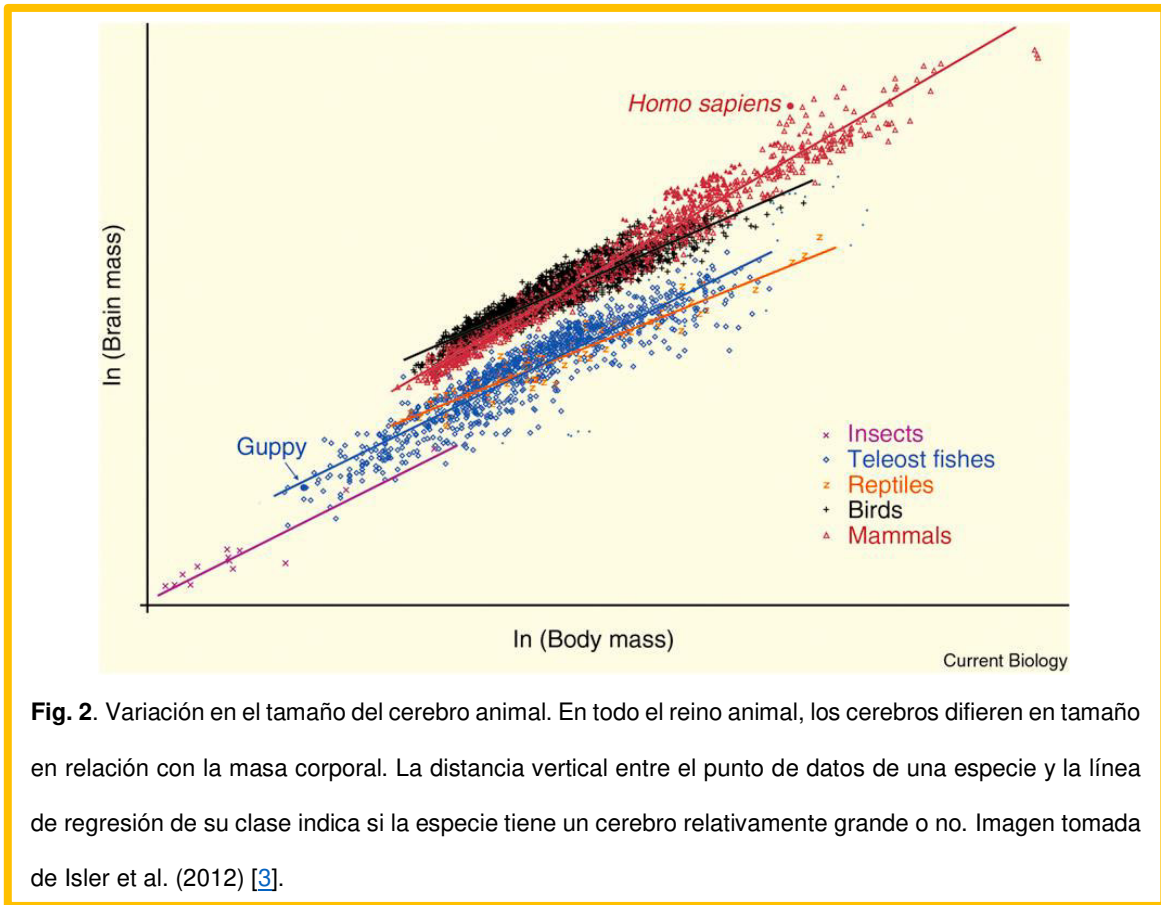


Fig. 1. Conformación principal del cerebro en la clase insecta. Donde (A) representa la estructura del cerebro de algunos insectos como las langostas, cucarachas, etc. y (B) en otros insectos como moscas, abejas, polillas, etc. A pesar de que son de diferentes órdenes de la clase insecta se pueden identificar las mismas regiones. Se muestra la nomenclatura correcta para describir cada región del cerebro de insectos donde SPG = ganglios supraesofágicos (que se encuentran por encima del esófago), SEG = ganglios subesofágicos (que se encuentran por debajo del esófago) estas abreviaciones en color azul remplazaron a las ambiguas abreviaciones en color rojo. PR = protocerebro, DE = deutocerebro, TR = tritocerebro, ES = esófago, MN = neuomero mandibular, MX = neuomero maxilar, LB = neuomero labial. Imagen tomada de Ito et al. (2014) [4].



La memoria es el proceso por el cual se obtiene información con base en la experiencia [5,6], ya que los organismos durante su ciclo de vida se enfrentan a diferentes tipos de estímulos que permiten el aprendizaje y la consolidación de la memoria. La memoria de corto plazo puede convertirse en memoria de largo plazo y la ocurrencia en este proceso radica no solo en la información almacenada y los beneficios que presenta en la adecuación, sino también en la energía requerida para realizar este proceso.

La energía requerida para realizar el proceso de memoria se obtiene principalmente de las mitocondrias, que se encuentran en el soma de las neuronas

en grandes cantidades en comparación con células ubicadas en otros tejidos. En las crestas mitocondriales se lleva a cabo el transporte de electrones por medio de 4 complejos enzimáticos fijos, los complejos I y III generan especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) [7] (Fig. 3). Estos radicales, son un arma de dos filos porque favorecen la memoria pero, también pueden dañar a las biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA, cuando existe. El DNA mitocondrial, parece ser particularmente vulnerable a la acción de los ROS, en parte debido a su proximidad con el sitio de mayor generación de ROS no controlada, pero también debido al bajo nivel de actividad de reparación que se registra en este organelo [8, 9, 10]. Por ejemplo, el acondicionamiento de la mosca *Drosophilla melanogaster* que memoriza, muestra daño visible en las células, y viven menos que las no memorizan [11, 12] (Fig. 4). Estos trabajos sugieren que las actividades que implican la memoria podrían causar daño celular, cambios en la conformación del cerebro, así como acortar la expectativa de vida.

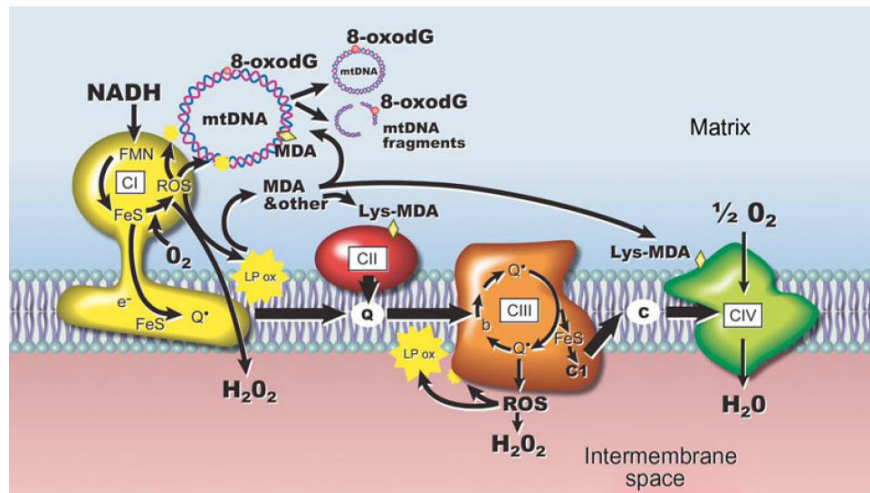


Fig. 3. Representación esquemática de procesos mitocondriales pertinentes a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El diagrama identifica los complejos mitocondriales I y III como los principales sitios de generación mitocondrial de ROS, y la producción de superóxido complejo I se limita al lado de la matriz mitocondrial. Los radicales de oxígeno atacan lípidos, carbohidratos, proteínas y DNA. Los productos de la peroxidación lipídica incluyen moléculas altamente reactivas que pueden causar daño por lipoxidación al DNA y proteínas mitocondriales (de Hulbert et al., 2007). Imagen tomada de Buttemer et al. (2010) [7]

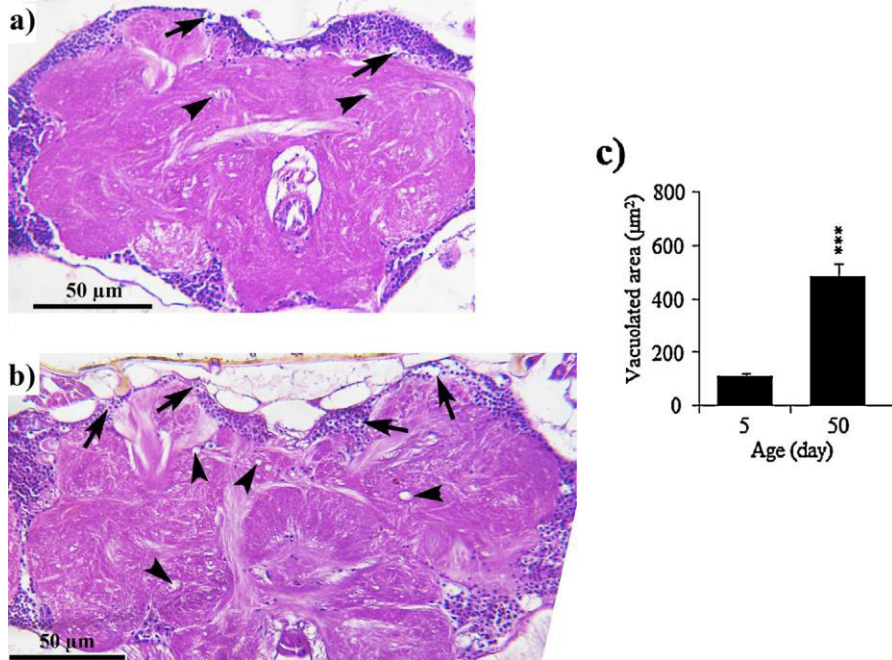


Fig. 4. Morfología de células de Kenyon y cuerpos fúngicos. La histología del cerebro de *Drosophila* reveló un aumento de la neurodegeneración dependiente de la edad en los cuerpos celulares y en el área neuropil de las células de Kenyon. Las fotomicrografías de las secciones frontales del cerebro en 5 días (a) y 50 días (b) de moscas revelaron las regiones vacuoladas en el área neuropil (puntas de flecha) y los cuerpos celulares (flechas) de células de Kenyon que son indicadores aceptados de aparición de apoptosis. Las áreas vacuoladas se midieron y analizaron con el software Image J y se mostraron como media \pm SE. El tamaño promedio de las áreas vacuoladas en la sección del cerebro de moscas jóvenes y moscas viejas fue de 280 μm^2 y 680 μm^2 , respectivamente. El cerebro de las moscas de 50 días mostró un aumento significativo en la neurodegeneración (c) (***) $p < 0,001$, utilizando la prueba t, $n = 5$). Imagen tomada de Haddadi et al. (2014) [12].

La generación de especies reactivas (RS por si siglas en inglés) tanto de oxígeno (ROS) como nitrógeno (RNS por si siglas en inglés) pueden acarrear peligros [13, 14]. Sin embargo, algunas moléculas como el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) puede ser altamente reactivo, ya que tiene una amplia gama de biomoléculas con las que reacciona, pero son importantes para la respuesta inmune y en procesos de inflamación además también favorecen la comunicación neuronal.

Por ende, es que se localiza una mayor concentración de óxido nítrico sintasa (NOS por sus siglas en ingles) en los cuerpos fúngicos donde se lleva a cabo procesos de memoria en insectos [15, 16] (Fig. 5).

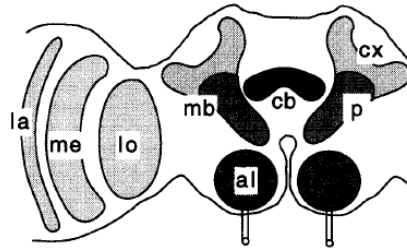


Fig. 5. Esquema de la localización del NOS en cerebro de varias especies de insectos. Los neuropilos que presentan mayor actividad de NOS se encuentran en oscuro, los neuropilos que muestran diferente actividad de NOS se encuentran más claros. En todos los insectos investigados, el sitio primario de procesamiento de información, los lóbulos antenales (al), exhiben altos niveles de NOS. En contraste, los neuropilos visuales (la, lámina; me, médula; lo, lóbulo), muestran niveles muy distintos de NOS en diferentes especies de insectos. El complejo central en forma de abanico (cb) está etiquetado en todas las especies analizadas. Distintos neuropilos de los cuerpos fúngicos (mb) muestran diferentes etiquetas. Mientras que el área de entrada, el cáliz (CX) de los cuerpos fúngicos, muestra diferentes etiquetas en distintas especies, el pedúnculo (p) generalmente se etiqueta en varias especies. Imagen tomada de Müller et al. (1996) [16].

A pesar del riesgo que representa la alta liberación de ROS generada por el consumo de oxígeno durante la producción de energía los organismos pueden prevenir el daño oxidante a biomoléculas por medio de la acción del sistema antioxidante [17]. Los antioxidantes son la primera defensa contra las ROS (Fig. 6) y se dividen en endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos se sintetizan

por el organismo y los exógenos se obtienen del alimento. Cada grupo de antioxidantes tiene beneficios y funciones distintas (ver tabla 1 del apéndice). Dentro de las células se puede crear un desbalance entre antioxidantes y RS, y si, estas últimas sobrepasan a los antioxidantes se le conoce como estrés oxidante.

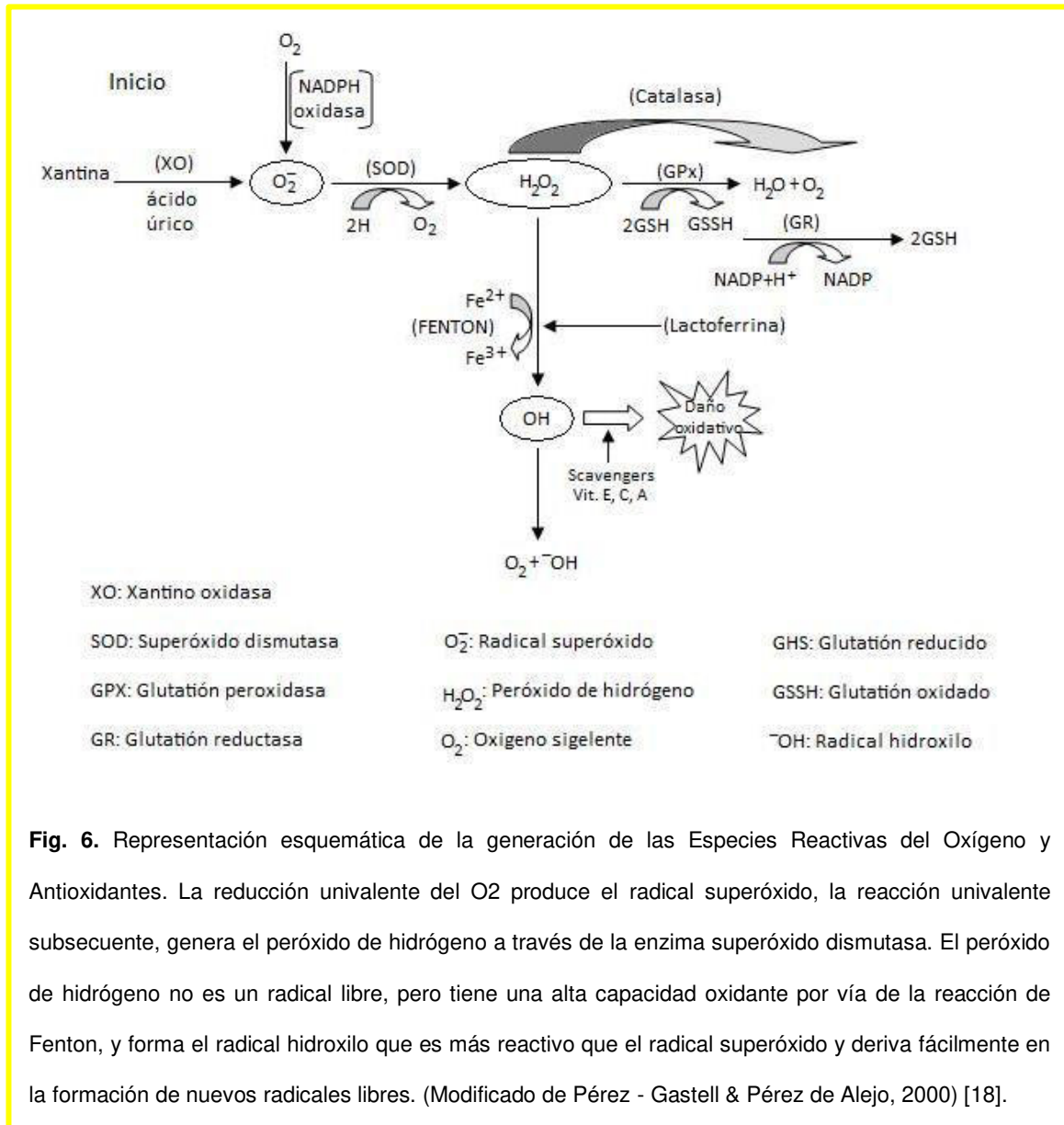


Fig. 6. Representaci\u00f3n esquem\u00e1tica de la generaci\u00f3n de las Especies Reactivas del Ox\u00edgeno y Antioxidantes. La reducci\u00f3n univalente del O_2 produce el radical super\u00f3xido, la reacci\u00f3n univalente subsecuente, genera el per\u00f3xido de hidr\u00f3geno a trav\u00e9s de la enzima super\u00f3xido dismutasa. El per\u00f3xido de hidr\u00f3geno no es un radical libre, pero tiene una alta capacidad oxidante por v\u00eda de la reacci\u00f3n de Fenton, y forma el radical hidroxilo que es m\u00e1s reactivo que el radical super\u00f3xido y deriva f\u00e1cilmente en la formaci\u00f3n de nuevos radicales libres. (Modificado de P\u00e9rez - Gastell & P\u00e9rez de Alejo, 2000) [18].

Los antioxidantes presentan diferentes tipos de actividades y reacciones con RS. Pueden desencadenar otras reacciones que resultan beneficiosas en los organismos, tal es el caso de los polifenoles que presentan actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiproliferativo, protegen de enzimas endógenas y modulan de señales de transducción, entre otras [19]. Lo que supone que los organismos mejor alimentados tendrían mejores defensas antioxidantes y mayor capacidad de respuesta ante el estrés oxidante. Desde el punto de vista de la selección sexual, dado que el daño oxidante podría mermar la supervivencia, las hembras deberían elegir a machos que expresen mejor defensa antioxidante. Uno de los antioxidantes que se deposita en los ornamentos sexuales son los carotenoides, porque juegan un papel en la señalización sexual y como inmunoestimulantes [20]. Así que los carotenoides en ornamentos sexuales revelan la capacidad de los machos para resistir parásitos, enfermedades o estrés oxidante . Como los carotenoides no pueden ser sintetizados de *novo* por los vertebrados son un recurso limitado que solo puede ser obtenido por medio de la dieta. Por ejemplo en *Gasterosteus aculeatus* los machos con una dieta alta en carotenoides presentan mejor coloración, menor susceptibilidad al estrés oxidante, mayor tiempo de vida, y son más preferidos por las hembras durante la elección de pareja [21] (Fig. 7).

