



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**“INSULINA: ¿UN MECANISMO QUE FAVORECE LA PRODUCCIÓN DE  
ORNAMENTOS Y AFECTA LA CONDICIÓN MASCULINA?”**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ELAINE MARIANA MÉNDEZ MUÑIZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

**DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**MORELIA, MICHOACÁN.**

**OCTUBRE, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**“INSULINA: ¿UN MECANISMO QUE FAVORECE LA PRODUCCIÓN DE  
ORNAMENTOS Y AFECTA LA CONDICIÓN MASCULINA?”**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ELAINE MARIANA MÉNDEZ MUÑIZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

**DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**MORELIA, MICHOACÁN.**

**OCTUBRE, 2023**

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
OFICIO: CGEP/CPCB/ENESMO/0676/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **19 de junio de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** de la estudiante **MÉNDEZ MUÑIZ ELAINE MARIANA** con número de cuenta **521014405** con la tesis titulada **"Insulina: ¿Un mecanismo que favorece la producción de ornamentos y afecta la condición masculina?"**, realizada bajo la dirección del **DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON  
Vocal: DRA. INGRID ANNETTE FETTER PRUNEDA  
Vocal: DR. RODRIGO MACIP RÍOS  
Vocal: DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA  
Secretario: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de agosto de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/JHP/EARR/jhp

# Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios profesionales.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que, a través del Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT no. de proyecto: IN225120) nos brindó financiamiento económico para la compra de equipo, reactivos y demás material que hicieron posible la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca estudiantil que recibí durante los 4 semestres de mi maestría (no. apoyo: 791645).

A mi comité tutor conformado por el Dr. Jorge Contreras-Garduño que me recibió en su laboratorio, confió en mí y dirigió este proyecto con gran sabiduría, y, sobre todo, cariño. La Dra. Roxana Torres Avilés quien siempre mostró gran interés hacia este proyecto, realizó observaciones críticas y atinadas y me brindó gran parte de su tiempo para guiarme durante los análisis estadísticos. Y el Dr. Carlos Cordero Macedo quien con sus comentarios y opiniones me ayudó a entender desde una perspectiva más amplia lo referente a este proyecto. Gracias a los tres por su tiempo, con su ejemplo espero ser algún día una investigadora valiosa para la ciencia.

# Agradecimientos a título personal

Agradezco a mis papás Rosita y Dionisio. Ellos me dieron las herramientas para cumplir este sueño, me besaron y arroparon noche tras noche y cuidaron de mí como si fuese lo máspreciado. A mis hermanas Eri y Nay, que me enseñaron lo que es el amor incondicional, me levantaron después de cada tropiezo y me alentaron a cada paso. A mi pequeña Nora, su sonrisa alegra mi corazón y me llena de esperanza, serás grande en todo lo que te propongas. A Francia y Roberto, por las tardes pokemoneras, las noches de monopoly y por el cariño incondicional. Gracias por ayudarme desde que salí de la universidad y por alentarme en cada nuevo proyecto.

A Ernesto, que con su amor y dedicación me inspira a continuar en el mundo de la ciencia. Por estar siempre presente, por acudir a mis seminarios, ensayar mis presentaciones, leer mis escritos y, sobre todo, permitirme ser parte de su vida. Estoy segura de que será un gran investigador.

A la Sra. Lada, por recibirme en su familia y quererme tanto, por las caminatas en el bosque y sus palabras de aliento.

A Monroy, por ser una persona increíble, por creer incondicionalmente en mí, por su cariño y por enseñarme que la familia, a veces la elegimos nosotros.

Agradezco a Sagrario, Heriberto y Vic. A Sagrario por ser mi mentora, me enseñó a hacer los experimentos de conducta, a cuidar de los animales de laboratorio, le agradezco por sus constantes consejos, por su tenacidad y por alentarme siempre. Pero, sobre todo, le agradezco por ser mi mejor amiga. A Heriberto por hacer que la maestría fuera una experiencia muy bonita, por escucharme, por su lealtad y valor; lo admiro y quiero. A Vic por su paciencia y cariño, por todas las tardes compartidas trabajando o disfrutando y por sus consejos. A ustedes por celebrar años nuevos, navidades y cumpleaños juntos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, siempre dispuestos a contribuir con opiniones y consejos enriquecedores. Por mostrarme lo que es un gran equipo.

A los alumnos y amigos del laboratorio que como parte de su servicio social, prácticas profesionales o voluntariado me ayudaron a realizar los experimentos del proyecto, en especial a: Frida, Itzel, Edgar, Vania, Sebastián y Gaby.

A mis sinodales: Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza, Dr. Carlos Rafael Cordero Macedo, Dra. Ingrid Annette Fetter Pruneda, Dra. Robyn Elizabeth Hudson y Dr. Rodrigo Macip Ríos. Gracias por aceptar revisar, comentar y evaluar este proyecto, sus comentarios y conocimiento me ayudaron a ver desde otra perspectiva este trabajo y me animaron a hacerme nuevas preguntas.

Con gran admiración y cariño agradezco a mi tutor, el Dr. Jorge. Él me ha mostrado lo increíble que es la ciencia. Gracias por hacer del laboratorio mi hogar.

A Plutón y Mercurio, mis acompañantes de los últimos 9 años, por las jornadas nocturnas y el amor incondicional.

A Alexandra Elbakyan, gracias a su valentía la ciencia es más libre cada día.

A ustedes, todo mi amor, respeto y agradecimiento.

“La redecilla fue seguida por la lupa; la lupa, por un modesto microscopio, y, con ello, mi destino quedó irremediabilmente sellado. Puesto que el que contempla con sus ojos la belleza, no es ya tributario de la muerte, como dice Platón, sino de la Naturaleza, cuya belleza ha comprendido. Y si sus ojos sirven realmente para ver, llegará a ser, inexcusablemente, naturalista”

K. Lorenz

*Para mis papás con amor*

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| Resumen .....                                      | 1         |
| Abstract .....                                     | 2         |
| <b>1. Introducción .....</b>                       | <b>3</b>  |
| <b>2. Objetivo, Hipótesis y Predicciones .....</b> | <b>13</b> |
| <b>3. Antecedentes.....</b>                        | <b>14</b> |
| <b>4. Metodología .....</b>                        | <b>16</b> |
| Animales.....                                      | 16        |
| Grupos .....                                       | 16        |
| Pruebas de conducta y supervivencia .....          | 18        |
| Análisis estadísticos.....                         | 20        |
| <b>3. Resultados .....</b>                         | <b>21</b> |
| Elección femenina .....                            | 21        |
| Supervivencia .....                                | 21        |
| <b>4. Discusión .....</b>                          | <b>25</b> |
| <b>5. Conclusión .....</b>                         | <b>30</b> |
| <b>6. Referencias bibliográficas.....</b>          | <b>31</b> |
| <b>7. Anexos.....</b>                              | <b>48</b> |
| Pruebas piloto .....                               | 49        |

# Resumen

Los ornamentos son caracteres sexuales secundarios cuya elevada extravagancia aumenta el éxito reproductivo de los portadores porque indican a las posibles parejas la honestidad de la señal. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que mantienen honesta la señal se han estudiado poco en insectos. Por ejemplo, se sabe que la calidad y cantidad de alimento influyen sobre la condición del individuo, y el almacenaje y uso de energía están controlados en parte, por la ruta de la insulina. Además, se ha observado que esta ruta puede favorecer la producción de estructuras exageradas que funcionan como armas y ornamentos. Sin embargo, no se sabe si la insulina favorece la elaboración de ornamentos a expensas de la supervivencia. En este trabajo se respondió esta pregunta utilizando como modelo al escarabajo de la harina *Tenebrio molitor*. Se aplicaron distintas dosis de insulina a machos adultos para saber si eran más atractivos para las hembras a las 0.5, 3 ó 24 horas de su aplicación. No se encontró una regulación dependiente de la dosis y el tiempo de aplicación sobre la elección femenina, de manera interesante los machos respondieron de 3 formas distintas a los tratamientos, esta: disminuyó su atractivo sin afectar su supervivencia, disminuyó la supervivencia sin afectar el atractivo o no afectó ni el atractivo ni la supervivencia. Proponemos que la insulina podría: 1) tener un papel secundario en la regulación de ornamentos, 2) que actúe junto con otra ruta metabólica (por ejemplo, la hormona juvenil) o 3) que influya en etapas previas a la madurez sexual.

# Abstract

Ornaments are secondary sexual characters whose conspicuousness enhance reproductive success because they are honest indicators of condition to potential mates. Nevertheless the mechanism by which these signals are produced and maintained in insects is not clear. For example, it is known that food quality and quantity influence the condition of the individual, and energy storage and use are controlled, in part, by the insulin pathway. In addition, it has been observed that this pathway may favor the production of exaggerated structures that function as weapons and ornaments. However, it is not known whether insulin favors the elaboration of ornaments at the expense of survival. In this work, this question was answered using the flour beetle *Tenebrio molitor* as a model. Different doses of insulin were applied to adult males to see if they become more attractive to females at 0.5, 3 or 24 hours after application. The results suggest that there is no relationship between dose, time of application and ornament production. Interestingly, males responded in 3 different ways to the treatments: decreased attractiveness without affecting survival, decreased survival without affecting attractiveness, or did not affect either attractiveness or survival. We propose that insulin may 1) have a secondary role in ornamental regulation, 2) act in conjunction with another metabolic pathway (e.g., juvenile hormone), or 3) influence stages prior to sexual maturity.

# Introducción

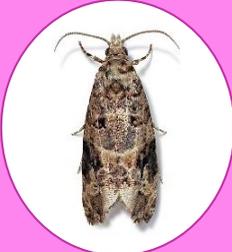
Darwin (1859) observó que los animales poseen características como cantos, aromas, colores, estructuras y comportamientos llamativos, que no pueden ser explicadas por la selección natural. Para él, estos rasgos conspicuos podrían considerarse contraintuitivos porque llaman la atención de depredadores o entorpecen la destreza de los animales que los presentan. Darwin (1859) propuso que los caracteres sexuales secundarios (CSS) aumentaban el éxito reproductivo de los portadores de forma indirecta porque, a diferencia de los caracteres sexuales primarios, estos no forman parte de los órganos reproductivos. Además, describió dos mecanismos por los que evolucionan: 1) competencia por parejas y 2) elección de pareja (Darwin, 1859; 1871). La competencia por parejas (o competencia intraespecífica) favorece la formación de armas que son utilizadas en contiendas ritualizadas o agresivas entre individuos del mismo sexo (McCullough *et al.*, 2016; Andersson, 1994) y ocurre generalmente entre machos (Bateman, 1948; Trivers, 1972). La elección de pareja es ejercida comúnmente por las hembras (Bateman, 1948; Trivers, 1972) y favorece la elaboración de ornamentos y cortejo aumentando el atractivo de los portadores (Rosenthal, 2017). No obstante, se debe destacar que hay evidencia de que las armas y los ornamentos están presentes en ambos sexos (Andersson, 1994; Amudsen, 2000; Edward & Chapman, 2011; Tobias *et al.*, 2012), por lo tanto, también hay elección masculina o elección mutua de pareja (Bounduriansky, 2001; Courtiol *et al.*, 2016; Edward & Chapman, 2011; Hopper & Miller, 2008).

La expresión de los CSS es muy variable y va desde la ausencia de estos rasgos hasta su producción sumamente elaborada (Andersson, 1994). Los CSS son utilizados como señales honestas de la calidad y condición del portador porque su producción y mantenimiento son costosos y disminuyen su supervivencia (Caja 1) (Berglund *et al.*, 1996; McCullough *et al.*, 2016; Zahavi, 1975, 1977). Por ejemplo, la expresión de estos caracteres puede comprometer la resistencia del portador a parásitos y patógenos (Hamilton & Zuk,

Caja 1. Ornamentos y ejemplos en insectos

Los ornamentos son caracteres que actúan como señales biológicas emitidas en la comunicación animal y que se han producido, mantenido o evolucionado por presiones de selección sexual (Zuk, 1991). Su presencia aumenta el éxito reproductivo del portador al hacerlo más atractivo (Darwin, 1979). Una de las razones por las que se ha propuesto que estas señales favorecen la elección de pareja es porque indican a las posibles parejas sobre la calidad del emisor (Zahavi, 1975), de esta forma los individuos que prefieran aparearse con parejas ornamentos extravagantes aumentan su adecuación y reciben más beneficios directos (e. g. parejas con el mejor territorio y más recursos disponibles, regalos nupciales nutritivos, etc.) o indirectos (e. g. mejor cuidado parental, habilidad de construcción de nidos, transmisión de buenos genes a la progenie, etc.).

Estas señales son muy diversas, en insectos se han identificado distintos tipos, a continuación, presentamos algunos ejemplos:

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>Señales visuales</b></p>   | <p>Los machos de libélulas del género <i>Calopteryx</i> desarrollan manchas alares basadas en pigmentos constituidos por melanina. La melanina es un componente de la respuesta inmunitaria importante en el encapsulamiento ante agentes externos. Por lo que estos caracteres son indicadores honestos de la capacidad de respuesta inmunitaria de los portadores (Rantala <i>et al.</i>, 2000).</p>  | <p><b>Señales acústicas</b></p>  <p>Los grillos macho de la especie <i>Gryllus bimaculatus</i> emiten cantos para atraer a las hembras. Las frecuencias a las que son emitidos estos cantos varía acorde a la tasa de encapsulamiento frente a un reto de inmunocompetencia, que está relacionada directamente con la capacidad de los machos de protegerse frente a patógenos. Las hembras al preferir estos rasgos obtienen beneficios indirectos ya que esta capacidad es heredada a su progenie (Rantala <i>et al.</i>, 2003c)</p> |
| <p>La polilla <i>Lobesia botrana</i> presenta selección mutua, las hembras producen feromonas sexuales que indican a los machos sobre su tamaño y capacidad reproductiva: Las hembras más grandes suelen ser preferidas por los machos y tener un mayor tamaño y número de huevos. Además, se sabe que la producción de estas señales es costosa porque la emisión constante de estas disminuye su supervivencia y el número de huevos (Harari <i>et al.</i>, 2011).</p> | <p><b>Señales químicas</b></p>   |  |
|  | <p><b>Regalos nupciales</b></p>  <p>En la especie de mecópteros <i>Panorpa vulgaris</i>, los machos producen secreciones salivares que ofrecen a las hembras. Las hembras ajustan el tiempo de cópula con los machos en función al número de regalos nupciales que ellos les brindan. Además, la producción de estas secreciones son dependientes del estado nutricional del macho y del tamaño de sus glándulas salivares (rasgo que es hereditario-Engels <i>et al.</i>, 2006)</p> |  |

1982), la respuesta inmunitaria (Møller, 1990) y es dependiente de los recursos disponibles en el ambiente asignados al esfuerzo reproductivo (Stearns, 1989; Sheldon & Verhulst, 1996). Por lo tanto, solo aquellos individuos de mejor calidad y condición pueden producir CSS muy elaborados y sobrevivir (Zahavi, 1977).

