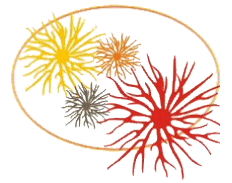




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



**ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA ASSOCIADA À REPRODUÇÃO E  
ENVELHECIMENTO DE *Gryllus assimilis* (FABRICIUS, 1775)  
(ORTHOPTERA: GRYLLIDAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Guilherme Martins Limberger

Rio Grande - RS, Brasil

Março de 2018

**ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA ASSOCIADA À REPRODUÇÃO E  
ENVELHECIMENTO DE *Gryllus assimilis* (FABRICIUS, 1775)  
(ORTHOPTERA: GRYLLIDAE)**

Guilherme Martins Limberger

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery

**Coorientador:** Prof. Dr. Duane Barros da Fonseca

**DEDICO:**

*À minha avó, Aliete T. Limberger, por toda força.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fábio Limberger e Jane Limberger por todo amor e preocupação que sempre tiveram comigo. Sem vocês nada disso seria possível, pois sempre acreditaram em mim e nos meus sonhos. Essa é uma enorme conquista e é nossa!

Agradeço enormemente aos meus familiares que sempre estiveram torcendo ou me ajudando no que podiam, inclusive em orações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery pelo aceite da minha orientação no início deste trabalho, pelas suas incalculáveis contribuições, sempre visando desenvolver em mim o pensamento científico durante nossas discussões e por toda confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Duane Barros da Fonseca pela importância que assumiu na minha vida, principalmente nestes últimos anos quando descobrimos, por coincidência, nosso interesse pelo estudo morfofisiológico de insetos. Te agradeço pela amizade que construímos e pela excelente relação que temos, por todo o tempo investido em mim e por todos os conselhos. Penso que não poderia ter encontrado melhor pessoa para me auxiliar neste processo. A ti, toda minha admiração e gratidão.

Aos professores que aceitaram compor minha banca examinadora neste momento ímpar para mim, Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa e Prof. Dr. Raul Guedes, meu profundo agradecimento pelo tempo dedicado e pelas contribuições/discussões que serão suscitadas.

Às minhas amigas e colegas, Lamia Halal e Raquel Martins que passaram por toda esta etapa ao meu lado, dividindo tudo que podíamos, desde o intenso estudo para a seleção do mestrado até as melhores comemorações. Agradeço a vocês pela amizade que temos. Tenho certeza que alcançar esse sonho ao lado de vocês vai ser muito melhor!

À minha colombiana preferida, Jéssica Sanchez, pela positividade e em especial pelas aulas de “estadística”, agradeço profundamente. Agradeço ao Jimmy Garibaldi por dividir o dia-a-dia comigo e me aturar falando da pesquisa todo tempo! Ao Ricardo Brugnera, pela parceria, pelas diversas discussões, e ajuda que sempre me foi oferecida! Agradeço também pelas boas energias e incentivo dos meus amigos mais distantes geograficamente durante estes dois anos de intenso trabalho, Pedro Silva, Jéssica Asami e Filipe Midão.

Ao pessoal da Salinha 1, pela receptividade, pelo chimarrão, descontração e trocas de experiências! Vocês são ótimos!

À acadêmica Cindy S. Xavier, pela imensa ajuda que me foi dada na manutenção, contagem e disseções dos animais, meu muito obrigado!

À Caroline Ruas e Rudmar Krumreick, do Centro de Microscopia Eletrônica do Sul - CEME-Sul/FURG por ajudarem a fazer desse lugar o melhor! Trabalhar com vocês é sempre muito, mas muito mais divertido.

Ao Prof. Dr. Augusto Ferrari, do Laboratório de Entomologia Sistemática e Biogeografia (LESB) da FURG pelo acesso ao laboratório e aos materiais.

Ao MSc. Luciano Martins, pela identificação do grilo utilizado neste trabalho. Agradeço pela solicitude e pelo empenho em ajudar nessa (árdua) tarefa. Finalmente, *G. assimilis!*

Agradeço também a FURG, todos os professores e técnicos do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – PPGCF, pelos conhecimentos construídos e por proporcionarem um ambiente de trabalho digno, mesmo nas atuais condições brasileiras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de estudos.

Meu sincero agradecimento a todos!

# SUMÁRIO

RESUMO.....	1
<i>ABSTRACT</i> .....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. <i>Trade-off</i> entre reprodução e sobrevivência em insetos.....	4
1.2. O aparato sensorio-auditivo e comportamento reprodutivo em grilos .....	7
1.3. Envelhecimento/Senescência e acúmulo de neurolipofuscina .....	10
1.4. <i>Gryllus assimilis</i> (Fabricius, 1775).....	12
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
 <b>Manuscrito: LIFESPAN AND MORPHOPHYSIOLOGICAL ANALYSES ASSOCIATED WITH REPRODUCTION AND AGEING IN THE JAMAICAN FIELD CRICKET <i>Gryllus assimilis</i> (FABRICIUS, 1775).....</b> Erro! Indicador não definido.	
Abstract:.....	16
1. Introduction: .....	17
2. Material and methods: .....	18
2.1. <i>Crickets rearing</i> .....	18
2.2. <i>Experimental design</i> .....	18
2.3. <i>Tympanum analysis</i> .....	19
2.4. <i>Neurolipofuscin quantification</i> .....	20
2.5. <i>Statistics</i> .....	20
3. Results.....	21
3.1. <i>Survival curves</i> .....	21
3.2. <i>Neurolipofuscin accumulation</i> .....	21
3.3. <i>Tympanal wear</i> .....	22
4. Discussion .....	23

<b>5. Acknowledgements .....</b>	<b>27</b>
<b>6. References .....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURES .....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURES LEGENDS .....</b>	<b>37</b>
<b>3. DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>38</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>43</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## RESUMO