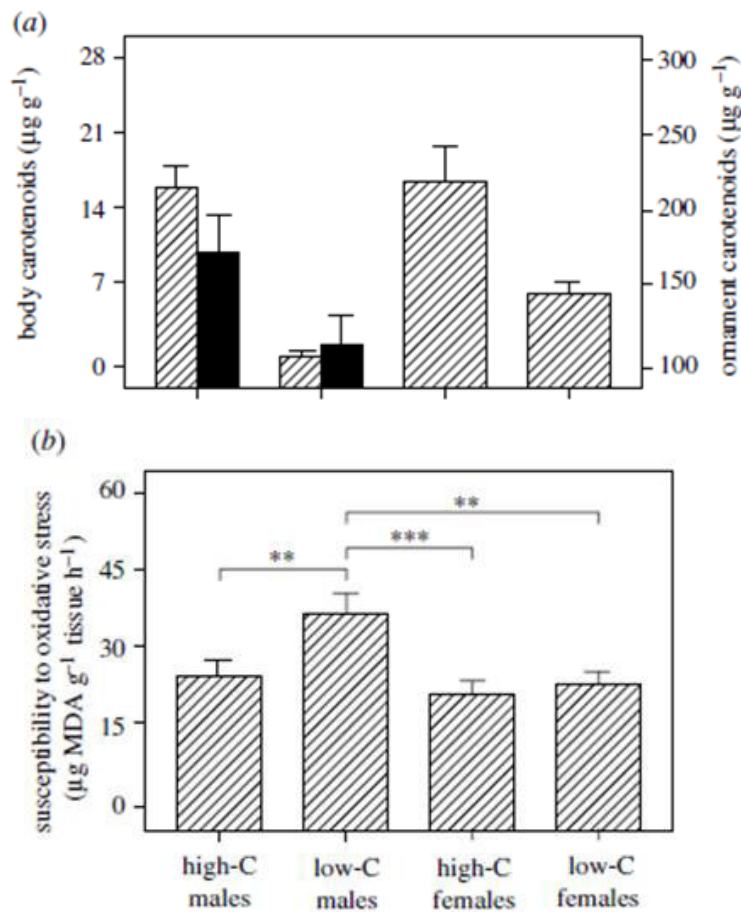


Fig. 7. (a) Concentración total de carotenoides en el cuerpo de machos y hembras (barras rayadas) y la coloración nupcial de los machos (barras negras) y (b) Susceptibilidad al estrés oxidativo (medido en términos de MDA, un subproducto de la peroxidación lipídica) en machos y hembras alimentados con dietas con alto contenido de carotenoides (alto-C) o bajo (C-bajo). Media+s.e. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Imagen tomada de Pike et al. (2007) [21].

En los ejemplos anteriores se muestra como la selección sexual resulta costosa tanto en términos de estrés oxidante como en mantenimiento de rasgos sexuales. Una teoría del envejecimiento de Arnold De loof et. al 2010 [22] propone

que se debe tener en cuenta una característica esencial del funcionamiento que poseen las células, el potencial de membrana. El potencial de membrana se define como la diferencia de potencial a ambos lados de una membrana que separa dos soluciones de diferente concentración de iones que se acumulan en la membrana plasmática, además de algunos compartimentos de membrana, los iones se difunden de manera pasiva y activa por medio de canales proteicos (Fig. 8). Lo que supone que la muerte celular este dada por la falla irreversible del potencial de membrana, en la cual los canales proteicos en los animales estarían dañados por el resultado de las RS causados por el estrés oxidante; un ejemplo al daño de proteínas por efecto de la reproducción y el envejecimiento se puede representar por el grillo *Grylodes sigillatus* en donde las hembras presentaron mayor acumulación de proteínas carboniladas (marcador de daño) dando un efecto negativo en la esperanza de vida [23], (Fig. 9). En elefantes marinos del norte, tanto en machos como hembras durante la crianza, aumenta la peroxidación de lípidos debido a la producción de ROS [24], (Fig. 10). Por tanto, en resumen, toda esta evidencia muestra la importancia del ROS en distintos parámetros de la reproducción, pero también parecen ser clave para entender el costo de la memoria.

En *Tenerbio molitor* las hembras son polígamas pero prefieren copular con un macho conocido que con uno nuevo (Fig. 11), por lo que Cordero-Molina (2015) [25] propuso que las hembras memorizan al primer macho con el que copulan. En otro experimento las hembras copularon con un macho al que se asignó como macho pareja, e impregnaron un papel fieltro con el aroma del macho pareja y dos papeles con olor de machos nuevos, durante la prueba de preferencia, las hembras pasaron más tiempo en el papel impregnado con el aroma del macho pareja, lo que

sugiere que la hembra podría memorizar el olor del macho con el que copula primero (Fig.12). Para saber si realmente la hembra memorizaba el olor del macho pareja y la memoria estaba implicada en el reconocimiento del macho se administro a las hembras zebularina como amnésico ya que afecta la memoria a largo plazo [26] ya que la memoria podría estar mediada por bases epigenéticas [27], Encontrando que las hembras perdían la preferencia por elegir el olor del macho pareja [25].

En este trabajo queremos analizar el costo de la memoria de pareja en términos de estrés oxidante en el escarabajo *T. molitor*. Esta especie utiliza feromonas para la atracción masculina ((Z)-3- dodecenyl acetate 28) y femenina (4-methyl-1-nonanol Tanaka et al. 29) y las hembras memorizan la identidad de su pareja con base en el olor (30).

Suponemos que el memorizar resulta costoso porque genera RS en términos de anión superóxido, peróxido de hidrogeno y NO, y enzimas antioxidantes que contrarresten las ROS como lo son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa. Esto supone una demanda energética (cantidad de triglicéridos) y reducción en la supervivencia cuando las ROS sobrepasan la capacidad antioxidante del individuo.

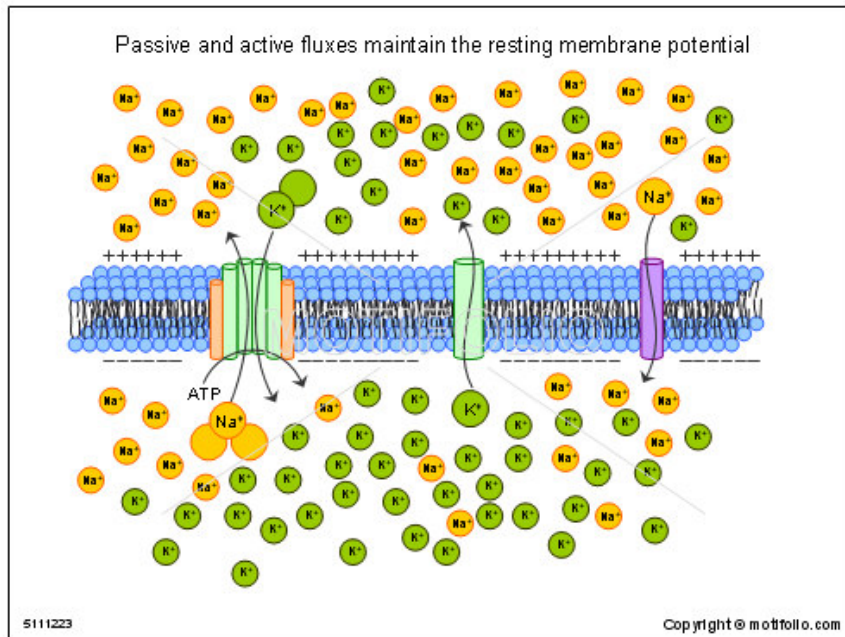


Fig. 8. Todas las células acumulan un gradiente de voltaje sobre su membrana plasmática y sobre algunos de sus compartimientos internos de membrana. tienen medios para crear y mantener un gradiente de especies iónicas particulares sobre la membrana. El gradiente es posible gracias a las proteínas de membrana especializadas, las bombas de iones, que realizan el transporte activo, y los canales iónicos, que son agentes pasivos. La bomba de iones más conocida es la ATPasa de Na-K que es esencial para el funcionamiento de todos los tipos de células. Imagen tomada de Rhoades and Bell et al. (2013) [31].

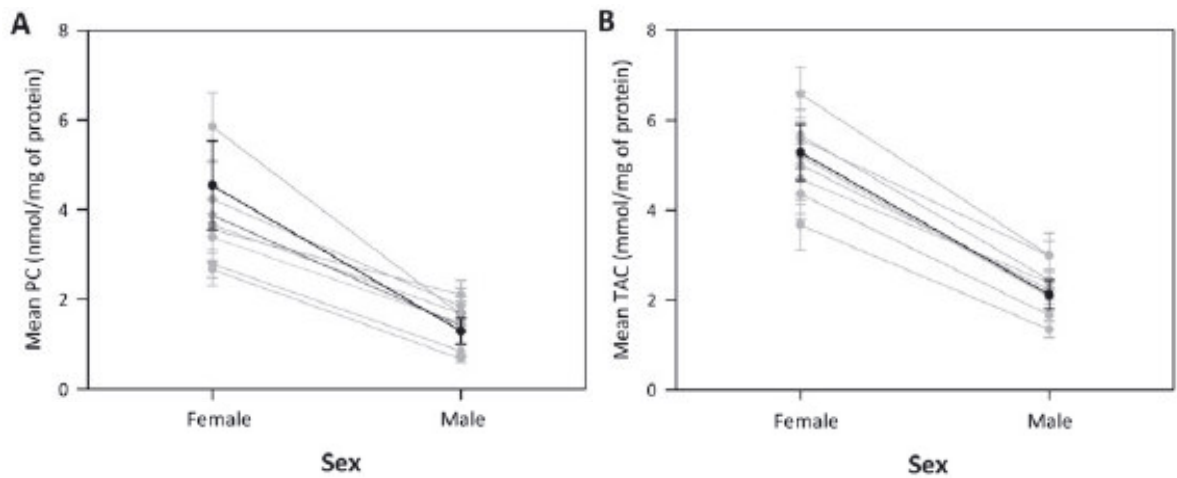


Fig. 9. (A) diferencias en la carbonilación de proteínas (PC) y (B) diferencias en la capacidad antioxidante total (TAC) de acuerdo al sexo en las diferentes líneas endogámicas y la población exogámica de *Gryllobates sigillatus*. La población exogámica se proporciona en negro y las líneas endogámicas en gris claro. Medias (\pm SE). Imagen tomada y modificada de Archer et al. (2012) [23].

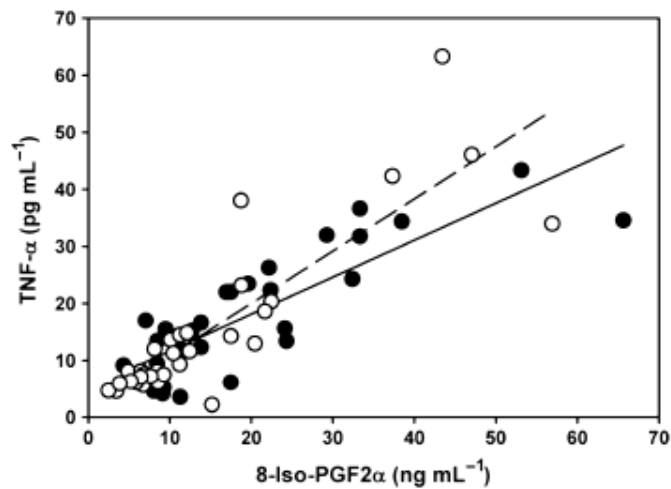


Fig. 10. Relación entre las concentraciones plasmáticas de 8-isoprostano (8-Iso-PGF $_{2\alpha}$) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) para la reproducción masculina (círculos cerrados, línea continua) y femenina (círculos abiertos, línea discontinua) elefantes marinos adulto del norte. Machos: $y = 4.80 + 0.66x$, $r^2 = 0.70$, $F_{1,27} = 67.68$, $P < 0.0001$; mujeres: $y = 1.72 + 0.92x$, $r^2 = 0.74$, $F_{1,31} = 85.59$, $P < 0.0001$. La pendiente de regresión y la intersección para los machos provienen de una regresión de modelo mixto. Imagen tomada de Sharick (2015) et al. [24].

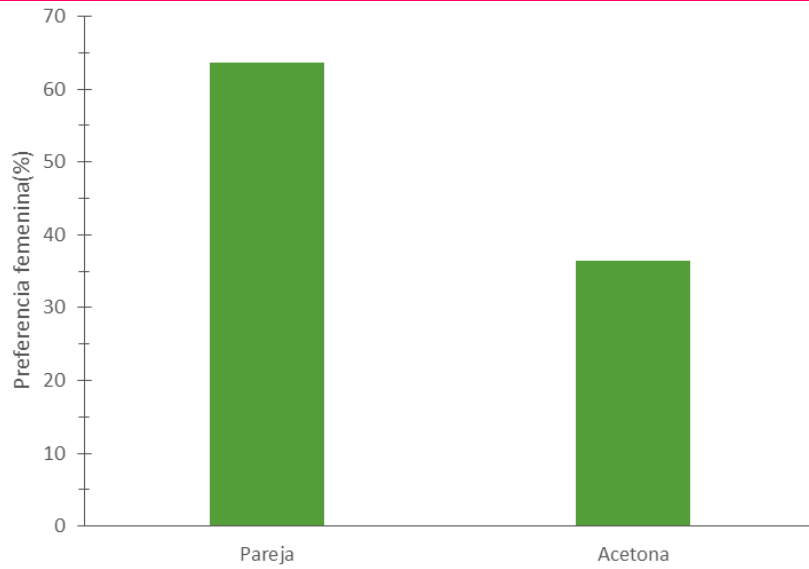


Fig. 11. Preferencia de las hembras para copular con su pareja o con el macho nuevo. Probabilidad que las hembras copulen con la primera pareja en un segundo encuentro (63.63%), comparación con el macho nuevo (36.36%; $X^2 = 16.16$; $p < 0.001$; $n = 33$). Este resultado sugiere que las hembras recuerdan a su pareja. Imagen tomada y modificada de Cordero et al. (2015) [\[25\]](#).

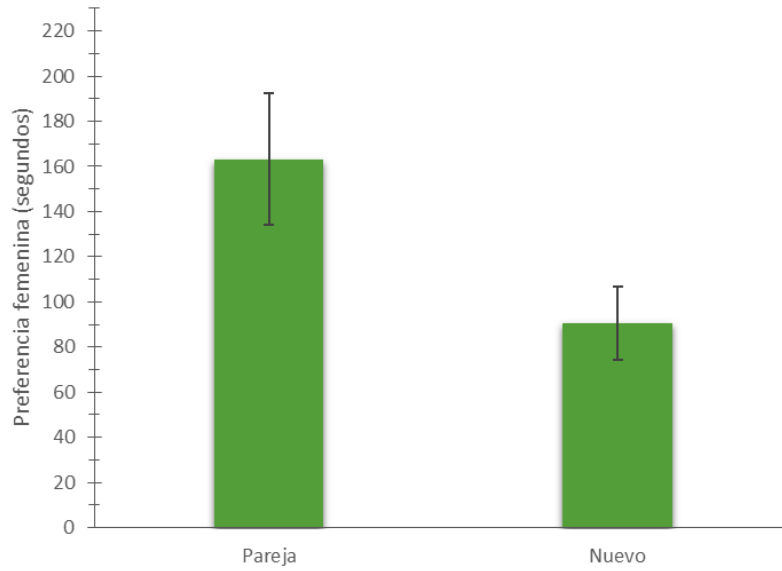


Fig. 12. Preferencia femenina. Tiempo que pasaron las hembras el sitio donde se encontraba el olor de cada macho (Pareja HJ y Nuevo HJ). Tiempo en el sitio donde se encontraba el papel impregnado con el olor del macho pareja (163.11 ± 29.21) y con el papel impregnado con el olor del macho control (90.57 ± 16.39 ; $t = 2.1$; $p = 0.03$; $n = 26$. Imagen tomada y modificada de Cordero et al. (2015) [25]

OBJETIVO

Determinar si recordar a la pareja implica un costo para las hembras de *Tenebrio molitor*.

HIPÓTESIS

Recordar a la pareja impone costos en términos de estrés oxidante y merma la supervivencia

Predicciones:

- Las hembras expuestas con más frecuencia al olor de su pareja, presentarán más RS y menos enzimas antioxidantes que las hembras expuestas con menos frecuencia al olor de su pareja/tratadas con un amnésico.
- Las hembras expuestas con más frecuencia al olor de su pareja presentarán menor probabilidad de supervivencia que las hembras expuestas con menos frecuencia al olor de su pareja/tratadas con un amnésico.
- Las reservas de triglicéridos se reducen mientras las hembras son enfrentadas con más frecuencia al olor de su pareja.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó con 9 tratamientos de hembras, y 10 réplicas de cada grupo con 5 cerebros por grupo durante 7 días.

Descripción de tratamientos

En el tratamiento 1 se compone de hembras vírgenes (V), en el tratamiento 2 se le colocó zebularina antes de copular (ZC), en el tratamiento 3 las hembras copularon, pero no fueron tratadas con zebularina (C). En el tratamiento 4 copularon y 6 días después la hembra eligió entre el macho pareja y uno nuevo (C + E), en el tratamiento 5 a las hembras se les colocó zebularina y copularon con el macho y 6 días después eligieron (ZC + E), el tratamiento 6 copularon y 6 días antes de elegir se les colocó zebularina (C + ZE), el tratamiento 7 copularon y se reencontraron 2 veces cada 3 días (C + 2E), en el tratamiento 8 antes de copular se le colocó zebularina y después se reencontraron 2 veces cada 3 días en donde antes de tener el primer reencuentro se le colocó zebularina (ZC + ZE + E). finalmente, el tratamiento 9 copularon y se reencontraron 2 veces cada 3 días en los cuales se les colocó zebularina y eligieron entre el macho pareja o nuevo (C + ZE + ZE) (Fig. 16).

Al séptimo día de experimentación se les extrajo el cerebro y se colocó en el ultracongelador para el posterior análisis.

En otro experimento se establecieron los 9 tratamientos, pero en este caso las hembras no fueron sacrificadas y siguió su supervivencia por 20 días.