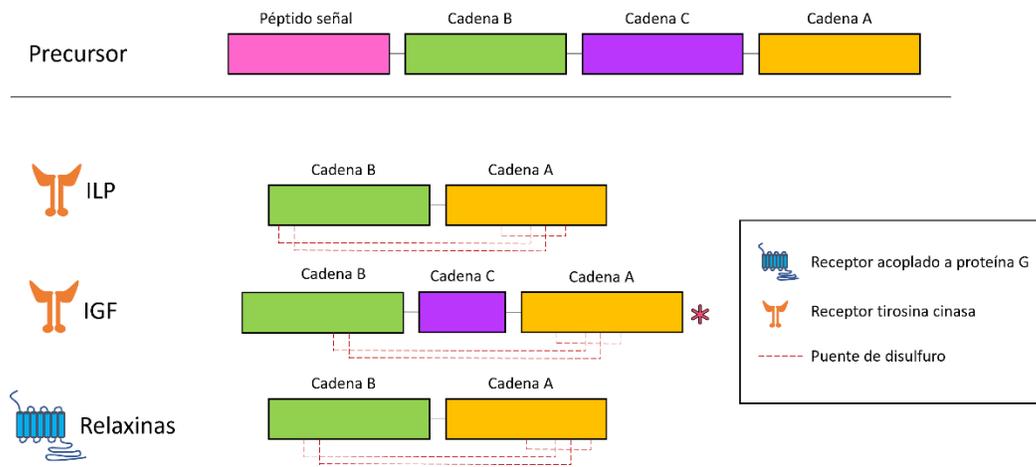
La alimentación ha sido ampliamente estudiada en términos de calidad y cantidad como un factor limitante de la formación de CSS. Por ejemplo, en vertebrados, se ha relacionado positivamente con la producción de cuernos y astas en artiodáctilos (*e. g.* Hoefs & Nowlan, 1997; Festa-Bianchet *et al.*, 2004), la coloración de plumas en aves (Siefferman & Hill, 2005; Velando *et al.*, 2006) y de escamas en peces (Karino *et al.*, 2007). Por otro lado, en invertebrados, se observó que el crecimiento y desarrollo de algunos CSS como cuernos de escarabajos (Emlen, 1997; Emlen & Nijhout, 1999; 2001), feromonas y despliegues de cortejo en *Drosophila melanogaster*, pueden estar regulados por la talla del individuo, que a su vez depende de la dieta (Schultzhaus, *et al.*, 2018). De manera directa, también se observó que la dieta afecta negativamente 1) el tamaño de los cuernos de *Onthophagus acuminatus* (Emlen, 1994; 1997), *Onthophagus taurus* (Moczek, 1998; 1999; Berson & Simmons, 2018), *Allomyrina dichotoma septentrionalis* (Iguchi, 1998; Cotton *et al.*, 2004), 2) la longitud de las madíbulas en *Aegus chelifera* (Songvorawit *et al.*, 2022), 3) ornamentos como los pedúnculos oculares de *Cyrtodiopsis dalmanni* (David *et al.*, 1998), 4) el tiempo de canto de *Gryllus campestris* (Holzer, 2003; Jacot *et al.*, 2007), 5) los perfiles de hidrocarburos de cutícula de las hembras de *Drosophila melanogaster* (Fedina *et al.*, 2012), y 6) el cortejo en *Hygrolycosa rubrofasciata* (Kotiaho, 2000).

Los estudios del efecto de la dieta en la producción de caracteres sexuales secundarios abrieron la puerta al conocimiento de los componentes que regulan estos rasgos, como la proporción de carbohidratos/proteínas (*e. g.* Hunt *et al.*, 2004; Reifer *et al.*, 2018; Duffield *et al.*, 2020) y la investigación sobre los mecanismos fisiológicos reguladores de la producción de armas y ornamentos. Uno de los principales mecanismos propuestos es la ruta de la insulina, que incluye factores de crecimiento insulínico (IGF), insulina y péptidos parecidos a la insulina (ILP's) (Nässel & Broeck, 2016) (Caja 2).

La expresión de los genes reguladores de ILP's es dependiente de la nutrición (Ikeya *et al.*, 2002). El factor de transcripción con dominio *forkhead* tipo O (FOXO) regula la plasticidad del crecimiento de distintos órganos y tejidos mediante su sensibilidad a la nutrición y a la insulina (Tang *et al.*, 2011) y justamente, esta sensibilidad diferencial entre

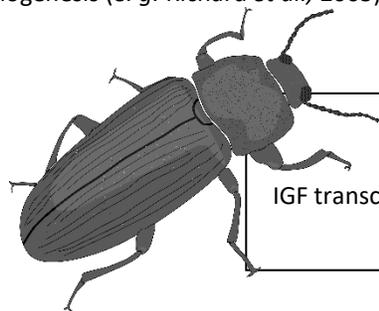
Caja 2. Insulina en vertebrados e insectos

La ruta de la insulina y de los factores de crecimiento insulínicos (IIS), es una ruta evolutivamente bien conservada (Pertseva & Shpakov, 2002) que está presente desde hace 600 millones de años en los precursores de los vertebrados e invertebrados (Ebberink *et al.*, 1989). Hay tres tipos de insulina en insectos que son estructuralmente similares a los de los vertebrados. Las relaxinas y los ortólogos de los péptidos parecidos a la insulina 8 de *D. melanogaster* (DILP-8) que se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y los ILP's acoplados a receptores de tirosina cinasa (Veenstra, 2019).



Compuestos insulínicos en vertebrados y sus receptores. Imagen modificada de Li *et al.*, 2020. Asterisco: Los IGF pueden tener además dominios D y E.

La primera observación de moléculas con actividad similar a la insulina en insectos fue realizada en abejas melíferas por Dixit & Patel en 1964. Posteriormente, Nagasawa en 1986 detalló estas estructuras en *Bombix mori*, por lo que fueron nombradas bombixinas. Ahora, sabemos que los componentes de la superfamilia de la insulina en insectos están involucrados en distintas funciones fisiológicas. Por ejemplo, controlan el crecimiento mediante el aumento del tamaño celular y del número de células (*e. g.* Emlen *et al.*, 2012), regulan la expresión de polifenismos (*e. g.* Fawcett *et al.*, 2018), la ovogénesis y la vitelogénesis (*e. g.* Richard *et al.*, 2005).



En *T. molitor* se han descrito:  
 ILP 1-3 y (veenstra, 2019) 4 con 2 alelos  
 IGF transcriptos *a* y *b* (IGFa-b) (Marciniak *et al.*, 2022; Veenstra, 2019)  
 1 relaxina (Veenstra, 2019)

tejidos ha sido propuesta como la mediadora de la producción de características exageradas como cuernos y mandíbulas (Emlen, 2012). Por ejemplo, la expresión de receptores de insulina es diferencial según el tamaño de los cuernos de *Onthophagus nigriventris* (Lavine *et al.*, 2013). En el escarabajo *Gnatocerus cornutus*, el tamaño de las mandíbulas está relacionado con los niveles de transcripción de ILP (Okada *et al.*, 2019) y se sabe que la ruta de la insulina y la ruta de señalización de la ecdisona intervienen en el crecimiento y desarrollo de los cuernos de *Trypoxylus dichotomus* (Lavine *et al.*, 2019). Por otro lado, la regulación de CHC's en *D. melanogaster* es independiente de FOXO, pero está regulado por la vía de la molécula diana de la rapamicina (mTOR) que es sensible a la nutrición, de manera conjunta con la ruta de la insulina y de los factores de crecimiento insulínicos (IIS) (Kuo *et al.*, 2013). En ambos casos, la señalización de la insulina/IGF circundante en los individuos es dependiente de la condición del portador, y ésta a su vez, regula la tasa de proliferación celular de estructuras exagerados o la transcripción de genes de CHC's. Se ha propuesto que las señales dependientes de la insulina reflejan por si solas la condición del portador (Emlen *et al.*, 2012). Por ello no es necesario que estos CSS confieran una desventaja para ser señales honestas (Emlen *et al.*, 2012).

Esta propuesta ha sido explorada tanto en vertebrados como en invertebrados, pero las conclusiones resultan controversiales. La Tabla 1 recopila las investigaciones en donde se ha puesto a prueba el efecto de la ruta de la insulina/IGF en la producción de CSS tanto en vertebrados como en invertebrados. 16 trabajos se realizaron con vertebrados. De estos, 14 correlacionaron los niveles de insulina/IGF circundante con la producción de astas en la familia Cervidae (ciervos y venados), 1 en Cercopithecidae (macacos) y 1 en Panuridae (aves paseriformes). De estos 16 trabajos, en 2 no se encontró una relación entre los niveles de insulina/IGF y la producción de CSS, en 2 mostraron una relación nula y en 1 se observó una correlación entre los niveles de insulina/IGF y el tamaño de armas en individuos juveniles, pero no en adultos. En invertebrados solo se ha estudiado el efecto de la insulina en la regulación de CSS en insectos. De 10 trabajos, solo en uno se encontró un efecto o relación positiva entre la insulina y la producción de CSS, en el resto, la evidencia mostró un efecto negativo de la insulina/IGF en la producción de estos caracteres. De los 26 trabajos

encontrados en total, solo en 6 se estudiaron caracteres no estructurales, en uno, los niveles de insulina/IGF no explican la coloración ornamental, y en otro se estableció una relación negativa entre los niveles de insulina y el cortejo. En la propuesta de Emlen y colaboradores (2012), se expone que la desventaja de la producción de CSS mediados por la insulina no es necesaria para que estos caracteres sean honestos. Sin embargo, esto no ha sido explorado ampliamente. Solo en un trabajo se midió la supervivencia después de favorecer la producción de CSS mediante la manipulación de la ruta IIS. En general, estos resultados sugieren que la ruta IIS podría ser el mecanismo regulador de CSS en insectos. No obstante, esta propuesta resulta controversial porque también se ha encontrado que puede disminuir la producción de estos caracteres.

Debido a que los ornamentos representan un costo para los individuos que los producen, la decisión de producirlos está afectada por factores externos como la disponibilidad (Bonduriansky, 2001; Cordero Molina *et al.*, en prensa; Gautier *et al.*, 2008) y calidad de posibles parejas (Bonduriansky, 2001, Carazo *et al.*, 2004; Cordero Molina *et al.*, en prensa). En esta especie la producción y liberación de estos componentes volátiles puede ser modificada en periodos cortos de tiempo. Por ejemplo, el perfil de feromonas que liberan las hembras después de haber copulado cambia (temporalmente) después de 2 horas y resultan menos atractivas que las que liberan las hembras de la misma edad y que no han copulado con ningún macho (Griffith *et al.*, 2020), y los machos también modifican los perfiles de feromonas 3 h después de la activación de la respuesta inmunitaria mediante la aplicación de paraquat (un herbicida que induce estrés oxidante - Ruíz-Guzmán *et al.*, 2020) o de la aplicación de metopreno (análogo de HJ- Rantala *et al.*, 2003). Además, hay evidencia que demuestra que los niveles de ILP pueden ser autorregulados por ciclos circadianos de 24 h en insectos (Vafopoulou *et al.*, 2012). Por ello, en este trabajo pusimos a prueba si la producción de feromonas sexuales en *T. molitor* es regulada por 1) la aplicación de insulina (factor interno) y 2) por el momento en el que se presenta un estímulo sexual (factor externo) después de la aplicación de insulina.

Tabla 1. Artículos publicados en donde se pone a prueba la insulina como regulador de producción y mantenimiento de CSS tanto en vertebrados como en invertebrados (1/4).

| Especie   | Etapa   |        | Sexo   |         | Manipulación  | Efecto   | Carácter Sexual Secundario |               | Efecto en supervivencia | Referencia  |
|---|---|--------|--------|---------|---|--|----------------------------|---------------|-------------------------|---|
|   | Larva/Pupa/Joven  | Adulto | Machos | Hembras |   |  | Estructura                 | No estructura |                         |   |
|   |   |        |        |         |   |  |                            |               |                         |   |
| Insectos  |   |        |        |         |   |  |                            |               |                         |   |
| Escarabajo rinoceronte japonés ( <i>Trypoxylus dichotomus</i> ) | Inicio de periodo prepupal  | -      | X      | -       | RNA de interferencia que disminuye la transcripción del gen del receptor de la insulina (InR)                         | Positivo   | Cuernos                    | -             | ¿?                      | Emlen, D. <i>et al.</i> , 2012<br>Science                                 |
| Mosca de la fruta ( <i>Drosophila melanogaster</i> )            | * Se utilizaron datos obtenidos de Kuo <i>et al.</i> , 2012. Y se compararon con medición de CHC' y el atractivo sexual |        |        |         |   | Positivo   | -                          | CHC' s        | ¿?                      | Fedina, T. Y. <i>et al.</i> , 2012<br>PLOS ONE                            |
| Mosca de la fruta ( <i>Drosophila melanogaster</i> )            | X   | X      | -      | X       | Manipulación de niveles de transcripción  | Positivo   | -                          | CHC' s        | ¿?                      | Kuo, T., <i>et al.</i> , 2012<br>PLOS Genetics                            |
| Escarabajo coprófago ( <i>Onthophagus nigriventris</i> )        | Larva (Tercer instar (último)   | X      | X      | X       | Secuenciación y comparación de transcripción de receptor de insulina en machos (cuernos largos y pequeños) y hembras) | Negativo   | Cuernos                    | -             | ¿?                      | Lavine, L. C., <i>et al.</i> , 2013<br>Insect biochemistry and physiology |
| Mosca de la fruta ( <i>Drosophila melanogaster</i> )            | Utilizaron líneas de D. melanogaster genéticamente modificadas  | -      | -      | X       | Comparación entre perfiles de CHC' s, parámetro de fecundidad y atractivo   | Dependiente del tejido. Positivo en células foliculares tardías negativo en cuerpo graso | -                          | CHC' s        | ¿?                      | Fedina, T. Y. <i>et al.</i> , 2017<br>PLOS Genetics                       |
| Escarabajo pelotero cornudo ( <i>Onthophagus Taurus</i> )       | Larva (Tercer instar (último)   | -      | X      | -       | Silenciamiento de genes RNAi InR1, InR2 y Foxo  | Negativo   | Cuernos                    | -             | ¿?                      | Casasa, S. & Moczek A. P., 2018<br>Royal Society of London. Series B      |

Tabla 1. Continuación (2/4)

|   |  |   |                            |                            |                            |   |   |            |         |   |   |
|---|--|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---|---|------------|---------|---|---|
| Escarabajo rinoceronte ( <i>Trypoxylus dichotomus</i> )         | 3er instar larvario (Modificación de la dieta alta y baja calidad) | - | X (medición de parámetros) | X (medición de parámetros) | X (medición de parámetros) | Análisis de secuenciación de RNA. Expresión diferencial en caracteres exagerados vs no exagerados y con distinta dieta. | Regulatorio Expresión diferencial entre caracteres, sexos y calidad de alimento | Cuernos    | -       | ¿?  | Zinna R., et al., 2018. Molecular Ecology                       |
| Escarabajo cornudo de la harina ( <i>Gnathocerus cornutus</i> ) | X  | X | X                          | -                          | -                          | Silenciamiento de genes RNA de transferencia  | Positivo  | Mandíbulas | -       | ¿?  | Okada Y., et al., 2019. PLOS                                    |
| Escarabajo rinoceronte japonés ( <i>Trypoxylus dichotomus</i> ) | X (Tercer instar)  | - | X                          | X                          | -                          | Silenciamiento de genes RNAi (chico, PTEN)  | Positivo  | Cuernos    | -       | SI (El silenciamiento de genes disminuyó la | Lavine, M. D., et al., 2019 Integrative and Comparative Biology |
| Mosca de la fruta ( <i>Drosophila melanogaster</i> )            | X  | X | X                          | -                          | -                          | Mutaciones -> cambio en la expresión ILP2 Alimentación con azúcar-> aumento de niveles de insulina                      | Negativo  | -          | Cortejo | ¿?  | Zhang L., et al., 2022. Science Advances                        |
| <b>Mamíferos</b>  |  |   |                            |                            |                            |   |   |            |         |   |   |
| Ciervo común ( <i>Cervus elaphus</i> )                          | X (ciervos de 2 años)  | - | X                          | -                          | -                          | Medición de IGF-I en plasma durante el crecimiento de cornamenta (regresión)  | Positivo  | Astas      | -       | ¿?  | Suttie, J. M., et al., 1985. Endocrinology                      |
| Ciervo común ( <i>Cervus elaphus</i> )                          | X (ciervos de 2 años)  | - | X                          | -                          | -                          | Impedimento quirúrgico de crecimiento de astas y medición de IGF-I circundante  | Negativo  | Astas      | -       | ¿?  | Suttie, J. M. et al., 1988 Journal of Endocrinology             |
| Ciervo rojo escocés ( <i>Cervus elaphus scoticus</i> )          | X (ciervos de 4 a 15 meses de edad)                                | - | X                          | -                          | -                          | Medición de IGF-I e IGF-II y correlacionarlo con crecimiento de astas   | Positivo  | Astas      | -       | ¿?  | Suttie, J. M. et al., 1989. Journal of Endocrinology            |