Durante a história de vida dos organismos, diferentes vias metabólicas devem ser otimizadas para garantir a ocorrência exitosa de processos fisiológicos distintos, como a reprodução e o investimento somático (manutenção). Neste viés, as reservas energéticas do animal nem sempre são suficientes para sustentar estes dois processos em paralelo, fazendo com que ocorra o *trade-off* entre a reprodução e a sobrevivência/longevidade, ou seja, animais que investem em reprodução, como típico de fêmeas, dispõem de menos energia para investir em reparos, acelerando o envelhecimento e reduzindo o tempo de vida, como mostrado por alguns estudos. Este fenômeno também é conhecido como “custo da reprodução”. Porém, distintos resultados vêm sendo encontrados ao relacionar estes aspectos, pois além da reprodução propriamente dita, o momento em que ela ocorre na história de vida também tem relação com a longevidade. Com o avanço da idade, a resposta das fêmeas de grilo ao chamado para a cópula emitido pelos machos é menor, podendo ser o resultado do envelhecimento de estruturas cruciais para a captação do som nestes insetos, o tímpano. Estudos acerca do envelhecimento morfológico deste órgão são inexistentes. Quando iniciada, a reprodução altera a taxa metabólica dos organismos pelo aumento da demanda energética, refletindo seus custos sobre o acúmulo de um pigmento derivado principalmente da oxidação de macromoléculas, denominado lipofuscina (LF). Neste estudo, grupos experimentais com fêmeas de *Gryllus assimilis* foram formados para determinar os efeitos da reprodução sobre a sobrevivência, ajustando-se o modelo de Gompertz e sobre o envelhecimento fisiológico, por meio da quantificação de neurolipofuscina (nLF), além do registro de danos morfológicos no tímpano causados ao longo do envelhecimento por meio de análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isto, um grupo foi privado de cópula, um grupo teve reprodução normal (como início aos 14 dias de vida) e outro, reprodução tardia (com início aos 30 dias de vida). Diferenças na longevidade máxima entre os grupos não foram observadas, porém em fêmeas virgens houve um atraso no início da queda exponencial da sobrevivência, enquanto em fêmeas de reprodução normal esta queda ocorreu mais cedo. Fêmeas de reprodução tardia ficaram em situação intermediária. Não foram encontradas diferenças significativas na taxa de acúmulo de nLF entre os grupos ao longo do tempo. Estes resultados podem ser explicados pela produção de ovos ocorrer em todas as condições reprodutivas, tendo custos semelhantes, refletidos no acúmulo de nLF, além de terem sido alimentadas *ad libitum*, mascarando maiores efeitos do *trade-off* entre reprodução/sobrevivência. No entanto, efeitos deletérios da cópula sobre a longevidade de fêmeas de *G. assimilis* não foram encontrados. Relativo ao envelhecimento morfológico do tímpano, cinco lesões foram descritas pela primeira vez: excrescência, perfuração, fungos, formação de placas e rachaduras, sendo as três primeiras significativas em relação ao tempo, possivelmente prejudicando o funcionamento do aparelho auditivo. Não houve diferenças nos danos encontrados entre os grupos experimentais, embora o aumento destes acentuou-se após o período reprodutivo (senescência). Portanto, a reprodução parece modular a história de vida das fêmeas de grilo e interferir na manutenção de estruturas importantes para este processo, como o tímpano.

**Palavras-chave:** *Trade-off*; lipofuscina; tímpano; custo da reprodução; morfologia.



## ***ABSTRACT***

During the life history of organisms, different metabolic pathways must be optimised to ensure a successful occurrence of distinct physiological traits, such as reproduction and somatic maintenance. In this way, the energy reserves of an animal are not enough to sustain these two processes simultaneously, leading to a trade-off between reproduction and survival, in other words, animals that invest in reproduction, as typical of females, have less energy to invest in self-repairs, accelerating ageing and reducing lifespan, as shown by some studies. This phenomenon is also known as "cost of reproduction". However, several results have been found showing that the moment when the start of reproduction in the life-history (i.e, either early or late reproduction) is also related to longevity. Because of the ageing process, the response of cricket females to the calling song emitted by males is slow, it could be the result of damages on fundamental structures of sound reception, i.e., the tympanal membrane. Studies on the morphological ageing of this organ are non-existent. When reproduction starts, it changes the metabolic rate of the organisms by increasing energy demand, reflecting its costs on the accumulation of a pigment derived mainly from oxidation of macromolecules, called lipofuscin (LF). This is an autofluorescent pigment already validated as a marker of physiological ageing in several animal species. In the present investigation, experimental groups with female crickets (*Gryllus assimilis*) were established to determine the effects of reproduction on survival, applying Gompertz model, and to quantify physiological ageing through neurolipofuscin (nLF) accumulation in the brain, and by recording morphological damages (tympanum) during ageing process by ultrastructural analysis using scanning electron microscopy (SEM). For this, a group was deprived from copula, one had normal reproduction (young adults) and another, late reproduction (old adults). No differences were found in maximum longevity among groups, but in virgin females it was observed a delay to initiate exponential decline in survival when compared to reproductive groups (normal and late). Late-reproducing females had an intermediate onset of mortality. For the first time the nLF accumulation was quantified in crickets, although significant differences in the rate of accumulation of this between groups over time were not found. These results are likely due to the similar costs exhibited by all reproductive conditions, reflecting in the accumulation of nLF, besides being fed *ad libitum*, what probably masked a traditional trade-off observation between reproduction and survival. Deleterious effects of copula on the longevity of *G. assimilis* females were not seen. Regarding to the morphological ageing of the tympanal membrane, five lesions were described for the first time: excrescence, perforation, fungi, plaque formation and cracking; the first three were time-dependent and impaired the functioning of the auditory organ in these insects. However, the increase of these damages accentuated after the reproductive period (senescence). Therefore, reproduction seems to modulate the life history of cricket females and interfere with the maintenance of important structures for this process, such as tympanum.

**Keywords:** Trade-off; Lipofuscin; Tympanum; Cost of reproduction; Morphology.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1- Esquema simplificado do mecanismo de *trade-off* entre reprodução e sobrevivência nos animais.

Figura 2 - Localização da membrana timpanal posterior em *Gryllus*.

Figura 3- Cópula de *Gryllus assimilis*.

Figura 4- Espermatóforo fixado no trato genital de fêmeas de *Gryllus assimilis*.

Figura 5- Neurolipofuscina no cérebro de *Gryllus assimilis*.

Figura 6- Fêmeas de *Gryllus assimilis*.

Figura 7- Dimorfismo sexual em ninfas de *Gryllus assimilis*.

### MANUSCRITO

Figure 1- Survival curves and neurolipofuscin accumulation.

Figure 2- Posterior tympanal membrane in coloured images.

Figure 3- Posterior tympanal membrane in Scanning Electron Microscopy (SEM).

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Trade-off* entre reprodução e sobrevivência em insetos

A ecologia fisiológica postula uma relação inversa entre reprodução e longevidade nos animais (Calow, 1987), impedindo que os organismos alcancem a taxa de fecundidade máxima durante toda a vida (Prowse & Partridge, 1997). Esta premissa vem da comparação entre espécies r-estrategistas (reprodução precoce, fecundidade alta e curto tempo de vida), e k-estrategistas (reprodução tardia, fecundidade baixa e longo tempo de vida) (Pianka, 1994). Associado a reprodução, estão envolvidos os seus custos.

Entende-se por “custo reprodutivo”, os efeitos deletérios da reprodução sobre a sobrevivência e também no êxito em futuros processos reprodutivos (Williams, 1966), podendo ser englobado no conceito de *trade-off*, ou seja, quando há o direcionamento das fontes de energia finitas do animal para o processo reprodutivo (e.g. produção de ovos, cópula, postura), em detrimento do uso desta energia para manutenção do próprio indivíduo, acarretando na aceleração da senescência e diminuição do tempo de vida (Flatt, 2011) (Fig. 1).