Tratamientos

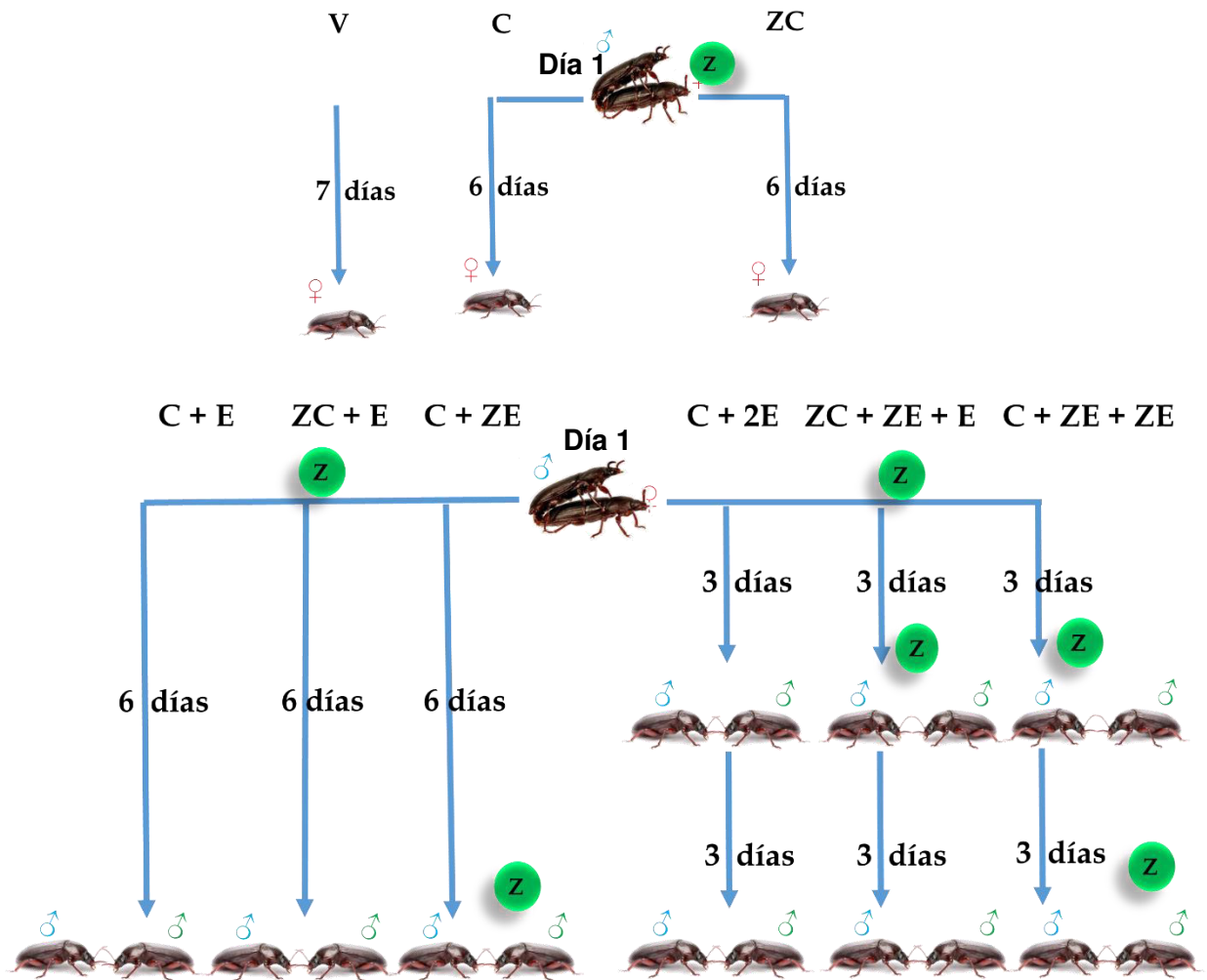


Fig. 16. Tratamientos en donde se pondrá a prueba la memoria de las hembras, experimento durante 7 días para todas las hembras, las flechas azules representan el macho pareja mientras que las flechas verde señalan al macho nuevo. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula, C = cópula, C + E = cópula más encuentro, C + ZE = cópula más encuentro con zebularina, ZC + Z zebularina antes de la cópula más encuentro, C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + E = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + 2ZE = cópula más dos encuentros con zebularina.

MÉTODO

1.- Obtención de pupas

Se obtuvieron pupas de *T. molitor* recién emergidas (de un día) de insectario de la ENES, unidad Morelia de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Morelia.

Dentro del insectario se mantuvieron a una temperatura de 27 °C, en completa oscuridad. Posteriormente, las pupas se separaron por sexo [32] (Fig. 13) y se colocaron de manera individual en cajas de plástico de 6 pozos (Corning). Se registró la fecha en que emergieron los adultos para controlar la edad de machos y hembras (10 ± 1 días). Todos se alimentaron con salvado y harina de maíz (1:1) y un trozo de manzana cada tercer día, hasta llegar a ser sexualmente activos (10 ± 1 días) ya que esta especie presenta diferentes estadios siendo la adulta la fase reproductiva (Fig. 13).

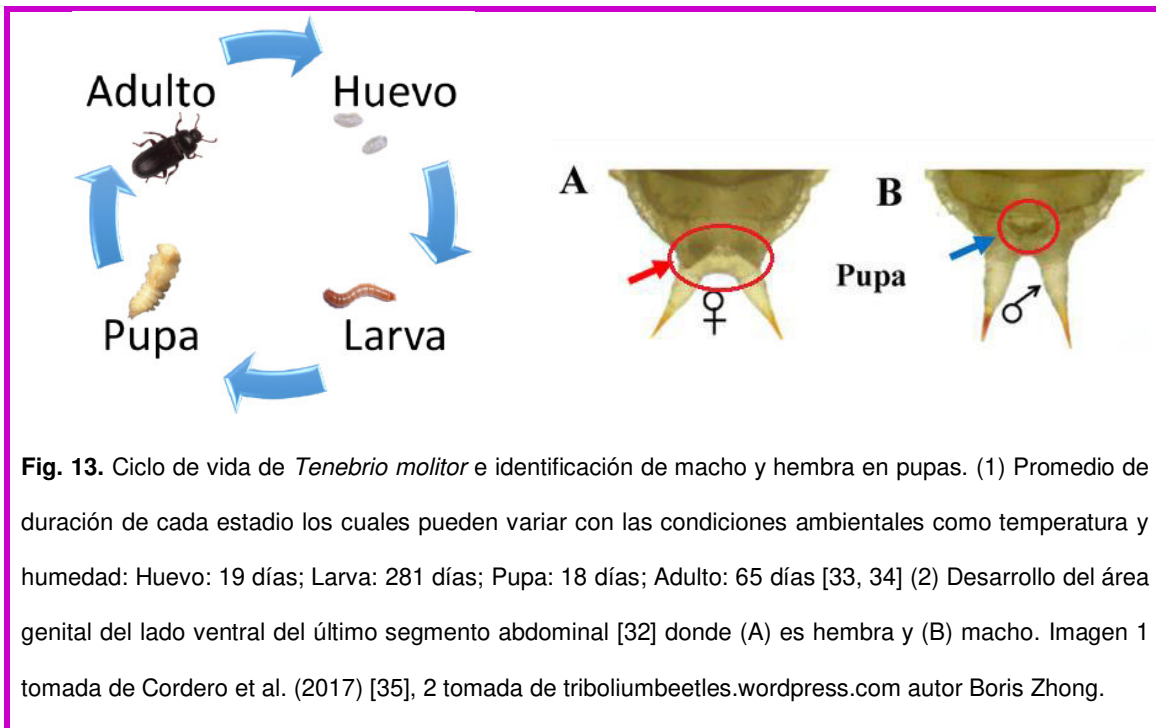


Fig. 13. Ciclo de vida de *Tenebrio molitor* e identificación de macho y hembra en pupas. (1) Promedio de duración de cada estadio los cuales pueden variar con las condiciones ambientales como temperatura y humedad: Huevo: 19 días; Larva: 281 días; Pupa: 18 días; Adulto: 65 días [33, 34] (2) Desarrollo del área genital del lado ventral del último segmento abdominal [32] donde (A) es hembra y (B) macho. Imagen 1 tomada de Cordero et al. (2017) [35], 2 tomada de triboliumbeetles.wordpress.com autor Boris Zhong.

2.- Tratamientos químicos

2.1.- Tratamiento con zebularina

Se registró la longitud de todas las hembras de 10 ± 1 día de edad para controlar su tamaño en todos los experimentos [36].

Las hembras fueron tratadas con zebularina como amnésico, ya que afecta la formación de la memoria de largo plazo [27, 37, 38]. Este se aplicó de manera tópica en la región entre la cabeza y el pronoto con una micropipeta. Se aplicó 1 μ L de zebularina (1mM; Sigma) (se usó acetona como vehículo de dilución). El tratamiento solo se aplicó a los grupos asignados 90 minutos antes de permitir a la hembra recorrer la arena para elegir al macho.

2.2.- Tratamiento con metopreno

Se registró la longitud de todos los machos de 10 ± 1 día de edad para controlar su tamaño en todos los experimentos [36].

Los machos fueron tratados con metopreno (Sigma), un análogo de la Hormona Juvenil (HJ), para favorecer la producción de feromonas. Éste se aplicó de manera tópica en la región entre la cabeza y el pronoto con una micropipeta. Se aplicó 1 μ L de metopreno de una solución de 200 μ g / mL (se usó acetona como vehículo de dilución). El tratamiento se aplicó 3 horas antes de iniciar las observaciones de conducta. Las dosis, tiempos y aplicación de tratamiento se realizaron con base a lo reportado por Hernández-Villanueva (2013) [39].

3.- Arena de conducta

Los encuentros se realizaron en una caja de acrílico que contiene 4 compartimentos secundarios, los cuales presentan una entrada/salida, en el centro

presenta una cámara donde convergen las entradas/salidas para los encuentros diseñados (Fig. 14). (Ver diseño experimental).

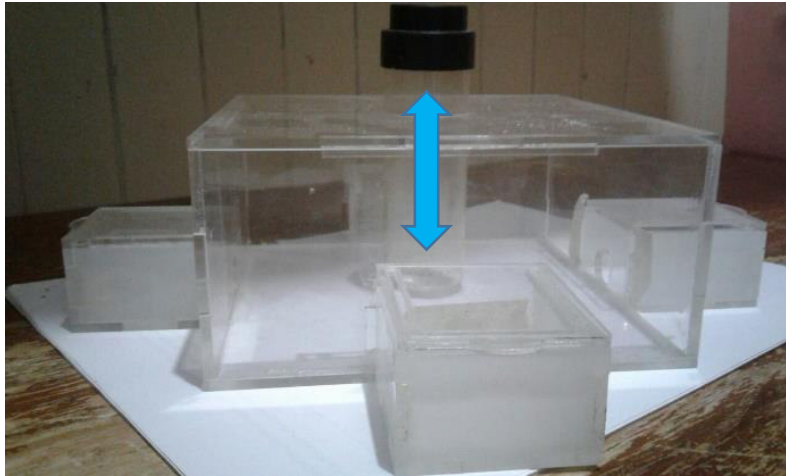


Fig. 14. Fotografía de la arena de acrílico donde se aprecia el dispositivo que contiene pequeños orificios para que la hembra pueda percibir feromonas y con el que se restringe la movilidad de la hembra por los primeros 5 minutos (la flecha de doble punta indica que es retráctil) y posteriormente se eleva permitiendo a la hembra recorrer la arena. Fotografía tomada de Cordero et al. (2017) [35].

3.1.- Identificación en la arena de conducta

Los insectos se marcaron con pinturas acrílicas (Baco) en el área superior izquierda del pronoto con la finalidad de identificarlos, los encuentros se realizaron en oscuridad con luz roja debido a que no es percibida por los insectos comportándose como si estuvieran en completa oscuridad [34].

4.- Encuentros

4.1.- Prueba de memoria y evocación de memoria

4.1.1.- Primer encuentro (memorización de macho pareja)

Día 1. Se colocó una hembra en una caja Petri de vidrio con un papel filtro circular que sirvió de sustrato durante 5 minutos y posteriormente, se colocó un macho de la misma edad y se realizaron observaciones de 10 minutos para determinar si la pareja copulaba. Las parejas que no copulaban se descartaban del experimento, y si la pareja copulaba, a este macho se le denominó macho pareja.

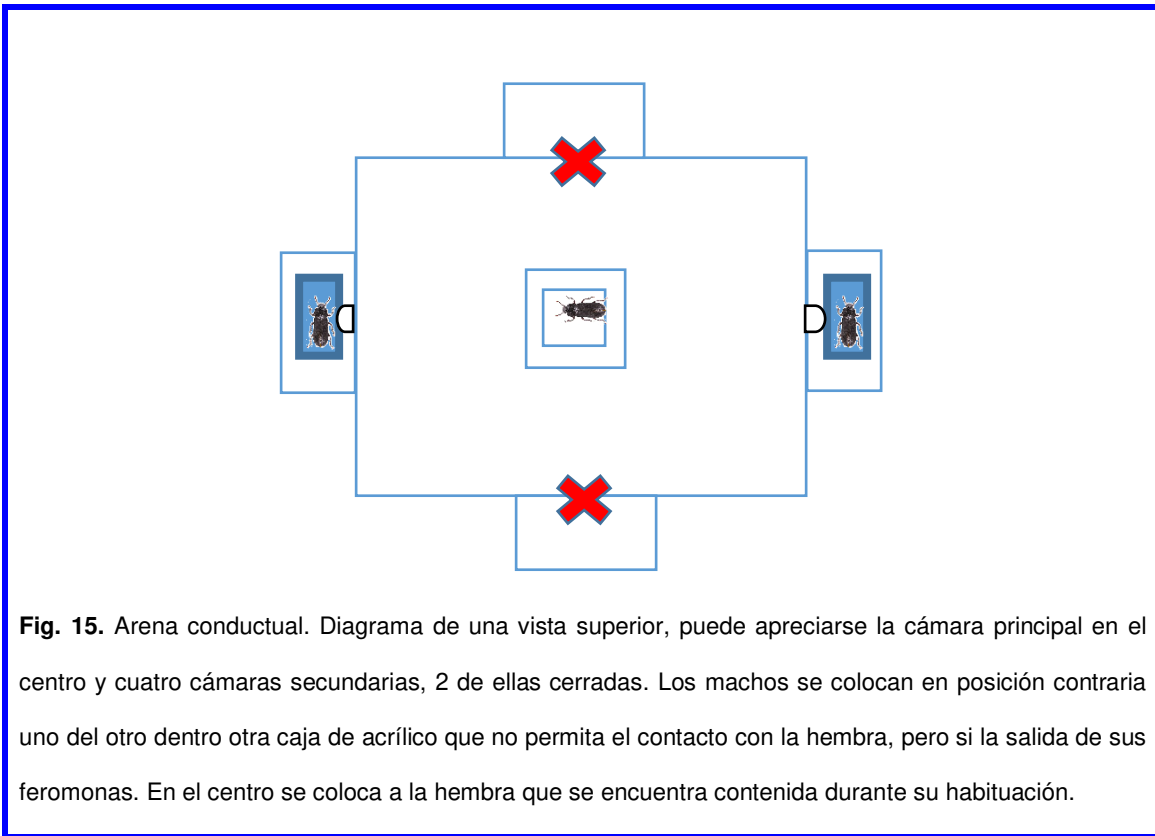
4.1.2.- Segundo encuentro (prueba evocación de memoria)

Día 3 y 7. Se colocó a la hembra en la arena de conducta, inmovilizada por el dispositivo marcado con flecha de doble punta azul (Fig.14), al macho pareja en un compartimento secundario y a un macho nuevo de la misma edad en la dirección opuesta al macho pareja, ambos inmovilizados por pequeñas cajas que contienen pequeñas aberturas que permiten la salida de las feromonas (Fig.15). se usó papel filtro como sustrato. Tanto machos como hembras permanecieron inmovilizados durante 5 minutos y posteriormente, se eleva el dispositivo donde se encuentra la hembra para que recorra la arena durante 10 minutos. Las hembras que preferían el macho nuevo fueron descartadas. Los grupos correspondientes al segundo encuentro los días 3 y 7 fueron C + 2E, ZC + ZE + E, C + ZE + ZE y C + E, ZC + E, C + ZE respectivamente, descritos en el diseño experimental.

4.1.3.- Tercer encuentro (prueba evocación de memoria)

Día 7. Los grupos correspondientes a un tercer encuentro fueron C + 2E, ZC + ZE + E y C + ZE + ZE bajo el método descrito en el segundo encuentro.

Cabe mencionar que tanto en el segundo encuentro como en el tercer encuentro las hembras no copulan con alguno de los machos debido a que los machos se encontraban encerrados en cajas de acrílico dentro de los compartimentos secundarios que solo permitían la salida de sus feromonas.



5.- Obtención de muestras de cerebro y almacenamiento

Una vez terminada la prueba de selección, se retiraron a las hembras y se inmovilizaron colocándolas en refrigeración por 5 minutos. Posteriormente se cortó la cabeza de las hembras en buffer de PBS frío pH 7.4 para extraer el cerebro y se colocaron en viales en grupos de 5 individuos por tratamiento con buffer PBS pH 7.4 almacenándolos a -70°C para su posterior análisis.

6.- Análisis de antioxidantes y especies reactivas (RS)

Se analizaron antioxidantes y RS del cerebro en los diferentes tratamientos, utilizando los siguientes kits:

SOD determination kit (Sigma-Aldrich®), Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes®), Catalase Assay Kit (Molecular Probes®), Triglyceride Quantification Kit (BioVision), Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Sigma-Aldrich®), Nitrite/Nitrate Assay Kit (Sigma-Aldrich®) y Superoxide Anion Assay Kit (Sigma-Aldrich®). Todos los análisis se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Apéndice, Tabla 2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las mediciones de los marcadores de daño oxidativo (Anión superóxido, peróxido de hidrogeno, NO, SOD, CAT y glutatión peroxidasa) así como los triglicéridos se analizaron usando modelos lineales generalizados, cada análisis se realizó comparando 3 tratamientos, a excepción del análisis de anión superóxido donde se comprarán 4 tratamientos (como se muestra en los resultados), bajo el supuesto de normalidad para cada tratamiento. El análisis de supervivencia se realizó mediante el método no paramétrico de Kaplan-Meier. Todas las pruebas se realizaron usando SPSS (V. 23; SPSS Inc.). Los promedios y las estimaciones de los parámetros se muestran con su error estándar.

La prueba Kaplan-Meier es un método no paramétrico (no asume ninguna función de probabilidad) y por máxima verosimilitud, es decir se basa en maximizar la función de verosimilitud de la muestra. Una muestra aleatoria de tamaño n , extraída de una población, estará formada por k ($k \leq n$) tiempos $t_1 < t_2 < \dots < t_k$ en los que se observan eventos. En cada tiempo t_i existen n_i "individuos en riesgo" (elementos de la muestra para los que el evento puede ocurrir, o que $T \geq t_i$) y se observan d_i eventos. Además, en el intervalo (t_i, t_{i+1}) se producen m_i pérdidas.

