



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Efectos multigeneracionales de la temperatura sobre la tolerancia al calor de *Drosophila melanogaster*

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Bióloga

Alison Natalia Urra Sandoval

Concepción, Abril de 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción



Prof. Guía

Dra. Grisel Cavieres _____

Prof. Evaluadores

Dra. Angela Sierra _____

Dr. Daniel Aguilera _____

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández _____

Concepción, Abril de 2024

Agradecimientos

Probablemente me falten dedos de la mano para agradecer a las personas que me han acompañado en este largo proceso, el cual ha sido una montaña rusa de emociones, pero del que no dudo que me ha hecho crecer profesionalmente y de manera más personal. En primer lugar, les agradezco a mis padres y hermano que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos. Quiero agradecer profundamente a mis amistades, quienes me han aportado risas, revisiones, consejos de manera incondicional. Le agradezco profundamente a mi profesora por su paciencia, sin sus palabras y correcciones no hubiese podido lograr llegar a esta instancia. Gracias por su guía y todos sus consejos. Agradezco al Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES) la oportunidad de realizar esta investigación, a ANID PIA/BASAL FB0002 y a FONDECYT 11190637 por el financiamiento.

Índice

Agradecimientos	3
Índice	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Hipótesis	12
<i>Predicción:</i>	12
Objetivos.....	13
<i>Objetivo general:</i>	13
<i>Objetivos específicos</i>	13
Metodología.....	14
<i>Modelo de estudio</i>	14
<i>Captura, mantención y diseño</i>	15
<i>Ensayos de tolerancia al calor.</i>	16
<i>Análisis estadísticos</i>	18
Resultados.....	20
Discusión	26
Conclusión.....	31
Bibliografía	33

Índice de figuras

- Figura 1.** Ilustración de *Drosophila melanogaster*. A) dimorfismo sexual en individuos adultos, y B) ciclo de vida con distintos estadios del desarrollo: huevo, larva, pupa y adultos15
- Figura 2.** Protocolo de mantención *Drosophila melanogaster* en el laboratorio A) Moscas mantenidas desde etapa de huevo hasta la eclosión a adulto en botellas de vidrio, B) Individuos adultos recién eclosionados mantenidos cajas de acrílico con medio de cultivo para alimentación y ovoposición, las moscas, C) Cámara climáticas con control de temperatura ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo.....16
- Figura 3.** Medición de tolerancia térmica en *Drosophila melanogaster* aclimatadas durante 17 generaciones a 21, 24, 27 y 30°C . La figura muestra un ensayo de tiempo de muerte térmica grabado con una cámara de video HD conectada a un computador junto al baño termorregulado, para posteriormente cuantificar el tiempo de colapso (ver metodología)... 17
- Figura 4.** Representación de colapso de *Drosophila melanogaster* durante ensayos de tiempo de muerte térmica medidos a 36, 37, 38, 39 y 40°C . El vial N°6 muestra la pérdida de capacidad locomotora (i.e., colapso o muerte térmica). 18
- Figura 5.** Curvas de supervivencia obtenidas a diferentes temperaturas para moscas aclimatadas a 21, 24, 27 y 30°C , y sometidas a diferentes temperaturas de ensayos térmicos (36, 37, 38, 39 y 40°C). Las mediciones involucraron $n = 5252$ individuos.....21
- Figura 6.** Tolerancia al calor en moscas aclimatadas a 21, 24, 27 y 30°C , expresada como curvas de muerte térmica (TDT). Los parámetros CT_{max} y Z representan, respectivamente, la tolerancia térmica después de una exposición de $t=1$ min (es decir, la temperatura que intercepta la abscisa) y la diferencia de temperatura requerida para aumentar t en un orden de magnitud (ver texto principal). Los símbolos en azul, celeste, rosado y rojo representan, respectivamente, temperaturas de aclimatación de 21, 24, 27 y 30°C . Las líneas punteadas corresponden al macho y hembra de cada tratamiento. Los valores se muestran como promedio \pm EE.....22

Índice de tablas

Tabla 1. Resultado de la selección de modelos que describen los efectos de la temperatura del ensayo térmico (T_{ens}), la temperatura del tratamiento térmico (T_{trat}) y sexo sobre el tiempo de sobrevivencia ($\log_{10}t$) en *Drosophila melanogaster*. Se muestran valores de AIC, Δ AIC, Peso (w), y grados de libertad (GL) sus pesos. El modelo con mejor ajuste se muestra en negrita.....23

Tabla 2. Temperatura critica superior (CT_{max}) y sensibilidad térmica (Z) de machos y hembras *Drosophila melanogaster* provenientes de diferentes ambientes térmicos (T_{trat}), obtenidos a partir de las curvas de muerte térmica (TDT).25

Resumen

Desde el siglo XX, el planeta ha experimentado un aumento de las temperaturas medias y fenómenos meteorológicos extremos más frecuentes. Frente a estos nuevos desafíos, la capacidad de los organismos y poblaciones de reaccionar con cambios fenotípicos puede ser clave para su persistencia. Se investigó el impacto de la temperatura ambiental experimentada durante múltiples generaciones sobre la tolerancia térmica en *Drosophila melanogaster*. Estimamos la tolerancia al calor de individuos adultos mantenidos durante 17 generaciones en ambientes térmicos (T_{trat}) cada vez más estresantes: 21, 24, 27 y 30°C. La tolerancia al calor se cuantificó empleando curvas de Tiempo de Muerte Térmica (curvas TDT, por sus siglas en inglés), que describen como el tiempo de sobrevivencia de los organismos varía en función de la temperatura (Temperatura de ensayo o T_{ens}). A través de esta metodología se estimaron parámetros que permiten diferenciar el impacto de la intensidad de la temperatura y el tiempo de exposición sobre los organismos: CT_{max} (Temperatura Crítica máxima) que corresponde a la temperatura de colapso o temperatura donde los organismos pierden la capacidad de mantenerse erguidos, y Z una constante que indica la sensibilidad al cambio de temperatura. Nuestros resultados revelaron que T_{trat} indujo cambios en la tolerancia térmica de *Drosophila melanogaster*. El tiempo de sobrevivencia de hembras fue 29% superior al de los machos, y la T_{ens} afectó negativa y significativamente el tiempo de sobrevivencia de *D. melanogaster*. Los organismos mantenidos a 24, 27 y 30°C durante múltiples generaciones sobrevivieron en promedio 3, 11 y 10% más tiempo que sus contrapartes mantenidas a 21°C. Encontramos interacciones significativas entre T_{trat} y T_{ens} , los individuos de los tratamientos de 27 y 30°C disminuyen su sobrevivencia en las temperaturas extremadamente altas (39 y 40°C). Finalmente, nuestros resultados revelaron un compromiso entre CT_{max} y sensibilidad Z , estos resultados proporcionan nueva evidencia sobre el impacto al largo plazo de la temperatura sobre el desempeño térmico de los organismos.

Palabras clave: Adaptación, curvas de muerte térmica, *Drosophila melanogaster*, historia térmica.

Abstract

Since the 20th century, the planet has experienced rising average temperatures and more frequent extreme weather events. In the face of these new challenges, the ability of organisms and populations to respond with phenotypic changes may be key to their persistence. We studied the effect of temperature experienced over multiple generations on thermal tolerance in *Drosophila melanogaster*. We estimated the heat tolerance of adult individuals maintained over 17 generations in increasingly stressful thermal environments (T_{trat}): 21, 24, 27 and 30°C. Heat tolerance was quantified using Thermal Death Time curves (TDT curves), which describe how the survival time of organisms varies as a function of temperature (test temperature or T_{ens}). This method allowed the estimation of parameters that differentiate the effects of temperature intensity and exposure time: CT_{max} (Maximum Critical Temperature), which corresponds to the collapse temperature or the temperature at which the organisms lose the ability to remain upright, and Z , a constant that indicates the sensitivity to temperature changes. Our results showed that T_{trat} induced changes in the thermal tolerance of *Drosophila melanogaster*. The survival time of females was 29% higher than that of males, and T_{ens} had a negative and significant effect on the survival time of *D. melanogaster*. Organisms maintained at 24, 27 and 30°C survived on average 3, 11 and 10% longer than their counterparts maintained at 21°C. We found significant interactions between T_{trat} y T_{ens} , individuals in the 27 and 30°C treatments decreased their survival at extremely high temperatures (39 and 40°C). Finally, our results revealed a trade-off between CT_{max} and Z , these results provide new evidence on the long-term effects of temperature on the thermal tolerance of organisms.

Keywords: Adaptation, Thermal death curves, *Drosophila melanogaster*, thermal history.

Introducción

El aumento de las temperaturas promedio y el incremento en la frecuencia de los eventos climáticos extremos, como las olas de calor, huracanes y sequías, tienen impactos significativos sobre la biodiversidad (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2023). Estudios previos, han estimado que como consecuencia de estos eventos, el riesgo de extinción de las especies puede incrementar hasta en un 54% (Malcolm et al., 2006; Thomas et al., 2004; Warren et al., 2013). Estos cambios podrían ser particularmente desafiantes para los organismos ectotermos debido a su falta de regulación interna de la temperatura corporal (Paaijmans et al., 2013).

Estudios experimentales han reportado que los organismos ectotermos pueden responder a cambios en el ambiente abiótico con una variedad de ajustes fenotípicos, que van desde cambios a nivel bioquímico, con modificaciones en la expresión de proteínas de membrana o proteínas de shock térmico (Colinet et al., 2010), cambios morfológicos, como modificaciones en el tamaño corporal (Sheridan & Bickford, 2011), cambios fisiológicos, a través de ajustes metabólicos o en tolerancias térmicas (Chidawanyika et al., 2017; Hoffmann et al., 2013; Loeschcke & Hoffmann, 2007), y modificaciones en el comportamiento, relacionados con la búsqueda de refugios y micrositios (Abram et al., 2017). Estos ajustes podrían permitir amortiguar el impacto negativo de los eventos climáticos extremos sobre su adecuación biológica (Ghalambor et al., 2007).