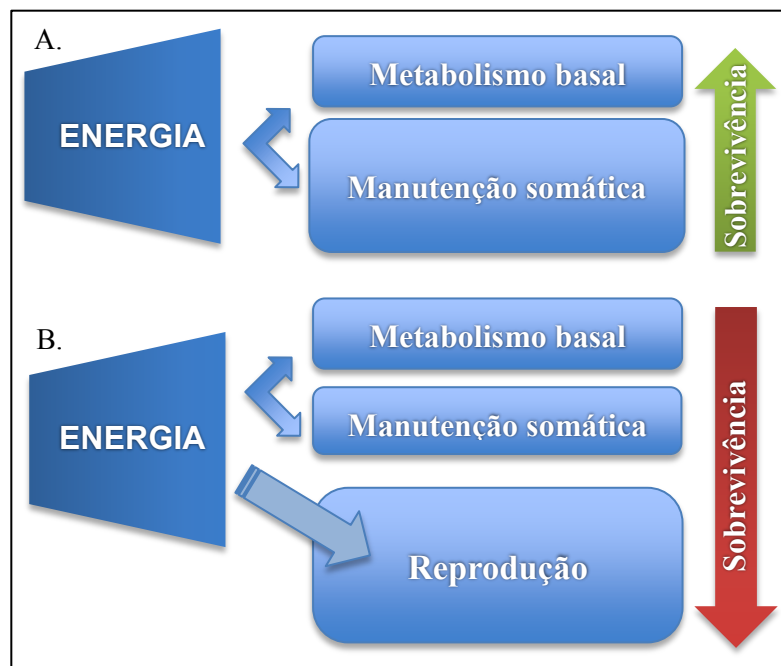


Figura 1- Modelo simplista de *trade-off* entre sobrevivência e reprodução. Em A, animais não reprodutivos (virgens); em B, animais reprodutivamente ativos. Fonte: autor.

Em outras palavras, o mesmo combustível energético utilizado em diferentes processos fisiológicos deve ser canalizado para uma via ou outra, estando estas negativamente relacionadas no sentido funcional (Flatt, 2011), como no caso da

reprodução e longevidade/manutenção. Isso ocorre, pois as fontes energéticas internas são limitadas (Zera & Harshman, 2001), portanto, a diminuição do investimento energético na manutenção somática do animal resultaria em uma “soma descartável” que seria mais suscetível ao processo de senescência (Kirkwood, 2005).

Este fenômeno é documentado com maior frequência em fêmeas de insetos, pois a produção dos ovos acelera o envelhecimento (Maynard-Smith, 1959). Estudos com machos também existem, em menor escala, como com o mosquito *Anopheles gambiae*, o qual apresentou decréscimo na sobrevivência para machos que copularam (Dao, et al., 2010) e com machos de mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*), encontrando resultados similares, ou seja, o aumento da longevidade para machos que nunca copularam (Prowse & Partridge, 1997). Estes fatos elucidam a grande pressão evolutiva imposta sobre este tipo de “ajuste” fisiológico que relaciona as condições energéticas do indivíduo com processos biológicos fundamentais, como a manutenção somática e a reprodução como um todo e não somente para fêmeas.

Em um pioneiro estudo sobre o assunto com insetos, Maynard-Smith (1959), demonstrou a presença de um *trade-off* entre a reprodução e longevidade em *Drosophila subobscura*, no qual fêmeas estéreis, sem ovários e virgens, foram mais longevas. Quase uma década mais tarde, Loschiavo (1968), pesquisando a influência de diferentes substratos na taxa de produção de ovos no besouro *Trogoderma parabile*, revelou que fêmeas que não ovipositavam eram mais longevas comparadas as fêmeas reprodutivas, relacionando inversamente a produção de ovos e a sobrevivência. Snell & King (1977), em manipulando o processo reprodutivo em rotíferos, relatou uma relação inversa entre a intensidade reprodutiva e longevidade. Fêmeas de *D. melanogaster* induzidas experimentalmente a produzir menor número ovos tiveram uma aumento da longevidade (Partridge et al., 1986). Para o gafanhoto *Romalea microptera*, em que fêmeas foram ovariectomizadas, houve um aumento na longevidade em torno de 20% e o dobro de reservas energéticas relativas ao controle (fêmeas não ovariectomizadas) (Tetlak et al., 2015). Neste mesmo sentido, o coleóptero coccinelídeo (joaninha) *Propylea dissecta*, apresentou um aumento na longevidade de cerca de duas vezes para fêmeas que não copularam quando comparadas às reprodutivas (Mishra & Omkar, 2006). Estes trabalhos demonstram claramente os efeitos deletérios da reprodução sobre a manutenção somática e consequente declínio na longevidade nestes insetos.

Os diferentes *trade-offs*, como reprodução e crescimento vs. sobrevivência, são importantes aspectos do ponto de vista genético, bioquímico e fisiológico, estando

suscetíveis ao processo de seleção de natural nas populações animais (Ellers, 1996). Esses *trade-offs* configuram-se em um importante componente no processo evolutivo das espécies, no qual pressões evolutivas poderão ser direcionadas em diferentes momentos da história de vida, principalmente por não ser possível maximizar vários processos anabólicos simultaneamente.

Curiosamente, resultados distintos são encontrados ao relacionar *trade-off* entre reprodução e longevidade em insetos. Dean (1981) não encontrou custos reprodutivos relacionados a produção de ovos em fêmeas do gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* e sugere que outros fatores influenciam de maneira mais pronunciada na longevidade, como as interações macho-fêmea e questões ambientais. Kotiaho & Simmons (2003) não encontraram custo reprodutivo em função da redução da longevidade para as fêmeas virgens e reprodutivas do besouro escarabeídeo *Onthophagus binodis*, porém este mesmo custo foi identificado, no mesmo experimento, para os machos desta espécie. Estes resultados apontam para a grande variedade de trajetórias evolutivas, as quais foram selecionadas em particular para cada grupo, levando em considerações aspectos como disponibilidade alimentar, bioenergética e aspectos intra-específicos.

Além da produção dos gametas, propriamente dita, o momento da primeira reprodução, por exemplo, tem relação direta, em mamíferos, com a longevidade máxima (Holliday, 1995). Em outros grupos animais como em pássaros, o desempenho reprodutivo aumenta com a idade, fato que pode estar relacionado com a eficácia de forrageio, por exemplo (Froy et al., 2017). Assim, animais que tipicamente investem fortemente na reprodução no início da vida adulta, irão sentir os custos da reprodução durante o processo de senescência, apresentando um declínio precoce e rápido na sobrevivência, exibindo diferenças na longevidade entre reprodução precoce e reprodução tardia (Reed et al., 2008). Na literatura de biologia evolutiva, isto refere-se à Teoria Pleiotrópica de Envelhecimento, na qual a fecundidade precoce (*fitness* Darwiniano) terá seus efeitos deletérios mais cedo (Williams, 1957).

Um estudo clássico em mosca-da-fruta (Luckinbill et al., 1984) mostrou que a manipulação da idade da primeira reprodução influencia a longevidade, ou seja, fêmeas que reproduzem cedo têm menor longevidade, ao passo que a reprodução tardia aumenta a longevidade nestes dípteros. Em gafanhotos, o mesmo fenômeno foi encontrado (Dean, 1981). Logo, fêmeas que ovipositam mais ovos ou que começam a oviposição precocemente são menos longevas que fêmeas que produzem menos ovos ou que iniciam a oviposição tardiamente (Dean, 1981).

Para grilos, a hipótese do *trade-off* entre reprodução e longevidade não foi ainda explorada, assim como a possível interferência da cópula e do momento da reprodução na história de vida destes animais.