Se puede demostrar que la función de verosimilitud para toda la muestra es:

$$L = \prod_{i=1}^k h_i^{d_i} (1 - h_i)^{n_i - d_i}$$

RESULTADOS

A continuación, se muestran resultados de las comparaciones entre grupos, desde los grupos control a los grupos con una copula y de uno a dos encuentros con su pareja.

1. Grupos Control

1.1. Supervivencia

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo (Log-Rank = 2.81, g.l. = 2, $p = 0.24$; CZ: 19.90 ± 0.03 ; C: 19.94 ± 0.04 ; V: 20.00 ± 0.04). Esto sugiere que la zebularina no afectada en la supervivencia y, por lo tanto, nuestros resultados no se deben al efecto de esta droga sino al tratamiento experimental de memoria.

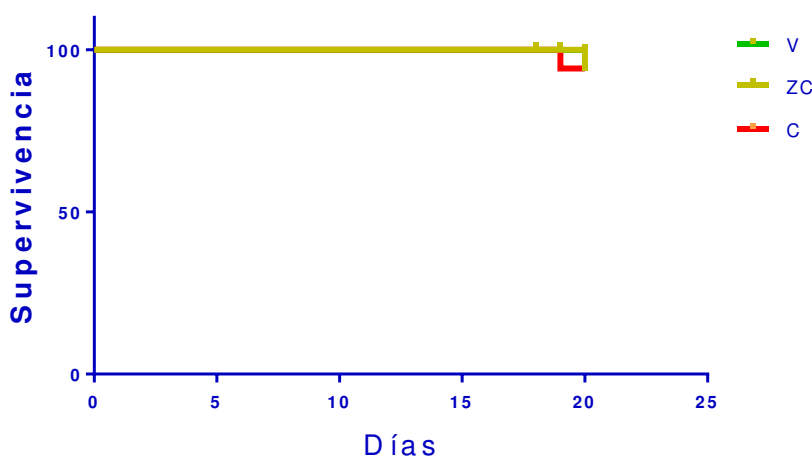


Fig. 17. Supervivencia de hembras de *T. molitor* durante 20 días. Donde

V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.2. Moléculas Pro-oxidantes

1.2.1 Anión Superóxido

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 2332.464$, g.l. = 2, $p < 0.0001$) donde el grupo V tuvieron menos anión superóxido (14.67 ± 0.21)

que ZC (33.59 ± 0.43 , $p < 0.0001$) o C (34.27 ± 0.51 , $p < 0.0001$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y C ($p = 0.99$), esto indica que la zebularina no afecta la producción de anión superóxido.

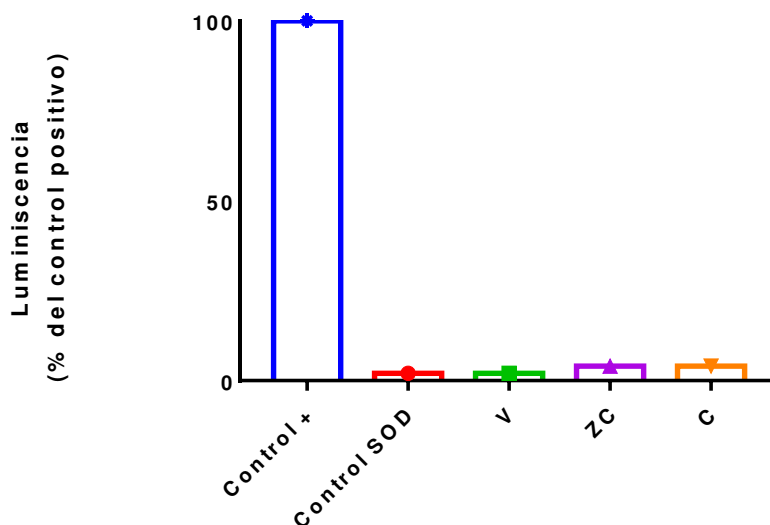


Fig. 18. Medición de luminiscencia producida por la reacción de anión superóxido con luminol en muestras de cerebro de hembras de *T. molitor*. Donde el control + representa el 100 % de la reacción del anión superóxido, mientras que el control SOD detiene la reacción compitiendo con el luminol por el anión superóxido. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.2.2. Peróxido de Hidrogeno

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 0.34$, g.l. = 2, $p = 0.84$; ZC: 0.27 ± 0.06 ; C: 0.29 ± 0.07 ; hembras vírgenes: 0.33 ± 0.85). Esto sugiere que la copula no afecta significativamente la producción de H_2O_2 .

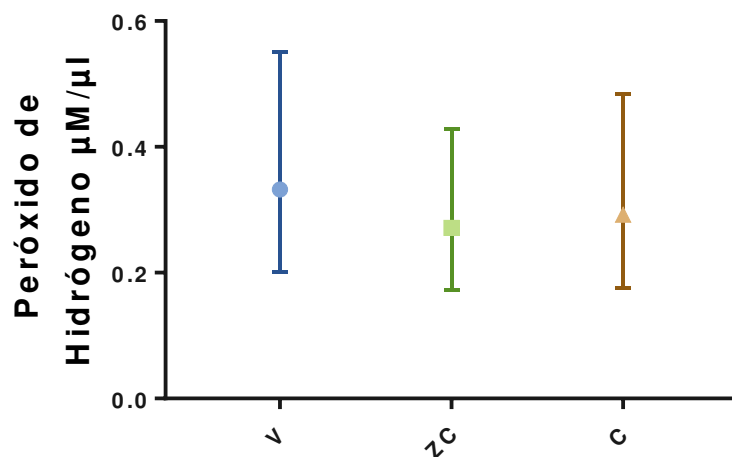


Fig. 19. Concentración de peróxido de hidrogeno en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.2.3. Óxido Nítrico (NO)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 39.52$, g.l. = 2, $p < 0.0001$) donde el grupo V tuvieron más ON (43.17 ± 4.35 , $p < 0.0001$) que ZC (17.19 ± 1.50 , $p < 0.0001$) o C (28.95 ± 2.91 , $p < 0.02$). Además, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y V ($p = 0.01$)

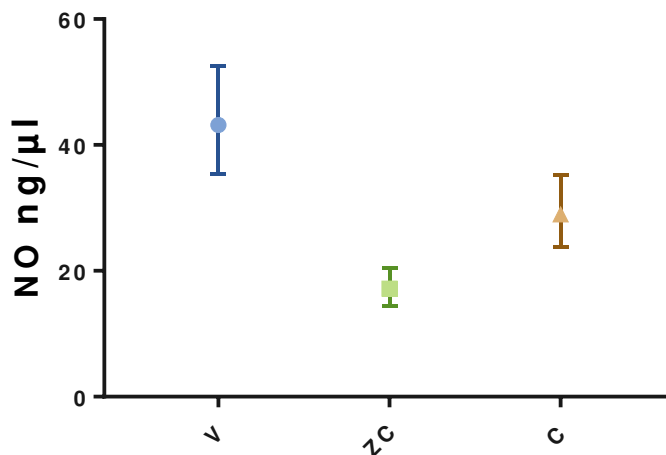


Fig. 20. Concentración de NO en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.3. Antioxidantes

1.3.1. Antioxidantes Totales

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 101.85$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento V tuvo menos antioxidantes (0.003 ± 0.0005) que los tratamientos ZC (0.13 ± 0.01 , $p < 0.0001$) o C (0.14 ± 0.02 , $p < 0.0001$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y C ($p = 0.99$). Esto sugiere que la cópula (memorización de la pareja) aumenta significativamente la producción de antioxidantes y que la zebularina no afecta la producción de antioxidantes.

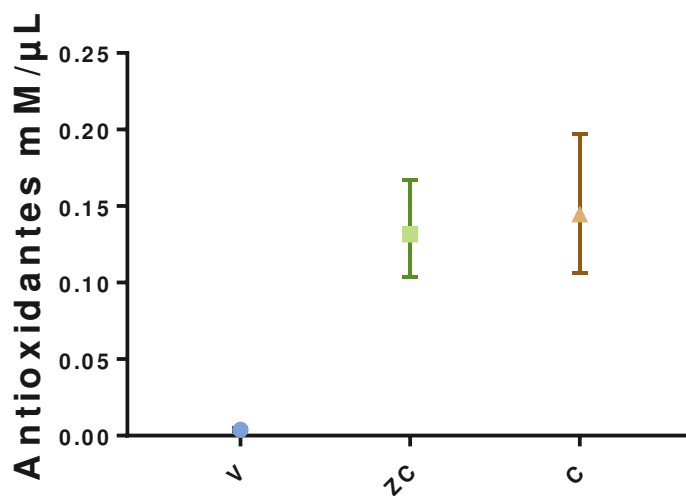


Fig. 21. Medición de la capacidad total de antioxidantes enzimáticos (catalasa y glutatión peroxidasa) y no-enzimáticos (tocoferoles, carotenos, vitamina A, ubiquinoles, glutatión y ascorbato). Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.3.2. Catalasa

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 11.01$, g.l. = 2, $p = 0.004$). El tratamiento V tuvo más catalasa (1607.14 ± 144.97) que los tratamientos ZC (1113.50 ± 84.03 , $p = 0.01$) o C (1054.64 ± 95.13 , $p = 0.004$). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y C ($p = 0.99$). Esto sugiere que la cópula (memorización de la pareja) y la zebularina no afecta significativamente la producción de catalasa.

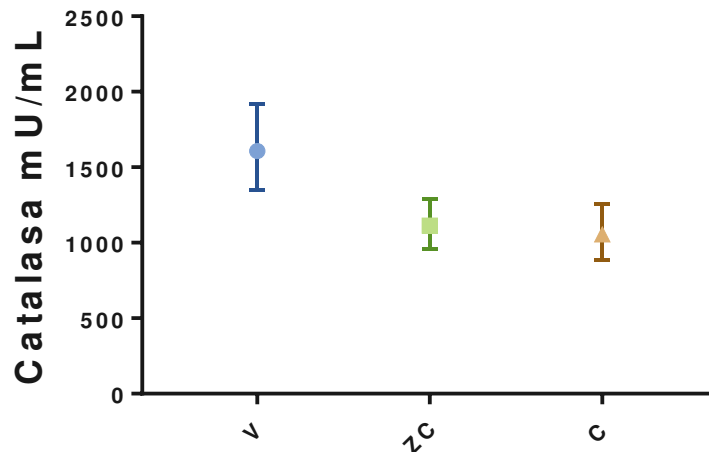


Fig. 22. Concentración de catalasa en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.3.3. Glutación Peroxidasa

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 6.04$, g.l. = 2, $p = 0.049$; El tratamiento V: 0.16 ± 0.01 ; ZC: 0.13 ± 0.009 ; C: 0.17 ± 0.01). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y C ($p = 0.99$). Esto sugiere que la cópula (memorización de la pareja) y la Zebularina no afecta significativamente la producción de Glutación peroxidasa.

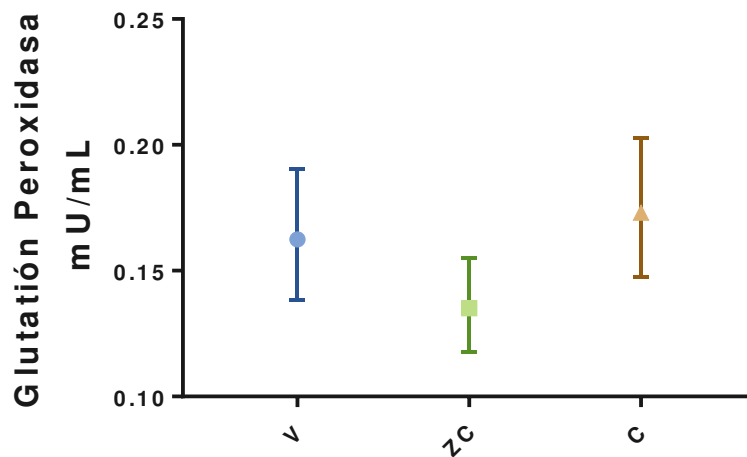


Fig. 23. Concentración de glutatión peroxidasa en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.3.4. Superóxido Dismutasa (SOD)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 31.01$, g.l. = 2, $p < 0.0001$) donde V tuvo más SOD (78.40 ± 9.00) que el tratamiento ZC (34.60 ± 3.32 , $p < 0.0001$) y una concentración similar al tratamiento C (66.07 ± 7.58 , $p = 0.88$). Además, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y C ($p < 0.0001$). Esto sugiere que la zebularina afecta la actividad de SOD.

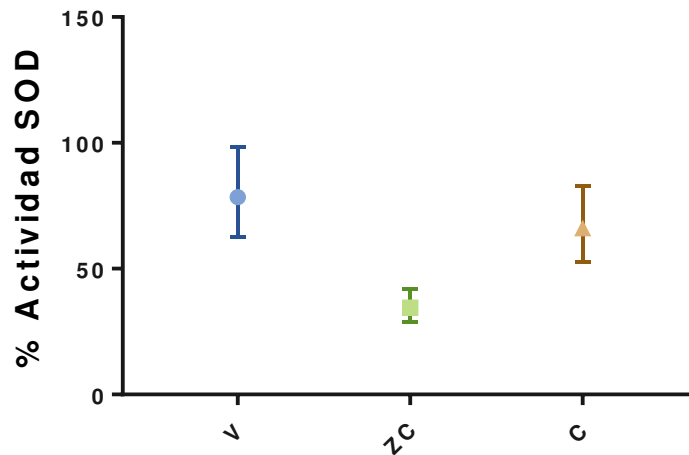


Fig. 24. Porcentaje de actividad de SOD en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

1.4. Reservas Energéticas (Triglicéridos)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 3474.11$, g.l. = 2, $p < 0.0001$) donde V tuvieron más triglicéridos (9.67 ± 0.21) que ZC (0.24 ± 0.004 , $p < 0.0001$) o C (2.73 ± 0.06 , $p < 0.0001$). Además, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ZC y C ($p < 0.0001$). Esto sugiere que copular (memorizar a la pareja) y tener zebularina reduce significativamente el uso de las reservas de triglicéridos.

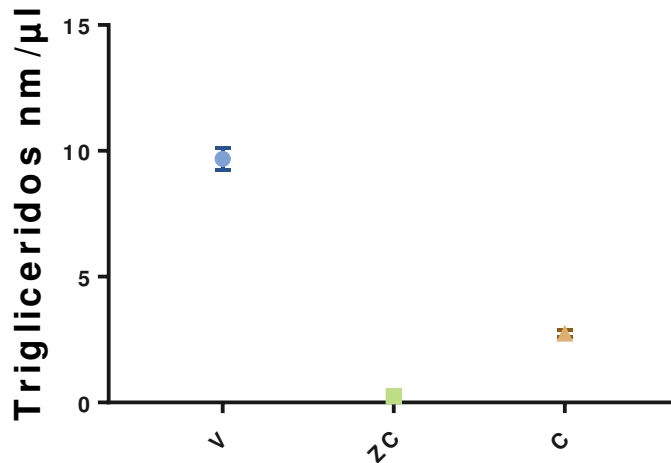


Fig. 25. Concentración de triglicéridos en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde V = virgen, ZC = zebularina antes de cópula y C = cópula.

2.- Una Copula y Un Encuentro

2.1 Supervivencia

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Log-Rank = 96.24, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + E (10.76 ± 0.44) murió más rápido que los grupos ZC + E (16.58 ± 0.38 ; $p < 0.0001$) o C + ZE (15.89 ± 0.40 ; $p < 0.0001$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p = 0.92$).

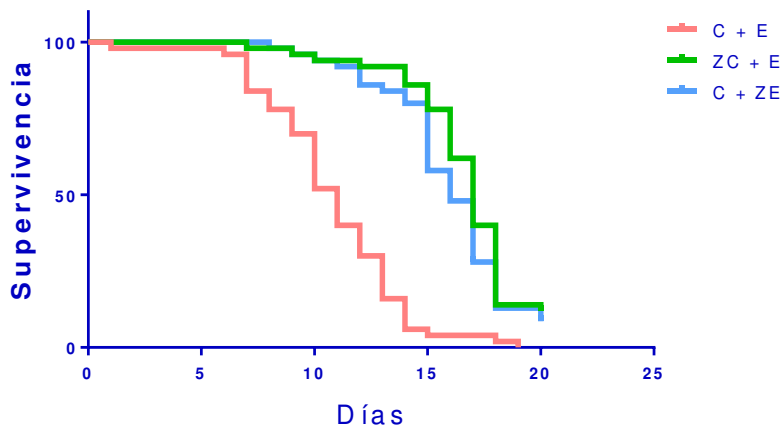


Fig. 26. Supervivencia de hembras de *T. molitor* durante 20 días. Donde C + E = cópula más un encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más un encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.2. Moléculas Pro-oxidantes

2.2.1. Anión superóxido

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 146279.94$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + E (478.78 ± 0.45) tuvo más superóxido que los grupos ZC + E (277.67 ± 0.26 ; $p < 0.0001$) o C +ZE (327.99 ± 0.31 ; $p < 0.0001$). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p < 0.0001$). Esto indica que la cópula (memorización) causa mayor producción de radicales superóxido que el re-encuentro (evocación de la memoria) de pareja.

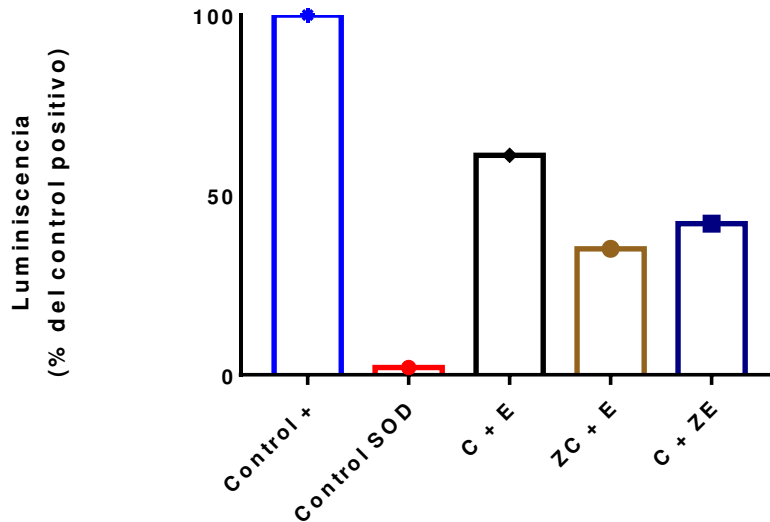


Fig. 27. Medición de luminiscencia producida por la reacción de anión superóxido con luminol en muestras de cerebro de hembras de *T. molitor*. Donde el control + representa el 100 % de la reacción del anión superóxido, mientras que el control SOD detiene la reacción compitiendo con el luminol por el anión superóxido. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.2.2. Peróxido de Hidrogeno

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 36.98$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + E (1.47 ± 0.3) tuvo más H_2O_2 que los grupos ZC + E (0.27 ± 0.1 ; $p < 0.0001$) o C +ZE (0.41 ± 0.11 ; $p < 0.0001$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p = 0.99$).