La capacidad de reaccionar con cambios fenotípicos a estos desafíos ambientales, puede darse durante la ontogenia de los organismos (Pigliucci, 2001), pero también pueden tener lugar a través de generaciones (Kim et al., 2024). Por ejemplo, Rodríguez-Romero et al. (2016) encontraron que la restauración y mantención de la capacidad reproductiva del poliqueto *Ophryotrocha labronica* tuvo lugar luego de tres generaciones expuestos a ambientes con baja presión parcial de oxígeno. Similares resultados fueron reportados por Cavieres et al. (2019) quienes estudiaron a *Drosophila melanogaster* encontraron que el ambiente térmico experimentado por progenitores inducía cambios en la tolerancia térmica de los descendientes.

La vulnerabilidad de los organismos a la temperatura puede estudiarse a través de los límites térmicos o temperaturas críticas máxima (CT_{max}) y mínima (CT_{min}), que corresponden al punto térmico superior o inferior en el que la actividad locomotora se desorganiza y el animal pierde su capacidad de reaccionar (Cowles & Bogert, 2006). Estos límites pueden variar entre especies, sexo y producto de la propia experiencia de los individuos (Angilletta, 2009; Bale et al., 2002). Las metodologías para estimar las temperaturas críticas se pueden separar en los métodos estáticos o dinámicos: los primeros evalúan la proporción de individuos que sobreviven al estrés térmico cuando son sometidos a una temperatura constante (Terblanche et al., 2006), mientras que los métodos dinámicos evalúan el tiempo de colapso de los organismos sometidos a una temperatura que cambia a una tasa controlada (Rezende et al., 2014). Observaciones empíricas y análisis teóricos muestran que los valores estimados de los límites térmicos dependen en gran medida de la metodología empleada, lo que genera dudas sobre la idoneidad y validez de diferentes estimaciones de tolerancia térmica para fines comparativos y extrapolaciones a entornos naturales (Chown et al., 2009; Lutterschmidt & Hutchison, 1997; Santos et al., 2011; Terblanche et al., 2006). Probablemente, la mayor limitación de estas estimaciones, tanto de CT_{max} como de CT_{min} , es que ignoran el tiempo requerido para que ocurra el colapso térmico (que se define como la temperatura donde los organismos pierden la capacidad de mantenerse erguidos, Terblanche et al., 2006). Rezende et al. (2014), proponen un enfoque metodológico alternativo para estudiar la tolerancia térmica, mediante el uso de curvas de tiempo de muerte térmica (curvas TDT). Estas curvas históricamente utilizadas en el área bacteriológica (Tang et al., 2007), representan matemática y gráficamente la mortalidad de los organismos frente a diferentes combinaciones de temperatura y tiempo de exposición (Armstrong et al., 2009; Cerdá et al., 1998; Cerdá & Retana, 2000; Smith, 1957). Lo interesante de las curvas TDT es que no solo permiten estimar los límites térmicos (CT_{max} o CT_{min}), sino también su sensibilidad térmica (Z) o sensibilidad a cambios en la temperatura ambiental. Las curvas TDT se pueden describir con la siguiente relación:

$$T = CT_{max} - Z \log_{10} t \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde, T corresponde a la temperatura letal ($^{\circ}\text{C}$), CT_{max} a la temperatura que provoca la muerte después de una exposición de 1 min ($^{\circ}\text{C}$), Z a la temperatura requerida para cambiar

el tiempo de supervivencia en un orden de magnitud ($^{\circ}\text{C}$) y t el tiempo transcurrido hasta la muerte (en minutos). Obsérvese que CT_{max} y Z se asemejan a la intersección y la pendiente de una regresión lineal. En términos simples un $CT_{max} = 40^{\circ}\text{C}$ y $Z = 3^{\circ}\text{C}$ implicaría que un organismo toleraría 40°C , durante 1 minuto, 37°C durante 10 min, 34°C durante 100 min, y así sucesivamente (Rezende et al., 2014). Altos valores de Z y CT_{max} indican que la capacidad de soportar temperaturas extremas, encapsulada en CT_{max} , no puede mantenerse durante largos períodos de tiempo (Z) sugiriendo un compromiso o trade-off entre el tiempo de exposición y la intensidad de la temperatura. Por otra parte, un todoterreno (jack-of-all-trades) tolerante al calor combinaría lo mejor de ambos mundos y exhibiría un CT_{max} alto y un Z bajo. Finalmente, altos valores de CT_{max} combinados con bajos valores de Z indican una menor sensibilidad a los cambios de temperatura, a expensas de tolerar altas temperaturas durante un breve período de tiempo (Rezende et al., 2014). La estimación de ambos parámetros, a través de las curvas TDT, brinda la posibilidad de hacer predicciones más robustas sobre el impacto del incremento de la temperatura sobre los organismos (Tang et al., 2000, 2007).

En el presente estudio se evaluó el impacto del incremento de la temperatura experimentada durante múltiples generaciones sobre la tolerancia al calor, estimada a través de curvas TDT. Para esto utilizamos como modelo a *Drosophila melanogaster*, quien es un excelente modelo para evaluar hipótesis sobre impactos del cambio climático en el desempeño de organismos, debido a que su bioquímica y fisiología ha sido ampliamente estudiada y sus respuestas fenotípicas a la temperatura ambiental y a otros factores climáticos son bien conocidos (Hoffmann et al., 1997; Krebs & Loeschcke, 1994)

Hipótesis

Como respuesta a la experiencia térmica experimentada a lo largo de múltiples generaciones, los organismos presentan ajustes fisiológicos que les permiten enfrentar las diferencias en el ambiente térmico. Estas diferencias se traducen en una mayor tolerancia al calor en organismos que habitan a mayores temperaturas ambientales.

Predicción

Organismos mantenidos durante múltiples generaciones a mayores temperaturas ambientales exhibirán valores más altos de CT_{max} que los organismos mantenidos a temperaturas más bajas. Sin embargo, esta mayor tolerancia al calor podría limitarse a periodos de tiempo más cortos, por los altos valores de Z que presentarán en comparación con los organismos mantenidos a menores temperaturas ambientales.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar cambios en la tolerancia al calor de *Drosophila melanogaster* en respuesta a la variación en el ambiente térmico experimentado sobre múltiples generaciones.

Objetivos específicos:

1. Construir curvas de muerte térmica (curvas TDT) para organismos machos y hembras provenientes de tratamientos térmicos de 21, 24, 27 y 30°C.
2. Estimar la temperatura crítica máxima (CT_{max}) y la sensibilidad térmica (Z) al incremento de la temperatura a través del uso de curvas TDT en organismos provenientes de distintos tratamientos térmicos (ver Objetivo específico 1).
3. Evaluar si la sobrevivencia de los organismos en los ensayos térmicos varía entre sexos y tratamiento térmico.

Metodología

Modelo de estudio

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830), comúnmente conocida como "mosca del vinagre", es una especie perteneciente a la familia Drosophilidae y el género *Drosophila*. Poseen un cuerpo de 2 a 3 mm de longitud y color marrón claro, unos anillos negros transversales en el abdomen, y ojos de color rojo ladrillo (Figura 1; (Markow & O' Grady, 2005). Es una especie cosmopolita, originaria del África ecuatorial, de donde emigró dispersándose por casi todo el planeta, con excepción de la Antártida aproximadamente desde el siglo X a través de rutas comerciales (Keller, 2007). Se estima que llegó al continente americano desde el siglo XVI debido a la expansión europea (Osten-Sacken, 1862). Se alimenta de fruta en descomposición y tiene un ciclo de vida holometábola con cuatro etapas principales, huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1). Las hembras adultas ponen sus huevos en frutas maduras, materia orgánica en descomposición o levadura fermentada (Markow & O'Grady, 2005). Exhiben un marcado dimorfismo sexual, donde las hembras son más grandes que los machos. Estos últimos presentan un abdomen delgado y oscuro hacia la parte terminal por la fusión de bandas abdominales, tienen peines o crestas sexuales en el primer par de patas y ganchos genitales que utilizan para adherirse a la hembra durante el apareamiento (Figura 1), (Martín-Nieto & Maldonado, 2010). Son organismos ectotermos, es decir su fuente principal de calor es externo, lo que significa que su tasa de desarrollo, metabolismo y comportamiento depende de la temperatura ambiental (González-Tokman et al., 2020; Santalla et al., 2016). *Drosophila melanogaster* es un organismo modelo ampliamente utilizado en estudios, como lo son investigaciones científicas que incluyen estudios sobre genética (Castro & Carareto, 2004), evolución (Higueras, 2017), comportamiento (Betti, 2016; Rey Mateos, 2021) y fisiología térmica (Bozinovic et al., 2011; Cavieres et al., 2020). Entre los motivos de su utilización son por la facilidad de manejo en el laboratorio, su ciclo de vida corto y su genoma bien caracterizado (Ashburner, 1989).

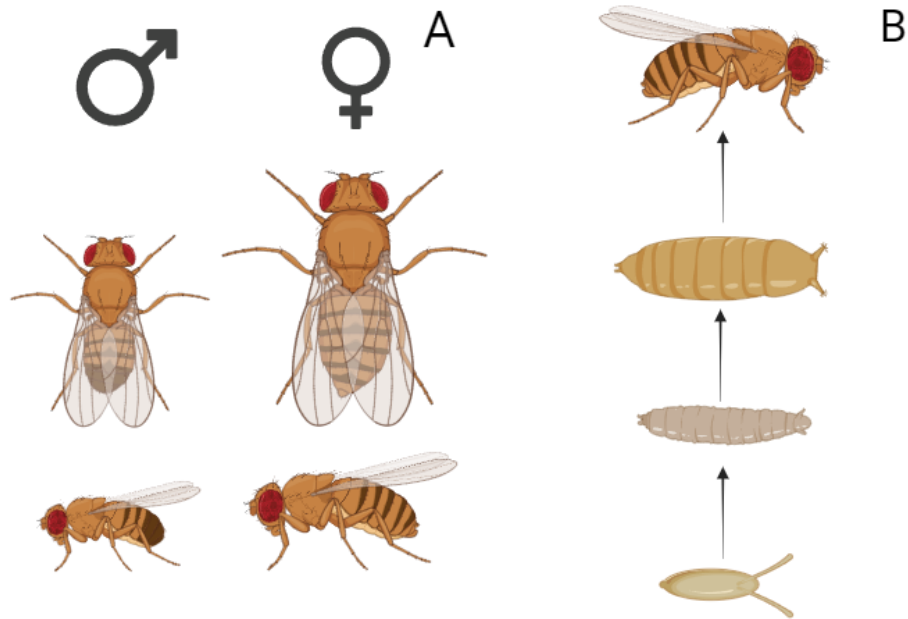


Figura 1. Ilustración de *Drosophila melanogaster*. A) dimorfismo sexual en individuos adultos, y B) ciclo de vida con distintos estadios del desarrollo: huevo, larva, pupa y adultos.