## 1.2. O aparato sensório-auditivo e comportamento reprodutivo em grilos

Os grilos utilizam sobretudo a audição para desencadear respostas aos eventos reprodutivos. Estes insetos possuem duas membranas timpânicas (tímpanos) de forma oval nas pernas anteriores; uma está localizada na superfície anterior e outra na superfície posterior de cada tíbia, tanto em machos quanto em fêmeas (Fig. 2). Este aparelho especializado é constituído por uma membrana timpânica esticada sobre um saco de ar (expansões traqueais) associado a um órgão sensorial denominado órgão cordotonal. Este órgão é composto por conjuntos de neurônios sensoriais bipolares inseridos distalmente em células chamadas escalópales (Hoy & Robert, 1996), que encontram-se cercadas de células gliais e de células de suporte. Nestes insetos, o órgão timpanal possui entre 60 e 80 mecanoreceptores denominados escalopídeos (Yack, 2004) (conjunto de escalópales + células gliais + células de suporte) que percebem as vibrações mecânicas no interior da tíbia causadas pelas ondas sonoras provenientes do ambiente externo.

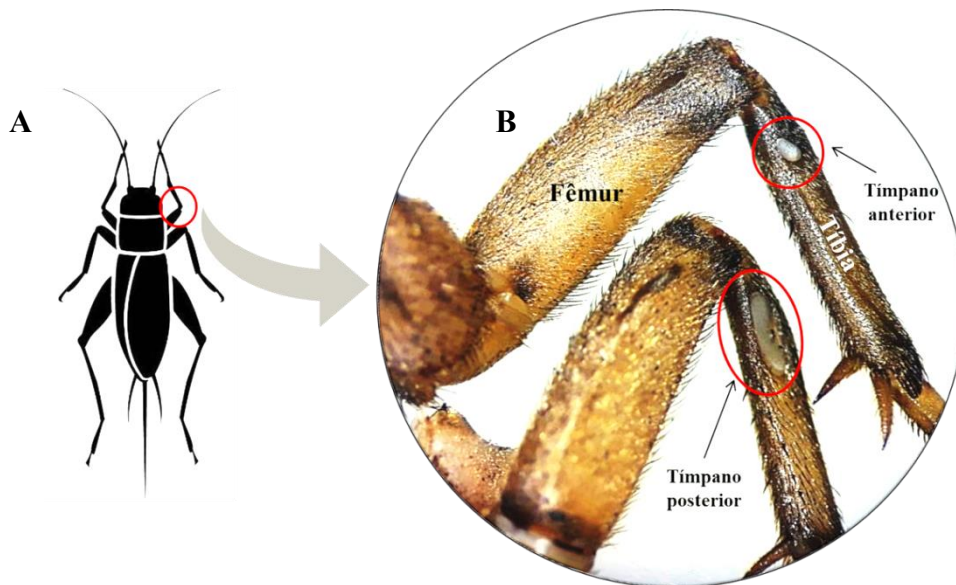
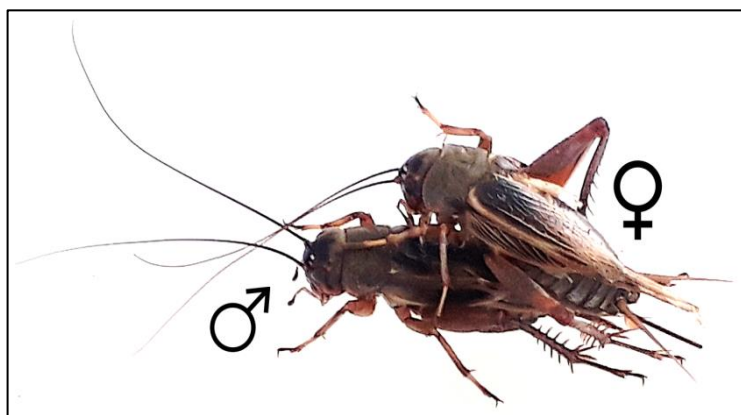


Figura 2- A: Apêndice anterior (fêmur + tíbia) - círculo. B: Aspecto macroscópico dos tímpanos – existe um par destes em cada tíbia: Tímpano anterior e tímpano posterior (enlaçados em vermelho e devidamente identificados pelas setas na imagem) em distintos apêndices. Fonte: autor.

Este tímpano tem a função de ampliar as ondas sonoras que serão percebidas por estes mecanorreceptores (escalopídeos) no interior desta cavidade, cujos sinais devem ser decodificados no sistema nervoso central. Esta aferência sensorial chega ao gânglio protorácico, onde localiza-se o neurópilo auditório e em seguida para o cérebro, por meio do interneurônio AN1 (*Ascending Neuron 1*), que está relacionado com a recepção de frequências características dos chamamentos (ou *calling songs*; estridulação atrativa para a fêmea) (Wohlers & Huber, 1982). Esta percepção leva a movimentar-se em direção ao macho, caso esteja receptiva para a cópula. Os tímpanos das fêmeas trabalham juntos, como um aparato altamente direcional devido a sua localização nas tíbias anteriores. No entanto, dois *inputs* sensoriais permanecem separados em duas redes neurais, sendo subsequentemente comparados para a análise da direção do som, tanto em grilos como em esperanças (Stumpner & von Helversen, 2001), conforme sugerido por Alexander (1961).

Os componentes sonoros são utilizados para diferentes comportamentos em grilos (Alexander, 1962; Stumpner & von Helversen, 2001), podendo-se destacar: (I) Interações entre machos e fêmeas: corte, cópula e chamamento de aproximação, sinais pós-cópula, sons de reconhecimento e elaboração de ninhos; (II) Interações entre machos: territorialismo e sons agressivos; (III) Interações entre prole e progenitores: cuidado de ovos e das ninfas e alimentação para as ninfas (Alexander, 1962).

A sinalização sonora para a corte por parte do macho é o primeiro passo do processo reprodutivo em Gryllidae (MacDougall, 1996) e leva a fêmea a assumir a posição de cópula (Fig. 3) nas diversas espécies de grilos (Alexander, 1961), tornando este sentido o mais importante para o encontro de parceiros sexuais aptos à reprodução



**Figura 3-** Cópula de *G. assimilis*. A fêmea (posição superior) monta sobre o macho (posição inferior) para a transferência do espermatóforo. Fonte: autor.

a longas e médias distâncias. Os machos deste grupo produzem sons de chamado para a cópula (*calling songs*) que são gerados nas tégminas (asas superiores modificadas) e possuem padrões típicos de cada espécie (MacDougall, 1996), sendo as fêmeas capazes de discriminar estes

sinais de acordo com a duração, taxa e frequência (Gerhardt & Huber, 2002), graças ao elaborado aparato auditivo que possuem. Desta maneira, as fêmeas orientam-se em direção ao macho (fonotaxia) por intermédio destes receptores auditivos timpanais (Alexander, 1962). Por exemplo, as fêmeas de grilo-doméstico (*Acheta domesticus*) utilizam somente a estridulação para decidirem entre machos para o acasalamento (Crankshaw, 1979). Neste sentido, a fêmea não pode ser obrigada a copular pelo seu parceiro, pois deve montar no macho (Fig.3) para que receba o espermatóforo (cápsula contendo os espermatozóides) (Wagner et al., 2001; Leonard & Hedrick, 2010) que se prende diretamente no ducto vaginal ou vagina (Fig. 4). Por diferença de pressão, os espermatozóides alcançam a espermateca (onde ficam armazenados) e os ovários, fecundando assim os ovócitos.