**Tabla 1. Continuación (3/4)**

|   |                                      |        |   |   |   |   |  |       |   |    |   |
|---|--------------------------------------|--------|---|---|---|---|--|-------|---|----|---|
| Ciervo común<br>( <i>Cervus elaphus</i> )               | -                                    | X      | X | X | - | Estudios de receptores por autorradiografía   | Positivo (Se encontraron receptores de IGF-I)      | Astas | - | ¿? | Elliott, J. L. et al., 1992. Journal of Endocrinology |
| Ciervo común<br>( <i>Cervus elaphus</i> )               | -                                    | X      | X | X | - | Estudios de receptores por autorradiografía   | Positivo (Se encontraron receptores de IGF-II)     | Astas | - | ¿? | Elliott, J. L. et al., 1993. Journal of Endocrinology |
| Ciervo común<br>( <i>Cervus elaphus</i> )               | X (Ciervos de 17-20 meses)           | -      | X | - | - | Recolección de astas de ciervos muertos durante periodo de crecimiento de astas y medición de la captación de timidina y adición de IGF-I       | Positivo Favorecen la mitogénesis                  | Astas | - | ¿? | Price, J. S. et al., 1994. Journal of Endocrinology   |
| Ciervo común<br>( <i>Cervus elaphus</i> )               | ¿? (Por lo menos en su segunda muda) | ¿?     | X | - | - | Adición de IGF-I y II a cultivos de células no diferenciadas de las cornamentas Cuantificación de mitogénesis mediante la captación de timidina | Positivo Favorecen la mitogénesis                  | Astas | - | ¿? | Sadighi, M. et al., 1994. Journal of Endocrinology y  |
| Ciervo común<br>( <i>Cervus elaphus</i> )               | X (Ciervos de entre 314 y 360 días)  | -      | X | - | - | Cultivo celular y aplicación de IGF y Testosterona  | Positivo (IGF-I estimuló la proliferación celular) | Astas | - | ¿? | Li, C. et al., 1999. Journal of Endocrinology         |
| Gamo común<br>( <i>Dama dama</i> )                      | X (Gamos de aprox. 27 meses)         | -      | X | - | - | Castración y aplicación de antiandrogeno acetato de ciproterona. Medición de astas, andrógenos e IGF-I  | Nula   | Astas | - | ¿? | Bartos, L. et al., 2000. Journal of Endocrinology y   |
| Venado cola blanca<br>( <i>Odocoileus virginianus</i> ) | -                                    | Adulto | X | - | - | Medición de niveles de IGF-I durante la temporada reproductiva  | Positivo   | Astas | - | ¿? | Ditchkoff, S. S., 2001. Comparative Biochemistry      |

**Tabla 1. Continuación (4/4)**

|  |                       |                           |   |   |   |   |                  |                             |    |  |
|--|-----------------------|---------------------------|---|---|---|---|------------------|-----------------------------|----|--|
| Ciervo común<br>( <i>Cervus elaphus</i> )  | X (Ciervos de 2 años) | X (Ciervos de 4 a 9 años) | X | - | Medición de IGF-I   | Nula (en adultos, en juveniles si pero se correlacionó con crecimiento) | Astas            | -                           | ¿? | Bartoš, L. et al., 2009. Bone                      |
| Macaco rhesus<br>( <i>Macaca mulatta</i> ) | -                     | X                         | - | X | Medición de péptido C en orina  | Nula  | -                | Coloración facial           | ¿? | Higham, J. P. et al., 2011. PLOS ONE               |
| Siervo Sika<br>( <i>Cervus nippon</i> )    | ¿?                    | ¿?                        | X | - | Alimentación con distinta composición proteica  | Correlación entre IGF-I, aumento de peso y tamaño de astas              | Astas            | -                           | ¿? | Yang, F. et al., 2012. Science                     |
| Siervo Sika<br>( <i>Cervus nippon</i> )    | No lo menciona        | No lo menciona            | X | - | Medición de niveles de IGF-I en muestras de sangre durante el periodo de crecimiento de los cuernos       | Correlación entre IGF-I, aumento de peso y tamaño de astas              | Astas            | -                           | ¿? | Park, J. et al., 2015. Animal Science.             |
| Siervo Sika<br>( <i>Cervus nippon</i> )    | ¿?                    | ¿?                        | X | - | Análisis de asociación del genoma completo (GWAS) análisis de red de coexpresión génica ponderada (WGCNA) | Positivo: Alta transcripción de genes de IGF-I en cuernos               | Astas            | -                           | ¿? | Hu P. et al., 2022. Animals                        |
| <b>Aves</b>                                |                       |                           |   |   |   |   |                  |                             |    |  |
| Bigotudo<br>( <i>Panurus biarmicus</i> )   | -                     | Adultos                   | X | X | Medición de IGF-1 y componentes del plumaje   | Positivo  | Plumaje (tamaño) | Plumaje (reflectancia a UV) | ¿? | Mahr, K., 2020 Behavioral Ecology and Sociobiology |

# Objetivo

Conocer el papel de la insulina en la producción de feromonas sexuales de *Tenebrio molitor*, y su función en la señalización honesta.

# Hipótesis

Dado que la activación de la ruta de la insulina favorece la producción y mantenimiento de los ornamentos, es posible que sea un mediador del compromiso entre ornamentos y supervivencia de manera dosis dependiente. Y que mantenga honesta su señalización. No obstante, esta disyuntiva depende del momento en el que los machos tienen la posibilidad de cortejar a las hembras.

# Predicciones

- I. La aplicación de insulina en dosis bajas a machos de *T. molitor* 0.5 y 3 horas antes de cortejar a la hembra no afectará la producción de ornamentos ni la supervivencia, no obstante, la aplicación de insulina en dosis media y altas favorecerá la producción de ornamentos a costa de la supervivencia.
- II. La aplicación de insulina en dosis bajas a machos de *T. molitor* 24 horas antes de cortejar a la hembra no afectará la producción de ornamentos ni la supervivencia, no obstante, la aplicación de insulina en dosis medias no afectará la producción de ornamentos, pero disminuirá la supervivencia y finalmente, en la dosis alta favorecerá la producción de ornamentos a costa de la supervivencia.

# Antecedentes

Para dilucidar si la vía de la insulina y el momento en el que se les presenta un estímulo sexual regulan de manera conjunta la producción de feromonas sexuales, se utilizó como modelo al escarabajo cosmopolita *Tenebrio molitor*, esta es una especie holometábola y su ciclo de vida consta de huevo, larvas, pupa y adulto (Ribeiro *et al.*, 2018; Fig. 1). *T. molitor*

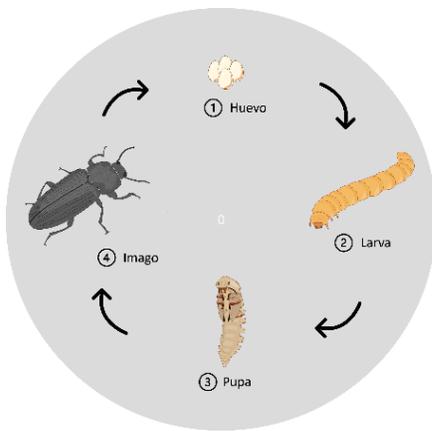


Fig. 1. Ciclo de vida de *T. molitor*.

no presenta dimorfismo sexual aparente, sin embargo, la comunicación química durante el proceso de apareamiento es mediada por feromonas volátiles (Happ, 1969; Rantala *et al.*, 2003b) y por hidrocarburos de cutícula (CHC's), que actúan como feromonas sexuales de contacto especializadas en el reconocimiento y evaluación de la posible pareja (Nielsen & Holman, 2012; Omkar, 2022), por lo tanto, son considerados como feromonas. Tanto hembras como machos alcanzan la madurez sexual

aproximadamente 5 días después de la eclosión (Valentine, 1931) y alcanzan su pico reproductivo aproximadamente a los 12 días de edad (Cole *et al.*, 2003), Las hembras producen 4-metilnonanol (4MNol), feromonas volátiles que atraen a los machos (Tanaka *et al.*, 1986) y les indican acerca de su madurez sexual y estado reproductivo. Por otro lado, los machos producen (Z)-3-dodecenil acetato (Z3-12:Ac-Bryning *et al.*, 2005) para atraer a las hembras. Rantala y colaboradores (2002) demostraron que la cantidad de las feromonas sexuales de los machos indica la condición del sistema inmune y favorece la elección de pareja. A su vez, la expresión de las feromonas sexuales y la respuesta inmunitaria dependen de la nutrición (Rantala, 2003a). La disponibilidad y calidad del alimento es fundamental para las decisiones de asignación de recursos de este compromiso (Krams *et al.*, 2014). Los machos con mala alimentación también son de mala condición y producen

menos feromonas sexuales, por lo que son menos atractivos para las hembras (Rantala *et al.*, 2003a; Krams *et al.*, 2014). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones y ante un reto en donde se activa la respuesta inmunitaria, pueden adoptar la estrategia de inversión terminal y favorecer la reproducción actual a costa de la reproducción futura (Krams *et al.*, 2014). Los machos con inversión terminal son más preferidos por las hembras, pero disminuyen su respuesta inmunitaria (Nielsen & Holman, 2012; Krams *et al.*, 2014) y viven poco (Krams *et al.*, 2015). Esta estrategia depende también del contexto social (*i. e.* disponibilidad de pareja) (Duffield *et al.*, 2017). Debido a que la respuesta inmunitaria y las señales sexuales son costosas la estrategia adoptada dependerá (entre otras cosas) de la intensidad del estímulo que desencadena la activación de la respuesta inmunitaria y la disponibilidad de pareja (Duffield *et al.*, 2017; Cordero-Molina *et al.*, en revisión).

Dado que la dieta es un factor clave en la producción de ornamentos, se planteó poner a prueba la IIS como mecanismo regulador de estos caracteres. Además, se propuso que este mecanismo puede estar influenciado por el tiempo que pasa entre la modificación de los niveles de insulina y el momento en el que se presenta un estímulo sexual. Para conocer el efecto de la insulina sobre la elección femenina de *T. molitor* y su papel en la regulación de los costos de la producción de estos ornamentos, se aplicaron distintas dosis de insulina a machos adultos y se realizaron pruebas conductuales en donde se comparó la preferencia de las hembras hacia ellos, midiendo así, de manera indirecta la producción de ornamentos de estos machos. Por otro lado, se utilizaron 3 distintos tiempos entre la aplicación de la insulina y la prueba de conducta en donde se les presentó una posible pareja. Finalmente, se midió la supervivencia para ver el efecto que tiene la aplicación de los tratamientos y el contexto social en la condición de los machos.

# Metodología

## Animales

Se utilizaron individuos de *T. molitor* del Insectario Maria Sibylla Merian de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Morelia, UNAM. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de salvado de trigo y harina de maíz (MASECA) en una proporción 3:1, previamente esterilizada en autoclave a 120° C durante 15 minutos. Además, se les brindó manzana cada tercer día, y se mantuvieron a temperatura constante de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  en oscuridad (Carazo *et al.*, 2004). Se colectaron y sexaron pupas según la morfología del octavo esternito abdominal (Bhattacharya *et al.*, 1970; Halstead, 1963. Fig. 2). Hembras y machos fueron separados. Diariamente se revisó los recipientes con pupas, en busca de imagos recién emergidos. Estos fueron extraídos y examinados de manera visual para asegurar que tuvieran sus extremidades completas y no presentaran malformaciones. Posteriormente, fueron colocados individualmente en cajas Falcon de 6 ó 2 pozos con alimento esterilizado y les fue suministrada manzana cada tercer día hasta el momento de las pruebas de conducta.

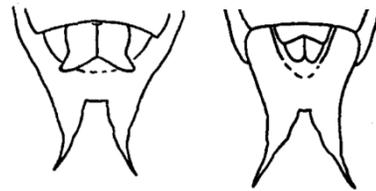


Fig. 2. Vista ventral de los últimos segmentos abdominales de pupas de *T. molitor*, en donde se aprecian los apéndices sexuales de hembras (izquierda) y machos (derecha), tomado de Halstead (1963).

## Grupos

Se realizó un diseño factorial con dos variables. La primera variable correspondió a la dosis aplicada de insulina y tuvo 5 niveles. La segunda variable se definió como el tiempo que pasó entre la aplicación de la insulina y la realización de la prueba de conducta y tuvo 3

niveles. Por lo tanto, se tuvieron 15 tratamientos en total. En cada tratamiento se formó un grupo control y un grupo experimental con una n de entre 30 y 35. Estos grupos los fueron formados con machos adultos de  $11 \pm 1$  días de edad, los cuales fueron examinados para descartar a los que no tenían todas sus extremidades o que presentaban malformaciones. Posteriormente fueron pesados en una balanza analítica y se formaron parejas de machos bajo el criterio de haber emergido el mismo día y tener el peso más cercano (que la diferencia de pesos no fuese mayor a 0.01g). De las parejas formadas, se asignó de manera aleatoria uno al grupo experimental (E) en donde se les aplicó Insulina bovina y el otro a un grupo control (C), en donde se les aplicó HEPES 25mM pH = 8 que es la vía de administración de la Insulina (Xu *et al.*, 2013). Después de formar los grupos, se colocó a los machos C y E en cajas Falcon separadas, se marcó el grupo al que pertenecían en la base de cada caja (sitio no visible) y se mezclaron, la identidad de cada grupo se desconoció hasta la captura de los datos. De esta forma se aseguró que los experimentos fueran realizados con un ciego y disminuyeron las posibilidades de sesgos. Dado que en los machos de ambos grupos se controló el peso, la edad, la crianza y la manipulación, también se garantizó que su condición fuese similar.

Para dilucidar la función de la insulina en la producción de ornamentos y la señalización honesta de la condición, se prepararon cinco soluciones de Insulina Bovina (Número CAS:11070-73-8; Sigma-Aldrich) de 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 mg/ml disueltos en HEPES 25mM con un Ph=8 (Xu *et al.*, 2013). La aplicación fue mediante una inyección de 1  $\mu$ l debajo de la inserción de la pata izquierda del tercer par de manera horizontal para prevenir perforar los órganos del insecto. Se utilizó una microjeringa (Hamilton) para cromatografía de 10  $\mu$ l. Se partió de la aplicación de 1  $\mu$ l de una concentración de 2mg/ml porque esta dosis ha sido utilizada previamente en *Tribolium castaneum* (Xu *et al.*, 2013). Además, en pruebas piloto de este proyecto se observó que la mortalidad de los insectos era muy alta en dosis por encima de 4 mg/ml (S3.), por lo que se decidió utilizar dosis más bajas. Las pruebas de conducta fueron realizadas 30 minutos, 3 horas ó 24 horas después de la aplicación de los reactivos (de manera independiente). Esto, porque se ha observado que hay una respuesta diferencial de la asignación de recursos en los machos al enfrentar un

reto de estrés oxidante si se les presenta la posibilidad de obtener pareja 3 o 24 horas después (Cordero-Molina et al., en revisión). Además, se sabe que la ingesta de azúcares puede conducir a cambios en la conducta sexual de *D. melanogaster* inmediatamente (Zhang, 2022).