Captura, mantención y diseño experimental

Se colectaron cerca de 250 individuos adultos de la especie de *Drosophila melanogaster* en la zona central de Chile ($33^{\circ}26$ S; $70^{\circ}39$ W a 500 m sobre el nivel del mar), durante el verano del 2021 en ~ 1200 m². Luego de la captura, las moscas fueron transportadas al Laboratorio de Ecofisiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, ubicado en la Región Metropolitana para la identificación taxonómica en base a rasgos morfológicos (Markow & O' Grady, 2005), y subsecuente establecimiento en el laboratorio. Tres grupos fueron formados con aproximadamente 80 moscas cada uno (1:1, macho: hembra), estos fueron mantenidos en cajas de acrílico de 20x15x15cm, dentro de cámaras climáticas Pitec-Bioref19L, bajo condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (Luz: Oscuridad 16:8h) por tres generaciones con medio de cultivo Burdick (Figura 2). Para mantener un régimen de generación discreto, se permitió que las moscas depositaran huevos durante 24hrs en nuevos platos de comida colocados en cada caja. A continuación, aprox. 100 huevos se depositaron en botellas de mantención con 250 ml de medio de cultivo para evitar efectos de hacinamiento (Figura 2). A medida que las moscas fueron eclosionando se transfirieron a una nueva caja. El tamaño de la población dentro de cada caja varió entre

aproximadamente 1000 y 1500 individuos adultos reproductores, esta población de moscas constituyó el stock del laboratorio. Se colectaron los huevos de individuos de la cuarta generación pertenecientes al stock del laboratorio y se asignaron aleatoriamente a 4 tratamientos de temperatura: 21, 24, 27 y 30°C, cada tratamiento térmico contó con réplicas experimentales (Figura 2). Las réplicas experimentales para los tratamientos 21, 24 y 30°C fueron N=3 y para el tratamiento 27°C hubo N=2, N° total = 11 réplicas. Las moscas fueron mantenidas en cada tratamiento/réplica por 17 generaciones donde se realizaron ensayos de tolerancia térmica en individuos adultos (10± días de edad), para evaluar el efecto del ambiente térmico sobre la tolerancia al calor de los individuos.

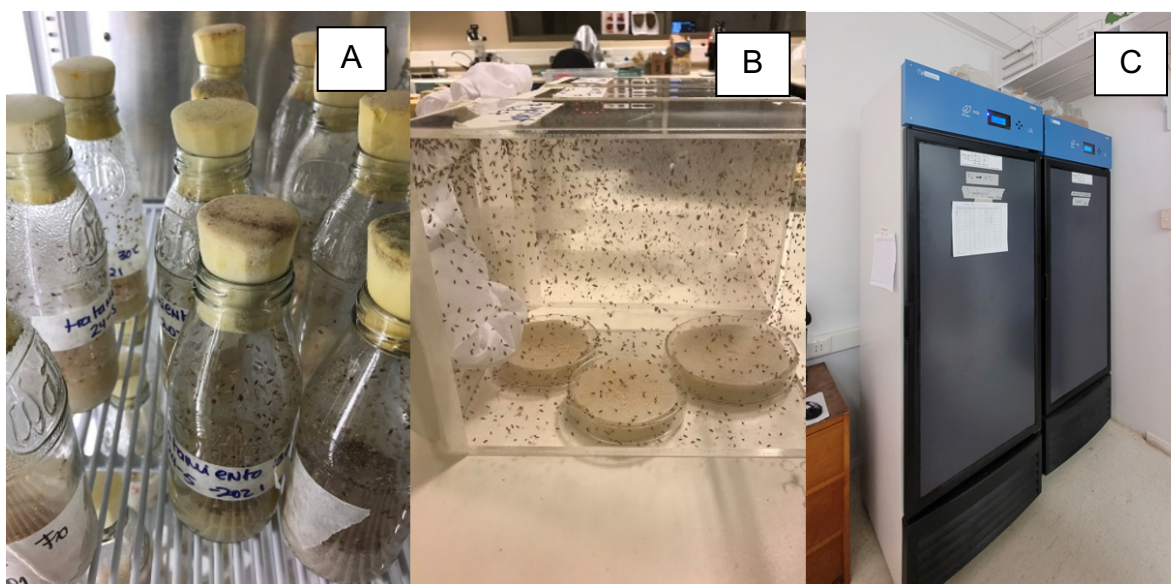


Figura 2. Protocolo de mantención *Drosophila melanogaster* en el laboratorio A) Moscas mantenidas desde etapa de huevo hasta la eclosión a adulto en botellas de vidrio, B) Individuos adultos recién eclosionados mantenidos cajas de acrílico con medio de cultivo para alimentación y ovoposición, las moscas, C) Cámara climáticas con control de temperatura ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo.

Ensayos de tolerancia al calor: Curvas TDT

Se cuantificó la tolerancia al calor en individuos adultos (10± días de edad) expuestos durante 17 generaciones a uno de los siguientes tratamientos térmicos, correspondientes a 21, 24, 27 y 30°C siguiendo el protocolo descrito por (Castañeda et al., 2015). Brevemente,

medimos la tolerancia térmica en 50 individuos simultáneamente en un baño termorregulado (46 cm × 35 cm × 35 cm, Figura 3) que contiene una rejilla con 4 filas × 15 columnas de viales, con ~25 individuos por sexo aleatorizados dentro de cada baño. Se utilizaron 5 temperaturas constantes en los ensayos térmicos (T_{ens}): 36, 37, 38, 39 y 40°C, los ensayos para cada temperatura se hicieron por duplicado ($2 \times T_{ens}$). La temperatura del agua fue controlada mediante una unidad de calefacción programable que también garantizaba una correcta circulación del agua (JULABO ED, JULABO Labortechnik, Seelbach, Alemania). El comportamiento de cada mosca se registró utilizando una cámara de video digital HD (SONY HDR-CX110E, Tokio, Japón) donde se grabó el tiempo hasta la muerte. Este se estimó como el período requerido para que cada individuo pierda la coordinación motora o cese la actividad (Terblanche et al., 2006; Figura 4). Con este diseño, los ensayos de tolerancia al calor involucraron un total de $n = 6000$ moscas (50 individuos × 5 temperaturas de ensayo × 2 videos × 4 temperaturas de tratamiento × 3 réplicas).

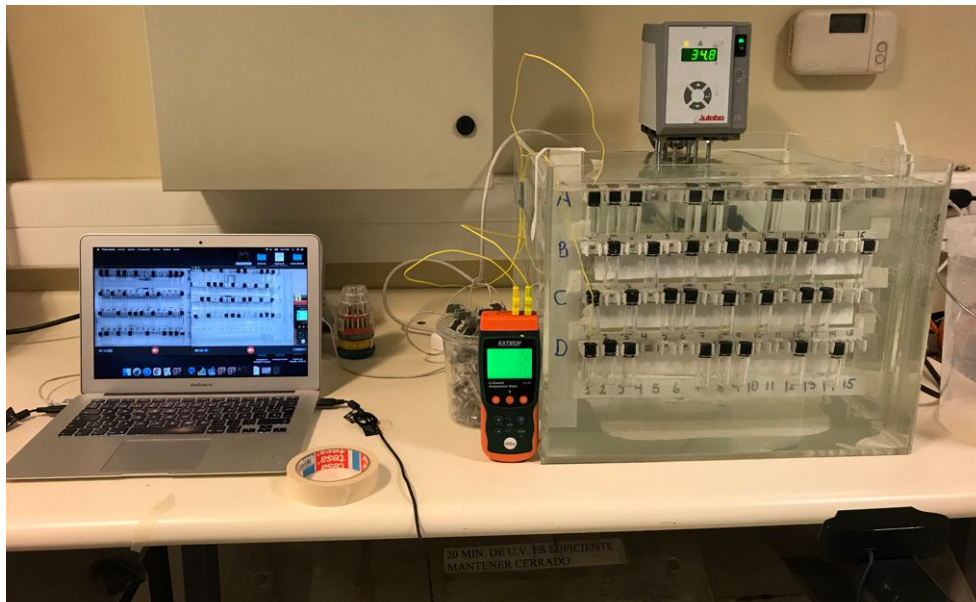


Figura 3. Medición de tolerancia térmica en *Drosophila melanogaster* aclimatadas durante 17 generaciones a 21, 24, 27 y 30°C. La figura muestra un ensayo de tiempo de muerte térmica grabado con una cámara de video HD conectada a un computador junto al baño termorregulado, para posteriormente cuantificar el tiempo de colapso (ver metodología).

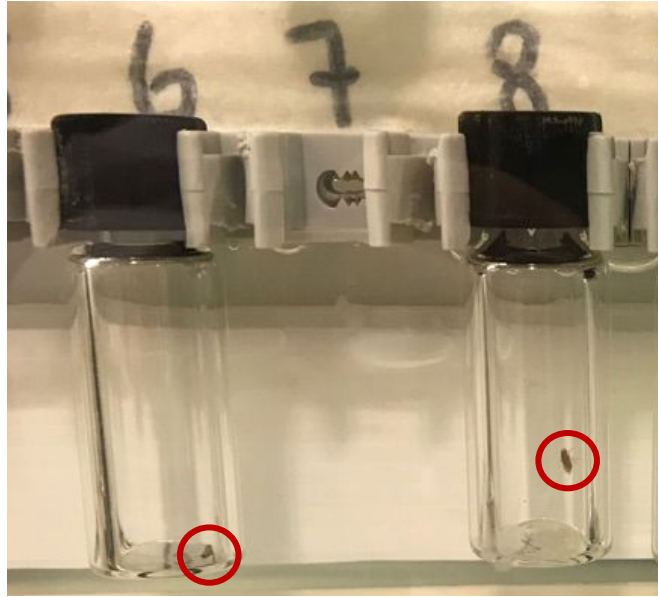


Figura 4. Representación de colapso de *Drosophila melanogaster* durante ensayos de tiempo de muerte térmica medidos a 36, 37, 38, 39 y 40°C. El vial N°6 muestra la pérdida de capacidad locomotora (i.e., colapso o muerte térmica).