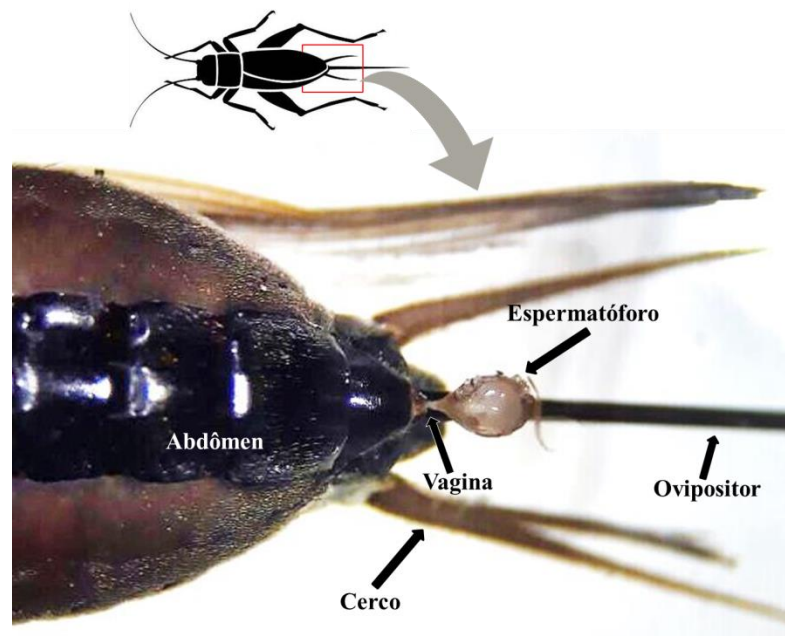


Figura 4- Vista ventral do abdômen de uma fêmea de *G. assimilis* com o espermatóforo preso no canal vaginal (vagina) após a transferência do mesmo durante cópula.

O órgão auditivo relacionado à percepção destes sons de chamado para a cópula em Gryllidae, sofre desgaste com o tempo (Akai & King, 1982). Evidências experimentais indicam que a idade é um dos fatores que influencia na reprodução (Prosser et al., 1997). O trabalho demonstrou que fêmeas jovens (~14 dias após a muda para adulto) de *Gryllus integer* são mais seletivas em direção a um sinal atrativo para cópula (*calling song*) quando comparadas com fêmeas mais velhas (~28 dias após a muda para adulto). Para *Gryllus assimilis* e para outras espécies de ortópteros, até o momento, faltam análises ultraestruturais do envelhecimento da membrana timpanal,



podendo ser este um dos fatores que explicam a baixa velocidade com que fêmeas velhas (22 – 28 dias de vida adulta) se deslocam em direção à estridulação do macho. Isto foi observado em *G. assimilis* por Pacheco et al. (2013), reforçando a percepção de presbiacusia, ou seja, perda das funções auditivas decorrente da idade é um marco de envelhecimento em inúmeras espécies (Zheng et al. 1999; Gratton & Vázquez 2003; Kujoth et al., 2005). Neste viés, estruturas sensoriais importantes para a seleção dos parceiros sexuais, como o tímpano (órgão auditivo dos ortópteros), poderiam estar prejudicados pela ação do tempo (idade) e/ou pela presença de parasitas, impedindo o êxito deste sistema auditivo na resposta à atração dos machos como resultado do processo de senescência imediato após o alcance da idade reprodutiva neste grupo. Informações acerca do envelhecimento do tímpano são ausentes para insetos.

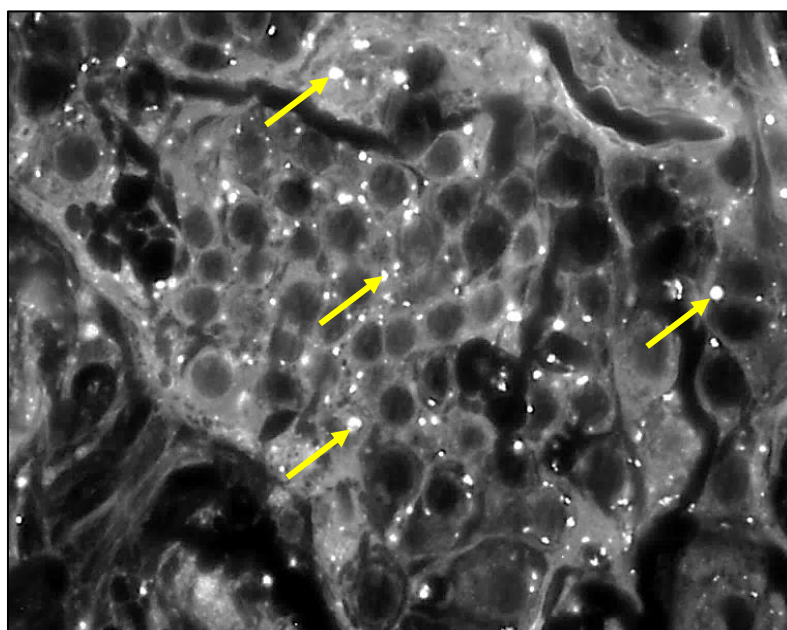
### **1.3. Envelhecimento/Senescência e acúmulo de neurolipofuscina**

Assume-se por envelhecimento o conceito proposto por Arking (1998), que o define como mudanças funcionais e estruturais que ocorrem de maneira cumulativa, progressiva, intrínseca e deletéria, que pode, eventualmente, levar o animal a morte. É um processo tempo-dependente que resulta de danos ou injúrias celulares, seguidas de subsequente declínio da função, elevando a vulnerabilidade dos organismos à morte (Lopez-Otin et al., 2013). Muitas das manifestações do envelhecimento irão aparecer em organismos que já passaram pelo período de reprodução e, portanto encontram-se distantes da seleção natural, demonstrando uma explicação evolutiva para o envelhecimento (Gavrilov & Gavrilova, 2002), uma vez que esta é uma das fases inerentes contidas nos ciclos de vida dos organismos, juntamente com o nascimento, crescimento e reprodução, culminando na morte. Para este processo natural de envelhecimento após o período reprodutivo, denominamos senescência (Arking, 1998). Portanto, teoricamente, animais que reproduzem mais cedo estarão sujeitos ao processo de senescência também mais cedo. O mesmo raciocínio se aplica para animais que reproduzem tardiamente ao longo do seu ciclo de vida.

Uma das mais fortes vertentes que contribuem para o envelhecimento está relacionada aos danos oxidativos produzidos durante a respiração celular. A Teoria do Envelhecimento baseada em radicais livres (Harman, 1956), estabelece que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) resulta em danos acumulativos que levarão ao envelhecimento. As principais ERO são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial (Ruder et al., 2009) e estão relacionados aos custos da reprodução (Harshman & Zera

2007) e ao processo de senescência. Sabe-se que há uma queda nas defesas antioxidantes em diferentes grupos animais relacionada à reprodução (Alonso-Alvarez et al., 2004), incluindo insetos, como documentado para *D. melanogaster* (Wang et al., 2001; Rush et al., 2007).

Neste propósito, nem todos os danos oxidativos gerados ao longo da vida, e que podem ser agravados pela reprodução em alguns grupos, conseguem ser eliminados pelos sistemas de defesa antioxidantes do organismo. Desta maneira o acúmulo destes danos ocorre paralelo ao acúmulo de um pigmento, denominado lipofuscina (LF) ou pigmento de envelhecimento, que quando encontrado no tecido nervoso, chama-se neurolipofuscina (Fig. 5).