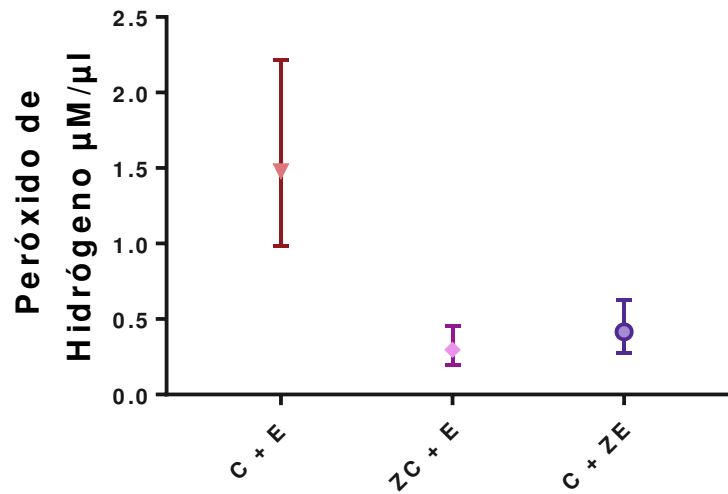


Fig. 28. Concentración de peróxido de hidrógeno en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.2.3. Óxido Nítrico (NO)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 16.42$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + E (12.01 ± 1.17) tuvo menos ON que los grupos ZC + E (19.44 ± 1.89 ; $p < 0.003$) o C + ZE (18.90 ± 1.84 ; $p < 0.005$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p = 0.99$).

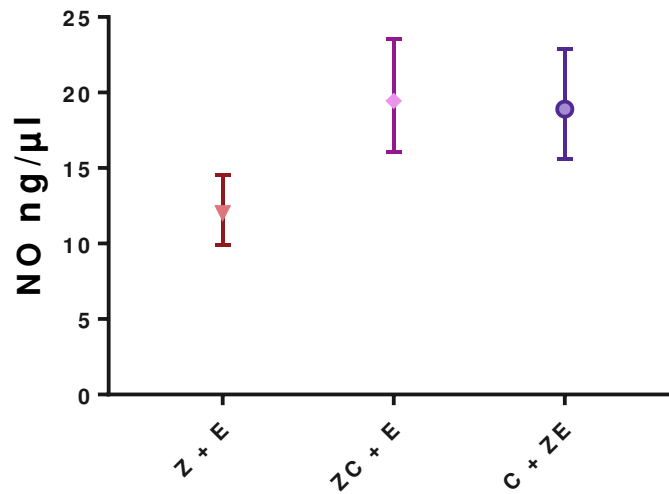


Fig. 29. Concentración de NO en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.3. Antioxidantes

2.3.1 Antioxidantes totales

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 7.83$, g.l. = 2, $p = 0.02$). El tratamiento C + E (0.10 ± 0.005) tuvo menos antioxidantes que los grupos ZC + E (0.12 ± 0.007 ; $p = 0.39$) o C +ZE (0.12 ± 0.007 ; $p = 0.08$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p = 0.99$).

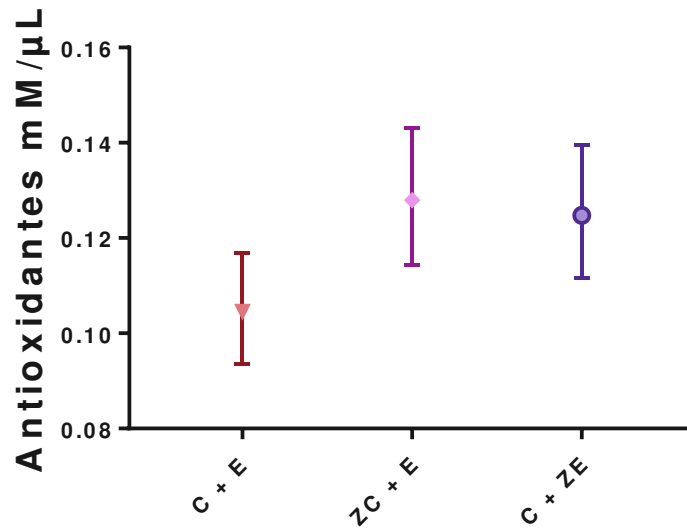


Fig. 30. Medición de la capacidad total de antioxidantes enzimáticos (catalasa y glutatión peroxidasa) y no-enzimáticos (tocoferoles, carotenos, vitamina A, ubiquinoles, glutatión y ascorbato). Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.3.2. Catalasa

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 1.73$, g.l. = 2, $p = 0.42$; Tratamiento C + E: 1256.00 ± 81.90 ; ZC + E: 1138.00 ± 74.02 ; C + ZE: 1120.75 ± 73.08). Esto sugiere que la cópula (memorización de la pareja) y re-encuentro (evocación de la memoria) no afecta significativamente la producción de catalasa.

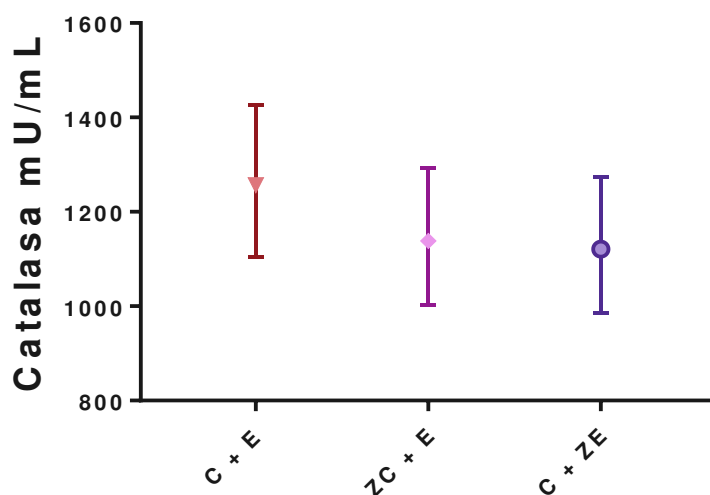


Fig. 31. Concentración de catalasa en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.3.3. Glutación Peroxidasa

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 2.12$, g.l. = 2, $p = 0.34$; Tratamiento C + E: 0.14 ± 0.009 ; ZC + E: 0.13 ± 0.008 ; C +ZE: 0.15 ± 0.009). Esto sugiere que la cópula (memorización de la pareja) y re-encuentro (evocación de la memoria) no afecta significativamente la producción de Glutación peroxidasa.

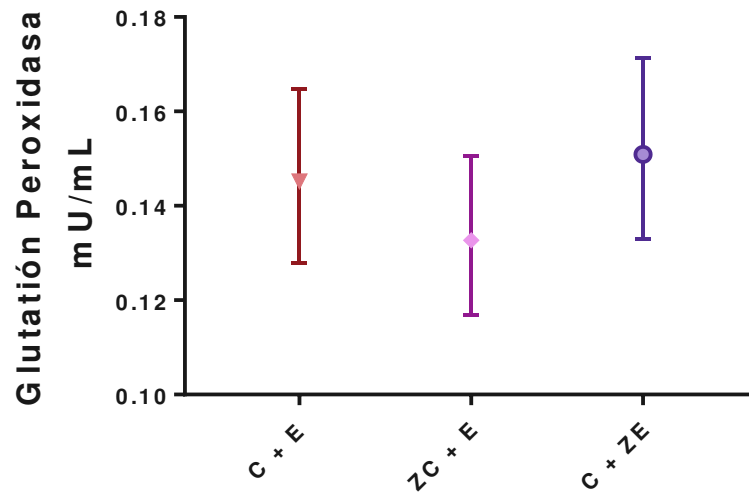


Fig. 32. Concentración de glutatión peroxidasa en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.3.4. Superóxido Dismutasa (SOD)

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 1.70$, g.l. = 2, $p = 0.42$; El tratamiento C + E: 34.48 ± 3.79 ; ZC + E: 34.95 ± 3.84 ; C +ZE: 41.63 ± 4.58). Esto sugiere que al copular (memorizar a la pareja) o tener re-encuentros

(evocación de la memoria) no afecta significativamente la producción de SOD.

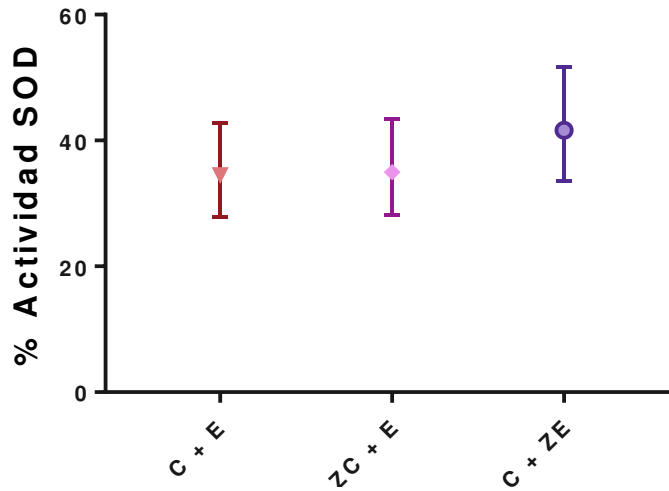


Fig. 33. Porcentaje de actividad de SOD en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

2.4. Reservas energéticas (triglicéridos)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 317.46$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + E (0.28 ± 0.005) tuvo menos triglicéridos que los grupos ZC + E (0.47 ± 0.008 ; $p < 0.0001$) o C + ZE (0.37 ± 0.007 ; $p < 0.0001$). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p < 0.0001$). Esto sugiere que al copular (memorizar a la pareja) afecta significativamente las reservas de triglicéridos.

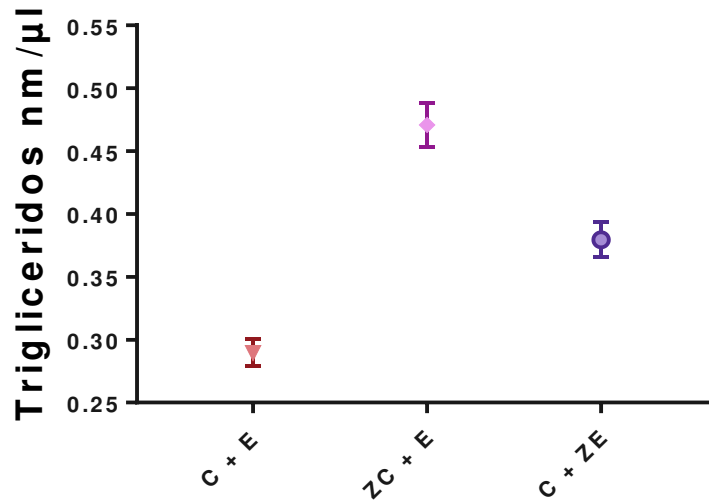


Fig. 34. Concentración de triglicéridos en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + E = cópula más encuentro, ZC + E = zebularina antes de cópula más encuentro y C + ZE = cópula más zebularina antes de encuentro.

3. Una Copula y Dos Encuentros

3.1. Supervivencia

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Log-Rank = 152.62, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + 2E (5.86 ± 0.31) que el grupo ZC + ZE + E (14.82 ± 0.31) o C + ZE + ZE (12.84 ± 0.54). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p < 0.04$), y los resultados sugieren que evocar la memoria y no el aprendizaje y memorización, son los más costosos.

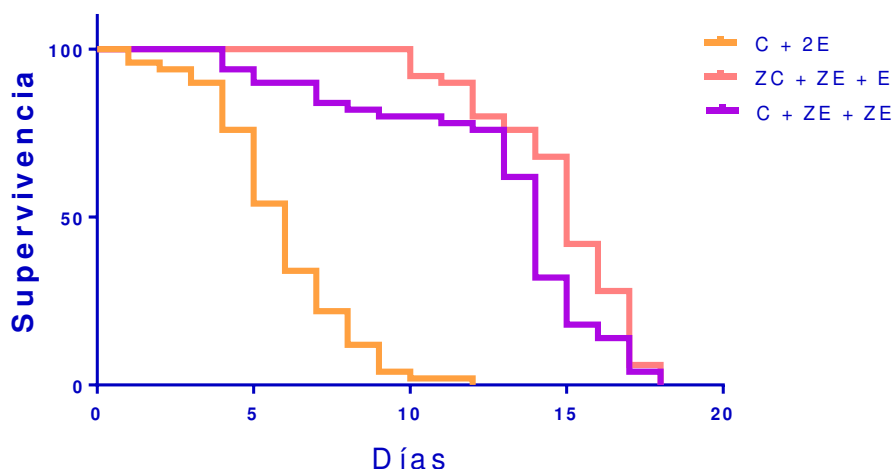


Fig. 35. Supervivencia de hembras de *T. molitor* durante 20 días. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.2. Moléculas Pro-oxidantes

3.2.1. Anión Superóxido

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 92.75$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + 2E (644.42 ± 13.00) tuvo más anión superóxido que el grupo ZC + ZE + E (487.78 ± 9.84 ; $p < 0.0001$) o C + ZE + ZE (556.75 ± 11.25 ; $p < 0.0001$). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p < 0.0001$). Estas diferencias indican que en la evocación de la memoria se producen mayor cantidad de anión superóxido.

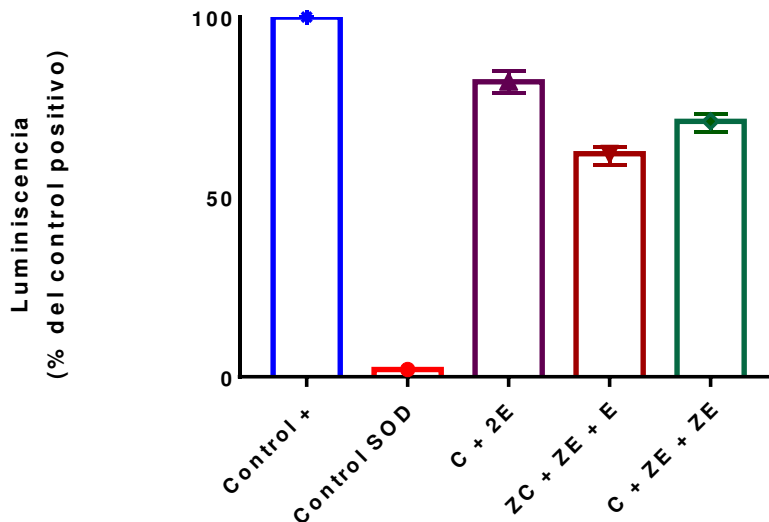


Fig. 36. Medición de luminiscencia producida por la reacción de anión superóxido con luminol en muestras de cerebro de hembras de *T. molitor*. Donde el control + representa el 100 % de la reacción del anión superóxido, mientras que el control SOD detiene la reacción compitiendo con el luminol por el anión superóxido. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.2.2 Peróxido de Hidrogeno

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 109.57$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + 2E tuvo más H_2O_2 (3.07 ± 0.24) que el grupo ZC + ZE + E (1.88 ± 0.15 ; $p < 0.0001$) o C + ZE + ZE (0.93 ± 0.07 ; $p < 0.0001$). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p < 0.0001$).

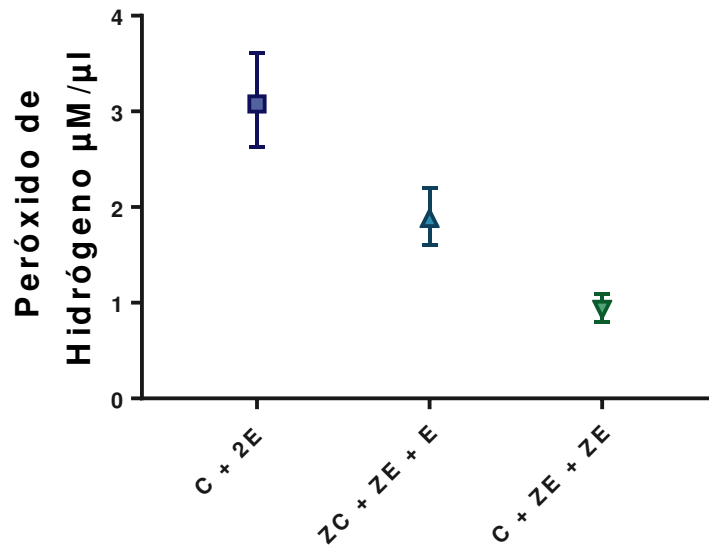


Fig. 37. Concentración de peróxido de hidrogeno en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.2.3 Óxido Nítrico (NO)

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 2.37$, g.l. = 2, $p = 3.05$; el tratamiento C + 2E: 18.72 ± 1.39 ; ZC + ZE + E: 21.22 ± 1.57 ; C + ZE + ZE: 21.70 ± 1.61).

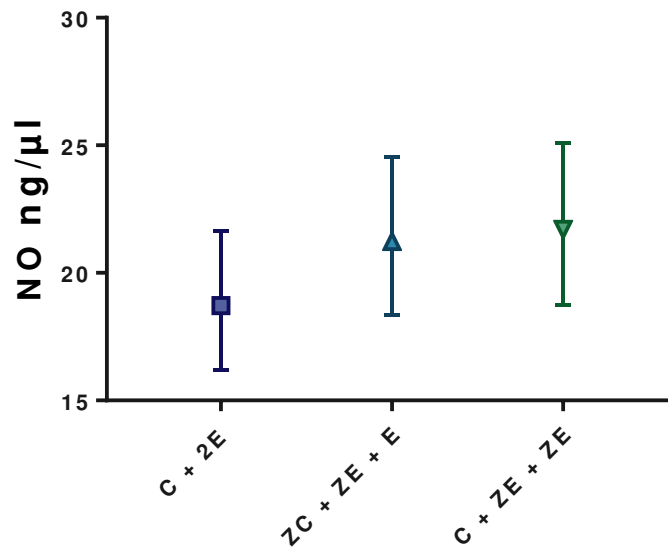


Fig. 38. Concentración de NO en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.3. Antioxidantes

3.3.1. Antioxidantes Totales

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 2.88$, g.l. = 2, $p = 2.23$; el tratamiento C + 2E: 0.15 ± 0.008 ; ZC + ZE + E: 0.14 ± 0.007 ; C + ZE + ZE: 0.13 ± 0.007). Esto sugiere que al copular (memorizar a la pareja) o tener re-encuentros (evocación de la memoria) no afecta significativamente el incremento o decremento de antioxidantes.