Análisis estadísticos

Las curvas de muerte térmica (TDT) fueron estimadas para cada tratamiento y sexo, utilizando regresiones lineales entre la temperatura de ensayo (°C) y el tiempo de colapso en escala logarítmica ($\log_{10}t$), seguido por una transformación inversa $CT_{max} = -$ intercepto/pendiente, y $Z = 1/\text{pendiente}$ (Rezende et al., 2014). Para evaluar las potenciales asociaciones entre los parámetros de la TDT, CT_{max} y Z , y la temperatura de aclimatación realizamos un análisis de regresión lineal. Adicionalmente se cuantificaron las curvas de probabilidad de supervivencia durante los desafíos térmicos para todos los tratamientos como describe Castañeda et al. (2015). En estas curvas de supervivencia, el tiempo (t) corresponde al tiempo requerido para que ocurra el 50% de mortalidad de los individuos (Rezende et al., 2020). Las diferencias en tolerancia al calor entre tratamientos y sexos fueron evaluadas utilizando Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) mediante el paquete lmn4 del software. Este análisis permitió controlar la no independencia de datos, dada por las réplicas de tratamientos: R1, R2, R3, y por las réplicas de ensayos térmicos. El GLMM incluyó $\log_{10}t$ como variable dependiente, y tratamiento térmico (T_{trat}), temperatura de ensayo (T_{ens}) y sexo

como factores independientes (Tabla 1). La incorporación de estos factores en el modelo fue evaluada mediante una selección de modelos utilizando el criterio de información de Akaike para muestras finitas (AICc). Los modelos se compararon utilizando tanto, valores delta AIC (Δ_i) que corresponde a una medida de cada modelo con relación al mejor modelo, como también los pesos del modelo, que corresponde a una medida de la evidencia que respalda un modelo específico.

Todos los análisis estadísticos se hicieron con el software R versión 4.3.2 (<https://www.r-project.org/>).

Resultados

De un total de 5226 mediciones individuales del tiempo de supervivencia ($Log_{10}t$) obtuvimos curvas de probabilidad de supervivencia para cada tratamiento experimental. La Figura 5 muestra que la probabilidad de supervivencia se ve afectada tanto por el tratamiento térmico (T_{trat}) como por la temperatura del ensayo térmico (T_{ens}). En términos generales, el análisis visual muestra un incremento de la probabilidad de supervivencia de *D.melanogaster* a mayor T_{trat} . Por el contrario, con el incremento de T_{ens} hay una marcada disminución de la probabilidad de supervivencia. Las temperaturas de 27 y 30°C tienen un efecto notorio en las tasas de mortalidad a temperaturas menos extremas, particularmente a 36 y 37°C, mientras que en las temperaturas más altas prevalece el impacto del estrés térmico (Figura 5). Las curvas TDT (Figura 6) muestran la misma tendencia, organismos provenientes de tratamientos de altas temperaturas sobreviven por más tiempo en distintas T_{ens} . Paralelamente, el tiempo de supervivencia disminuye a medida que aumenta T_{ens} .

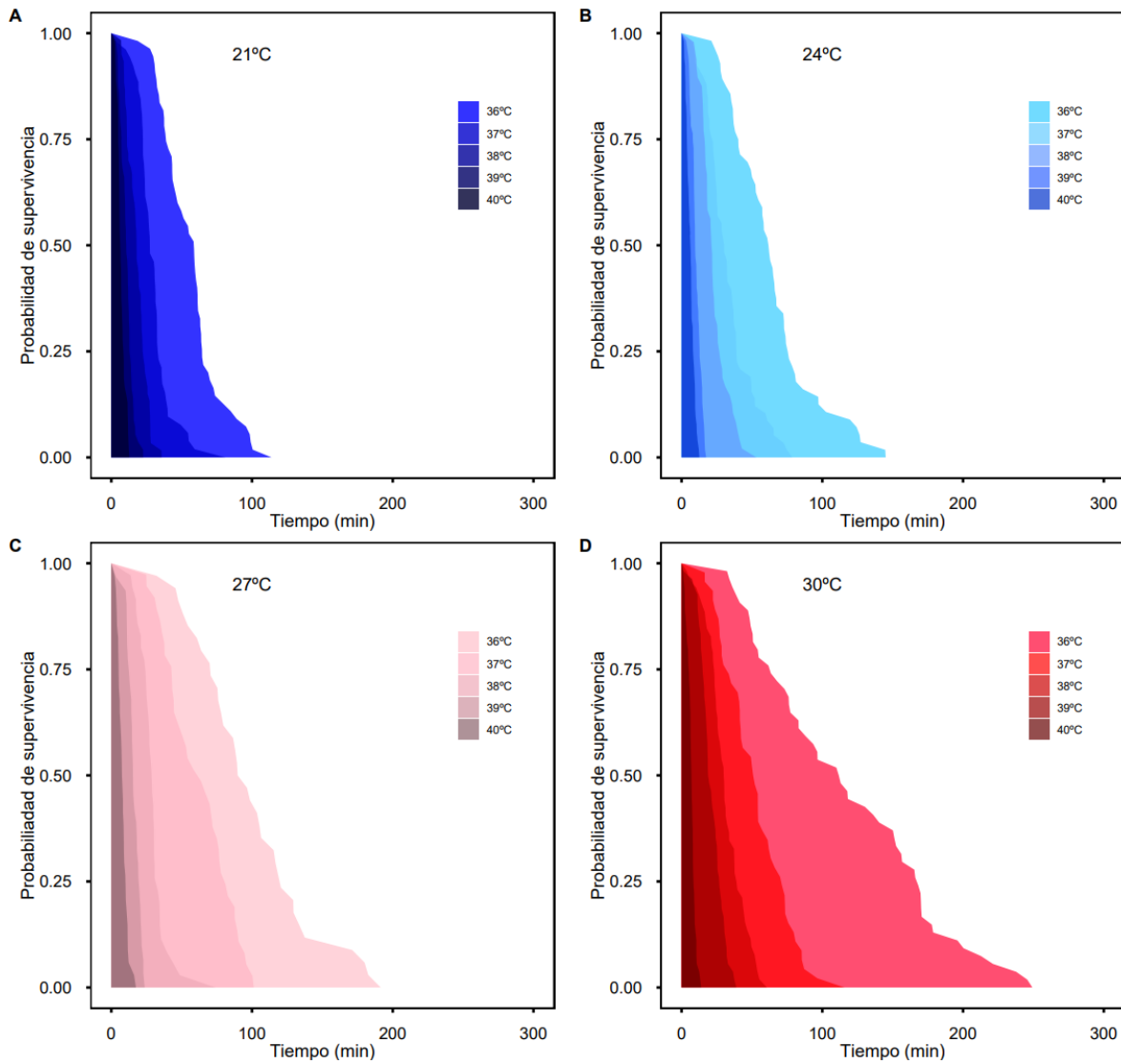


Figura 5. Curvas de supervivencia obtenidas a diferentes temperaturas para moscas aclimatadas a 21, 24, 27 y 30°C, y sometidas a diferentes temperaturas de ensayos térmicos (36, 37, 38, 39 y 40°C). Las mediciones involucraron $n = 5252$ individuos.

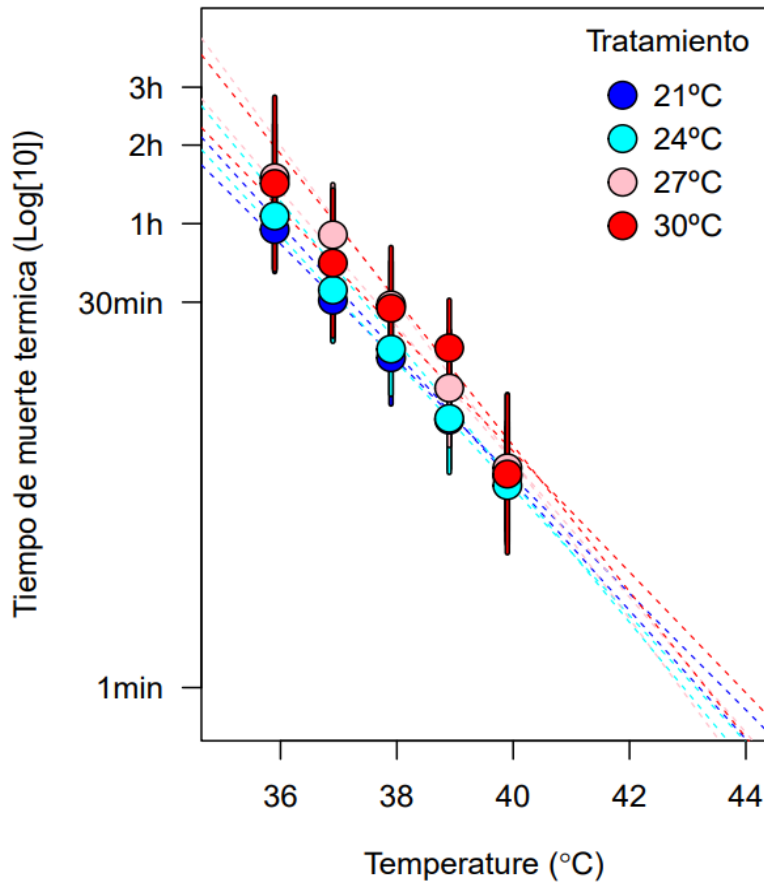


Figura 6. Tolerancia al calor en moscas aclimatadas a 21, 24, 27 y 30°C, expresada como curvas de muerte térmica (TDT). Los parámetros CT_{max} y Z representan, respectivamente, la tolerancia térmica después de una exposición de $t=1$ min (es decir, la temperatura que intercepta la abscisa) y la diferencia de temperatura requerida para aumentar t en un orden de magnitud (ver texto principal). Los símbolos en azul, celeste, rosado y rojo representan, respectivamente, temperaturas de aclimatación de 21, 24, 27 y 30°C. Las líneas punteadas corresponden al macho y hembra de cada tratamiento. Los valores se muestran como promedio \pm EE.