**Figura 5-** Grânulos de neurolipofuscina (em branco) localizados no citoplasma de células neurosecretoras da *pars intracerebralis* de *G. assimilis* em microscopia de fluorescência. Setas amarelas: grânulos. Objetiva: 100x. Fonte: autor.

O pigmento LF é autofluorescente, constituído basicamente por grânulos formados majoritariamente de proteínas e lipídios oxidados (Terman & Brunk, 1998) que não são alvos de degradação lisossomal, comprometendo a viabilidade celular, especialmente em células pós-mitóticas (como neurônios) (Höhn & Grune, 2013). Estes grânulos ficam armazenados nos lisossomos, no entanto podem ser formados no interior da própria organela ou no citoplasma celular, sendo posteriormente autofagocitados pela mesma, pois não são excitados, embora não possam ser degradados pelas enzimas lisossomais (Terman & Brunk, 2004). Fonseca et al. (2005) encontrou uma forte correlação entre a concentração de neurolipofuscina e a taxa de mortalidade idade-

específica, em ambos os sexos, no gafanhoto migratório *Locusta migratoria*. Um estudo com mosca (*Musca domestica*) verificou que o acúmulo de LF está diretamente relacionado com a taxa metabólica do animal. Neste trabalho, moscas com alta taxa metabólica (provocada pela atividade física) acumularam cerca de 50% mais LF que moscas controle, com baixa atividade física, porém não houve diferenças na quantidade do pigmento em insetos com 14 dias de vida para animais em alta atividade física quando comparados aos animais com 30 dias de vida em condições opostas (Sohal, 1981), ou seja, a velocidade de acúmulo é proporcional ao metabolismo durante a vida e reflete a idade fisiológica do organismo.

Estudos com outros insetos, como com a abelha de mel *Apis mellifera carnica* Pollmann (Münch et al., 2013), com a mosca-da-carne *Sarcophaga bullata* Parker (Ettershank et al., 1983) e com formigas *Polyrhachis sexpinosa* Latrielle (Robson & Crozier, 2009) já verificaram o pigmento de envelhecimento lipofuscina (LF) nestes organismos. Até o presente momento, não se encontram publicações que procedessem à análise de neurolipofuscina em grilos, portanto, conhecimentos básicos acerca da taxa de acumulação de lipofuscina e as regiões do cérebro com maior abundância do pigmento não foram documentados. Portanto, os efeitos de condições reprodutivas associadas ao acúmulo deste pigmento não foram ainda explorados em *Gryllus*.

#### 1.4. *Gryllus assimilis* (Fabricius, 1775)

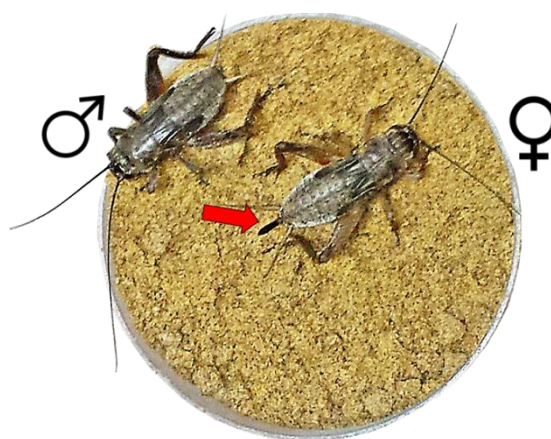
A espécie foi descrita por Fabricius em 1775 como *Acheta assimilis*, proveniente da Jamaica. Por esta razão, também é conhecido na literatura como grilo jamaicano ou em inglês, “Jamaican field cricket”. Em 1838, Burmeister, transferiu a espécie para o gênero *Gryllus*. A espécie, *G. assimilis* (Fig. 6), passou desde então por diversas mudanças na classificação taxonômica, incluindo novas combinações, sinonimizicações e descrições de novas espécies até então consideradas como pertencentes a esta espécie (Weissman et al., 2009; Cigliano et al., 2018).



Figura 6- Fêmeas adultas de *G. assimilis* ovipositando em algodão umedecido. Fonte: autor.

A maioria dos grilos possuem hábitos noturnos, são onívoros e canibais. Porém não ficam restritos aos horários noturnos para estridular ou se alimentar. Podem ser encontrados em diversos tipos de vegetação, em tocas/fendas no solo ou em paredes, troncos, galhos, pedras, entre outros (Ackert & Wadley, 1921). Os mesmos autores (Ackert & Wadley, 1921) encontraram uma proporção semelhante de machos e fêmeas na natureza, exceto no final da época reprodutiva, em que as fêmeas com seus abdomens cheios de ovos ultrapassam a quantidade de machos vivos.

Em nosso laboratório (Biotério de Invertebrados Terrestres da Universidade Federal do Rio Grande - FURG), são animais com ciclo de vida em torno de cinco meses. Destes, aproximadamente três são de fases ninfais e dois de vida adulta. As fêmeas se distinguem bem dos machos à medida que avançam no desenvolvimento ontogenético (Fig. 7).



**Figura 7- Ninfas (macho e fêmea) de último estágio de *G. assimilis*, provenientes de colônia estabelecida no Biotério de Invertebrados Terrestres - FURG. Seta vermelha indica o ovipositor das fêmeas, evidenciando o claro dimorfismo sexual dos imaturos. Fonte: autor.**

Atualmente, insetos como os grilos são importantes fontes alimentares no mundo todo, sendo criados em escalas industriais tanto para servirem de alimento para zoológicos, lojas de animais (*pet shops*) e também para fábricas de alimentos processados. Além disso, possuem também importância econômica, pois os grilos são pragas agrícolas (Grodzki, 1972; Barbosa et al., 2009).

O crescimento demográfico mundial implicará em mudanças nos hábitos alimentares da população, incluindo novas fontes alimentares que sejam mais rentáveis, que produzam menos poluição global e que tenham potencial proteico e lipídico

elevados, como no caso dos insetos (Deroy, 2015; van Huis, 2016; Barroso et al., 2017; Megido et al., 2018), tornando-se fundamental a compreensão de aspectos relacionados à biologia destes animais incluindo estudos de sobrevivência, de processos reprodutivos, envelhecimento e senescência. Complementar aos interesses econômicos, estudos ecofisiológicos em diferentes populações animais irão favorecer planejamentos de manejo sustentável da fauna, avaliação de impactos ambientais causados por ações antropogênicas e/ou abióticas, além de enriquecer a literatura científica com novos dados, servindo de base para trabalhos que envolvam reprodução e principalmente o envelhecimento morfofisiológico em insetos, cujo tema apresenta grandes lacunas e carência de pesquisas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Identificar efeitos da reprodução na longevidade e no envelhecimento morfofisiológico de fêmeas do grilo Jamaicano (*Gryllus assimilis*).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Comparar a sobrevivência entre fêmeas com restrição reprodutiva, com reprodução normal e com reprodução tardia;
- Descrever modificações morfológicas nos tímpanos posteriores de fêmeas com restrição reprodutiva, com reprodução normal e com reprodução tardia de *G. assimilis* ao longo da vida adulta.
- Quantificar o envelhecimento fisiológico no cérebro de fêmeas com restrição reprodutiva, com reprodução normal e com reprodução tardia.