## Pruebas de conducta y supervivencia

La arena de elección (Fig. 3) consistió en un contenedor de acrílico transparente (15 × 15 × 7.5 cm) con 2 compartimentos laterales (4.5 × 4.5 × 2.5 cm) (Márquez-García *et al.*, 2016; Morales-Patiño, 2019). La arena de elección fue limpiada antes de cada prueba conductual con alcohol al 70% diluido con agua destilada. En el fondo de la arena se colocó papel filtro previamente esterilizado para permitir que los animales caminaran dentro sin resbalarse. La prueba inició con la introducción de una hembra de elegida al azar de  $12 \pm 1$  día de edad en el compartimento central dentro de un retenedor móvil que limitaba su movilidad. Inmediatamente después se introdujo un macho E y un C de la misma edad dentro de retenedores ubicados en los compartimentos laterales. Se alternó el lado en el que fueron colocados los machos de manera aleatoria, de tal forma que no siempre los machos C o E se encontraron del mismo lado. Cada retenedor contaba con agujeros que limitan el contacto físico entre machos y hembras, pero que permitían el intercambio de componentes volátiles. Posteriormente, se tomaron 5 minutos de habituación con los tres escarabajos dentro de la arena. Al finalizar el tiempo de habituación el compartimento móvil en el que se encontraba la hembra fue retirado, permitiéndole moverse libremente en el compartimento central y los laterales, pero aún sin la posibilidad de tocar a los machos. Inmediatamente se iniciaron observaciones focales a las hembras durante 10

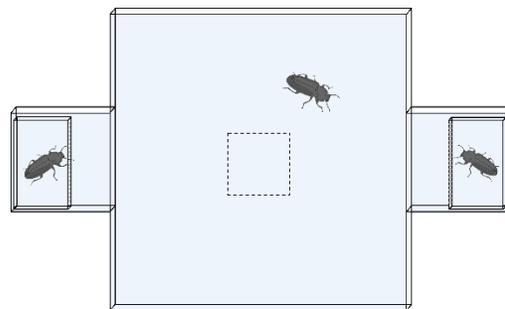


Fig. 3. Arena de elección femenina, la hembra es colocada en la parte central y los machos en los compartimentos laterales. En líneas punteadas se muestra el sitio donde es colocado el retenedor móvil de la hembra utilizado en el tiempo de habituación. Después de los 5 minutos de habituación, la hembra es liberada para que visite a los machos (como se muestra en la imagen).

minutos. Se registraron las visitas que realizó a cada macho anotando el momento de las entradas y salidas de los compartimentos laterales y se obtuvo el tiempo total que pasó con cada uno de los machos (Márquez-García, 2016). Al finalizar el tiempo de observación, los machos fueron devueltos a la caja Falcon multipozos de la que provenían para el registro de supervivencia.

Después de la prueba de conducta, cajas de los machos fueron revisadas diariamente entre las 5 y las 8 pm. Cada macho se inspeccionó de manera visual, y registró a los que iban muriendo, tomando como parámetro que no presentaran movilidad alguna, incluso al presentarles un estímulo (ligeros toques con una pinza). De esta forma, los datos de supervivencia obtenidos se registraron como número de días que vivieron los machos después de la prueba de conducta (Fig. 4).

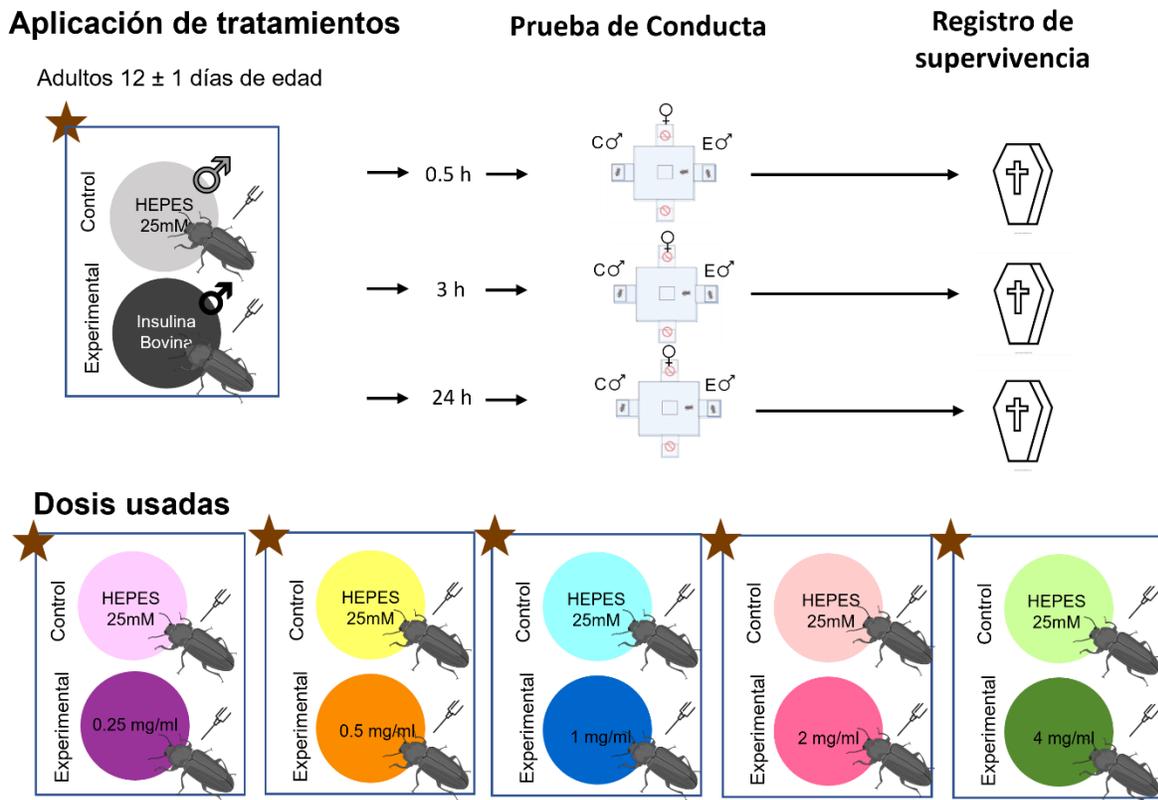


Fig. 4. Diseño experimental. Los machos en edad reproductiva fueron emparejados de acuerdo con su peso corporal. En cada pareja, uno fue asignado al grupo Control y se le administró una solución salina y otro al grupo Experimental y se le aplicó Insulina Bovina en distintas dosis (estrellas rojas). Después de 0.5, 3 o 24 horas se realizaron pruebas de conducta en donde se registró el tiempo que las hembras pasaron con cada macho. Después de la prueba conductual se registró el número de días que los machos vivieron. En cada tratamiento se realizaron entre 30 y 35 ensayos.

## Análisis estadísticos

Se utilizó el programa R Studio versión 4.2.0 (2022-04-22) “Vigorous Calisthenics” para las pruebas estadísticas. Para analizar la preferencia de las hembras, se comparó el tiempo que estas pasaron con cada macho. Para ello, se registró la duración total de las visitas de las hembras a cada macho de los grupos C y E en todos los tratamientos. Se analizaron los tiempos de visita de cada hembra a los machos C y E de cada tratamiento de manera independiente. Por lo que para los datos de cada tratamiento se realizó el análisis del supuesto de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk, dado que la distribución de los datos no cumplió con los criterios de normalidad en ninguno de los tratamientos (S1), se utilizó la prueba no paramétrica de Fligner Killeen para evaluar la homocedasticidad de los grupos de cada tratamiento. Dado que los datos de ningún tratamiento cumplieron ambos criterios de manera conjunta (S1) se realizaron pruebas de Wilcoxon para comparar los datos de los grupos C y E. En caso de que los datos incluyan muchos ceros, el programa R Studio recomienda realizar una corrección de continuidad de los rangos utilizando la función `Wilcox_test`. Dado que no le es posible determinar el valor de p de manera exacta. En esos casos realizamos dicha corrección.

Se comparó el tiempo de supervivencia de los machos de los grupos C y E de cada tratamiento de manera independiente. Se realizaron análisis de supervivencia en donde se calculó el cociente de riesgos instantáneos (HR, por su nombre en inglés, Hazard ratio) mediante el modelo de regresión de Cox, posteriormente se realizó el análisis de riesgos proporcionales. En caso de que estos supuestos se cumplieran se compararon los grupos mediante un análisis de Log Rank en caso contrario se realizó una prueba de Gehan (S2.).

# Resultados

## Elección femenina

Las hembras prefirieron pasar más tiempo con los machos del grupo control que con los machos tratados con 2mg/ml de insulina, aplicados 3 horas antes de la prueba de conducta (Wilcoxon:  $z = 2.74$ ,  $p < 0.01$ ; Fig. 5). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la preferencia, entre los grupos control y el experimental en el resto de las dosis de insulina, ni en los otros tiempos de aplicación (Tabla 2).

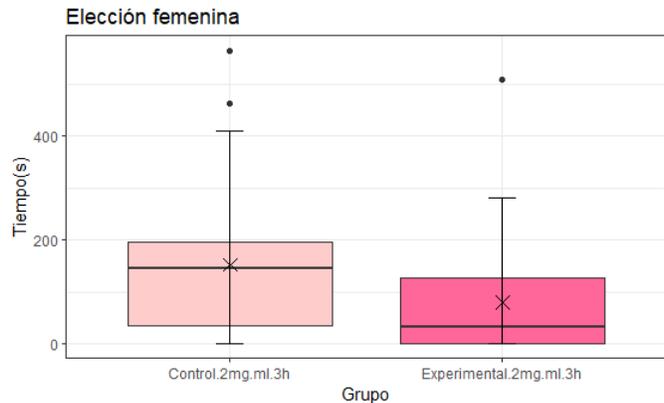


Fig. 5. Preferencia de las hembras medida en segundos que pasó con los machos controles y experimentales tratados con 2mg/ml 3 h antes del experimento. La línea central muestra la mediana de cada grupo, las x representan la media. La preferencia de la hembra fue distinta entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## Supervivencia

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tiempo de supervivencia en la mayoría de las comparaciones entre los machos del grupo control y del grupo experimental (Tabla 2). Los machos del grupo control vivieron más tiempo que los machos experimentales cuando estos últimos fueron tratados con con 0.25 mg/ml por 24h (Hazard ratio=1.81, IC=1.10-2.98; Log Rank: Chi cuadrada=5.5,  $p=0.02$ ), 0.5mg/ml por 0.5h (Hazard ratio=1.56, IC=0.97-2.5; Gehan: Chi cuadrada=8.9,  $p=0.003$ ), 0.5mg/ml por 24h (Hazard ratio=1.46, IC=0.91—2.36; Gehan: Chi cuadrada=5.7,  $p=0.02$ ), 2 mg/ml 24h (Hazard ratio=1.69, IC=1.04-2.77; Gehan: Chi cuadrada=18.1,  $p < 0.01$ ) y 4mg/ml 0.5h (Hazard ratio=

2.7, IC=1.60-4.71; Log rank :Chi cuadrada=13.6,  $p < 0.01$ ) (Fig.5.). En el resto de los tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2.).

| Tabla 2. Comparación entre Grupos Control y Experimentales en parámetros de Elección femenina y Supervivencia |    |                   |                 |                         |              |
|---|----|-------------------|-----------------|-------------------------|--------------|
| Dosis   | N  | Elección femenina |                 | Supervivencia           |              |
|   |    | Estadístico       | p               | Estadístico             | P            |
| 0.25mg/ml 0.5h  | 33 | Z = 1.51          | 0.1295          | Log Rank<br>Chisq=2.5   | 0.1          |
| 0.25mg/ml 3h  | 32 | V= 276            | 0.832           | Log Rank<br>Chisq= 0    | 1            |
| 0.25mg/ml 24h   | 35 | Z = -0.38         | 0.6982          | Log Rank<br>Chisq=5.5   | <b>0.02</b>  |
| 0.5mg/ml 0.5h   | 36 | V = 349           | 0.8099          | Gehan<br>Chisq=8.9      | <b>0.003</b> |
| 0.5mg/ml 3h   | 35 | Z = -1.76         | 0.07696         | Log Rank<br>Chisq=2.2   | 0.1          |
| 0.5mg/ml 24h  | 35 | Z = 1.05          | 0.2898          | Gehan<br>Chisq= 5.7     | <b>0.02</b>  |
| 1mg/ml 0.5h   | 34 | Z = -1.33         | 0.1812          | Log Rank<br>Chsq= 2.8   | 0.09         |
| 1mg/ml 3h   | 33 | Z = -1.72         | 0.08412         | Log Rank<br>Chisq=0.1   | 0.8          |
| 1mg/ml 24h  | 32 | Z = -0.63         | 0.5269          | Log Rank<br>Chisq=0.5   | 0.5          |
| 2mg/ml 0.5h   | 33 | Z = -0.48         | 0.6281          | Log Rank<br>Chisq=0.1   | 0.7          |
| 2mg/ml 3h   | 33 | Z = 2.74          | <b>0.0061**</b> | Log Rank<br>Chisq=0.1   | 0.7          |
| 2mg/ml 24h  | 35 | Z = 1.43          | 0.1504          | Gehan<br>Chisq= 18.1    | <b>2e-05</b> |
| 4mg/ml 0.5h   | 33 | Z = -1.32         | 0.1861          | Log Rank<br>Chisq= 13.6 | <b>2e-04</b> |
| 4mg/ml 3h   | 35 | Z = -0.27         | 0.7855          | Gehan<br>Chisq= 2.7     | 0.1          |
| 4mg/ml 24h  | 34 | V = 316           | 0.7613          | Log Rank<br>Chisq=0     | 1            |

Notas: La comparación entre los grupos de elección y supervivencia se realizó con la prueba de Wilcoxon, excepto cuando se cumplieron los criterios de normalidad y homocedasticidad (★). El estadístico presentado es Z cuando se realizó la corrección del programa con Wilcox\_test, es V cuando se realizó de manera normal.

La decisión de inversión de recursos en *T. molitor* para atraer pareja fue dinámica al manipular sus niveles de insulina (Tabla 3.). Por un lado, se observó que en el tratamiento en donde se les aplicó 2 mg/ml 3 h antes de la prueba conductual los machos experimentales fueron menos atractivos pero vivieron lo mismo que los machos control.

Por otro lado, la aplicación de insulina disminuyó la supervivencia sin afectar en atractivo en 5 tratamientos (Fig 6.). Finalmente, en el resto de los tratamientos no tuvo un efecto estadísticamente significativo.

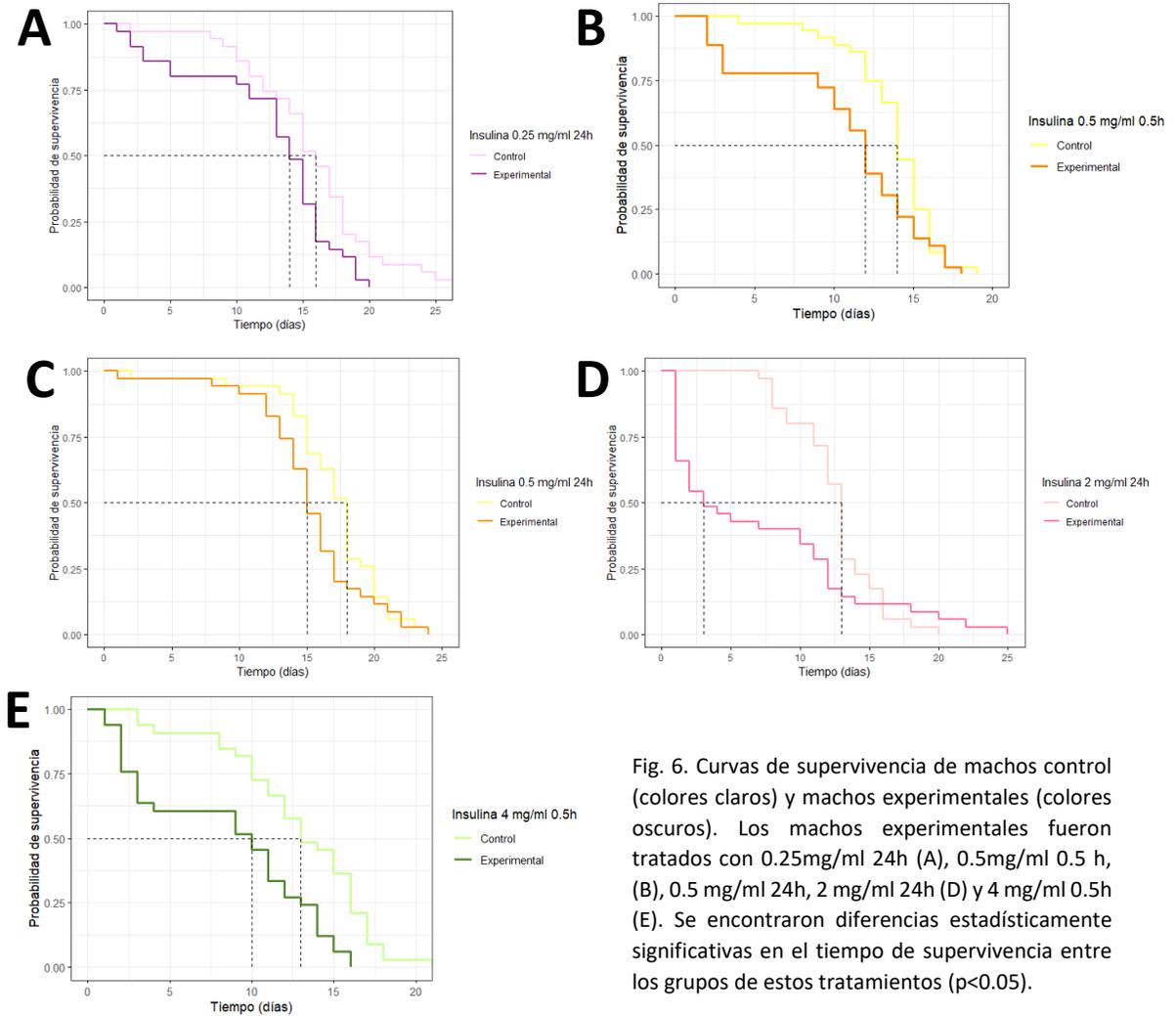


Fig. 6. Curvas de supervivencia de machos control (colores claros) y machos experimentales (colores oscuros). Los machos experimentales fueron tratados con 0.25mg/ml 24h (A), 0.5mg/ml 0.5 h, (B), 0.5 mg/ml 24h, 2 mg/ml 24h (D) y 4 mg/ml 0.5h (E). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de supervivencia entre los grupos de estos tratamientos ( $p < 0.05$ ).