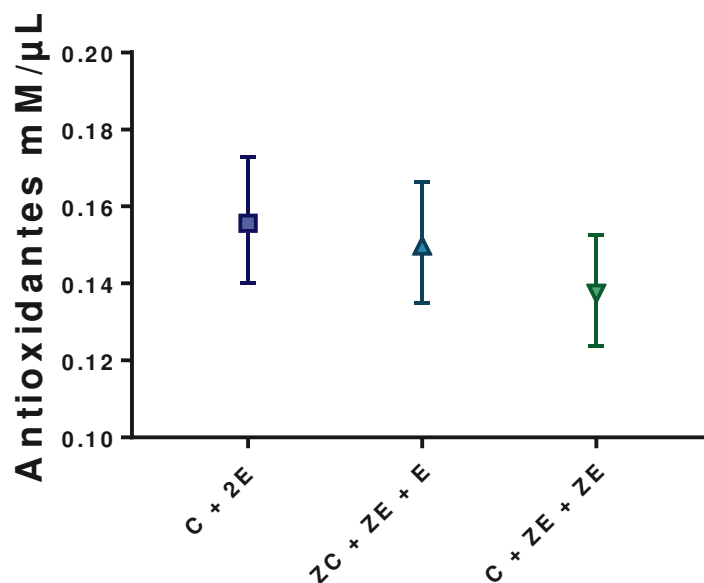


Fig. 39. Medición de la capacidad total de antioxidantes enzimáticos (catalasa y glutatión peroxidasa) y no-enzimáticos (tocoferoles, carotenos, vitamina A, ubiquinoles, glutatión y ascorbato). Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.3.2. Catalasa

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 0.27$, g.l. = 2, $p = 0.87$; El tratamiento C + 2E: 1178.00 ± 94.76 ; ZC + ZE + E: 1110.25 ± 89.31 ; C + ZE + ZE: 1135.00 ± 91.31). Esto sugiere que al copular (memorizar a la pareja) o tener re-encuentros (evocación de la memoria) no afecta significativamente la producción de catalasa.

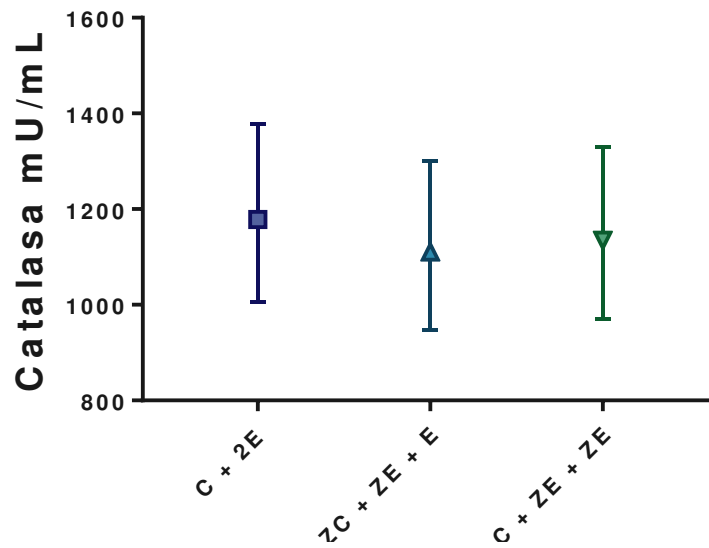


Fig. 40. Concentración de catalasa en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.3.3. Glutación Peroxidasa

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 0.20$, g.l. = 2, $p = 0.90$; El tratamiento C + 2E: 0.14 ± 0.01 ; ZC + ZE + E: 0.14 ± 0.01 ; C + ZE + ZE: 0.15 ± 0.01). Esto sugiere que al copular (memorizar a la pareja) o tener re-encuentros (evocación de la memoria) no afecta significativamente la producción de Glutación peroxidasa.

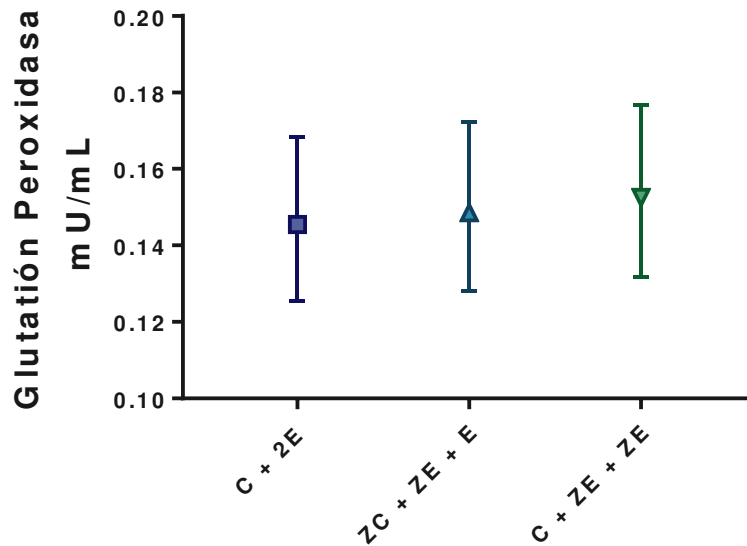


Fig. 41. Concentración de glutatión peroxidasa en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.3.4 Superóxido Dismutasa (SOD)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 20.80$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + 2E tuvo menos SOD (35.26 ± 3.73) que el grupo ZC + ZE + E (75.48 ± 7.99 ; $p < 0.0001$), pero tuvo concentraciones similares de SOD con el tratamiento C + ZE + ZE (43.34 ± 4.58 ; $p = 0.51$). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p = 0.001$). Esto sugiere que al copular (memorizar a la pareja) o tener re-encuentros (evocación de la memoria) afecta significativamente la producción de SOD.

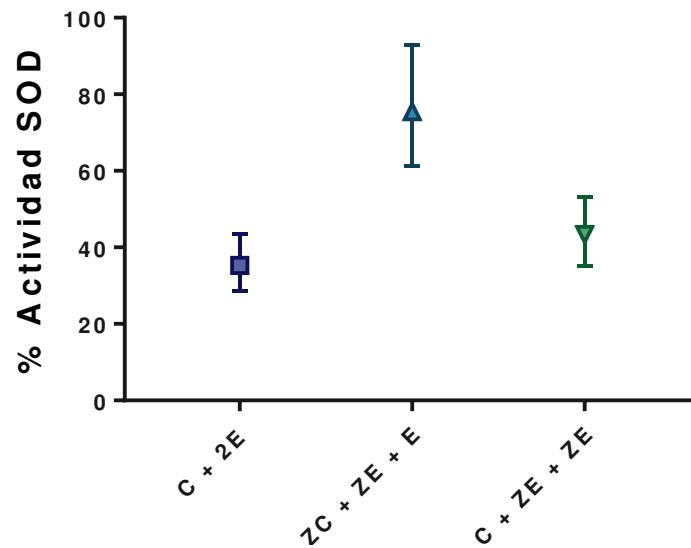


Fig. 42. Porcentaje de actividad de SOD en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

3.4 Reservas Energéticas (Triglicéridos)

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($X^2 = 1674.96$, g.l. = 2, $p < 0.0001$). El tratamiento C + 2E tuvo menos triglicéridos (0.21 ± 0.004) que los tratamientos ZC + ZE + E (0.81 ± 0.01 ; $p < 0.0001$) o C + ZE + ZE (0.65 ± 0.01 ; $p < 0.0001$). Además, encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con zebularina ($p < 0.0001$). esto sugiere que re-encontrar a la pareja (evocación de la memoria) afecta significativamente el uso de las reservas de triglicéridos.

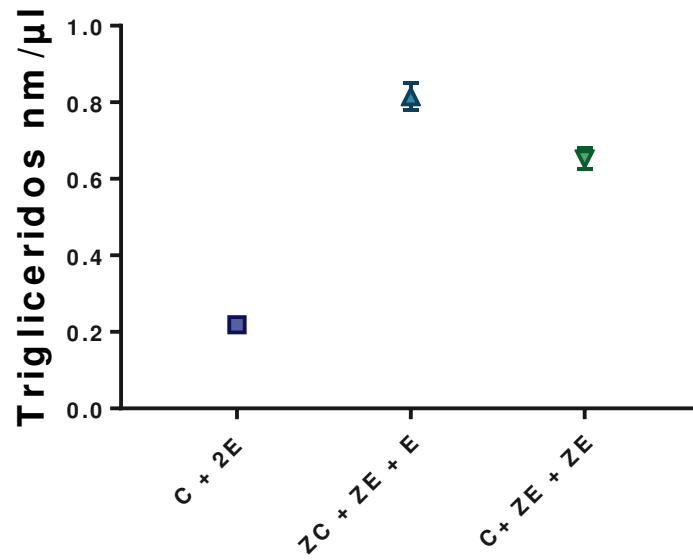


Fig. 43. Concentración de triglicéridos en muestra de cerebro de hembras *T. molitor*. Donde C + 2E = cópula más dos encuentros, ZC + ZE + Z = zebularina antes de cópula más zebularina antes de encuentro más encuentro y C + ZE + ZE = cópula más zebularina antes de dos encuentros.

DISCUSIÓN

1.- Supervivencia

Se encontró que las hembras vírgenes (V), y las que copularon sin recordar a su pareja (C) vivieron más que las hembras que recordaron a su pareja (C + E y C + 2E). Dado que en todos los grupos controlamos factores como el tamaño, condición y edad, proponemos que esto se debió a que no evocaron la memoria y por ello no incurrieron en el costo de memorización, mientras que las hembras que evocaron la memoria murieron más rápido (C + E y C + 2E). Esto va de acuerdo con los resultados observados en *D. melanogaster* [12] donde se vio que la memoria a largo plazo afecta la supervivencia, pero en nuestro estudio sugerimos que la mortalidad podría radicar a que sus cerebros se oxidan y pierden energía.

2.- Antioxidantes vs especies reactivas (RS)

Para entender los mecanismos del efecto producido por la evocación de la memoria se analizaron las RS y antioxidantes. Encontramos que las hembras vírgenes V tuvieron menos RS y menos antioxidantes que las hembras que copularon (C), y las diferencias fueron más marcadas con las hembras con zebularina antes de la copula (ZC), lo que demuestra que el cerebro de las hembras vírgenes (V) tiene más actividad oxidante que las hembras a las que se les afectó el poder discriminatorio de la memoria. Esto sugiere que la capacidad antioxidante del cerebro de las hembras con cópula (C, ZC) incrementa, y muestra la respuesta del cerebro al estrés oxidante generado por la cópula (memorización). Ahora sería muy interesante hacer un análisis más detallado de la oxidación del cerebro

tomando en cuenta los cuerpos fúngicos porque es el sitio donde se procesa y almacena la mayoría de la información asociativa en insectos [40]. De acuerdo a este trabajo, se esperaría que los cuerpos fúngicos tuvieran más daño por estrés oxidante, en comparación con los lóbulos oculares.

Las hembras que enfrentaron el recuerdo del macho pareja después de la cópula (ZC + E y C + ZE) tuvieron menos antioxidantes totales, mientras que las hembras que enfrentaron 2 veces el recuerdo del macho (C + 2E, ZC + ZE + E y C + ZE + ZE) mantuvieron la concentración de antioxidantes totales similares a las que solo copularon. Estos resultados sugieren que en el tercer re-encuentro, los radicales libres sobrepasaron a los antioxidantes, dañando su capacidad de defensa, y sugieren que esta podría ser la causa de las diferencias en supervivencia entre grupos. Dado que en *D. melanogaster* se ha visto daño a las células cuando usan la memoria [11], nuestros resultados podrían explicar porque se dañan las células y ahora sería interesante determinar el grado de daño en las células de las hembras en función del recuerdo de la pareja, así como posible daño al DNA, lípidos y proteínas [41, 42, 43].

3.- Triglicéridos

Las reservas energéticas se pueden analizar usando como marcador la cantidad de triglicéridos [44]. Dentro de los análisis las hembras vírgenes (V) presentaron una concentración elevada y sugerimos que esto se debe a que gastaron poca energía. En cambio, las hembras que memorizaron a su pareja (C, C + E y C + 2E) mostraron menor cantidad de triglicéridos que las hembras que

fueron afectadas por la zebularina (ZC, ZC + E, C +ZE, ZC + ZE + E y C + ZE + ZE). Esto va de acuerdo con la propuesta de que memorizar y evocar la memoria demanda recursos energéticos y muestra la importancia que tiene para las hembras memorizar al macho pareja evitando posibles engaños de la condición [45, 46, 47]. Esto sugiere que, si las hembras evitan la inversión terminal de los machos por medio de la memoria de la condición de la pareja, incurren en costos elevados en términos energéticos. Además, con la disminución de triglicéridos observamos una mayor cantidad de RS.

4.- Estrés oxidante (pro-oxidantes)

El producto resultante de la reacción superóxido dismutasa (SOD) con el anión superóxido genera el peróxido de hidrogeno el cual por medio de la reacción de FENTON puede generar especies reactivas (radical hidroxilo y anión superóxido) (Fig. 6). En este análisis se encontró una cantidad de peróxido de hidrogeno similar entre las hembras que solo copularon (C y ZC) con las vírgenes (V). Esto sugiere que la cópula por sí sola no incrementa el peróxido de hidrogeno, pero si lo aumenta la evocación de la memoria.

Las hembras que enfrentaron nuevamente el recuerdo del macho pareja intervenidas con zebularina (ZC + E, C +ZE, ZC + ZE + E y C + ZE + ZE) mostraron una concentración más baja de peróxido de hidrogeno que las hembras que memorizaron y evocaron la memoria (C + E, C + 2E). Los resultados de peróxido de hidrogeno muestran hasta una concentración mayor de 3 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ en los tratamientos

que evocaron la memoria sin ser intervenidas con zebularina (C + E y C + 2E) [12, 48].

Por otro lado, en las hembras vírgenes (V) se encontró una concentración elevada de NO, y este resultado parece inesperado pero una hipótesis para explicarlo es que los niveles de NO en hembras vírgenes (V) sean basales y disminuya con la memorización [49]. Esto tiene sustento porque en diversas especies se usa NO durante la memoria [49, 50, 51, 42], y quizás, conforme se use más NO, se vaya consumiendo. Sin embargo, otra hipótesis es que al mantener elevados niveles de radicales derivados de oxígeno, el aumento en los niveles de NO sería demasiado costoso para las hembras. De acuerdo a esto, se ha reportado de manera muy interesante que el anión superóxido reacciona con NO formando el anión peroxinitrito [42]. Tanto el peroxinitrito como su ácido conjugado son prooxidantes muy fuertes que atacan biomoléculas como las metaloproteínas (catalasa, NOS, citocromo c) [43], lípidos, carbohidratos y DNA [52]. El daño que puede causar el peroxinitrito *in vivo* es variado, pero se destaca la inactivación de componentes de transporte electrónico mitocondrial, inactivación de enzimas con grupos sulfidrilos como la gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa de la glicólisis [53], e inactivación de enzimas con centros ferrosulfurados como la aconitasa del ciclo Krebs [54]. Todo esto lleva a una inhibición persistente de la respuesta celular y los procesos de formación de ATP. Esto genera estrés oxidante y la pérdida de la respuesta celular, y tal vez pudo ocurrir en las hembras que memorizaron (C y ZC) y evocaron la memoria (C + E, ZC + E, C +ZE, C + 2E, ZC + ZE + E y C + ZE + ZE) en comparación con las hembras vírgenes (V). Si es así, el efecto podría ser si

aumentaran al mismo tiempo los niveles de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y NO. De esta manera, la estrategia óptima sería que debido al aumento de H₂O₂, disminuya el NO. Estas hipótesis deberían ponerse a prueba a futuro y sería muy interesante saber por qué no aumentan los niveles de NO, pero sí los de H₂O₂.

5.- Enzimas antioxidantes

Por otro lado, el peróxido de hidrogeno puede ser neutralizado por la catalasa y la glutatión peroxidasa. Ambos antioxidantes se encontraron en concentraciones similares en todos los tratamientos, por lo que parece que la disposición está limitada a la alimentación recibida. De modo que no pudieron sintetizar una concentración elevada de ambos antioxidantes. Aunado el estrés oxidante que generaron con la evocación de la memoria, las RS fueron sobrepasando a los antioxidantes.

Una diferencia notable es que las mU/mL de glutatión peroxidasa son mucho menores a las de la catalasa. Esto podría explicar que las células tienen más afinidad por sintetizar catalasa o ¿será que la producción de la catalasa podría ser menos costosa que la glutatión peroxidasa?.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a otros trabajos, demostramos que la copula y la formación de la memoria no implica costos en supervivencia. Se demostró que las hembras que evocaron la memoria de su pareja en un segundo y tercer encuentro generan RS que pueden afectar en su supervivencia.

Analizándolo de manera evolutiva, la selección sexual implica una estrategia de las hembras que memorizan la condición del macho evitando señales deshonestas, de manera que cuando el macho disminuye su condición, la hembra puede discernir la preferencia.

Las hembras activan mecanismos de reparación de daño y tal es el caso de la catalasa y glutatión peroxidasa que mantuvieron constante y que representa un costo energético que debe ser compensado, sugerimos que esta compensación se lleva a cabo por los triglicéridos ya que la memoria demanda energía.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Balda R. P. y Kamil A. C. (1989).** A comparative study of cache recovery by three corvid species. *Anim. Behav.* 38, 486-495.
- 2.- **Karen L. H. y Lauren M. G. (2011).** Associative Learning in Insects: Evolutionary Models, Mushroom Bodies, and a Neuroscientific Conundrum. *Learning in insects.* 6, 24-45.
- 3.- **Isler, K. (2013).** Brain size evolution: how fish pay for being smart. *Current Biology*, 23(2), R63-R65.
- 4.- **Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V., ... & Keshishian, H. (2014).** A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81(4), 755-765.
- 5.- **Pinel, J.P. (2001).** Biopsychology. Pearson Educación, S. A., Madrid, 4ª edición.
- 6.- **Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (2001)** Principios de Neurociencia, McGraw Hill, Madrid, 4ª edición.
- 7.- **Buttemer, W. A., Abele, D., & Costantini, D. (2010).** From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional ecology*, 24(5), 971-983.
- 8.- **Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239.
- 9.- **Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005).** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.
- 10.- **Falnes, P.Ø., Klungland, A. & Alseth, I. (2007).** Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience*, **145**, 1222–1232.