Manuscrito: **LIFESPAN AND MORPHOPHYSIOLOGY OF REPRODUCTION  
AND AGEING IN THE JAMAICAN FIELD CRICKET (*Gryllus assimilis*)**

Manuscrito a ser submetido ao periódico:

*Proceedings of the Royal Society B*

## LIFESPAN AND MORPHOPHYSIOLOGY OF REPRODUCTION AND AGEING IN THE JAMAICAN FIELD CRICKET (*Gryllus assimilis*)

Guilherme Martins Limberger<sup>1</sup>, Duane Barros da Fonseca<sup>1</sup>, Luiz Eduardo Maia Nery<sup>1\*</sup>.

1- Postgraduate Program in Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande - FURG, Av. Itália km 8, CEP: 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Luiz Eduardo Maia Nery. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália Km 8, CEP 96203-900, Rio Grande, RS - Brazil.

E-mail address: famnery@terra.com.br

### **Abstract:**

Some physiological traits not related, like reproduction and self-maintenance, are costly for many animals and an energetic compromise (trade-off) is necessary. Animals investing energy in reproduction would decrease their lifespan and *vice-versa*. The objective of this investigation was to verify the effect of mating in survival and morphophysiological ageing of female crickets (*Gryllus assimilis*) in three experimental groups: virgin, normal and late reproduction. Survival analysis and the *in situ* quantification of the age-pigment neurolipofuscin were performed. Ultrastructural analysis using scanning electron microscopy of the posterior tympanal membrane was carried out over time, to record potential changes on this important structure in the cricket reproduction. No differences were found longevity between groups, although virgin females took longer to initiate exponential survival decay. Neurolipofuscin accumulation was found in all groups and it was inversely related with lifespan, but no significant differences in accumulation between reproductive conditions was found. Five lesions associated with morphological ageing of the tympanum: excrescence, fungi agglomerate, perforation, plaque formation and crack between tympanal and tibial cuticle, but unrelated to the reproductive condition. However and regardless of the reproductive conditions, significant wear of the posterior tympanal membrane matched the reproductive senescence.

**Keywords:** Neurolipofuscin; trade-off; tympanum; morphology; senescence; cost of reproduction.

## 1. Introduction:

When an organism, at any moment in its life-history, has to divert limited energy resources from a physiological trait to another, a trade-off is observed [1]. The inverse relationship between contrasting traits, such as growth vs. longevity, growth vs. reproduction, and reproduction vs. longevity has been reported for a long time (e.g., some articles in a CIBA Foundation Colloquia on Ageing publication, such as Beverton & Hol [2], Bourlière [3], and Maynard-Smith [4]. The rationale is that it occurs because the internal energy source is limited to keep both life-history processes at the same time [5], whereas these are expensive processes in life-history. Ecologically, it prevents organisms from reaching the maximum fertility rate throughout its entire life [6]. Trade-off between reproduction and longevity is associated with the „cost of reproduction“ concept, meaning that the current reproduction prevents future reproduction and decreases survival [7], considering that energy expenditure in somatic maintenance would result in a “disposable soma”, being more susceptible to senescence, like proposed by Kirkwood [8], leading to acceleration of senescence and death. This phenomenon is often documented for insect females due to the acceleration of senescence by egg producing [9], although some studies with males had been carried out [6, 10].

Besides reproduction by itself, the moment of the first reproduction is regarded as inversely related to longevity [11-13]. In some species, reproductive performance increases with age [14]. Animals that typically invest heavily in reproduction early in adulthood will experience the costs of reproduction early during the senescence, exhibiting an early and rapid decline in survival or a trade-off between early and late reproduction [15]. In the evolutionary literature, it has been called the pleiotropy theory of ageing in which increases of fecundity early in life (Darwinian fitness) would have deleterious effects late in life [16]. This aspect is unknown for crickets.

Experimental evidences found by Prosser *et al.* [17], demonstrated that young adult females are more selective for mating call than older females of *Gryllus integer*. However, no information regarding survivorship is reported. For *G. assimilis*, Pacheco *et al.* [18] showed that females with 22-28 days old went toward male calling song (phonotaxis) at a low speed. It might be due the senescence process of morphological structures involved in the reproductive behaviour of crickets, but analyses considering it have not been performed.



Crickets have tympanal organs to capture sounds. They are located in the foreleg tibia, one on the anterior surface and the other on the posterior surface [19]. These hearing organs are directly linked to the nervous and tracheal system and they allow females to decide among mate partners by discriminating duration, rate, and the frequency of the calling song produced by males [20, 21], being the most important sensorial input related to the reproductive behaviour. During ageing, this complex structure may wear micro and macroscopically, influencing the perception and phonotaxis response of female crickets.

Associated with the metabolism (including reproduction and ageing), the autofluorescent age pigment called lipofuscin is gradually deposited over time and it is formed mostly by undigested oxidized proteins and lipids [22]. As follows, it has been shown elsewhere that reproduction also decreases the antioxidant defences in some animals, including insects [23-25], likely resulting in an increase of oxidative damage. Therefore, the reproductive effort could increase neurolipofuscin accumulation. To date, no studies have been done on neurolipofuscin accumulation in crickets.

This study had three major goals. The first was to determine the influence of reproduction in the lifespan of female crickets. The second goal was to identify the damages in the posterior tympanum caused by the ageing process in virgins and reproductive females. The last, third goal, was to determine and to compare neurolipofuscin accumulation rate in the brain of virgins and reproductive females.

## **2. Material and methods:**

### **2.1. Crickets rearing**

The Jamaican field crickets, *G. assimilis*, were reared in the Bioterium of Terrestrial Invertebrates at the Institute of Biological Sciences (Federal University of Rio Grande) in Rio Grande/RS - Brazil. Crickets were maintained under a controlled light and temperature regime (12hL:12hD,  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ). They were fed *ad libitum* with Cat Chow® since the eclosion of the eggs. The animals were kept in plastic boxes (41x29x13cm) with egg cartons to provide hiding places. To avoid uncontrolled mating, all nymphs – from the 4<sup>th</sup> stage – were sexed and sorted by sex prior the experiments.

### **2.2. Experimental design**

Female crickets from the same cohort (within three days of difference in age) were used to set three experimental groups (n: 35), with three replicates. The first group,

virgins (V) was deprived from mating (Control). The second group, normal reproduction (N) was allowed to mate once early in life (15 days after imaginal moult). The third group, late reproduction (L) had access to males later in life (30 days after imaginal moult). For normal and late reproduction groups, adult males (n: 40) were randomly selected and left together with females for seven days.

After males removal, females of the three groups were monitored and deaths were daily recorded. Survival curves were constructed and the Gompertz survival model was fit to data. This model –  $(EXP((a/b)*(1-EXP(b*age)))$  – assumes an exponential increase in death rate after sexual maturity. The “b” parameter of model indicates this exponential increase in death rate [26].

During the survival monitoring, three sampling times were carried out in all groups: Time 1: at beginning of experiment ( $2\pm 1$  days old – adults age – 100% of survivors); Time 2: when virgins and mated females, including normal and late reproductive groups, reached 40% of survival, respectively and; Time 3: at the end of experiment, when all females (virgins and mated) reached 5% of survivorship. At each sampling time, two females per box (three replicates) were sampled for neurolipofuscin quantification plus two for tympanum ultramorphological analysis. The three times of sampling were defined according to prior survival curves estimated for these experimental conditions, and they reflected an initial phase of no mortality, a second phase of a sharp increase in mortality rate, and a third phase of a decline in mortality rate late in life.