| Tabla 3. Efecto de la insulina en los machos tratados |   |   |   |
|---|---|---|---|
| Dosis/Tiempo  | 0.5h  | 3h  | 24h   |
| 0.25mg/ml   | -   | -   | Disminuye la supervivencia sin afectar el atractivo |
| 0.5mg/ml  | Disminuye la supervivencia sin afectar el atractivo | -   | Disminuye la supervivencia sin afectar el atractivo |
| 1mg/ml  | -   | -   | -   |
| 2mg/ml  | -   | Disminuye el atractivo sin afectar la supervivencia | Disminuye la supervivencia sin afectar el atractivo |
| 4mg/ml  | Disminuye la supervivencia sin afectar el atractivo | -   | -   |

# Discusión

No se encontró evidencia estadísticamente significativa de que la insulina favorezca la producción de feromonas volátiles en machos de *T. molitor*. De manera interesante, los resultados sugieren que la insulina disminuye la supervivencia, y, dependiendo de la dosis y el tiempo que transcurre en su aplicación y el encuentro con las posibles parejas, induce la estrategia de inversión terminal o disminuye la producción de ornamentos y se convierte en una señal honesta para las hembras.

Se ha propuesto que la ruta de la insulina/IGF regula el desarrollo de armas (Emlen *et al.*, 2012; Lavine *et al.*, 2013; Casasa & Moczek, 2018; Okada *et al.*, 2019) y de ornamentos (Kuo *et al.*, 2012; Fedina *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022) en invertebrados. La IIS tal vez regula la producción de estos caracteres mediante la proliferación y aumento del tamaño celular en cuernos y mandíbulas de coleópteros (Emlen *et al.*, 2012), la transcripción de los genes involucrados en la producción de CHC's (Kuo *et al.*, 2012), o la excitación o inhibición de las neuronas P1 en *Drosophila* involucradas en el cortejo (Zhang *et al.*, 2022). Aunque no se encontró un efecto contundente en la regulación de ornamentos en *T. molitor*, aún no es posible descartar su papel como mediador en esta especie porque es necesario manipular los niveles de insulina circundante en periodos previos a los picos reproductivos y/o durante periodos más largos que los previstos en este trabajo. Por ejemplo, Rantala y colaboradores (2003a) encontraron que la manipulación en la alimentación de machos de 6 días de edad durante 7 días los hizo menos atractivos. Krams y colaboradores (2015) modificaron la dieta durante 3 días y también observaron una reducción en su atractivo. Kuo y colaboradores (2012) utilizaron líneas de *D. melanogaster* genéticamente modificadas para transcribir de manera diferencial los sustratos de los receptores insulínicos, y encontraron que la producción de CHC's se veía modificada entre cepas. Por ello se propone que en futuros trabajos se explore el efecto de la manipulación de los perfiles insulínicos en feromonas sexuales a largo plazo. Por ejemplo, desde pupa, larva o imagos sexualmente inmaduros.

Por otro lado, Kuo y colaboradores (2012) propusieron que los caracteres dependientes de la insulina son honestos *per se*, y que para poder mentir sobre la condición, estos individuos deberían modificar la IIS, lo cual reduciría su adecuación. Por esto, sugieren que la producción de caracteres regulados por la insulina no implica costos asociados. Sin embargo, en este trabajo se observó que el aumento de los niveles circundantes de ILP puede disminuir la supervivencia. Esto sugiere que el aumento de los niveles de insulina implica un costo. La expresión de la IIS regula la fecundidad (*e. g.* Zhang *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020) y el atractivo (*i.e.* Kuo *et al.*, 2012). En este estudio se observó que la aplicación de insulina disminuyó la longevidad y que la producción de los ornamentos parece ser costosa en términos energéticos. Es necesario considerar que en los trabajos en donde se ha puesto a prueba a la insulina como regulador de CSS (Tabla 1), solo en uno se ha visto su efecto en la longevidad y contrasta con nuestros resultados porque el silenciamiento de genes involucrados en la síntesis del sustrato de receptores insulínicos disminuyó la supervivencia (Lavine *et al.*, 2019). Es importante que trabajos posteriores registren 1) el efecto de la insulina en los ornamentos al ser manipulada en larvas, pupas o imagos sexualmente inmaduros 2) el costo energético de la producción de ornamentos y 3) el efecto en la supervivencia. Hasta entonces, no es posible descartar a la insulina como un candidato adecuado para la regulación del compromiso entre producción de ornamentos y supervivencia mediante la asignación de recursos.

Los resultados de esta investigación sugieren que la aplicación de insulina puede inducir la estrategia de inversión terminal porque, aunque reduce la supervivencia de los machos, no afecta su atractivo respecto a los machos control. La Inversión terminal está definida como el aumento en esfuerzo reproductivo cuando la probabilidad del éxito reproductivo futuro (valor reproductivo residual) disminuye (Williams, 1966; Clutton-Brock, 1984). Esta estrategia es dinámica y dependiente de varios factores (Duffield *et al.*, 2017; 2018), por ejemplo, la senescencia (Duffield *et al.*, 2017). Aunque al envejecer, los organismos reducen su valor reproductivo residual, al realizar inversión terminal, asignan más recursos a la reproducción actual dado que la inversión futura es incierta (Clutton-Brock, 1984). Otros factores desencadenantes de inversión terminal son la activación de la

respuesta inmunitaria (e. g. Giehr *et al.*, 2017; Krams *et al.*, 2011), y la dieta (e. g. Hudson *et al.*, 2020; Krams *et al.*, 2015). De manera interesante, en *T. molitor* se ha encontrado que los machos a los que se les activa la respuesta inmunitaria mediante implantes de nylon (Sadd *et al.*, 2006; Krams *et al.*, 2011; 2015; Kivleniece *et al.*, 2010) y con exposición a lipopolisacáridos (Nielsen & Holman, 2012), invierten más recursos en la producción de feromonas glandulares y CHC's, y son más atractivos para las hembras que los machos control. Los machos que optan por la estrategia de inversión terminal viven menos que los machos a los que no se les activa la respuesta inmunitaria (Krams *et al.*, 2015; Kivleniece *et al.*, 2010) y aumentan su tasa metabólica en reposo (Krams *et al.*, 2014). Esto sugiere que los recursos se destinan a la producción de CSS a expensas del mantenimiento y supervivencia, y se ha observado que esta estrategia puede depender de la cantidad de alimento disponible (Krams *et al.*, 2015). En estos trabajos se ha considerado como inversión terminal la disminución de la supervivencia y el aumento del atractivo. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que no solo el aumento del esfuerzo reproductivo, sino también una compensación en este debe ser considerado como inversión terminal. En este escenario, la producción de señales sexuales compensadas no es honesta porque son producidas por machos que están a punto de morir (Individuos con un valor reproductivo residual disminuido que mantienen el mismo esfuerzo reproductivo que los machos con un valor reproductivo residual más alto).

Es importante tomar en consideración que, aunque en especies como *Bombyx mori* (Gu *et al.*, 2009) y *Tribolium castaneum* (Xu *et al.*, 2011) la aplicación de insulina bovina puede activar respuestas análogas a ILP's, no se tiene la certeza de que su aplicación desencadene una respuesta análoga de todos los ILP's en *T. molitor*. Se propone que en trabajos futuros se aborde esto con más detalle mediante la medición de niveles de ILP's después de la aplicación de tratamientos para conocer si su aplicación modifica los perfiles de insulina en la hemolinfa. También es posible la aplicación de inhibidores de ILP's para contrastar las observaciones realizadas con análogos. Bajo nuestra hipótesis esperaríamos que la aplicación de inhibidores disminuyera el atractivo de los machos al disminuir la producción de feromonas sexuales. Otra alternativa que consideramos adecuada es utilizar agonistas y

antagonistas colinérgicos cuya aplicación en larvas de *T. molitor* ya ha sido probada y se ha observado que afecta los niveles de ILP's en hemolinfa a las 2 horas (Acetilcolina aumenta los niveles de ILP y escopolamina los disminuye) (Chowanski et al., 2019). No obstante, en este trabajo se presenta una aproximación general de cómo podría estar funcionando este mecanismo.

De manera paralela a la propuesta de Insulina como mecanismo mediador de la producción de CSS, hay propuestas alternativas en vertebrados. Folstad & Karter (1992) propusieron la hipótesis de la Inmunocompetencia (“Immunocompetence Handicap Hypothesis”). Esta hipótesis explica que la producción de las señales sexuales se encuentra bajo el control endócrino. La testosterona actúa como una espada de doble filo; por un lado, favorece la producción de CSS y disminuye la respuesta inmunitaria (Folstad & Karter, 1992). Esta propuesta es ampliamente aceptada (Foo et al., 2016). Sin embargo, los invertebrados no producen testosterona, en su lugar se ha sugerido que la Hormona Juvenil (HJ) es la responsable de la modulación del compromiso entre CSS y supervivencia (Rantala et al., 2003b; Contreras-Garduño et al., 2009). La aplicación de análogos de HJ puede favorecer atributos utilizados en las contiendas entre machos, como la agresión en libélulas del género *Calopteryx* (Contreras-Garduño et al., 2009), el tamaño de estructuras exageradas como los pedúnculos oculares de los machos del díptero *Cyrtodiopsis dalmanni* (Fry, 2006) y las mandíbulas de *Gnatocerus cornutus* (Okada et al., 2012) y *Cyclommatus metallifer* (Gotoh et al., 2011). También favorecen ornamentos como la biosíntesis de feromonas sexuales en los escarabajos *Tenebrio molitor* (Rantala et al., 2003b; Márquez-García et al., 2016) e *Ips pini* (Keeling et al., 2006) y la pigmentación alar de libélulas del género *Calopteryx* (Contreras-Garduño et al., 2011). Aunado a esto, su aplicación disminuye el tamaño testicular y la producción de espermatozoides (Fry, 2006, Márquez-García et al., 2016). Además, reduce la actividad de la fenoloxidasa (Rantala et al., 2003a,b; Contreras-Garduño et al., 2009), expone a los machos a estrés oxidante (Martínez-Lendech et al., 2019) y consume las reservas energéticas (Contreras-Garduño et al., 2011). Esto sugiere que la HJ mantiene honesta la señal porque favorece la elaboración de ornamentos a expensas de la supervivencia. Por lo que es posible que la vía de la señalización de manera

independiente o en conjunto con la responsable de la regulación del compromiso entre supervivencia y elaboración de CSS en insectos. Para contestar esta interrogante, se propone la realización de futuros estudios concentrados en la manipulación de ambas rutas de manera simultánea para observar sus efectos en el atractivo, la producción de ornamentos, y los costos asociados. Dado que los ornamentos co-evolucionan con rasgos compensatorios y estos pueden enmascarar los costos, es importante, medir estos costos en más de un parámetro de condición (Husak & Swallow, 2011) como supervivencia, respuesta inmunitaria y estrés oxidante.

# Conclusión

Conocer los mecanismos de producción y mantenimiento de los CSS en insectos permitirá comprender estos rasgos a nivel evolutivo, fisiológico y funcional. Para ello es necesario poner a prueba de manera experimental los posibles mecanismos que los producen. En este trabajo no encontramos evidencia que sugiera que la insulina es un regulador dosis dependiente de la producción de ornamentos en *T. molitor*. Sin embargo, observamos que su aplicación puede disminuir la producción de estos caracteres e inducir la respuesta de inversión terminal. Por lo que no podemos descartar su papel como mecanismo regulador. Para poder comprender si la IIS tiene un papel importante en la producción y mantenimiento de los ornamentos proponemos explorar de manera más amplia este mecanismo en otras etapas de vida y en interacción con la ruta de la HJ, un factor regulador de CSS que interactúa con la IIS.

# Referencias bibliográficas

Amundsen, T. (2000). Why are female birds ornamented? *Trends in Ecology & Evolution*, 15(4), 149-155. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01800-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01800-5)

Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, University Press.

Bartos, L., Schams, D., Kierdorf, U., Fischer, K., Bubenik, G. A., Siler, J., Losos, S., Tománek, M., & Lastovkova, J. (2000). Cyproterone acetate reduced antler growth in surgically castrated fallow deer. *Journal of endocrinology*, 164(1), 87-96. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1640087>

Bartoš, L., Schams, D., & Bubenik, G. A. (2009). Testosterone, but not IGF-1, LH, prolactin or cortisol, may serve as antler-stimulating hormone in red deer stags (*Cervus elaphus*). *Bone*, 44(4), 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.12.004>

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2(3), 349-368.