- 11.- **Mery, F., & Kawecki, T. J. (2005).** A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science*, 308(5725), 1148-1148.
- 12.- **Haddadi, M., Jahromi, S. R., Sagar, B. C., Patil, R. K., Shivanandappa, T., & Ramesh, S. R. (2014).** Brain aging, memory impairment and oxidative stress: a study in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural brain research*, 259, 60-69.
- 13.- **Michealis, L. (1951).** Theory of Oxidation-Reduction, Chapter 44 in *The Enzymes*, edited by Sumner, JB and Myrbiick, K, Vol. 2, Part 1.
- 14.- **Waters, W. A. (1946).** The chemistry of free radicals. Clarendon Press; Oxford.
- 15.- **Elphick, M. R., Green, I. C., & O'Shea, M. (1993).** Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. *Brain research*, 619(1-2), 344-346.
- 16.- **Müller, U. L. I. (1997).** The nitric oxide system in insects. *Progress in neurobiology*, 51(3), 363-381.
- 17.- **Halliwell B. (2007)** Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 5, 1147-1150.
- 18.- **Pérez Gastell, P.L. & J.L.Pérez de Alejo. (2000)** Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Medica Militar*. 29(3):192-198.
- 19.- **Oroian, M., & Escriche, I. (2015).** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- 20.- **Olson, V. A., & Owens, I. P. (1998).** Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(12), 510-514.

- 21.- **Pike, T. W., Blount, J. D., Bjerkeng, B., Lindström, J., & Metcalfe, N. B. (2007).** Carotenoids, oxidative stress and female mating preference for longer lived males. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1618), 1591-1596.
- 22.- **De Loof, A. (2011).** Longevity and aging in insects: is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the “trade-off” concept. *Journal of insect physiology*, 57(1), 1-11.
- 23.- **Archer, C. R., Sakaluk, S. K., Selman, C., Royle, N. J., & Hunt, J. (2013).** Oxidative stress and the evolution of sex differences in life span and ageing in the decorated cricket, *Gryllodes sigillatus*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 67(3), 620-634.
- 24.- **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.
- 25.- **Cordero-Molina, S. (2015).** El papel de la memoria en la elección femenina. (Tesis de licenciatura).
- 26.- **Biergans, S. D., Jones, J. C., Treiber, N., Galizia, C. G., & Szyszka, P. (2012).** DNA methylation mediates the discriminatory power of associative long-term memory in honeybees. *PloS one*, 7(6), e39349.
- 27.- **Jarome, T. J., & Lubin, F. D. (2014).** Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiology of learning and memory*, 115, 116-127.

- 28.- **Bryning, G. P., Chambers, J., & Wakefield, M. E. (2005).** Identification of a sex pheromone from male yellow mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. *Journal of chemical ecology*, 31(11), 2721-2730.
- 29.- **Tanaka, Y., Honda, H., Ohsawa, K. & Yamamoto, I. (1986)** A sex attractant of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. and its role in the mating behaviour. *Journal of Pesticide Science*, **11**, 49-55.
- 30.- **Carazo, P., Sanchez, E., Font, E., & Desfilis, E. (2004).** Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Animal Behaviour*, 68(1), 123-129.
- 31.- **Rhoades, R. A., & Bell, D. R. (Eds.). (2012).** *Medical physiology: Principles for clinical medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
- 32.- **Bhattacharya, A. K., Ameel, J. J., & Waldbauer, G. P. (1970).** A method for sexing living pupal and adult yellow mealworms. *Annals of the Entomological Society of America*, 63(6), 1783-1783.
- 33.- **Cotton, R.T. (1927).** Notes on the biology of the meal worms, *Tenebrio molitor* Linne and *T. Obscurus* Fab. *Annals of the Entomological Society of America*, 20, 81-86.
- 34.- **Balfour, C.E. & Carmichael, L. (1928).** The Light Reactions of the Meal Worm (*Tenebrio molitor* Linn). *The American Journal of Psychology*, 40, 575-584.
- 35.- **Cordero-Molina, S. (2017).** Importancia de la memoria femenina en la selección sexual de *Tenebrio molitor*. (Tesis de maestría).

- 36.- **Marquez-García, A., Canales-Lazcano, J., Rantala, M.J. & Contreras-¿Garduño, J. (2016)** Is Juvenile Hormone a potential mechanism that underlay the “branched Ymodel”? *General and Comparative Endocrinology*, 230, 170-176.
- 37.- **Lockett, G. A., Helliwell, P., & Maleszka, R. (2010).** Involvement of DNA methylation in memory processing in the honey bee. *Neuroreport*, 21(12), 812-816.
- 38.- **Barron, A. B., Maleszka, J., Vander Meer, R. K., Robinson, G. E., & Maleszka, R. (2007).** Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. *Journal of insect physiology*, 53(2), 187-194.
- 39.- **Hernández-Villanueva, M. (2013).** Efecto de la hormona juvenil en el éxito reproductivo de los machos y los cambios en la expresión de proteínas en el cerebro de su pareja (Tesis de maestría).
- 40.- **Cognigni, P., Felsenberg, J., & Waddell, S. (2018).** Do the right thing: neural network mechanisms of memory formation, expression and update in *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology*, 49, 51-58.
- 41.- **Müller, U. (1996).** Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*, 16(3), 541-549.
- 42.- **Beckmen, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990).** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1620-4.
- 43.- **Radi, R. (1996).** Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chemical research in toxicology*, 9(5), 828-835.

- 44.- **Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010)**. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207-225.
- 45.- **Nielsen, M. L., & Holman, L. (2012)**. Terminal investment in multiple sexual signals: immune-challenged males produce more attractive pheromones. *Functional Ecology*, 26(1), 20-28.
- 46.- **Krams, I., Daukšte, J., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M. J., Ramey, G., & Šauša, L. (2011)**. Female choice reveals terminal investment in male mealworm beetles, *Tenebrio molitor*, after a repeated activation of the immune system. *Journal of Insect Science*, 11(1), 56.
- 47.- **Sadd, B., Holman, L., Armitage, H., Lock, F., Marland, R., & Siva-Jothy, M. T. (2006)**. Modulation of sexual signalling by immune challenged male mealworm beetles (*Tenebrio molitor*, L.): evidence for terminal investment and dishonesty. *Journal of evolutionary biology*, 19(2), 321-325.
- 48.- **Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012)**. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- 49.- **Kemenes, I., Kemenes, G., Andrew, R. J., Benjamin, P. R., & O'Shea, M. (2002)**. Critical time-window for NO–cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Journal of Neuroscience*, 22(4), 1414-1425.
- 50.- **Kendrick, K. M., Guevara-Guzman, R., Zorrilla, J., Hinton, M. R., Broad, K. D., Mimmack, M. A., & Ohkura, S. (1997)**. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*, 388(6643), 670.

- 51.- **Matsumoto, Y., Unoki, S., Aonuma, H., & Mizunami, M. (2006).** Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory. *Learning & Memory*, 13(1), 35-44.
- 52.- **Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., ... & Freeman, B. A. (1994).** Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26066-26075.
- 53.- **Radi, R. B. J. S., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991).** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4244-4250.
- 54.- **Castro, L., Rodriguez, M., & Radi, R. (1994).** Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 269(47), 29409-29415.

APÉNDICE

Tabla 1. Fuentes naturales de antioxidantes y sus beneficios para la salud.

Antioxidantes					
Clasificación	Ejemplo	En/Ex	¿Reacciona con?	Fuentes naturales	Beneficios
Vitaminas	Vitamina C	Exógena	ERO	Manzana (Bosch et al., 2013), Plátano (Bosch et al., 2013), myrica (Yu, Lin, Zhan, He y Zhu, 2013), Brócoli (Rybarczyk-Plonska et al., 2014), Cáscara de cítricos (de Moraes Barros et al., 2012), Ajo (Di Cagno, Coda, de Angelis, y Gobbetti, 2013), Jugo de naranja (Remini et al., 2015), Pera (Bosch et al., 2013), Fresa (Sapei & Hwa, 2014), Mandarina (Bosch et al., 2013), Menta (Curutchet, Dellacassa, Ringuelet, Chaves, y Viña, 2014), menta verde (Curutchet et al., 2014)	La vitamina C es de gran interés debido a la posibilidad de aumentar la resistencia del plasma a la peroxidación lipídica en el caso de la suplementación a corto y largo plazo (Shahkar et al., 2015), en la disminución de los niveles séricos de ácido úrico, resultando en una incidencia correspondientemente menor de la gota (Roddy y Choi, 2014), disminuye significativamente el riesgo de tener un accidente cerebrovascular (Yamagata & Tagami, 2015) y reduce la incidencia de enfermedades crónicas y degenerativas (Wojcik, Burzynska-Pedziwiatr y Wozniak, 2010)
	Vitamina E	Exógena	ROS Radicales fenoxilo y	Dabai (Azlan y otros, 2010), Granos (Gerstenmeyer et al., 2013; Okarter, Liu, Sorrells y Liu, 2010), Té verde (Yin, Becker, Andersen y Skibsted, 2012), Aceitunas y aceite de oliva (Azlan et al., 2010; Beltrán et al., 2010), Aceite de palma (Azlan et al., 2010), Semillas de calabaza (Butinar, Bučar-Miklavčič, Mariani, y Raspor, 2011), Semillas de girasol y aceite de girasol (Aladedunye & Przybylski, 2013)	Se cree que la vitamina E es el componente principal del sistema antioxidante de los espermatozoides (Anel-López et al., 2012) y es uno de los principales protectores de membrana contra las especies reactivas del oxígeno y la peroxidación lipídica (Yousef, 2010).
Carotenoides	β -caroteno	Exógena	ROS	Amaranto (Gautam, Platel, y Srinivasan, 2010), Verduras de hoja verde oscuro (Lemmens et al., 2013), Gac (<i>Momordica cochinchinensis</i> Spreng) (Kubola, Meeso, y Siriamornpun, 2013), Aceite de oliva (Samaniego-Sánchez et al., 2010), Zanahorias rojas (Gautam et al., 2010; Lemmens et al., 2013; Zaccari, Cabrera, Ramos y Saadoun, 2015), Batata (Laurie, van Jaarsveld, Faber, Philpott y Labuschange, 2012).	Se ha demostrado que los carotenoides desempeñan diversas funciones en la prevención de diversos trastornos de la salud, incluido el cáncer, las enfermedades metabólicas y posiblemente las enfermedades cardiovasculares (Jomova & Valko, 2013). Se ha informado que el β -caroteno se asocia con influencia positiva en ciertos tipos de

					cáncer (Greenlee, 2012) y enfermedades cardiovasculares (Key, 2011).
	Licopeno	Exógena	ROS	Albaricoques, pomelos, guayabas, sandías, papayas y zanahorias (Zuknik, Norulaini y Omar, 2012), Tomates (Ilahy, Hdider, Lenucci, Tlili y Dalessandro, 2011; Lavelli y Torresani, 2011; Choi et al., 2014) - la cáscara contiene cinco veces más licopeno que la pulpa de tomate (Machmudah et al., 2012), Gac (<i>Momordica cochinchinensis</i> Spreng) (Kubola et al., 2013)	El licopeno previene varias patologías, tales como: enfermedad cardiovascular (Riccioni et al., 2012), obesidad (Kim et al., 2012) y algunos tipos de cáncer (de Groot & Munden, 2012).
	Xantofilas	Exógena	ROS	Espinacas (Pasaporte et al., 2014), Kale (Arnold, Jentsch, Dawczynski, & Böhm, 2013), Zea mays (Pasaporte et al., 2014), Zanahoria (Pasaporte et al., 2014)	La luteína y la zeaxantina están fuertemente asociadas con la salud visual y también están involucradas en la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Pasaporte et al., 2014)
Polifenoles	Flavonoides	Exógenos	ROS y activación de vías como: factor kappa B, factor transcripcional sensible a la redox AP-1-a, activación de enzima falle II y Nrf2 y la ruta de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)	Granos (Gerstenmeyer et al., 2013; Okarter et al., 2010; Taleon, Dykes, Rooney y Rooney, 2014), Miel (Alvarez-Suarez et al., 2012; Oroian, 2012), Jugo de naranja (da Silva et al., 2013), Tsaoko amomum fruit (Lu, Yuan, Zeng y Chen, 2011), Palillo de tambor (<i>Moringa oleifera</i>) (Moyo, Oyedemi, Masika y Muchenje, 2012), Hojas de Stevia rebaudiana (Periche, Castelló, Heredia y Escriche, 2015)	La ingesta de flavonoides está inversamente relacionada con el cáncer posterior (Chen y Chen, 2013; Kurzawa-Zegota, Najafzadeh, Baumgartner y Anderson, 2012).
	Flavonoles	Exógena	ROS	Cáscaras de bayas de uva <i>Vitis vinifera</i> (Alcalde-Eon et al., 2014; Liang et al., 2014 ^a , 2014b), Té verde (Bae, Ham, Jeong, Kim y Kim, 2015; Song et al., 2011; Yin et al., 2012), Vino (Liang et al., 2014 ^a , 2014b), Prickleyash verde (Lu et al., 2011), Pimienta de Sichuan (Lu et al., 2011), Hinojo (Lu et al., 2011), Cebolla (Kühn, Wollseifen, Galensa, Schulze-Kaysers, y Kunz, 2014), Palillo de tambor (<i>Moringa oleifera</i>) (Moyo et al., 2012)	Los estudios han demostrado que la quercetina, que es el flavonol principal presente en las cebollas, exhibe actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antiviral, y también puede prevenir la enfermedad cardiovascular en humanos (Caridi et al., 2007; Santos et al. 2014).

	Flavones	Exógena	ROS	Cáscara de cítricos (de Moraes Barros, de Castro Ferreira, y Genovese, 2012), Trollflowers (Sun et al., 2013), Cebolla (Rehman et al., 2013), Perejil (Kaiser, Carle, y Kammerer, 2013), Seda de maíz (Zea mays L.) (Liu et al., 2011 ^a , 2011b)	Las flavonas tienen antioxidante (Voicescu, Nistor y Meghea, 2015), anticancerígeno (Yuan et al., 2012), antiinflamatorio (Hou y Kumamoto, 2010), neuroprotector (Yu, He y Du, 2012), anti-diabetes (Singh et al., 2014), anti-úlceras (Sumbul, Ahmad, Mohd, y Mohd, 2011) y efectos antimicrobianos (Sagrera, Bertucci, Vazquez, y Seoane, 2011)
	Flavanones	Exógena	ROS	Limonas, limas, naranjas dulces, tangerinas y tangas de cítricos (Khan & Dangles, 2014), Sorgos negros (Dykes, Rooney y Rooney, 2013), Olivo desvainado (Alu'datt, Rababah, Ereifej, y Alli, 2013), Soja desfundida (Alu'datt et al., 2013)	Como flavanona, la naringenina exhibe actividad antioxidante y antidiabética (Kapoor y Kakkar, 2014) y demuestra propiedades antiproliferativas en el cáncer de cuello uterino (Ramesh y Alshatwi, 2013). La naringenina inhibe la contractilidad del músculo liso gastrointestinal en tejidos animales aislados (Yang, Pan, Zuo, Guo y Zhou, 2014) y la secreción de cloruro en epitelios colónicos aislados (Collins et al., 2011). Este compuesto tiene un amplio espectro de propiedades farmacológicas como antiinflamatorio, anticancerígeno, antihipertensivo y antiaterogénico (Rodrigo, Gil, Miranda-Merchak y Kalantzidis, 2012) y también exhibe propiedades antioxidantes (Shagirtha y Pari, 2011).
	Flavonones	Exógena	ROS	Té verde (Song et al., 2015), Leche humana (Song, Jouni, y Ferruzzi, 2013), Licores de membrillo (Carbonell-Barrachina, Szychowski, Vásquez, Hernández y Wojdyło, 2015), Partridgeberry (Mitchella) (Bhullar & Rupasinghe, 2015)	Flavonoles presenta actividades antioxidantes, antitrombóticas, antiinflamatorias y antiproliferativas, así como la inhibición de bacterias patógenas y la modulación del metabolismo de los lípidos (Monagas et al., 2010; Sánchez-Patán et al., 2012).
	Antocianinas	Exógena	ROS	Bayas (Ferrari et al., 2011; Kubota et al., 2012; Ramirez, Zambrano, Sepúlveda, Kennelly, y Simirgiotis, 2015), Uvas, tomates, granadas y zanahorias violetas (Can, Arli, & Atkosar, 2012), Granos de café verde (Cheong et al., 2013), Repollo rojo (Chandrasekhar et al., 2012; Wiczkowski, Szawara-Nowak, y Topolska, 2015), Batatas (Truong, Hu, Thompson, Yencho, y Pecota, 2012), Vino (Can et al., 2012; Chen et al.,	Las antocianinas ejercen efectos beneficiosos sobre los humanos; exhiben actividad antioxidante y anticancerígena (Hui et al., 2010), juega un papel vital en la prevención de enfermedades neuronales y cardiovasculares, cáncer y diabetes (Castañeda -Ovando et al., 2009; Konczak & Zhang, 2004; Santos- Buelga, Mateus, y De Freitas, 2014; Tomas-Barberan y Andres-Lacueva, 2012). Está demostrado que la

				2015; Mulero, Pardo y Zafrilla, 2010), Palillo de tambor (<i>Moringa oleifera</i>) (Moyo et al., 2012)	administración de antocianinas durante 4 semanas disminuye la miopía, la apoptosis, la diabetes y los síntomas de obesidad (Tsuda, 2012). El potencial antioxidante de las antocianinas depende de la estructura química de la molécula, la estructura fenólica proporciona propiedades antioxidantes (Pojer et al., 2013).
	Isoflavonas	Exógena	ROS	Soja (Lee, Chung, Kim y Jung, 2015; Toro-Funes et al., 2012), Lentejas verdes, amarillas y rojas, frijoles rojos, alubias y garbanzos (Konar, Poyrazoğlu, Demir, y Artik, 2012).	Las isoflavonas tienen un amplio espectro de beneficios funcionales en el cuerpo humano, como la reducción del riesgo cardiovascular (Liu, Ho, Chen y Ho, 2012), síntomas posmenopáusicos (Virk-Baker, Barnes, Krontiras y Nagy, 2014) o cáncer (He y Chen, 2013).
	Alcoholes fenólicos	Exógena	ROS	Aceitunas y aceite de oliva (Franco et al., 2014), Aguas residuales de almazara (Rahmanian, Jafari y Galanakis, 2014) Vinos blancos griegos de <i>Vitis vinifera</i> L cv. Malagousia (Tourtoglou, Nenadis, y Paraskevopoulou, 2014)	La notable actividad antioxidante del hidroxitirosol la convierte en una alternativa muy prometedora frente a los antioxidantes sintéticos, como el 2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno (BHT), 2- y 3-terc-butil-4-hidroxianisoles (BHA), o etoxiquina, que todavía se usan comúnmente como conservantes de alimentos y / o piensos a pesar de su toxicidad confirmada (Kulawik, Ozogul, Glew y Ozogul, 2013). El hidroxitirosol y el tirosol ejercen un efecto protector in vitro contra la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en bajas concentraciones se ha descubierto que protegen a los eritrocitos humanos y al DNA contra los daños oxidativos (Ilavarasi, Kiruthiga, Pandian y Devi, 2011). El hidroxitirosol es uno de los pocos nutraceuticos aprobados por la E. F. S. A. (2011) por su capacidad para mantener niveles saludables de colesterol LDL y antioxidantes lipídicos.
	Ácidos fenólicos	Exógena	ROS	Jengibre seco (Lu et al., 2011), Hinojo (Lu et al., 2011), granos (Gerstenmeyer et al., 2013), Granos de café verde (Cheong et al., 2013), Prickleyash verde (Lu et al., 2011), Mostaza (Lu et al., 2011), Jugo de naranja (Agcam, Akyıldız, y	Los ácidos fenólicos son poderosos antioxidantes y se ha informado que demuestran acciones antibacterianas, antivirales, anticancerígenas,