La selección de modelos mostro que los factores: temperatura del ensayo térmico, temperatura del tratamiento y sexo impactaron significativamente el tiempo de sobrevivencia de *D. melanogaster* (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la selección de modelos que describen los efectos de la temperatura del ensayo térmico (T_{ens}), la temperatura del tratamiento térmico (T_{Trat}) y sexo sobre el tiempo de sobrevivencia ($Log_{10}t$) en *Drosophila melanogaster*. Se muestran valores de AIC, Δ AIC, Peso (w), y grados de libertad (GL) sus pesos. El modelo con mejor ajuste se muestra en negrita.

Respuesta	Predictores	GL	AIC	Δ AIC	Peso
<i>Log₁₀t</i>	Sexo + T_{ens} + (T_{Trat})	10	-1648.4	269.2	3.4×10^{-59}
	Sexo + T_{ens}	7	-935.9	981.7	6.5×10^{-214}
	Sexo	3	5786.6	7704.5	0×10^0
	(Sexo+ T_{ens} + T_{Trat})²	29	-1917.6	0	1×10^0
	(Sexo+ T_{ens}) ²	11	-1006.4	911.2	1.3×10^{-198}

El ANOVA del modelo seleccionado revelo un significativo efecto del sexo sobre $Log_{10}t$ ($F_{1,5226} = 168$, $p < 0.0001$), específicamente los machos mostraron una disminución de 29% en la sobrevivencia en los ensayos térmicos. Paralelamente, la temperatura del tratamiento térmico (T_{Trat}) tuvo un impacto significativo en el tiempo de sobrevivencia de *D. melanogaster* ($F_{3,5226} = 270.6$, $p = 0.0001$), altos valores de T_{trat} se asociaron con altos valores de sobrevivencia (Figura 5). Por ejemplo, los organismos aclimatados a 24°C aumentaron su tiempo de sobrevivencia en un 3% en comparación a los de 21°C. De manera similar los individuos de los tratamientos de 27 y 30°C incrementaron su tiempo de sobrevivencia en un 11 y 10%, respectivamente, en comparación al tratamiento de 21°C. La prueba *a posteriori* de Tukey, indico que $Log_{10}t$ de los organismos mantenidos a 27 y 30°C fue superior al de los

organismos mantenidos a 24 y 21°C ($p < 0.001$). Además, el tiempo de sobrevivencia fue similar entre 24 y 21°C ($p = 0.996$), y $Log_{10}t$ entre organismos de los tratamientos de 27 y 30°C ($p = 0.999$).

La temperatura del ensayo (T_{ens}) influyó significativamente en $Log_{10}t$ ($F_{4,5226} = 4139.8$, $p < 0.0001$), mostrando una disminución de este último ($Log_{10}t$) a medida que aumentaba la T_{ens} (Figura 5 y 6), donde en los ensayos de 37, 38, 39 y 40°C disminuyeron en promedio su sobrevivencia en un 47, 68, 82 y 91% respectivamente, en relación con la temperatura de 36°C. Además, el test de Tukey reveló diferencias significativas entre $Log_{10}t$ de los organismos sometidos a los T_{ens} , siendo todos diferentes entre sí ($p < 0.001$).

Encontramos efectos de la interacción entre el sexo y T_{Trat} ($F_{3,5226} = 10.4$, $p < 0.0001$), el sexo y T_{ens} ($F_{4,5225} = 23.7$, $p < 0.0001$), así como entre T_{Trat} y T_{ens} ($F_{12,5226} = 15.7$, $p < 0.0001$) sobre $Log_{10}t$. El test de comparaciones múltiples de *Tukey* mostró que los machos de los T_{Trat} de 24, 27 y 30°C disminuyeron en un 5.8, 6.7 y 6% su sobrevivencia en comparación con las hembras de su respectivo tratamiento cada tratamiento (Figura 6). Paralelamente, los machos de los T_{ens} de 36, 37 y 38°C redujeron en un 9, 7 y 5% su $Log_{10}t$ con respecto a las hembras de este T_{ens} . Por otro lado, las interacciones significativas $T_{Trat}:T_{ens}$ fueron las de $T_{ens39}:T_{trat27}$, $T_{ens40}:T_{trat27}$, $T_{ens39}:T_{trat30}$ y $T_{ens40}:T_{trat30}$, en donde disminuye la sobrevivencia en un 58, 44, 67 y 44%, en relación con la temperatura de 36°C de su respectivo T_{Trat} .

El análisis de regresión lineal entre, CT_{max} y Z obtenidos de las curvas TDT para cada sexo y T_{trat} , (Tabla 2), reveló la existencia de una asociación positiva y significativa entre ambas variables ($r^2=0.53$, $F_{(1,6)}=6.81$, $p=0.04$). Sin embargo, a pesar de que el tiempo de sobrevivencia de las moscas fue afectado significativamente por T_{trat} , T_{ens} , y el sexo (Tabla 1, Figura 5 y 6), el análisis de regresión no mostró una asociación significativa entre los parámetros CT_{max} y Z con T_{trat} (CT_{max} : $F_{(1,6)}=0.89$, $p=0.38$; Z : $F_{(1,6)}=0.7$, $p=0.43$)

Tabla 2. Temperatura crítica superior (CT_{max}) y sensibilidad térmica (Z) de machos y hembras *Drosophila melanogaster* provenientes de diferentes ambientes térmicos (T_{trat}), obtenidos a partir de las curvas de muerte térmica (TDT).

T_{trat}	<i>Sexo</i>	CT_{max} (°C)	Z (°C)
21°C	Macho	43.6	4.5
	Hembra	43.1	4
24°C	Macho	43.1	4.1
	Hembra	42.9	3.7
27°C	Macho	43.4	3.8
	Hembra	43	3.4
30°C	Macho	44.3	4.5
	Hembra	43.2	3.5

Discusión

La capacidad de responder a desafíos ambientales puede ser clave en un mundo que está en constante cambio. En este estudio, evaluamos la existencia de ajustes en la tolerancia al calor de *Drosophila melanogaster* en respuesta a la variación en el ambiente térmico experimentado a lo largo de 17 generaciones. Nuestros resultados revelaron que la temperatura de tratamiento, la temperatura de ensayo térmico y el sexo son factores determinantes en la tolerancia al calor de *D. melanogaster*.

El tiempo de sobrevivencia en distintos ensayos térmicos fue dependiente del tratamiento térmico (Figura 6). Por ejemplo, en ensayos a 36°C el tiempo de sobrevivencia de organismos provenientes de tratamientos de 27 y 30°C fue en promedio 58% superior al encontrado en organismos de 21 y 24°C. En este sentido, una mayor expresión de proteínas de choque térmico (HSP, del inglés Heat Shock Proteins) y de enzimas antioxidantes (Apel & Hirt, 2004; Navarro, 2020), podrían explicar el incremento de la sobrevivencia a medida que incrementó T_{Trat} (estos ítems no fueron evaluados en este estudio). Estas proteínas funcionan como chaperonas moleculares para el correcto ensamblaje de otras proteínas. Varios estudios han reportado que existe una sobreexpresión de genes Hsp70 como respuesta a choques de calor, tanto en respuestas a condiciones extremas de cortos períodos de tiempo (horas o días) como en largos períodos de tiempo (meses o estaciones) en especies de diversos órdenes como, Coleóptera (Yuan et al., 2014), Hemíptera (Qiao et al., 2015), Lepidóptera (Wang et al., 2015) y Díptera (Cheng et al., 2016). Bajo estrés térmico también se han reportado la sobreexpresión de proteínas chaperonas de la familia Hsp90, la cual está involucrada en procesos fisiológicos importantes como control del ciclo celular, sobrevivencia celular y señales hormonales (Buchner & Li, 2013; Jackson, 2013). Esta proteína puede representar entre 1% y 2% del total de proteínas de células en condiciones normales y, bajo condiciones de estrés térmico, son inducidas a niveles que alcanzan hasta el doble de su cantidad en condiciones normales (Whitesell & Lindquist, 2005), sumado a que en diversas especies de insectos se ha registrado la expresión de genes Hsp90 como respuesta al estrés por altas temperaturas. Por ejemplo, Colinet et al. (2013) investigaron la respuesta proteómica de adultos de *D. melanogaster* donde los organismos mantenidos a altas

temperaturas incrementaron su expresión HSP. En *Grapholita molesta* (Lepidóptera) se incrementó su expresión a medida que se sometía a condiciones de estrés por calor, a temperaturas cada vez más altas (26° a 44°C) y por períodos de tiempo más extensos, de 15 a 105 min (Chen et al., 2013). Además, en *L. oryzophilus* (Coleóptera) dos genes de Hsp90 fueron sobre expresados en condiciones de estrés térmico a 43°C (Yuan et al., 2014).

La temperatura del ensayo térmico también afectó la sobrevivencia de *Drosophila melanogaster*, altas temperaturas de ensayo tuvieron efectos negativos sobre la sobrevivencia de los organismos. Por ejemplo, los individuos que fueron mantenidos a 21 y 24°C, soportaron en promedio 6 y 5 minutos a 40°C, respectivamente, mientras que sus contrapartes de temperaturas a 27 y 30°C toleraron 7 y 8 minutos, respectivamente, a la misma temperatura del ensayo térmico (Figura 6). Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han demostrado que el daño por calor en los insectos provoca una serie de trastornos a nivel molecular, bioquímico y fisiológico (Bowler, 2018; Chown & Nicolson, 2004). Por ejemplo, el calor extremo provoca la desnaturalización de las proteínas (Angilletta, 2009; King & MacRae, 2015), alteraciones en la fluidez de las membranas fosfolipídicas y la homeostasis celular (Angilletta, 2009; Bowler, 2018). Además, las condiciones de estrés térmico generan altas concentraciones de especies de oxígeno reactivas (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) en las células de los insectos, provocando daño oxidativo en proteínas, ADN y lípidos en las células (Apel & Hirt, 2004). Para contrarrestar los efectos dañinos de ROS, las células podrían aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y peroxidasas (POD) (Kang et al., 2017; Zhang et al., 2015). Paralelamente, se ha reportado que altas temperaturas pueden alterar el equilibrio iónico celular, lo que afecta de manera negativa las funciones neurofisiológicas (O’Sullivan et al., 2017) así como dañar las mitocondrias (Bowler, 2018) y, además, provoca un aumento en la pérdida de agua, lo que resulta en la muerte por desecación (Chown et al., 2011).