Berglund, A., Bisazza, A., & Pilastro A. (1996). Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility, *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(4), 385–399. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1996.tb01442.x>

Berson, J. D., & Simmons, L. W. (2018). A costly chemical trait: phenotypic condition dependence of cuticular hydrocarbons in a dung beetle. *Journal of evolutionary biology*, 31(12), 1772-1781. <https://doi.org/10.1111/jeb.13371>

Bhattacharya, A. K., Ameel, J. J., & Waldbauer, G. P. (1970). A method for sexing living pupal and adult yellow mealworms. *Annals of Entomological Society of America*, 63(6), 1783-1873. <https://doi.org/10.1093/aesa/63.6.1783>

- Bonduriansky, R. (2001). The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, 76(3), 305-339. <https://doi.org/10.1017/S1464793101005693>
- 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, 2721–2730. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-7622-x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.10.014>
- Casasa, S., & Moczek, A. P. (2018). Insulin signalling's role in mediating tissue-specific nutritional plasticity and robustness in the horn-polyphenic beetle *Onthophagus taurus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1893), 20181631. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1631>
- Chen, N. M., Borden, J. H., & Pierce, H. D. (1988). Effect of juvenile hormone analog, fenoxycarb, on pheromone production by *Ips paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of chemical ecology*, 14, 1087-1098. <https://doi.org/10.1007/BF01019337>
- Chowański, S., Pacholska-Bogalska, J., & Rosiński, G. (2018). Cholinergic agonists and antagonists have an effect on the metabolism of the beetle *Tenebrio molitor*. *Molecules*, 24(1), 17. <https://doi.org/10.3390/molecules24010017>
- Clutton-Brock T. H. (1984) Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *The American Naturalist*. Nat 123 (2), 212–2. <https://doi.org/10.1086/284198>
- Cole, T. J., Eggleston, P., & Hurd, H. (2003). Juvenile hormone titre and egg production in *Tenebrio molitor* infected by *Hymenolepis diminuta*: effect of male and/or female infection, male age and mating. *Journal of Insect Physiology*, 49(6), 583-590. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00030-1)
- Contreras-Garduño, J., Córdoba-Aguilar, A., Lanz-Mendoza, H. & Cordero Rivera, A. (2009). Territorial behaviour and immunity are mediated by juvenile hormone: the physiological

- basis of honest signalling? *Functional Ecology*, 23, 157–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01485.x>
- Contreras-Garduño, J., Córdoba-Aguilar, A., Azpilcueta-Amorín, M. & Cordero-Rivera, A. (2011). Juvenile hormone favors sexually-selected traits but impairs fat reserves and abdomen mass in males and females. *Evolutionary Ecology*, 25, 845-856. <https://doi.org/10.1007/s10682-010-9438-6>
- Cotton, S., Fowler, K., & Pomiankowski, A. (2004). Condition dependence of sexual ornament size and variation in the stalk-eyed fly *Cyrtodiopsis dalmanni* (Diptera: Diopsidae). *Evolution*, 58(5), 1038-1046. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00437.x>
- Courtiol, A., Etienne, L., Feron, R., Godelle, B., & Rousset, F. (2016). The evolution of mutual mate choice under direct benefits. *The American Naturalist*, 188(5), 521-538. <https://doi.org/10.1086/688658>
- Darwin, C. (1859). On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life. London: *John Murray*.
- Darwin, C. (1871). The descent of man, and selection in relation to sex. London: *John Murray*.
- David, P., Hingle, A., Greig, D., Rutherford, A., Pomiankowski, A., & Fowler, K. (1998). Male sexual ornament size but not asymmetry reflects condition in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1411), 2211-2216. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0561>
- Ditchkoff, S. S., Spicer, L. J., Masters, R. E., & Lochmiller, R. L. (2001). Concentrations of insulin-like growth factor-I in adult male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): associations with serum testosterone, morphometrics and age during and after the breeding season. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129(4), 887-895. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00351-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00351-8)

- Dixit, P. K., & Patel, N. G. (1964). Insulin-like activity in larval foods of the honeybee. *Nature*, 202 (4928); 189-190. <https://doi.org/10.1038/202189a0>
- Duffield, K. R., Bowers, E. K., Sakaluk, S. K., & Sadd, B. M. (2017). A dynamic threshold model for terminal investment. *Behavioral ecology and sociobiology*, 71(12), 185. <https://doi.org/10.1007/s00265-017-2416-z>
- Duffield, K. R., Hampton, K. J., Houslay, T. M., Hunt, J., Rapkin, J., Sakaluk, S. K., & Sadd, B. M. (2018). Age-dependent variation in the terminal investment threshold in male crickets. *Evolution*, 72(3), 578-589. <https://doi.org/10.1111/evo.13443>
- Duffield, K. R., Hampton, K. J., Houslay, T. M., Rapkin, J., Hunt, J., Sadd, B. M., & Sakaluk, S. K. (2020). Macronutrient intake and simulated infection threat independently affect life history traits of male decorated crickets. *Ecology and Evolution*, 10(20), 11766-11778. <https://doi.org/10.1002/ece3.6813>
- Ebberink, R. H. M., Smit, A. B., & Van Minnen, J. (1989). The insulin family: evolution of structure and function in vertebrates and invertebrates. *The Biological Bulletin*, 177(2), 176-182. <https://doi.org/10.2307/1541928>
- Edward, D. A., & Chapman, T. (2011). The evolution and significance of male mate choice. *Trends in ecology & evolution*, 26(12), 647-654. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.07.012>
- Elliott, J. L., Oldham, J. M., Ambler, G. R., Bass, J. J., Spencer, G. S., Hodgkinson, S. C., Breier, B. H., Gluckman, P. D. & Suttie, J. M. (1992). Presence of insulin-like growth factor-I receptors and absence of growth hormone receptors in the antler tip. *Endocrinology*, 130(5), 2513-2520. <https://doi.org/10.1210/endo.130.5.1315246>
- Elliott, J. L., Oldham, J. M., Ambler, G. R., Molan, P. C., Spencer, G. S. G., Hodgkinson, S. C., Breier, B. H., Gluckman, P. D., Suttie, J. M. & Bass, J. J. (1993). Receptors for insulin-like growth factor-II in the growing tip of the deer antler. *Journal of endocrinology*, 138(2), 233-NP. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1380233>

- Emlen, D. J. (1994). Environmental control of horn length dimorphism in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 256(1346), 131-136. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0060>
- Emlen, D. J. (1997). Diet alters male horn allometry in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1381), 567-574. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0081>
- Emlen, D. J., & Nijhout, H. F. (1999). Hormonal control of male horn length dimorphism in the dung beetle *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology* 45(1), 45-53. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00096-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00096-1)
- Emlen, D. J., & Nijhout, H. F. (2001). Hormonal control of male horn length dimorphism in *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae): a second critical period of sensitivity to juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology*, 47(9), 1045-1054. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00084-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00084-1)
- Emlen, D. J., Warren, I. A., Johns, A., Dworkin I., & Lavine, L. C. (2012). A Mechanism of Extreme Growth and Reliable Signaling in Sexually. *Science*, 337; 860-864. <https://doi.org/10.1126/science.1224286>
- Engels, S., & Sauer, K. P. (2006). Resource-dependent nuptial feeding in *Panorpa vulgaris*: an honest signal for male quality. *Behavioral Ecology*, 17(4), 628-632. <https://doi.org/10.1093/beheco/ark007>
- Fawcett M.M., Parks M. C., Tibbetts A. E., Swart J. S., Richards E. M., Vanegas J. C., Cenzer M., Crowley L, Simmons W. R., Hou W. S., Angelini D. R. (2018) Manipulation of insulin signaling phenocopies evolution of a host-associated polyphenism. *Nature Communications*. 9(1):1699. doi: 10.1038/s41467-018-04102-1
- Fedina, T. Y., Kuo, T. H., Dreisewerd, K., Dierick, H. A., Yew, J. Y., & Pletcher, S. D. (2012). Dietary effects on cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila*. *PLoS one*, 7(12), e49799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049799>

- Fedina, T. Y., Arbuthnott, D., Rundle, H. D., Promislow, D. E., & Pletcher, S. D. (2017). Tissue-specific insulin signaling mediates female sexual attractiveness. *PLoS Genetics*, 13(8), e1006935. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006935>
- Festa-Bianchet, M., Coltman, D. W., Turelli, L., & Jorgenson, J. T. (2004). Relative allocation to horn and body growth in bighorn rams varies with resource availability. *Behavioral Ecology*, 15(2), 305-312. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh014>
- Fisher, I., *The Theory of Interest*, New York: Macmillan, 1930.
- Folstad, I, Karter, A. J. (1992). Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *The American Naturalist*, 139(3), 603–622. <https://doi.org/10.1086/285346>
- Foo, Y. Z., Nakagawa, S., Rhodes, G., & Simmons, L. W. (2016). The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biological Reviews*, 92(1), 551-571. <https://doi.org/10.1111/brv.12243>
- Fry, C. L. 2006. Juvenile hormone mediates a trade-off between primary and secondary sexual traits in stalk-eyed flies. *Evolution & Development*, 8(2), 191-201. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.00089.x>
- Gautier, P., Barroca, M., Bertrand, S., Eraud, C., Gaillard, M., Hamman, M., Motreuil S., Sorci, G. & Faivre, B. (2008). The presence of females modulates the expression of a carotenoid-based sexual signal. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 1159-1166. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0544-1>
- Giehr, J., Grasse, A. V., Cremer, S., Heinze, J., & Schrempf, A. (2017). Ant queens increase their reproductive efforts after pathogen infection. *Royal Society open science*, 4(7), 170547. <https://doi.org/10.1098/rsos.170547>
- Gotoh, H., Cornette, R., Koshikawa, S., Okada, Y., Lavine, L. C., Emlen, D. J., & Miura, T. (2011). Juvenile Hormone Regulates Extreme Mandible Growth in Male Stag Beetles. *PLoS ONE*, 6(6), e21139. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0021139>

- Griffith, O. L., Vakili, R., Currie, R. W., & Vanderwel, D. (2020). The effect of mating on the sex pheromone system of the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 86, 101572. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101572>
- Gu, S. H., Lin, J. L., Lin, P. L., & Chen, C. H. (2009). Insulin stimulates ecdysteroidogenesis by prothoracic glands in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(3), 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.012>
- Halstead, D. G. H. (1963). External sex differences in stored-products Coleoptera. *Bulletin of Entomological Research*, 54(1), 119-134. <https://doi.org/10.1017/S0007485300048665>
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, 218(4570), 384-387. <https://doi.org/10.1126/science.7123238>
- Happ, G.M. (1969). Multiple sex pheromones of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. *Nature*, 222(5189), 180-181. <https://doi.org/10.1038/222180a0>
- Harari, A. R., Zahavi, T., & Thiéry, D. (2011). Fitness cost of pheromone production in signaling female moths. *Evolution*, 65(6), 1572-1582. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01252.x>
- Higham, J. P., Girard-Buttoz, C., Engelhardt, A., & Heistermann, M. (2011). Urinary C-peptide of insulin as a non-invasive marker of nutritional status: some practicalities. *PLoS One*, 6(7), e22398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022398>
- Hoefs, M., & Nowlan, U. (1997). Comparison of horn growth in captive and free-ranging Dall's rams. *The Journal of wildlife management*, 1154-1160. <https://doi.org/10.2307/3802113>
- Holzer, B., Jacot, A., & Brinkhof, M. W. (2003). Condition-dependent signaling affects male sexual attractiveness in field crickets, *Gryllus campestris*. *Behavioral Ecology*, 14(3), 353-359. <https://doi.org/10.1093/beheco/14.3.353>

- Hooper, P. L., & Miller, G. F. (2008). Mutual mate choice can drive costly signaling even under perfect monogamy. *Adaptive Behavior*, 16(1), 53-70. <https://doi.org/10.1177/1059712307087283>
- Hu, P., Wang, Z., Li, J., Wang, D., Wang, Y., Zhao, Q., & Li, C. (2022). IGF1R and LOX Modules Are Related to Antler Growth Rate Revealed by Integrated Analyses of Genomics and Transcriptomics. *Animals*, 12(12), 1522. <https://doi.org/10.3390/ani12121522>
- Hudson, A. L., Moatt, J. P., & Vale, P. F. (2020). Terminal investment strategies following infection are dependent on diet. *Journal of Evolutionary Biology*, 33(3), 309-317. <https://doi.org/10.1111/jeb.13566>
- Hunt, J., Brooks, R., Jennions, M. D., Smith, M. J., Bentsen, C. L., & Bussiere, L. F. (2004). High-quality male field crickets invest heavily in sexual display but die young. *Nature*, 432(7020), 1024-1027. <https://doi.org/10.1038/nature03084>
- Husak, J. F. & Swallow, J. G. (2011). Compensatory traits and the evolution of male ornaments. *Behaviour*, 148(1), 1-29. <https://www.jstor.org/stable/25799795>
- Iguchi, Y. (1998). Horn dimorphism of *Allomyrina dichotoma septentrionalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) affected by larval nutrition. *Annals of the Entomological Society of America*, 91(6), 845-847. <https://doi.org/10.1093/aesa/91.6.845>
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., & Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current biology*, 12(15), 1293-1300. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01043-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01043-6)
- Jacot, A., Scheuber, H., Holzer, B., Otti, O., & Brinkhof, M. W. (2008). Diel variation in a dynamic sexual display and its association with female mate-searching behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1634), 579-585. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1500>
- Karino, K., Shinjo, S., & Sato, A. (2007). Algal-searching ability in laboratory experiments reflects orange spot coloration of the male guppy in the wild. *Behaviour*, 101-113.

- Keeling, C. I.; Bearfield, J. C.; Young, S.; Blomquist, G. J. & Tittiger, C. (2006). Effects of juvenile hormone on gene expression in the pheromone-producing midgut of the pine engraver beetle, *Ips pini*, *Insect Molecular Biology*, 15(2), 207–216. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00629.x
- Kivleniece, I., Krams, I., Daukšte, J., Krama, T., & Rantala, M. J. (2010). Sexual attractiveness of immune-challenged male mealworm beetles suggests terminal investment in reproduction. *Animal Behaviour*, 80(6), 1015-1021. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.09.004>
- Kotiaho, J. S. (2000). Testing the assumptions of conditional handicap theory: costs and condition dependence of a sexually selected trait. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48, 188-194. <https://doi.org/10.1007/s002650000221>
- 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. <https://doi.org/10.1673/031.011.5601>
- Krams, I.A., Krama, T., Moore, F.R., Kivleniece, I., Kuusik, A., Freeberg, T.M., Mänd, R., Rantala, M.J., Daukšte, J. & Mänd, M. (2014), Male mealworm beetles increase resting metabolic rate under terminal investment. *Journal of Evolutionary Biology*, 27 (3), 541-550. <https://doi.org/10.1111/jeb.12318>
- Krams, I.A., Krama, T., Moore, F.R., Rantala, M. J., Mänd, R., Mierauskas, P. & Mänd, M. (2015). Resource availability as a proxy for terminal investment in a beetle. *Oecologia* 178, 339–345. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3210-5>
- Kuo, T. H., Fedina, T. Y., Hansen, I., Dreisewerd, K., Dierick, H. A., Yew, J. Y., & Pletcher, S. D. (2012). Insulin signaling mediates sexual attractiveness in *Drosophila*. *PLoS genetics*, 8(4), e1002684. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002684>
- Lavine, L. C., Hahn, L. L., Warren, I. A., Garczynski, S. F., Dworkin, I., & Emlen, D. J. (2013). Cloning and characterization of an mRNA encoding an insulin receptor from the horned

- scarab beetle *Onthophagus nigriventris* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, 82(1), 43-57. <https://doi.org/10.1002/arch.21072>
- Lavine, M. D., Gotoh, H., Hayes, A. & Lavine, L. C. (2019). The Insulin Signaling Substrate Chico and the Ecdysone Response Element Broad Both Regulate Growth of the Head Horns in the Asian Rhinoceros Beetle, *Trypoxylus dichotomus*. *Integrative and Comparative Biology*, 59 (5), 1338–1345. <https://doi.org/10.1093/icb/icz093>
- Li, C., Littlejohn, R. P., & Suttie, J. M. (1999). Effects of insulin-like growth factor 1 and testosterone on the proliferation of antlerogenic cells in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 284(1), 82-90. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990615\)284:1<82::AID-JEZ11>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990615)284:1<82::AID-JEZ11>3.0.CO;2-K)
- Li, D., Chen, X., Zhu, F., & Chen, K. (2020). Insulin-like peptides in model insects. *Invertebrate Survival Journal*, 17(1), 186-195. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.186-195>
- Liu, Y. K., Luo, Y. J., Deng, Y. M., Li, Y., Pang, X. Q., Xu, C. D., ... & Tang, B. (2020). Insulin receptors regulate the fecundity of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 1151-1159. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.09.011>
- Mahr, K., Vincze, O., Tóth, Z., Hoi, H., & Lendvai, Á. Z. (2020). Insulin-like growth factor 1 is related to the expression of plumage traits in a passerine species. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 74, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00265-020-2821-6>
- Marciniak, P., Pacholska-Bogalska, J., & Ragionieri, L. (2022). Neuropeptidomes of *Tenebrio molitor* L. and *Zophobas atratus* Fab. (Coleoptera, Polyphaga: Tenebrionidae). *Journal of Proteome Research*, 21(10), 2247-2260. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00694>
- Márquez-García, A., Canales-Lazcano, J., Rantala, M. J., & Contreras Garduño, J. (2016). Is Juvenile hormone a potential mechanism that underlay the “branched Y-model”? *General and Comparative Endocrinology*, 230-231, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.027>