				Akdemir Evrendilek, 2014), Pimienta de Sichuan (Lu et al., 2011), Especias (tomillo, salvia, romero, orégano, albahaca, mejorana) (Pokorny y Panek, 2012), Tsaoko amomum fruit (Lu et al., 2011), Vino (Mulero et al., 2010)	antiinflamatorias y vasodilatadoras (Lima et al., 2014; Mudnic et al., 2010).
	Taninos	Exógena	ROS	Los taninos condensados están presentes en los abrigos de semillas de frijol (Díaz, Caldas y Blair, 2010), los caquis (Tian et al., 2012), los mangostanes (Zhou, Lin, Wei, y Tam, 2011) y la canola (Khattab, Goldberg, Lin, y Thiyam, 2010), Granos de café verde (Cheong et al., 2013), Los galotaninos hidrolizables pueden estar presentes en el vino del roble, y podrían agregarse como oenotaninos durante la vinificación (tradicionalmente para eliminar las proteínas indeseables) (Harbertson, Parpinello, Heymann y Downey, 2012), Núcleos de mango (Luo et al., 2014), Granadas (Li et al., 2015), Fresas (Álvarez-Fernández, Hornedo-Ortega, Cerezo, Troncoso y García-Parrilla, 2014), Nueces (Slatnar, Mikulic-Petkovsek, Stampar, Veberic, y Solar, 2015), Whisky (Maitin, 2014)	Se ha informado que los taninos tienen efectos antitrombóticos, antiaterogénicos (Ntchapda et al., 2015), antimutagénicos, antidiabéticos y antiproliferativos (Landete, 2011; Larrosa, García-Conesa, Espín y Tomás-Barberán, 2010), anticancerígeno (Tikoo, Sane, & Gupta, 2011), antiinflamatorio (Piwowarski, Kiss, & Kozłowska-Wojciechowska, 2011), antiviral (Kwon et al., 2010) y propiedades antibacterianas (Chan, Ng, Tan y Low, 2011).
	Estilbenos	Exógena	ROS	Almendras (Xie y Bolling, 2014), Chocolate y cacao (Crozier y Hurst, 2014), Semillas y pieles de uva, vino tinto (Mulero et al., 2010)	Los estilbenos tienen: eficacia antioxidante y antimicrobiana que previene la enfermedad cardiovascular, la arteriosclerosis y el cáncer y actúan como agentes antiinflamatorios y antivirales (Frombaum, Le Clanche, Bonnefont-Rousselot y Borderie, 2012; Galindo et al., 2011).
	Lignanós	Exógena	ROS	Raíces, hojas, semillas, frutas y partes leñosas de plantas vasculares, vegetales, bebidas no alcohólicas, bebidas alcohólicas y cereales (Fang et al., 2014; Su, Wang, Wang y Wu, 2015), Especias (Mukhija, Lal Dhar y Nath Kalia, 2014)	Los lignanos son antioxidantes y juegan un papel en el funcionamiento normal del colon e inhiben / retrasan el crecimiento del cáncer de mama experimental (Landete, 2012).
Enzimas	SOD	Endógena	Anión superóxido	Presente en casi todos los organismos vivos.	Ayuda en la eliminación del superóxido, generando peróxido de hidrógeno.
	CAT	Endógena	Peróxido de hidrógeno	Presente en casi todos los organismos vivos.	Ayuda en la eliminación del peróxido de hidrógeno, generando agua y oxígeno
	Glutatión peroxidasa	Endógena	Peróxido de hidrógeno	Presente en casi todos los organismos vivos.	Utiliza el peróxido de hidrógeno para catalizar la reacción de glutatión a glutatión disulfuro
	lactoferrinas	Endógena	Peróxido de hidrógeno	Presente en los mamíferos.	En presencia de átomos de Fe+2 y Fe+3 reacciona con el peróxido de hidrógeno

formando el radical hidroxilo en la reacción de FENTON.

Tabla 2. Cuantificación de enzimas antioxidantes, ROS y reserva energética.

Nombre		Como funciona	Procedimiento para preparar muestras	Calculo de concentración (unidades)
Antioxidantes				
Antioxidantes totales	TAC	El Trolox, (un análogo de la vitamina E soluble en agua) es usado para estandarizar antioxidantes, con todos los otros antioxidantes que se miden en equivalentes de Trolox. TAC Assay kit, puede medir pequeñas moléculas antioxidantes, proteínas y pequeñas moléculas solas en presencia de la máscara de proteína. Cu ²⁺ es convertido a Cu ⁺ tanto para moléculas pequeñas y proteínas. La máscara de proteína impide la reducción de Cu ²⁺ por la proteína, lo que permite el análisis de sólo las pequeñas moléculas antioxidantes. El ion Cu ⁺ reducido se quela con una sonda colorimétrica para dar un amplio pico de absorbancia alrededor de 570 nm, proporcional a la capacidad antioxidante total.	Para la curva de calibración colocar 0, 4, 8, 12, 16, y 20 µL de 1 mM (1 nmole/µL) "Trolox Standard Solution", se agrega agua para ajustar a él volumen a 50 µl. Luego en los pozos restantes de una placa de 96 pozos se colocan 25 µL de la muestra y 25 µL de la "protein mask", obteniendo un total de 50 µL para realizar la prueba. Se adicionan 100 µL de la "working solution Cu ²⁺ " en todos los pozos, se incuba a temperatura ambiente por 90 min y se lee la absorbancia a 570 nm (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).	Se graficaron los datos obtenidos de la absorbancia de la curva de calibración vs la concentración, se obtuvo la pendiente, y se despejo para obtener la concentración en mM, finalmente se divide entre el volumen de muestra añadido. $Sa/Sv = C$ Donde Sa representa los datos obtenidos de la curva estándar de la muestra (mM o nmoles), Sv representa el volumen de muestra agregado al pozo (µl), C concentración de antioxidantes en muestra (mM/µL o nmoles/µL).

Superoxido dismutasa	SOD	La superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del anión superóxido (O ₂ ⁻) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La sensibilidad del kit utiliza WST-1 que produce un formazán soluble en agua sobre la reducción con el anión. La tasa de la reducción con un anión superóxido está relacionado linealmente con la actividad de la xantina oxidasa (OX), y es inhibido por SOD. Por lo tanto, la actividad de inhibición de SOD puede ser determinado por un método colorimétrico.	Se definió un pozo blanco 1 que contenía 10 µL de ddH ₂ O, 100 µL "WST working solution" y 10 µL de la "Enzyme working solution", un blanco 3 que contenía 10 µL de ddH ₂ O, 100 µL "WST working solution" y 10 µL "Dilution buffer". Se definieron pozos blancos 2 que contenían 10 µL de muestra, 100 µL "WST working solution" y 10 µL "Dilution buffer". Y los pozos muestra que contenían 10 µL de muestra, 100 µL "WST working solution" y 10 µL de "Enzyme working solution". Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se mide a 450nm (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).	En el caso de SOD solo se obtuvo la actividad calculándola de la siguiente manera: Actividad SOD (% radio de inhibición) = $\frac{\{(A_{blanco\ 1} - A_{blanco\ 3}) - (A_{muestra} - A_{blanco\ 2})\}}{(A_{blanco\ 1} - A_{blanco\ 3})} \times 100$.
Catalasa	CAT	La catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en agua y oxígeno. El Amplex Red Catalase Assay Kit (A22180) proporciona un ensayo ultrasensible pero simple para medir la actividad de la catalasa. En el ensayo, la catalasa primero reacciona con H ₂ O ₂ para producir agua y oxígeno (O ₂). Luego, el reactivo Amplex Red reacciona con una estequiometría 1: 1 con cualquier H ₂ O ₂ que no haya reaccionado en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) para producir la oxidación altamente fluorescente, como producto de la resorufina. Por lo tanto, a medida que aumenta la actividad de catalasa, la señal de resorufina disminuye.	Para la curva de calibración colocar en 0, 6.25 (1 U/mL), 12.5 (1 U/mL), 2.5 (10 U/mL), 5 (U/mL), 10 (U/mL) µL de catalasa, luego se agregan 25, 18.75, 12.5, 22.5, 20, 15 µL de "Reaction buffer 1x" respectivamente para obtener un volumen final de 25 µL por pozo y se agregan 25 µL de 40 µM H ₂ O ₂ . En cada pozo restante de una placa de 96 pozos se colocan 12.5 µL de muestra y 12.5 µL de 40 µM H ₂ O ₂ para llevar a cabo la primera reacción que se incubó 30 min a temperatura ambiente. Después se adicionan 25 µL de 0.4 U/mL amplex red reagent/HRP en todos los pozos, se incubó a 37 °C, protegiendo de la luz durante 30 min y se lee a 560 nm (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).	Las U/mL de catalasa diluidas en "Reaction buffer 1x" se obtiene una concentración final mU/mL, son las unidades que se expresarán al obtener la concentración de la pendiente obtenida del gráfico de concentración final vs absorbancia. El término unidad (U) es definida como la cantidad de enzima que formará 1 mg de purpurogalina de pirogalol en 20 segundos a pH6 a 20 °C.
Glutación peroxidasa	GPx	La enzima glutación peroxidasa cataliza la reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno, generando agua y oxígeno. El kit de ensayo Amplex® Red contiene un ensayo sensible de una etapa que utiliza el reactivo Amplex® Red (10-acetyl-3,7 dihydroxyphenoxazine) para detectar la actividad de la peroxidasa en presencia de H ₂ O ₂ .	Para la curva de calibración colocar de 0 a 2 µL de Horseradish peroxidase (HRP) (mU/mL) ajustando el volumen a 25 µL con "Reaction buffer 1x" en 6 pozos. En los pozos restantes de una placa de 96 pozos se colocan 25 µL de muestra y en todos los pozos 25 µL de una mezcla de reactivos (Amplex red, H ₂ O ₂ y buffer 1x), después se incubó a temperatura ambiente, protegiéndola de la luz durante 30 min y se	Las unidades de las concentraciones de la curva de calibración están dadas por la preparación de vial que contiene HRP dando U/mL al hacer la dilución adecuada se obtienen mU/mL utilizadas en la curva de calibración. Las unidades expresadas en los resultados son directas de la fórmula de la pendiente obtenida del gráfico de concentración final vs absorbancia.

			lee a 560 nm (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).	
ROS				
Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂	El peróxido de hidrógeno es un subproducto metabólico de oxígeno reactivo que sirve como un regulador clave para un número de estados relacionados con el estrés oxidativo. La enzima glutatión peroxidasa cataliza la reacción de oxidación de glutatión a glutatión disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno, generando agua y oxígeno. El kit de ensayo Amplex® Red contiene un ensayo sensible de una etapa que utiliza el reactivo Amplex® Red (10-acetyl-3,7 dihydroxyphenoxazine) para detectar el peróxido de hidrogeno. En presencia de peroxidasa, el reactivo Amplex Red reacciona con H ₂ O ₂ en una estequiometría 1: 1 para producir el producto de oxidación fluorescente, resorufina, pero que puede medirse por colorimetría.	Para la curva de calibración colocar de 0 a 10 µL de peróxido de hidrogeno (µM) ajustando el volumen a 25 µL con "Reaction buffer 1x". En los pozos restantes de una placa de 96 pozos se colocan 25 µl de muestra y en todos los pozos 25 µl de una mezcla de reactivos (amplex red, HRP y buffer 1x), después se incubaba a temperatura ambiente, protegiéndola de la luz durante 30 min y se lee a 560 nm (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).	Las unidades se obtienen al preparar la concentración de Peróxido de hidrogeno a partir de una solución 20 nM H ₂ O ₂ que debe ser llevada a una concentración µM para poder realizar la lectura correcta. Las unidades expresadas en los resultados son directas de la fórmula de la pendiente obtenida del grafico de concentración final vs absorbancia.
Anión superóxido	O ₂ ⁻	El anión superóxido (O ₂ ⁻) es un radical de vida corta generado por la adición de un electrón a oxígeno. El método del kit se basa en la oxidación del luminol por aniones superóxido que da como resultado la formación de quimioluminiscencia.	Para la preparación del control positivo se agrega 2.5 µL de "Luminol solution" 2.5 µl de "Enhancer solution" y 1 µL de "Xanthine oxidase Working solution", para preparar el control SOD se agrega 2.5 µL de "Luminol solution" 2.5 µL de "Enhancer solution", 1 µL de "Xanthine oxidase Working solution" y 1 µL superóxido dismutasa 4 U/µL ajustando el volumen de ambos controles a 50 µL. En cada pozo restante de una placa blanca de 96 pozos se colocan 45 µl de muestra, 2.5 µL de "Enhancer solution" y 2.5 µL de "Luminol solution" y para iniciar la reacción se agregan 50 µL de "xanthine working solution" en todos los pozos y se mide la luminiscencia durante 3-5 minutos en intervalos de 30 segundos por lectura.	Los resultados se expresaron en porcentajes tomando como referencia el control positivo que contiene el 100 % de luminiscencia, utilizando la primera lectura registrada.
Oxido nítrico	NO	NO es un radical altamente inestable que reacciona rápidamente con otras especies de oxígeno para formar productos estables, como	Para medir NO₂⁻ Curva de calibración: se colocan 0, 10, 20, 30 y 40 de "NaNO ₂ Standard Solution" (100	La concentración final de la curva de calibración resulta en nmol.

		<p>nitritos (NO₂), nitratos (NO₃) y radicales tóxicos, como el peroxinitrito.</p> <p>En el proceso, NO₃⁻ se convierte en NO₂⁻ por la enzima nitrato reductasa. El mecanismo del ensayo de Griess se resume como el acoplamiento azo entre especies de diazonio, que se producen a partir de sulfanilamida con NO₂ y naftiletilendiamina, dando como resultado un producto colorimétrico.</p>	<p>μM = 0.1 nmol/μL) y se ajusta el volumen a 50 μL por pozo con buffer. En cada pozo restante de una placa de 96 pozos se colocan 25 μL de muestra, 25 μL de buffer, después se adiciona 25 μL "Griess A" a todos los pozos, se incuba a 25 °C durante 5 min, después se adiciona 25 μL "Griess B" a todos los pozos y se incuba a 25 °C durante 10 min y se lee a 540 nm.</p> <p>Para medir NO₃⁻</p> <p>Curva de calibración: se colocan 0, 10, 20, 30 y 40 de "NaNO₃ Standard Solution" (100 μM = 0.1 nmol/μL) y se ajusta el volumen a 40 μL por pozo con buffer. En cada pozo restante de una placa de 96 pozos se colocan 25 μL de muestra, 15 μL de buffer y colocar en todos los pozos 5 μL de nitrato reductasa, 5 μL de "Enzyme Co-factors" y 25 μL "Griess A" mezclar e incubar a 25 °C durante 5 min, después se adiciona 25 μL "Griess B" y se incuba a 25 °C durante 10 min y se lee a 540 nm. (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).</p>	<p>Para calcular los gramos de NO₂⁻ presentes por pozo se usó la siguiente formula:</p> $ANO_2^- / VNO_2^- = CNO_2^-$ <p>Donde ANO₂⁻ representa la Absorbancia obtenida de la curva de calibración (nmol), VNO₂⁻ representa el volumen de la muestra colocada por pozo (μL) y CNO₂⁻ es la concentración de nitrito NO₂⁻. El resultado se multiplica por el peso molecular del nitrito: 46.01 ng/nmol.</p> <p>Para calcular los gramos de NO₃⁻ presentes por pozo se usó la siguiente formula:</p> $A [NO_3^- + NO_2^-] / V [NO_3^- + NO_2^-] = C [NO_3^- + NO_2^-]$ <p>Donde A [NO₃⁻ + NO₂⁻] representa la absorbancia obtenida de la curva de calibración de NO₃⁻ (nmol), V [NO₃⁻ + NO₂⁻] representa el volumen de muestra colocado por pozo (μL) y C [NO₃⁻ + NO₂⁻] representa la concentración tanto de NO₃⁻ como NO₂⁻. Para obtener la concentración pura de nitrato (NO₃⁻), se resta la concentración CNO₂⁻ a C [NO₃⁻ + NO₂⁻] y se multiplica por el peso molecular del nitrato 62.01 ng/nmole. El resultado expresado es la suma de nitrato y nitrito (ng/μL).</p>
Reserva energética				
Triglicéridos	TG	<p>Los triglicéridos (TG) son el componente principal del aceite vegetal, grasa animal, LDL y VLDL, y desempeñan un papel importante como transportadores de ácidos grasos y sirven como fuente de energía. En el ensayo, los TG se convierten en ácidos grasos libres y glicerol. El glicerol se oxida luego para generar un producto que reacciona con la sonda para generar color.</p>	<p>Para la curva de calibración colocar 0, 5, 10, 15, 20 y 25 μL de "Triglyceride (1 mM), se ajustó el volumen a 23 μL con buffer, generando una concentración final nmol/μL. En cada pozo restante de una placa de 96 pozos se colocan 23 μL de muestra y en todos los pozos 2 μL de lipasa y se incuba 2 min a temperatura ambiente, después se adiciona 25 μL de "Reaction mix"</p>	<p>Para calcular la cantidad de triglicéridos por pozo se usa la siguiente formula:</p> $C = B / V * D$ <p>Donde B es la absorbancia de obtenida de la curva de calibración de triglicéridos (nmol), V es el volumen de muestra añadido por pozo (μL) y D el factor de dilución de la muestra. Pero</p>

			<p>("triglyceride assay" 23 μl, "triglyceride probe" 1 μl y "Triglyceride enzyme" 1 μl) y se incuba a temperatura ambiente protegiendo de la luz durante 60 min. Se lee a 570 nm (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo scientific).</p>	<p>en el experimento no se diluyó la muestra por lo que solo se dividió la absorbancia (nmol) entre el volumen de muestra (μL)</p>
--	--	--	--	---