Nuestros resultados mostraron una interacción entre T_{Trat} y T_{ens} . Los organismos de T_{trat27} y $T_{trat30}^{\circ}\text{C}$, de igual forma que los otros T_{Trat} , fueron afectados negativamente en su $\text{Log}_{10}t$ a medida que aumentaba T_{ens} , lo que se puede visualizar en la proximidad de los puntos promedio de cada T_{Trat} en la $T_{ens40}^{\circ}\text{C}$ (Figura 6). Sin embargo, a pesar de que ocurre esta

disminución en el tiempo, los organismos mantenidos a 30°C toleraron un 20% más la exposición a 40°C en comparación con los individuos mantenidos a 21°C. Una serie de estudios experimentales comparativos han mostrado que los ectotermos responden a la variabilidad térmica cuando los individuos han vivido en ambientes de mayores temperaturas (Gu et al., 2019; A. A. Hoffmann & Parsons, 1989; Karl et al., 2009; Rodríguez-Romero et al., 2016; Zhang et al., 2015). Por ejemplo, al estudiar la tolerancia térmica en *Drosophila melanogaster*, Krebs & Feder (1997) indicaron que tanto el incremento en la temperatura como la duración de la exposición térmica en larvas, favoreció la concentración de HSP70, además de incrementar la tolerancia al estrés y disminuir el tiempo de desarrollo en larvas. Por otra parte, Colinet et al., (2013) aclimataron a individuos de *D. melanogaster* a altas y bajas temperaturas, evidenciando que moscas mantenidas a mayores temperaturas incrementaron la tolerancia al calor (CT_{max}) y la sobrevivencia.

El tiempo de sobrevivencia en ensayos térmicos varió entre sexos, observándose que los machos presentaron un menor $Log_{10}t$ en comparación con las hembras. En promedio, estas últimas presentaron un aumento de un 29% en su $Log_{10}t$ en comparación con los machos, esto se puede visualizar en las curvas TDT (Figura 6) junto con los valores de Z o de las pendientes (Tabla 2), ya que en cada T_{Trat} los machos obtuvieron mayores valores de Z lo que genera una mayor inclinación en las curvas que son representadas por las líneas punteadas. Una pendiente más pronunciada indica que la tasa de mortalidad aumenta rápidamente a medida que aumenta T_{ens} , respaldando que los machos mueren luego de estar expuestos por un menor periodo de tiempo. Adicionalmente, el sexo presentó una interacción entre T_{ens} y T_{Trat} . Durante los ensayos térmicos a 36°C las hembras del tratamiento térmico de 21°C soportaron en promedio 11 minutos más que los machos ($CT_{max} = 43.1^{\circ}C$, $Z = 4^{\circ}C$; y $CT_{max} = 43.6^{\circ}C$, $Z = 4.5^{\circ}C$, respectivamente), y en el tratamiento de 30°C soportaron en promedio 31 minutos más que los machos ($CT_{max} = 43.2^{\circ}C$, $Z = 3.5^{\circ}C$; y $CT_{max} = 44.3^{\circ}C$, $Z = 4.5^{\circ}C$, respectivamente, los cálculos se realizaron reorganizando la Ecuación 1). Diferentes estudios han demostrado que la hembra tiene mayor tolerancia al calor que los machos, tanto ante temperaturas extremas como ante variaciones ligeras de la temperatura normal (Andersen et al., 2006; Dahlggaard et al., 1998; Lansing et al., 2000; Sørensen et al., 1999, 2005), por lo tanto, poseen una tasa de supervivencia y de longevidad mayor (Jin et al., 2020).

Chang et al. (2018) han sugerido que el aumento de tolerancia térmica se debe a la diferencia de expresión de HSP entre machos y hembras (estas últimas presentaron mayor concentración), esto puede deberse a que la evolución ha favorecido a las hembras con mayor tolerancia térmica para poder preservar la fecundidad. Esto se plantea debido a la diferencia en la inversión energética a la hora de la reproducción (Gonzalez, 2015), ya que después de la fecundación los huevos permanecen dentro del vientre de las hembras durante las primeras etapas del desarrollo embrionario hasta que son depositados en el medio de cultivo (Aldeco, 2019). Otra de las evidencias que podrían sustentar esto es la sensibilidad (Chacón & Peralta, 2022), los insectos hembra en su mayoría, son más capaces de responder a las condiciones ambientales cambiantes que los machos (Jin et al., 2020). Una tercera explicación es la capacidad de recuperación de los individuos. Estudios realizados con especies del género *Drosophila* han demostrado que las temperaturas extremas, sean estas de calor o frío (Chacón & Peralta, 2022), conducen a esterilidad en machos (Hoffmann et al., 2003), además de esto se ha registrado que, en etapas tempranas existe la expresión de Hsps en ovarios y tejidos embrionarios de hembras, mientras que las estructuras reproductivas de los machos carecen de esta expresión (Jin et al., 2020; Kang et al., 2017).

Nuestros resultados mostraron una asociación significativa entre CT_{max} y Z , indicando que los organismos que resisten temperaturas más altas lo hacen durante un menor periodo de tiempo en comparación a aquellos que resisten temperaturas más bajas, concordando con nuestra hipótesis de que los organismos con una mayor tolerancia al calor presentan una disminución del tiempo de exposición, sugiriendo un compromiso o trade-off entre CT_{max} y Z , lo que se ve reflejado con la intensidad de la temperatura y el tiempo de exposición que pueden tolerar los individuos (Castañeda et al., 2015). Rezende et. Al. (2014) sugieren que, en entornos relativamente constantes, generalmente se deberían preferir valores bajos de Z en detrimento de un alto CT_{max} . Los resultados sugieren que existe una relación entre la tolerancia al calor y la historia de vida, ya que los individuos se mantuvieron durante 17 generaciones en el mismo ambiente térmico, lo que les permitió desarrollar respuestas adaptadas al entorno (Salinas et al., 2013). Este compromiso entre CT_{max} y Z ha sido reportada en investigaciones previas como en Castañeda et al. (2015), donde se evaluó la tolerancia al calor en *Drosophila suboscuro* de 5 localidades diferentes y de manera similar en Alruiz et al. (2022) con diferentes especies del género *Drosophila*. Sin embargo, de

manera opuesta a estas investigaciones, observamos que los valores de CT_{max} no cambiaron entre tratamientos térmicos. Posibles causas a la diferencia de nuestros resultados con lo reportado por Alruiz et al. (2022) y Castañeda et al. (2015), son el número de curvas TDT empleadas para los análisis: 8 de nuestro estudio vs 40 y 60 en los estudios de Alruiz et al., (2022) y Castañeda et al. (2015) respectivamente, además de que nuestro estudio es a nivel intraespecífico y no interespecífico como los estudios anteriormente mencionados. Por otra parte, una serie de estudios han demostrado que CT_{max} es un rasgo conservado (Addo-Bediako et al., 2000; Araújo et al., 2013; Chown & Terblanche, 2006; Hoffmann et al., 2013), debido a restricciones evolutivas (Araújo et al. 2013) y fisiológicas (Hochachka & Somero, 2002; Somero, 2000).

Aun cuando este trabajo solo contempla el efecto del ambiente térmico en la última generación, datos no publicados por Cavieres et al. (2024) muestran que hay un aumento en la longevidad en comparación con la primera generación. Por ejemplo, la primera generación (F1) a 21°C vive en promedio 11% menos que los de la generación 17 (F17) y en el tratamiento térmico de 30°C F1 vive en promedio 31% menos que los individuos de F17. Estos hallazgos resaltan la importancia de incorporar estudios que aumenten las escalas temporales en estudios de fisiología térmica para evitar subestimar la capacidad adaptativa potencial de los organismos ante el estrés térmico y cambio climático.

Conclusión

Los resultados de este estudio indican que el proceso de adaptación de *Drosophila melanogaster* al aumento de la temperatura es una característica compleja, influenciada por múltiples factores, como lo son el sexo y el tiempo que perdura el estrés térmico. Encontramos que el sexo desempeña un papel importante en estas respuestas, dado que las hembras mostraron una mayor capacidad para adaptarse a las temperaturas, lo que pone en manifiesto la importancia de considerar el factor sexual en estudios de adaptación al cambio climático. Además, observamos que la temperatura del tratamiento y del ensayo térmico tuvieron un impacto significativo en la capacidad de sobrevivencia de *Drosophila melanogaster* a lo largo de 17 generaciones. Las moscas mantenidas a mayores temperaturas del tratamiento mostraron una mayor sobrevivencia en comparación con las de tratamientos que poseían temperaturas más bajas. Sin embargo, con temperaturas extremadamente altas durante el ensayo (39 y 40°C), ocurría el mismo efecto para los organismos de los cuatro tratamientos, disminuyendo significativamente su sobrevivencia, ya que estas eran letales para *D. melanogaster*. En la temperatura del tratamiento de 24 y 27°C disminuyó CT_{max} y Z, por el contrario, a 30°C aumentó su CT_{max} y disminuyó su Z. Esto sugiere que el paso de 17 generaciones fue crucial para permitir que las moscas se adaptaran gradualmente al aumento de las temperaturas. La exposición prolongada a condiciones ambientales más cálidas puede tener un efecto positivo en la capacidad de supervivencia de las moscas en generaciones posteriores. Esto se ve reflejado en los parámetros CT_{max} y Z, ya que existió una asociación positiva entre ambos, indicando que los organismos que resisten temperaturas más altas lo hacen durante un menor periodo de tiempo en comparación a aquellos que resisten temperaturas más bajas, pues los machos de todos los tratamientos podían soportar temperaturas que las hembras no, sin embargo, estas toleraron más tiempo en las diferentes temperaturas de ensayo.