- Martínez-Lendeck, N., Osorio-Beristain, M., Franco, B., Pedraza-Reyes, M., Obregón, A. & Contreras-Garduño, J. (2019). Does juvenile hormone prompt oxidative stress in male damselflies? *Journal of Experimental Biology*, 222(5), jeb194530. <https://doi.org/10.1242/jeb.194530>
- McCullough, E. L., Miller, C. W., & Emlen, D. J. (2016). Why sexually selected weapons are not ornaments. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(10), 742-751. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.07.004>
- Moczek, A. P. (1998). Horn polyphenism in the beetle *Onthophagus taurus*: larval diet quality and plasticity in parental investment determine adult body size and male horn morphology. *Behavioral Ecology*, 9(6), 636-641. <https://doi.org/10.1093/beheco/9.6.636>
- Moczek, A. P., & Emlen, D. J. (1999). Proximate determination of male horn dimorphism in the beetle *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Evolutionary Biology* 12(1), 27-31. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1999.00004.x>
- Møller, A. P. (1990). Parasites and sexual selection: current status of the Hamilton and Zuk hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 3(5-6), 319-328. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1990.3050319.x>
- Morales-Patiño, A. (2019). Efecto del manejo agrícola en la elección de pareja de *T. molitor* (Tesis de Licenciatura). Escuela Nacional de Estudios Superiores. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Nässel, D. R., & Broeck, J. V. (2016). Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2), 271-290. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2063-3>
- Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., Suzuki, A., Takahashi, S. Y., & Ishizaki, H. (1986). Amino acid sequence of a

- prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(16), 5840-5843. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.5840>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01914.x>
- Omkar. & Mishra, G. (Eds.). (2022). *Reproductive Strategies in Insects* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003043195>
- Okada, Y., Gotoh, H., Miura, T., Miyatake, T., & Okada, K. (2012). Juvenile hormone mediates developmental integration between exaggerated traits and supportive traits in the horned flour beetle *Gnatocerus cornutus*. *Evolution and development*, 14(4), 363–371. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2012.00554.x>
- Okada, Y., Katsuki, M., Okamoto, N., Fujioka, H., & Okada, K. (2019). A specific type of insulin-like peptide regulates the conditional growth of a beetle weapon. *PLoS biology*, 17(11), e3000541. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000541>
- Park, J., Jeon, B., Kang, S., Oh, M., Kim, M., Jang, S., Park, P., Kim, S., & Moon, S. (2015). Study on the changes in enzyme and insulin-like growth factor-1 concentrations in blood serum and growth characteristics of velvet antler during the antler growth period in sika deer (*Cervus nippon*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(9), 1303. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0535>
- Pertseva, M. N., & Shpakov, A. O. (2002). Conservatism of the insulin signaling system in evolution of invertebrate and vertebrate animals. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 38, 547-561. <https://doi.org/10.1023/A:1022008932029>
- Price, J. S., Oyajobi, B. O., Oreffo, R. O., & Russell, R. G. G. (1994). Cells cultured from the growing tip of red deer antler express alkaline phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor-I. *Journal of endocrinology*, 143(2), R9-R16. <https://doi.org/10.1677/joe.0.143R009>

- Prokkola, J., Roff, D., Kärkkäinen, T., Krams, I., & Rantala, M. (2013). Genetic and phenotypic relationships between immune defense, melanism and life-history traits at different temperatures and sexes in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, *111*(2), 89-96. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.20>
- Rantala, M. J., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A., & Suhonen, J. (2002). Do pheromones reveal male immunocompetence? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *269*(1501), 1681-1685. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2056>
- Rantala, M. J., Kortet, R., Kotiaho, J. S., Vainikka, A., & Suhonen, J. (2003a). Condition dependence of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. *Functional Ecology*, *17*(4), 534-540. <https://www.jstor.org/stable/3598991>
- Rantala, M. J., Vainikka, A., & Kortet, R. (2003b). The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1530), 2257-2261. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2472>
- Rantala, M. J. & Kortet R. (2003c) Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*, *Biological Journal of the Linnean Society*, *79* (3), 503–510, <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00202.x>
- Reifer, M. L., Harrison, S. J., & Bertram, S. M. (2018). How dietary protein and carbohydrate influence field cricket development, size and mate attraction signalling. *Animal Behaviour*, *139*, 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.03.010>
- Ribeiro, N., Abelho, M., & Costa, R. (2018). A review of the scientific literature for optimal conditions for mass rearing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science*, *53*(4), 434-454. <https://doi.org/10.18474/JES17-67.1>
- Richard, D. S., Rybczynski, R., Wilson, T. G., Wang, Y., Wayne, M. L., Zhou, Y., Patridge, L. & Harshman, L. G. (2005). Insulin signaling is necessary for vitellogenesis in *Drosophila melanogaster* independent of the roles of juvenile hormone and ecdysteroids: female

- sterility of the chico1 insulin signaling mutation is autonomous to the ovary. *Journal of Insect Physiology*, 51(4), 455-464. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.12.013>
- Rosenthal, G. G. (2017). *Mate Choice: The Evolution of Sexual Decision Making from Microbes to Humans*. Princeton University Press. 648pp.
- Ruiz-Guzmán, G., Cordero-Molina, S., Krams, I., & Contreras-Garduño, J. (2020). Interactions between oxidative stress and attractiveness to mates and individual mate choice in the beetle *Tenebrio molitor*. *Ethology*, 127(2), 109-116.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.01062.x>
- Sadighi, M., Haines, S. R., Skottner, A., Harris, A. J., & Suttie, J. M. (1994). Effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on the growth of antler cells in vitro. *Journal of Endocrinology*, 143(3), 461-469. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1430461>
- Schultzhaus, J. N., Bennett, C. J., Iftikhar, H., Yew, J. Y., Mallett, J., & Carney, G. E. (2018). High fat diet alters *Drosophila melanogaster* sexual behavior and traits: decreased attractiveness and changes in pheromone profiles. *Scientific reports*, 8(1), 5387. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23662-2>
- Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in ecology & evolution*, 11(8), 317-321. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10039-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2)
- Siefferman, L., & Hill, G. E. (2005). Evidence for sexual selection on structural plumage coloration in female eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Evolution*, 59(8), 1819-1828. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01828.x>
- Songvorawit, N., Butcher, B. A., & Chaisuekul, C. (2022). Feeding performance of the larval stag beetle *Aegus chelifera* (Coleoptera: Lucanidae) explains adult body size variation and

- sexual dimorphism. *The Canadian Entomologist*, 154(1), e2.  
<https://doi.org/10.4039/tce.2021.50>
- Stearns, S. C. (1989). Trade-Offs in Life-History Evolution. *Functional Ecology*, 3(3), 259–268.  
<https://doi.org/10.2307/2389364>
- Suttie, J. M., Gluckman, P. D., Butler, J. H., Fennessy, P. F., Corson, I. D., & Laas, F. J. (1985). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) antler-stimulating hormone? *Endocrinology*, 116(2), 846-848. <https://doi.org/10.1210/endo-116-2-846>
- Suttie, J. M., Fennessy, P. F., Gluckman, P. D. & Corson, I. D. (1988). Elevated plasma IGF 1 levels in stags prevented from growing antlers. *Endocrinology*, 122(6), 3005-3007. <https://doi.org/10.1210/endo-122-6-3005>
- Suttie, J. M., Fennessy, P. F., Corson, I. D., Laas, F. J., Crosbie, S. F., Butler, J. H., & Gluckman, P. D. (1989). Pulsatile growth hormone, insulin-like growth factors and antler development in red deer (*Cervus elaphus scoticus*) stags. *Journal of Endocrinology*, 121(2), 351-360. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1210351>
- 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 behavior. *Journal of Pesticide Science*, 11, 49–55. <https://doi.org/10.1584/jpestics.11.49>
- Tang, H. Y., Smith-Caldas, M. S., Driscoll, M. V., Salhadar, S., & Shingleton, A. W. (2011). FOXO regulates organ-specific phenotypic plasticity in *Drosophila*. *PLoS genetics*, 7(11), e1002373. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002373>
- Tobias, J. A., Montgomerie, R., & Lyon, B. E. (2012). The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1600), 2274-2293. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0280>
- Trivers, R. L. (1972). Parental investment and sexual selection. In *Sexual Selection and the Descent of Man 1871-1971*. Ed. B. Campbell, 136–179. Chicago. Aldine-Atherton.

- Valentine, J. M. (1931). The olfactory sense of the adult mealworm beetle *Tenebrio molitor* (Linn.). *Journal of Experimental Zoology*, 58, 165–227. <https://doi.org/10.1002/jez.1400580109>
- Veenstra, J. A. (2019). Coleoptera genome and transcriptome sequences reveal numerous differences in neuropeptide signaling between species. *Peer J*, 7, e7144. <https://doi.org/10.7717/peerj.7144>
- Velando, A., Beamonte-Barrientos, R., & Torres, R. (2006). Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia*, 149, 535-542. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0457-5>
- Williams G. C. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, 100(916),687–690. <https://doi.org/10.1086/282461>
- Xu, J., Sheng, Z., & Palli, S. R. (2013). Juvenile hormone and insulin regulate trehalose homeostasis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS genetics*, 9(6), e1003535. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003535>
- Yang, F., Gao, X., & Li, G. (2012). Effects of dietary protein levels on production performance and serum insulin-like growth factor-1 levels in sika deer. *Animal production science*, 52(8), 728-730. <https://doi.org/10.1071/AN12010>
- Zahavi, A. (1975) Mate Selection—A Selection for a Handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53(1), 205-214. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-5193\(75\)90111-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-5193(75)90111-3)
- Zahavi, A. (1977). The cost of honesty (further remarks on the handicap principle). *Journal of theoretical Biology*, 67(3), 603-605. [10.1016/0022-5193\(77\)90061-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(77)90061-3)
- Zhang, L., Guo, X., & Zhang, W. (2022). Nutrients and pheromones promote insulin release to inhibit courtship drive. *Science Advances*, 8(10), eabl6121. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abl6121>

Zinna, R., Emlen, D., Lavine, L. C., Johns, A., Gotoh, H., Niimi, T., & Dworkin, I. (2018). Sexual dimorphism and heightened conditional expression in a sexually selected weapon in the Asian rhinoceros beetle. *Molecular ecology*, 27(24), 5049-5072. <https://doi.org/10.1111/mec.14907>

# Anexos

| S1. Análisis de supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos de elección femenina para cada grupo en las distintas dosis y tiempos |    |                         |           |                                  |                |                      |
|---|----|-------------------------|-----------|----------------------------------|----------------|----------------------|
| Tratamiento   | n  | Normalidad Shapiro-Wilk |           | Homocedasticidad Fligner-Killeen |                | Tipo de distribución |
|   |    | Estadístico (W)         | P         | Estadístico (Chi <sup>2</sup> )  | p              |                      |
| 0.25mg/ml<br>0.5h   | 33 | 0.84331                 | 7.594e-07 | 23.915, df = 21                  | <b>0.2972*</b> | Exponencial          |
| 0.25mg/ml<br>3h   | 32 | 0.78054                 | 2.181e-08 | 26.471, df = 22                  | <b>0.232*</b>  | Pareto tipo 2        |
| 0.25mg/ml<br>24h  | 35 | 0.82503                 | 1.18e-07  | 25.356, df = 23                  | <b>0.3322*</b> | Pareto tipo 2        |
| 0.5mg/ml<br>0.5h  | 36 | 0.80247                 | 2e-08     | 30.591, df = 26                  | <b>0.2438*</b> | Pareto tipo 2        |
| 0.5mg/ml<br>3h  | 35 | 0.81551                 | 6.328e-08 | 31.023, df = 25                  | <b>0.1883*</b> | Pareto tipo 2        |
| 0.5mg/ml<br>24h   | 35 | 0.79212                 | 1.484e-08 | .91, df = 22                     | <b>0.3014*</b> | Pareto tipo 2        |
| 1mg/ml<br>0.5h  | 34 | 0.83429                 | 3.005e-07 | 25.667, df = 26                  | <b>0.4815*</b> | Pareto tipo 2        |
| 1mg/ml 3h   | 33 | 0.86021                 | 2.54e-06  | 30.095, df = 26                  | <b>0.2637*</b> | Exponencial          |
| 1mg/ml 24h  | 32 | 0.84665                 | 1.301e-06 | 29.087, df = 25                  | <b>0.2603*</b> | Exponencial          |
| 2mg/ml<br>0.5h  | 33 | 0.86471                 | 3.554e-06 | 28.303, df = 23                  | <b>0.2046*</b> | Exponencial          |
| 2mg/ml 3h   | 33 | 0.82784                 | 2.682e-07 | 24.558, df = 19                  | <b>0.1756*</b> | Pareto tipo 2        |
| 2mg/ml 24h  | 35 | 0.85415                 | 9.093e-07 | 26.934, df = 22                  | <b>0.2138*</b> | Exponencial          |
| 4mg/ml<br>0.5h  | 33 | 0.84065                 | 6.324e-07 | 31.034, df = 29                  | <b>0.3638*</b> | Exponencial          |
| 4mg/ml 3h   | 35 | 0.82986                 | 1.631e-07 | 29.565, df = 25                  | <b>0.241*</b>  | Exponencial          |
| 4mg/ml 24h  | 34 | 0.84459                 | 6.125e-07 | 23.932, df = 21                  | <b>0.2964*</b> | Pareto tipo 2        |

Notas: Se señala con asteriscos cuando el valor de  $p > 0.05$  y se cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

| S2. Análisis de Riesgos Mantel-Cox |    |                 |               |  |                  |
|------------------------------------|----|-----------------|---------------|--|------------------|
| Tratamiento                        | n  | Estadístico     | P             | Hazard-Ratio                             | p                |
| 0.25mg/ml 0.5h                     | 33 | Chisq=1.17      | <b>0.28*</b>  | Hazard ratio= 1.4684; IC= 0.9025- 2.389  | 0.122            |
| 0.25mg/ml 3h                       | 32 | Chisq=3.79      | <b>0.052*</b> | Hazard ratio= 0.990966; IC= 0.6023-1.63  | 0.971            |
| 0.25mg/ml 24h                      | 35 | Chisq= 0.0289   | <b>0.87*</b>  | Hazard ratio= 1.8172; IC= 1.107-2.983    | 0.0182           |
| 0.5mg/ml 0.5h                      | 36 | Chisq= 7.41     | 0.0065        | Hazard ratio= 1.567; IC= 0.9793-2.508    | 0.0611           |
| 0.5mg/ml 3h                        | 35 | Chisq= 0.000251 | <b>0.99*</b>  | Hazard ratio= 1.4279; IC= 0.8839-2.307   | 0.145            |
| 0.5mg/ml 24h                       | 35 | Chisq= 3.93     | 0.047         | Hazard ratio= 1.4696; IC= 0.9151-2.36    | 0.111            |
| 1mg/ml 0.5h                        | 34 | Chisq= 0.863    | <b>0.35*</b>  | Hazard ratio= 1.497; IC= 0.9247-2.424    | 0.101            |
| 1mg/ml 3h                          | 33 | Chisq= 0.795    | <b>0.37*</b>  | Hazard ratio= 0.8917; IC= 0.5451-1.45    | 0.648            |
| 1mg/ml 24h                         | 32 | Chisq= 5.29e-05 | <b>0.99*</b>  | Hazard ratio= 1.1712; IC= 0.7103-1.931   | 0.536            |
| 2mg/ml 0.5h                        | 33 | Chisq= 0.898    | <b>0.34*</b>  | Hazard ratio= 1.09003; IC= 0.6682- 1.778 | 0.73             |
| 2mg/ml 3h                          | 33 | Chisq= 0.543    | <b>0.46*</b>  | Hazard ratio= 1.09361; IC= 0.6712- 1.782 | 0.719            |
| 2mg/ml 24h                         | 35 | Chisq= 25.3     | 4.9e-07       | Hazard ratio= 1.6991; IC= 1.041-2.773    | <b>0.0339*</b>   |
| 4mg/ml 0.5h                        | 33 | Chisq= 0.189    | <b>0.66*</b>  | Hazard ratio= 2.747; IC= 1.601-4.713     | <b>0.000242*</b> |
| 4mg/ml 3h                          | 35 | Chisq= 9.21     | 0.0024        | Hazard ratio= 1.08572; IC= 0.669-1.762   | 0.739            |
| 4mg/ml 24h                         | 34 | Chisq= 0.0257   | <b>0.87*</b>  | Hazard ratio= 1.03502; IC= 0.6395- 1.675 | 0.889            |

Notas: Se señala con asteriscos cuando el valor de  $p > 0.05$  y se cumple el supuesto de riesgos proporcionales y cuando el valor de  $p < 0.05$  al estimar el valor de HR.

## Pruebas piloto

### S.3

Originalmente el proyecto tenía el objetivo de poner a prueba la insulina y la HJ como reguladores de ornamentos en *T. molitor* de manera independiente y conjunta. En las pruebas piloto exploramos las dosis de fenoxycarb (análogo de HJ) y de Insulina bovina a utilizar, además del tiempo entre la aplicación de estos tratamientos y las pruebas de

conducta. La crianza y obtención de grupos fue realizada de la misma que se describe en la sección de métodos de este trabajo.

Realizamos dos modelos experimentales para estas pruebas. En el laboratorio hemos utilizado metopreno como análogo de HJ, sin embargo, ya no nos es posible conseguirlo, por ello consideramos utilizar otro compuesto. Para la estandarización de fenoxycarb (Número CAS: 72490-01-8; Sigma-Aldrich) utilizamos un modelo factorial con dos variables: 1) dosis utilizada (2 niveles) y tiempo entre la aplicación de fenoxycarb y la prueba de conducta (3 Niveles) (Fig. S3.1A.). Para la preparación de las alícuotas diluímos fenoxycarb en acetona hasta lograr una concentración de 200 y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. Elegimos estas ya que la primera es la dosis de metopreno (análogo de HJ) que usualmente utilizamos en el laboratorio para favorecer la producción de ornamentos. En total obtuvimos 6 tratamientos, cada uno con un grupo control y un grupo con una n entre 20 y 23 su aplicación fue de manera tópica entre la cabeza y el pronoto. En cada tratamiento el grupo experimental recibió la aplicación de 1  $\mu\text{l}$  de la dosis correspondiente, y el grupo control 1  $\mu\text{l}$  de acetona, ambos de manera tópica en la zona entre la cabeza y el pronoto. Para la

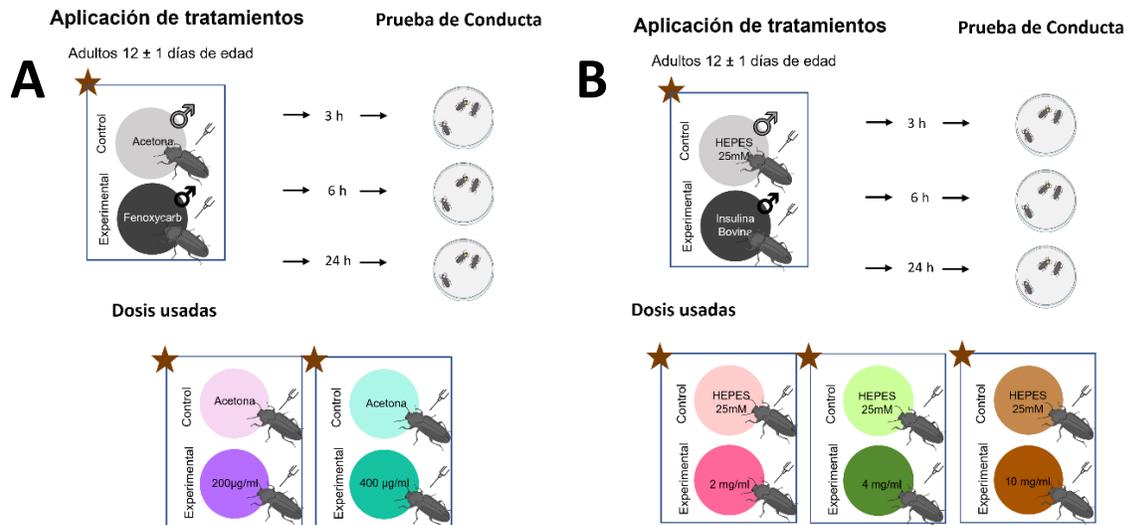


Fig. S3.1 Diseño experimental de las pruebas piloto. Los machos en edad reproductiva fueron emparejados de acuerdo con su peso corporal. En cada pareja, uno fue asignado al grupo Control y se le administró Acetona/HEPES, otro fue asignado al grupo Experimental y se le aplicó Insulina Fenoxycarb/Insulina bovina en distintas dosis (estrellas rojas). Después de 3, 6 o 24 horas se realizaron pruebas de conducta en donde se registró el tiempo que las hembras pasaron con cada macho. Después de la prueba conductual se registró el número de días que los machos vivieron. En cada tratamiento se realizaron entre 12 y 23 ensayos.

estandarización de Insulina Bovina (Número CAS:11070-73-8; Sigma-Aldrich) el diseño fue similar (Fig S3.1B). En este caso la variable dosis tuvo 3 niveles: 2, 4 y 10 mg/ml de insulina bovina diluida en HEPES 25mM pH=8. La variable tiempo de aplicación antes de la prueba de conducta tuvo 3 niveles: 3, 6 y 24 horas El grupo experimental de cada tratamiento recibió una inyección debajo de la inserción de la pata izquierda del tercer par de patas de 1  $\mu$ l de la dosis correspondiente, y el grupo control una inyección de 1  $\mu$ l de HEPES en la misma zona (Fig. S3.2).

En esta etapa utilizamos otra arena de conducta (S3.2) basándonos en los trabajos de Rantala y colaboradores (2003b). Los experimentos fueron llevados a cabo con luz roja. Utilizamos cajas de Petri limpiadas con algodón y alcohol al 70%. En la base de las cajas Petri colocamos papel filtro previamente esterilizado. El experimento inició colocando una hembra virgen en el centro de la arena de conducta y esperamos 5 minutos de adecuación, posteriormente colocamos un macho del grupo control y otro del grupo experimental marcados con pintura a base de agua amarilla o blanca (asignamos los colores de manera aleatoria). Realizamos observaciones focales a la hembra y registramos el tiempo de cópula que tuvo con cada macho.

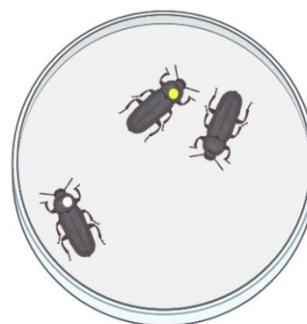


Fig. S3. 2. Arena de competencia. La hembra (escarabajo sin marca) se coloca dentro con un macho control y uno experimental, marcados con pinturas de distinto color y se registra el tiempo de cópula con cada uno.

Para cada tratamiento de los dos modelos realizamos comparaciones entre el grupo control y el grupo experimental en el programa RStudio. Analizamos los supuestos de normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro- Wilk y Fligner Killeen respectivamente (S3.3-4).

| S3.3. Análisis de supuestos de normalidad y homocedasticidad en los datos de éxito de cópula en los tratamientos con Fenoxycarb |                                     |                 |           |  |                |
|---|-------------------------------------|-----------------|-----------|--|----------------|
| Grupo   | Análisis de Normalidad Shapiro-Wilk |                 |           | Análisis de Homocedasticidad Fligner-Killeen |                |
|   | n                                   | Estadístico (W) | p         | Estadístico (Chi <sup>2</sup> )              | p              |
| 200µg/ml 3h   | 23                                  | 0.878           | 0.0001889 | 18.459                                       | <b>0.2393*</b> |
| 200µg/ml 6h   | 22                                  | 0.815           | 0.0000062 | 13.176                                       | <b>0.1548*</b> |
| 200µg/ml 24h  | 22                                  | 0.788           | 0.0000016 | 17.406                                       | <b>0.2352*</b> |
| 400µg/ml 3h   | 20                                  | 0.902           | 0.002207  | 18.649                                       | <b>0.2301*</b> |
| 400µg/ml 6h   | 21                                  | 0.869           | 0.0001975 | 12.173                                       | <b>0.2736*</b> |
| 400µg/ml 24h  | 21                                  | 0.893           | 0.0009225 | 19.655                                       | <b>0.2362*</b> |

Notas: Se señala con asteriscos cuando el valor de  $p > 0.05$  y se cumple el supuesto de normalidad u homocedasticidad.

| S3.4. Análisis de supuestos de normalidad y homocedasticidad en los datos de éxito de cópula en los tratamientos con Insulina |                                     |                 |           |  |                |
|---|-------------------------------------|-----------------|-----------|--|----------------|
| Grupo   | Análisis de Normalidad Shapiro-Wilk |                 |           | Análisis de Homocedasticidad Fligner-Killeen |                |
|   | n                                   | Estadístico (W) | p         | Estadístico (Chi <sup>2</sup> )              | p              |
| 2mg/ml 3h   | 20                                  | 0.882           | 0.0006203 | 16.671                                       | <b>0.2742*</b> |
| 2mg/ml 6h   | 16                                  | 0.89422         | 0.004428  | 10.136                                       | <b>0.4286*</b> |
| 2mg/ml 24h  | 21                                  | 0.81142         | 0.000007  | 17.701                                       | <b>0.2787*</b> |
| 4mg/ml 3h   | 20                                  | 0.87958         | 0.0005129 | 14.851                                       | <b>0.1894*</b> |
| 4mg/ml 6h   | 19                                  | 0.82595         | 0.0000369 | 16.811                                       | <b>0.3303*</b> |
| 4mg/ml 24h  | 21                                  | 0.8686          | 0.0001878 | 14.745                                       | <b>0.1945*</b> |
| 10mg/ml 3h  | 21                                  | 0.88448         | 0.0005102 | 12.418                                       | <b>0.8249*</b> |
| 10mg/ml 6h  | 17                                  | 0.91593         | 0.01242   | 9.7453                                       | <b>0.7806*</b> |
| 10 mg/ml 24h  | 20                                  | 0.88158         | 0.0005808 | 16.001                                       | <b>0.3133*</b> |

Notas: Se señala con asteriscos cuando el valor de  $p > 0.05$  y se cumple el supuesto de normalidad u homocedasticidad.

Finalmente realizamos comparaciones pareadas con la prueba de Wilcoxon dado que la distribución de los datos no cumplió con los datos de normalidad y homocedasticidad de manera simultánea (S3.3-4). En caso de que los datos incluyan numerosos ceros, el programa recomienda realizar una corrección de continuidad de los rangos dado que no le es posible determinar el valor de  $p$  de manera exacta con la función `Wilcox_test`, por lo que

en esos casos realizamos dicha corrección. En ninguno de los tratamientos encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (S3.5-6).

| S3.5 Éxito de cópula Fenoxycarb |                                   |              |        |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------|
| Dosis                           | Diferencias entre grupos Wilcoxon |              |        |
|                                 | n                                 | Estadístico  | p      |
| 200µg/ml 3h                     | 23                                | V= 176       | 0.2595 |
| 200µg/ml 6h                     | 22                                | V= 151       | 0.4434 |
| 200µg/ml 24h                    | 22                                | Z = 0.01209  | 0.9904 |
| 400µg/ml 3h                     | 20                                | Z = 0.081797 | 0.9348 |
| 400µg/ml 6h                     | 21                                | V = 155      | 0.179  |
| 400µg/ml 24h                    | 21                                | Z = 0.20198  | 0.8399 |

| S3.6. Éxito de cópula Insulina |                                   |             |         |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|---------|
| Dosis                          | Diferencias entre grupos Wilcoxon |             |         |
|                                | n                                 | Estadístico | p       |
| 2mg/ml 3h                      | 20                                | Z = -0.2331 | 0.8157  |
| 2mg/ml 6h                      | 16                                | Z = -0.1914 | 0.8482  |
| 2mg/ml 24h                     | 21                                | Z = -1.1072 | 0.2682  |
| 4mg/ml 3h                      | 20                                | V = 141     | 0.1893  |
| 4mg/ml 6h                      | 19                                | V = 80      | 0.5678  |
| 4mg/ml 24h                     | 21                                | Z = 1.8925  | 0.05842 |
| 10mg/ml 3h                     | 21                                | V = 94      | 0.4733  |
| 10mg/ml 6h                     | 17                                | V = 61      | 0.4874  |
| 10 mg/ml 24h                   | 20                                | V = 100     | 0.8695  |

Por lo que decidimos 1) Cambiar la arena de competencia por una de elección para poder evaluar la producción de ornamentos de manera indirecta mediante la preferencia de las hembras y reduciendo la interferencia de la competencia entre los machos. 2) En los tratamientos con fenoxycarb utilizar las mismas dosis previamente utilizadas en la arena de competencia y aumentar hasta (10 mg/ml) en el escarabajo *Ips paraconfusus* se reportó que la aplicación de 1 µl de Fenoxycarb disuelto en acetona a una concentración de 10 µg/µl aumenta la producción de feromonas a las 20 horas de la aplicación (Chen *et al.*, 1988). Sin embargo en estos nuevos tratamientos tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (S3.7-8)

| S3.7. Análisis de supuestos de normalidad y homocedasticidad en los datos de elección femenina en los tratamientos con Fenoxycarb |                                     |                 |           |  |                |
|---|-------------------------------------|-----------------|-----------|--|----------------|
| Grupo   | Análisis de Normalidad Shapiro-Wilk |                 |           | Análisis de Homocedasticidad Fligner-Killeen |                |
|   | n                                   | Estadístico (W) | p         | Estadístico (Chi <sup>2</sup> )              | p              |
| 200µg/ml 3h   | 30                                  | 0.82332         | 5.413e-07 | 21.298                                       | <b>0.1673*</b> |
| 200µg/ml 24h  | 29                                  | 0.78854         | 1.025e-07 | 23.345                                       | <b>0.2225*</b> |
| 400µg/ml 3h   | 30                                  | 0.84325         | 1.937e-06 | 21.798                                       | <b>0.4112*</b> |
| 400µg/ml 24h  | 29                                  | 0.82026         | 6.327e-07 | 23.345                                       | <b>0.2225*</b> |
| 800µg/ml 3h   | 31                                  | 0.85128         | 2.438e-06 | 22.258                                       | <b>0.7242*</b> |
| 800µg/ml 24h  | 29                                  | 0.87765         | 2.94e-05  | 25.835                                       | <b>0.3087*</b> |
| 1.2mg/ml 3h   | 29                                  | 0.85445         | 5.636e-06 | 20.367                                       | <b>0.3125*</b> |
| 1.2mg/ml 24h  | 29                                  | 0.83527         | 1.6e-06   | 21.841                                       | <b>0.1909*</b> |
| 5mg/ml 3h   | 30                                  | 0.81703         | 3.684e-07 | 23.771                                       | <b>0.2051*</b> |
| 5mg/ml 20h  | 31                                  | 0.85796         | 3.897e-06 | 27.93  | <b>0.3619*</b> |
| 10mg/ml 3h  | 28                                  | 0.82189         | 9.895e-07 | 20.775                                       | <b>0.1873*</b> |
| 10mg/ml 20h   | 30                                  | 0.86642         | 9.628e-06 | 23.055                                       | <b>0.3986*</b> |

Notas: Se señala con asteriscos cuando el valor de  $p > 0.05$  y se cumple el supuesto de normalidad u homocedasticidad.

| S3.8. Elección femenina Fenoxycarb |                                   |               |         |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------|
| Dosis                              | Diferencias entre grupos Wilcoxon |               |         |
|                                    | n                                 | Estadístico   | p       |
| 200µg/ml 3h                        | 30                                | V = 216       | 0.7457  |
| 200µg/ml 24h                       | 29                                | V = 221       | 0.9491  |
| 400µg/ml 3h                        | 30                                | V = 225       | 0.8872  |
| 400µg/ml 24h                       | 29                                | Z = 0.40953   | 0.6871  |
| 800µg/ml 3h                        | 31                                | Z = -1.7346   | 0.08344 |
| 800µg/ml 24h                       | 29                                | Z = -1.2157   | 0.2289  |
| 1.2mg/ml 3h                        | 29                                | Z = -0.086632 | 0.9346  |
| 1.2mg/ml 24h                       | 29                                | V = 242       | 0.6089  |
| 5mg/ml 3h                          | 30                                | Z = -0.66491  | 0.5109  |
| 5mg/ml 20h                         | 31                                | V = 212       | 0.4919  |
| 10mg/ml 3h                         | 28                                | Z = 0.38579   | 0.7047  |
| 10mg/ml 20h                        | 30                                | Z = 0.20087   | 0.8448  |

Por ello decidimos continuar con un diseño que evaluara únicamente a la insulina como mediador de la producción de ornamentos como factor interno.