Nuestros resultados son fundamentales para comprender la capacidad de adaptación de *Drosophila melanogaster* al aumento de la temperatura ambiental, ya que permite tener una visión completa de como responderían estos individuos durante el estrés térmico en periodos de tiempo que abarcan múltiples generaciones. Sin embargo, se requieren estudios

que evalúen la exposición prolongada sobre la tolerancia térmica en diferentes taxones. Además, es crucial comprender cuales son los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les permiten a estos individuos compensar el estrés térmico. Para lograrlo, se podrían realizar análisis genéticos de las moscas en diferentes etapas de su ciclo de vida, junto con la utilización de la transcriptómica para estudiar los cambios en la expresión génica en respuesta al calor, que revelaría cuales son los genes regulados diferencialmente en las moscas más tolerantes (Arturo et al. 2023). Asimismo, sería relevante investigar el papel de las proteínas de choque térmico en la adaptación al cambio climático. En conjunto, estas investigaciones proporcionarían una comprensión más profunda de cómo los organismos se adaptan al cambio climático, esta información sería vital para desarrollar estrategias que ayuden a las especies a hacer frente a las crecientes temperaturas ambientales. Estos avances científicos nos permitirían predecir y comprender mejor las respuestas de los organismos ante el aumento de las temperaturas y, de esta manera, desarrollar soluciones efectivas para enfrentar los desafíos del cambio climático.

Bibliografía

- Abram, P. K., Boivin, G., Moiroux, J., & Brodeur, J. (2017). Behavioural effects of temperature on ectothermic animals: Unifying thermal physiology and behavioural plasticity. *Biological Reviews*, 92(4), 1859-1876. <https://doi.org/10.1111/brv.12312>
- Addo-Bediako, A., Chown, S. L., & Gaston, K. J. (2000). Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1445), 739-745.
- Aldeco, R. I. G. (2019). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las larvas de *Drosophyla melanogaster*. *BInvestigación*, 1.
- Alruiz, J. M., Peralta-Maraver, I., Bozinovic, F., Santos, M., & Rezende, E. L. (2022). Temperature adaptation and its impact on the shape of performance curves in *Drosophila* populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(1998), 20230507. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0507>
- Andersen, J. P., Schwartz, A., Gramsbergen, J. B., & Loeschcke, V. (2006). Dopamine levels in the mosquito *Aedes aegypti* during adult development, following blood feeding and in response to heat stress. *Journal of Insect Physiology*, 52(11), 1163-1170. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.08.004>
- Angilletta, M. J. (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. OUP Oxford.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Araújo, M. B., Ferri-Yáñez, F., Bozinovic, F., Marquet, P. A., Valladares, F., & Chown, S. L. (2013). Heat freezes niche evolution. *Ecology letters*, 16(9), 1206-1219.
- Armstrong, J. W., Tang, J., & Wang, S. (2009). Thermal Death Kinetics of Mediterranean, Malaysian, Melon, and Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Eggs and Third Instars. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 522-532. <https://doi.org/10.1603/029.102.0209>
- Arturo, M. H. B. L., Elvia, S. M. A., Alejandro, D. L. C. C. H., Alfredo, C. O. J., Javier, C. A. F., Leticia, B. O. S., ... & Isabel, H. P. R. (2023). Transcriptómica.

- Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Bale, Dahlgaard, J., & Tambs-Lyche. (2002). Effects of thermal acclimatization on the lethal temperatures of arthropods. *Journal of Insect Physiology*, 48,7, 432-442.
- Betti, M. I. L. (2016). *Genómica poblacional del comportamiento de oviposición en Drosophila melanogaster*.
- Bowler, K. (2018). *Heat death in poikilotherms: Is there a common cause?* - ScienceDirect. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306456518302596?casa_token=ImfbpjIQIYUAAAAA:zMBWMA-agpSfvifbL2DGM6AzqTR6hDxyctZl2pMP05k8ZS8STXZFrm8SCZwZJtNe2M2EyfP
- Bozinovic, F., Bastías, D. A., Boher, F., Clavijo-Baquet, S., Estay, S. A., & Angilletta, M. J. (2011). The Mean and Variance of Environmental Temperature Interact to Determine Physiological Tolerance and Fitness. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(6), 543-552. <https://doi.org/10.1086/662551>
- Buchner, J., & Li, J. (2013). Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. *Biomedical Journal*, 36(3), 106. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.113230>
- Castañeda, L. E., Rezende, E. L., & Santos, M. (2015). Heat tolerance in *Drosophila subobscura* along a latitudinal gradient: Contrasting patterns between plastic and genetic responses: Plastic and genetic responses of heat tolerance. *Evolution*, 69(10), 2721-2734. <https://doi.org/10.1111/evo.12757>
- Castro, J. P., & Carareto, C. M. A. (2004). *Drosophila melanogaster* P Transposable Elements: Mechanisms of Transposition and Regulation. *Genetica*, 121(2), 107-118. <https://doi.org/10.1023/B:GENE.0000040382.48039.a2>
- Cavieres, G., Alruiz, J. M., Medina, N. R., Bogdanovich, J. M., & Bozinovic, F. (2019). Transgenerational and within-generation plasticity shape thermal performance curves. *Ecology and evolution*, 9(4), 2072-2082.
- Cavieres, G., Rezende, E. L., Clavijo-Baquet, S., Alruiz, J. M., Rivera-Rebella, C., Boher, F., & Bozinovic, F. (2020). Rapid within- and transgenerational changes in thermal tolerance and fitness in variable thermal landscapes. *Ecology and Evolution*, 10(15), 8105-8113. <https://doi.org/10.1002/ece3.6496>
- Cerdá, X., & Retana, J. (2000). Alternative strategies by thermophilic ants to cope with

- extreme heat: Individual versus colony level traits. *Oikos*, 89(1), 155-163. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.890117.x>
- Cerdá, X., Retana, J., & Cros, S. (1998). Critical thermal limits in Mediterranean ant species: Trade-off between mortality risk and foraging performance. *Functional Ecology*, 12(1), 45-55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00160.x>
- Chacón, M. J., & Peralta, D. V. (2022). Los genes y proteínas Hsp frente al estrés térmico en insectos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 43(1), 25-35.
- Chang, Y.-W., Zhang, X.-X., Chen, J.-Y., Lu, M.-X., Gong, W.-R., & Du, Y.-Z. (2018). Characterization of three heat shock protein 70 genes from *Liriomyza trifolii* and expression during thermal stress and insect development. *Bulletin of Entomological Research*, 109(2), 150-159. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000354>
- Chen, H., Xu, X.-L., Li, Y.-P., & Wu, J.-X. (2013). Characterization of heat shock protein 90, 70 and their transcriptional expression patterns on high temperature in adult of *Grapholita molesta* (Busck). *Insect Science*, 21(4), 439-448. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12057>
- Cheng, W., Li, D., Wang, Y., Liu, Y., & Zhu-Salzman, K. (2016). Cloning of heat shock protein genes (*hsp70*, *hsc70* and *hsp90*) and their expression in response to larval diapause and thermal stress in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*. *Journal of Insect Physiology*, 95, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.09.005>
- Chidawanyika, F., Nyamukondiwa, C., Strathie, L., & Fischer, K. (2017). Effects of Thermal Regimes, Starvation and Age on Heat Tolerance of the Parthenium Beetle *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae) following Dynamic and Static Protocols. *PLOS ONE*, 12(1), e0169371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169371>
- Chown, S. L., Jumbam, K. R., Sørensen, J. G., & Terblanche, J. S. (2009). Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Functional Ecology*, 23(1), 133-140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01481.x>
- Chown, S. L., & Nicolson, S. (2004). *Insect Physiological Ecology: Mechanisms and*

Patterns. OUP Oxford.

- Chown, S. L., Sørensen, J. G., & Terblanche, J. S. (2011). Water loss in insects: An environmental change perspective. *Journal of Insect Physiology*, *57*(8), 1070-1084. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.05.004>
- Chown, S. L., & Terblanche, J. S. (2006). Physiological diversity in insects: Ecological and evolutionary contexts. *Advances in insect physiology*, *33*, 50-152.
- Colinet, H., Lee, S. F., & Hoffmann, A. (2010). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *The FEBS Journal*, *277*(1), 174-185. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07470.x>
- Colinet, H., Overgaard, J., Com, E., & Sørensen, J. G. (2013). Proteomic profiling of thermal acclimation in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *43*(4), 352-365.
- Cowles, R. B., & Bogert, C. M. (2006). Preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Iguana*, *13*(1), 53-60.
- Dahlgaard, J., Loeschcke, V., Michalak, P., & Justesen, J. (1998). Induced thermotolerance and associated expression of the heat-shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, *12*(5), 786-793. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00246.x>
- Engqvist, L., & Reinhold, K. (2016). Adaptive trans-generational phenotypic plasticity and the lack of an experimental control in reciprocal match/mismatch-experiments. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12618>
- Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional ecology*, *21*(3), 394-407.
- Gonzalez Galli, L. M. (2015). *¿ Por qué los machos y las hembras somos tan diferentes?*
- González-Tokman, D., Córdoba-Aguilar, A., Dáttilo, W., Lira-Noriega, A., Sánchez-Guillén, R. A., & Villalobos, F. (2020). Insect responses to heat: Physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews*, *95*(3), 802-821. <https://doi.org/10.1111/brv.12588>
- Gu, L.-L., Li, M.-Z., Wang, G.-R., & Liu, X.-D. (2019). Multigenerational heat acclimation

- increases thermal tolerance and expression levels of Hsp70 and Hsp90 in the rice leaf folder larvae. *Journal of thermal biology*, 81, 103-109.
- Higueras, C. S. (2017). *Evolución y desarrollo de la glándula anular de drosophila melanogaster* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Pablo de Olavide]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=181138>
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford university press.
- Hoffmann, A. A., Chown, S. L., & Clusella-Trullas, S. (2013). Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: How constrained are they? *Functional Ecology*, 27(4), 934-949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02036.x>
- Hoffmann, A. A., Dagher, H., Hercus, M., & Berrigan, D. (1997). Comparing different measures of heat resistance in selected lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43(4), 393-405.
- Hoffmann, A. A., & Parsons, P. A. (1989). An integrated approach to environmental stress tolerance and life-history variation: Desiccation tolerance in *Drosophila*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2), 117-136. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1989.tb02098.x>
- Hoffmann, W. A., Orthen, B., & Nascimento, P. K. V. D. (2003). Comparative Fire Ecology of Tropical Savanna and Forest Trees. *Functional Ecology*, 17(6), 720-726.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2023). *Climate Change 2021 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press; Cambridge Core. <https://doi.org/10.1017/9781009157896>
- Jablonka, E., & Raz, G. (2009). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84(2), 131-176. <https://doi.org/10.1086/598822>
- Jackson, S. E. (2013). Hsp90: Structure and Function. En S. Jackson (Ed.), *Molecular Chaperones* (pp. 155-240). Springer. https://doi.org/10.1007/128_2012_356
- Jin, J., Zhao, M., & Wan, F. (2020). Induced Thermotolerance and Expression of Three Key Hsp Genes (Hsp70, Hsp21, and sHsp21) and Their Roles in the High Temperature Tolerance of *Agasicles hygrophila*. *Frontiers in Physiology*, 10.

- <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01593>
- Kang, Z.-W., Liu, F.-H., Tan, X.-L., & Liu, T.-X. (2017). The Potential Coordination of the Heat-Shock Proteins and Antioxidant Enzyme Genes of *Aphidius gifuensis* in Response to Thermal Stress. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00976>
- Karl, I., Sørensen, J. G., Loeschcke, V., & Fischer, K. (2009). HSP70 expression in the Copper butterfly *Lycaena tityrus* across altitudes and temperatures. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(1), 172-178. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01630.x>
- Keller, A. (2007). *Drosophila melanogaster's* history as a human commensal. [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(06\)02665-0.pdf](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(06)02665-0.pdf)
- Kim, M.-S., Lee, Y. H., Lee, Y., Jeong, H., Wang, M., Wang, D.-Z., & Lee, J.-S. (2024). Multigenerational effects of elevated temperature on host-microbiota interactions in the marine water flea *Diaphanosoma celebensis* exposed to micro- and nanoplastics. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 132877. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132877>
- King, A. M., & MacRae, T. H. (2015). Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 59-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162107>
- Krebs, R. A., & Feder, M. E. (1997). Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell stress & chaperones*, 2(1), 60.
- Krebs, R., & Loeschcke, V. (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional ecology*, 730-737.
- Lansing, E., Justesen, J., & Loeschcke, V. (2000). Variation in the expression of Hsp70, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 25(6), 443-450. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(00\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(00)00008-5)
- Loeschcke, V., & Hoffmann, A. A. (2007). Consequences of Heat Hardening on a Field Fitness Component in *Drosophila* Depend on Environmental Temperature. *The American Naturalist*, 169(2), 175-183. <https://doi.org/10.1086/510632>
- Lutterschmidt, W. I., & Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: History and

- critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1561-1574.
<https://doi.org/10.1139/z97-783>
- Malcolm, J. R., Liu, C., Neilson, R. P., Hansen, L., & Hannah, L. (2006). Global Warming and Extinctions of Endemic Species from Biodiversity Hotspots. *Conservation Biology*, 20(2), 538-548. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00364.x>
- Markow, T. A., & O'Grady, P. (2005). *Drosophila: A Guide to Species Identification and Use*. Elsevier.
- Martín-Nieto, J., & Maldonado, R. (2010). *Drosophila melanogaster*. *Cruzamientos monohíbridos y dihíbridos*. *Genética*.
- Meigen, J. M. (1830). *Systematische Beschreibung der bekannten Europäischen Zweiflügeligen Insekten*. V. 6. <https://obrasraras.usp.br/handle/123456789/1078>
- Mousseau, T. A., & Dingle, H. (1991). Maternal Effects in Insect Life Histories. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 511-534.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002455>
- Navarro, L. (2020). Respuestas moleculares de insectos a factores de estrés ambientales y biológicos. En P. Benavides Machado & C. E. Góngora (Eds.), *El Control Natural de Insectos en el Ecosistema Cafetero Colombiano* (pp. 142-157). Cenicafé.
https://doi.org/10.38141/10791/0001_6
- Osten-Sacken, C. R. (1862). *Catalogue of the Described Diptera of North America*. Smithsonian institution.
- O'Sullivan, J. D. B., MacMillan, H. A., & Overgaard, J. (2017). Heat stress is associated with disruption of ion balance in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Thermal Biology*, 68, 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.04.001>
- Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C., & Thomas, M. B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology*, 19(8), 2373-2380.
<https://doi.org/10.1111/gcb.12240>
- Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. JHU Press.
- Qiao, L., Wu, J. X., Qin, D. Z., Liu, X. C., Lu, Z. C., Lv, L. Z., Pan, Z. L., Chen, H., & Li, G. W. (2015). Gene Expression Profiles of Heat Shock Proteins 70 and 90 From *Empoasca onukii* (Hemiptera: Cicadellidae) in Response to Temperature Stress.

- Journal of Insect Science*, 15(1), 49. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev030>
- Rey Mateos, S. A. del. (2021, marzo). *Análisis de la variación de comportamiento en múltiples poblaciones de Drosophila melanogaster* [Info:eu-repo/semantics/bachelorThesis]. E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM). <https://oa.upm.es/68989/>
- Rezende, E. L., Bozinovic, F., Szilágyi, A., & Santos, M. (2020). Predicting temperature mortality and selection in natural *Drosophila* populations. *Science*, 369(6508), 1242-1245. <https://doi.org/10.1126/science.aba9287>
- Rezende, E. L., Castañeda, L. E., & Santos, M. (2014). Tolerance landscapes in thermal ecology. *Functional Ecology*, 28(4), 799-809. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12268>
- Rodríguez-Romero, A., Jarrold, M. D., Massamba-N'Siala, G., Spicer, J. I., & Calosi, P. (2016). Multi-generational responses of a marine polychaete to a rapid change in seawater pCO₂. *Evolutionary Applications*, 9(9), 1082-1095. <https://doi.org/10.1111/eva.12344>
- Salinas, S., Brown, S. C., Mangel, M., & Munch, S. B. (2013). Non-genetic inheritance and changing environments. *Non-Genetic Inheritance*, 1. <https://doi.org/10.2478/ngi-2013-0005>
- Santalla, M., Portiansky, E. L., & Ferrero, P. V. (2016). *Drosophila melanogaster*, un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas. *Revista argentina de cardiología*, 84(5), 1-2.
- Santos, M., Castañeda, L. E., & Rezende, E. L. (2011). Making sense of heat tolerance estimates in ectotherms: Lessons from *Drosophila*. *Functional Ecology*, 25(6), 1169-1180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01908.x>
- Sheridan, J. A., & Bickford, D. (2011). Shrinking body size as an ecological response to climate change. *Nature Climate Change*, 1(8), 401-406. <https://doi.org/10.1038/nclimate1259>
- Smith, J. M. (1957). Temperature Tolerance and Acclimatization in *Drosophila Subobscura*. *Journal of Experimental Biology*, 34(1), 85-96. <https://doi.org/10.1242/jeb.34.1.85>
- Somero, G. N. (2000). Unity in diversity: A perspective on the methods, contributions, and future of comparative physiology. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 927-937.

- Sørensen, J. G., Michalak, P., Justesen, J., & Loeschcke, V. (1999). Expression of the Heat-Shock Protein HSP70 in *Drosophila Buzzatii* Lines Selected for Thermal Resistance. *Hereditas*, *131*(2), 155-164. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1999.00155.x>
- Sørensen, J. G., Norry, F. M., Scannapieco, A. C., & Loeschcke, V. (2005). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(4), 829-837. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00876.x>
- Tang, J., Ikediala, J. N., Wang, S., Hansen, J. D., & Cavalieri, R. P. (2000). High-temperature-short-time thermal quarantine methods. *Postharvest Biology and Technology*, *21*(1), 129-145. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00171-X)
- Tang, J., Mitcham, E., Mitcham, E., Wang, S., Wang, S., & Lurie, S. (Eds.). (2007). *Heat treatments for postharvest pest control: Theory and practice* (1.^a ed.). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845932527.0000>
- Terblanche, J. S., KLOK, C. J., KRAFSUR, E. S., & CHOWN, S. L. (2006). Phenotypic plasticity and geographic variation in thermal tolerance and water loss of the tsetse *Glossina pallidus* (DIPTERA: Glossinidae): Implications for distribution modelling. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *74*(5), 786-794.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., de Siqueira, M. F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Townsend Peterson, A., Phillips, O. L., & Williams, S. E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, *427*(6970), 145-148. <https://doi.org/10.1038/nature02121>
- Wang, L., Yang, S., Han, L., Zhao, K., & Ye, L. (2015). Expression Profile of Two HSP70 Chaperone Proteins in Response to Extreme Thermal Acclimation in *Xestia c-nigrum* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, *98*(2), 506-515. <https://doi.org/10.1653/024.098.0218>
- Warren, R., VanDerWal, J., Price, J., Welbergen, J. A., Atkinson, I., Ramirez-Villegas, J., Osborn, T. J., Jarvis, A., Shoo, L. P., Williams, S. E., & Lowe, J. (2013). Quantifying the benefit of early climate change mitigation in avoiding biodiversity loss. *Nature Climate Change*, *3*(7), 678-682. <https://doi.org/10.1038/nclimate1887>

- Whitesell, L., & Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(10), 761-772. <https://doi.org/10.1038/nrc1716>
- Yuan, X., Zhou, W.-W., Zhou, Y., Liu, S., Lu, F., Yang, M.-F., Cheng, J., Gurr, G. M., & Zhu, Z.-R. (2014). Composition and Expression of Heat Shock Proteins in an Invasive Pest, The Rice Water Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*, 97(2), 611-619. <https://doi.org/10.1653/024.097.0237>
- Zhang, S., Fu, W., Li, N., Zhang, F., & Liu, T.-X. (2015). Antioxidant responses of *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) exposed to high temperature stress. *Journal of Insect Physiology*, 73, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.01.004>