### **2.3. Tympanum analysis**

Six crickets from each treatment were cold anaesthetised on ice and the forelegs were carefully removed disrupting the articulation between the femur and the trochanter using a pair of tweezers. This body part was used for observation of the posterior tympanal membrane (PT) in the tibia under Scanning Electron Microscopy (SEM). All forelegs were dehydrated in an ascending ethanol series and air-dried for 5 h before examination. The forelegs were attached to a holder using double sided carbon tape, sputter-coated with gold (Denton Vacuum Desk V), examined and photographed with a Jeol, JSM - 6610LV SEM at 10 kV~15 kV in the Southern Center of Electron Microscopy (CEME-Sul) located at Federal University of Rio Grande (FURG).

To evaluate the injuries throughout ageing, a ranked classification was proposed taking into account the severity of the wear (ranging from 1 to 5) of the posterior

tympanum (PT) as follows: (1) excrescence (Exc); (2) plaque formation (Pqf); (3) fungi agglomerate (Fng); (4) crack between tympanal and tibia cuticle (Ctt); and (5) perforation (Prf). Exc: was defined as rugged protrusion rising above the cuticle of the tympanal surface; prominence. Pqf: reflect formation of a cuticle-enriched plaque, modifying the natural morphology of the tympanum; Fng: presence of fungal hyphae and spores colonising tympanal surface. Ctt: cracking between the cuticle of the tympanum and the cuticle of tibia (insertion) and Prf: tympanal cuticle with perforation, fissure. Also, the area occupied by the damage was ranked from 0 to 5, as follows: (0) Absent; (1) slight initial (present); (2) mild to moderate (occupying  $\sim 1/3$  of total tympanal area); (3) Moderate (occupying  $\sim 2/5$  of total tympanal area); (4) Moderate to severe (occupying  $\sim 2/3$  of total tympanal area) and; (5) Severe (occupying total tympanal area). Using these two rankings, an index was calculated. For example, a plaque formation (2) occupying  $1/3$  of the tympanum (2) had an index value of  $2 \times 2 = 4$ .

#### **2.4. Neurolipofuscin quantification**

Six females were used from the three sampling times for neurolipofuscin quantification. Brains were dissected out under a stereomicroscope while submerging the insects head into iced insect saline buffer and were subsequently fixed with formalin 10% until preparation for histological procedures in an automatic Leica ASP200 tissue processor. After wax embedding, the brains were sectioned in a manual microtome set at  $6\mu\text{m}$  thickness. Sections were observed using a 100x oil immersion objective under blue (488 nm) fluorescence excitation, barrier filter at 515 nm. Images of the region of interest were acquired with a coupled camera (Olympus DP72) and saved in grayscale tiff format. Neurolipofuscin granules were quantified in the *pars intracerebralis*, as described by Fonseca *et al.* [27]. A total of 185 images was analysed in the free image editor program GIMP (version 2.8.20), allowing determination of the total area occupied for the granules within the region of interest (*pars intracerebralis*) in a tissue section. Neurolipofuscin concentration was expressed as volume fraction (% vol.), and according to Sheehy *et al.* [28], a geometric weighted average was estimated.

#### **2.5. Statistics**

The effect of reproduction regimes on specific mortality rate was verified applying Gompertz model. Estimates of the Gompertz b parameter – exponential rate of

increase of mortality – were compared by the 95% confidence intervals. The maximal longevity ( $T_{max}$  = age at 5% survival) and the mortality rate doubling time - time required for mortality rate to increase by 2-fold – ( $MRDT = \ln 2/b$ ) were calculated for survival curves.

Two-way ANOVA was applied to neurolipofuscin and tympanal wear data (reproductive condition and age as factors). No normality and homocedasticity was found to tympanal wear data, then Mann-Whitney Test with Holm-Bonferroni correction was used. A significance level of 5% was adopted in all analyses.

### **3. Results**

#### **3.1. Survival curves**

All fits of the Gompertz model to survival curves were significant (Fig. 1) ( $p < 0.001$ ); V-  $r^2 = 0.99$ ; N and L-  $r^2 = 0.98$ . The slope of the Gompertz model demonstrated that when the decay in survival starts, it occurred significantly faster in virgin females ( $b = -0.185 \pm 0.015$ ) than in reproductive groups (normal and late reproduction,  $b = -0.143 \pm 0.012$  and  $-0.174 \pm 0.016$ , respectively). Survival curves profiles show that virgin females took longer to start dying (slope at 20 days: V= -0.006; N= -0.011 and; L= -0.008), but virgins showed a faster decay in survival at 37 days (V=  $-0.0682 \pm 0.0001$ ), differing from reproductive groups (N=  $-0.0530 \pm 0.0001$  and L=  $-0.0640 \pm 0.0004$ ).

Taking account the Gompertz parameters,  $T_{max}$  were very similar among treatments, *i.e.*, 47.46, 46.58 and 46.60 days for N, V and L groups, respectively. No significant differences were found. The MRDT was significantly higher in normal reproductive females ( $4.84 \pm 0.38$  days) than virgin females ( $3.74 \pm 0.29$ ). For late reproduction females, the figure was  $3.97 \pm 0.34$  days.

#### **3.2. Neurolipofuscin accumulation**

Neurolipofuscin granules were found in different regions over the entire brain, including a neurosecretory center (*pars intracerebralis*), and Kenyon cells bodies at the mushroom bodies. Within each reproductive treatment, it was found a significant age dependency in accumulation of neurolipofuscin (ANOVA,  $p = 0.001$ ). The reproductive condition was not related to neurolipofuscin accumulation (ANOVA,  $p = 0.50$ ), as no interaction between variables was found (ANOVA,  $p = 0.21$ ). All Pairwise Multiple Comparison (Holm-Sidak method) to age data showed significant differences

in neurolipofuscin accumulation between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> and between the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> sampling times ( $p < 0.001$ ). No differences between the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> sampling times appeared ( $p < 0.78$ ) (scatter plot: Fig.1).

### 3.3. Tympanal wear

In the comparison between young (14 days) and old females (30 days) tympanum showed macroscopically differences (Fig. 2). The young female tympanum had a clean, continuous and homogeneous surface. During ageing, mainly from the ~37<sup>th</sup> day of adulthood (2<sup>nd</sup> sampling time), damages were more pronounced, changing clearly the normal morphology of the posterior tympanal membrane. The number and integrity of hairs (bristles) that typically surround tympanum in early adult females were remarkably reduced.

In our exploration, five different kinds of damage were found in SEM images analysis: excrescence (Exc); plaque formation (Pqf); fungi agglomerate (Fng); crack between tympanal and tibia cuticle (Ctt) and perforation (Prf) (Fig. 3).

For Exc the age was significantly ( $p < 0.005$ ), without interaction between factors ( $p = 0.35$ ). All Pairwise Multiple Comparison to age data showed significant differences ( $p < 0.01$ ) just between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> sampling times. For Pqf the age was also statistically significant ( $p < 0.005$ ), without interaction ( $p = 0.73$ ). All Pairwise Multiple Comparison to age data showed significant differences ( $p < 0.01$ ) between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> and between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> sampling times. For fungi agglomerate (Fng), the effect of age was significant ( $p < 0.001$ ), not having interaction between factors ( $p = 0.82$ ). All Pairwise Multiple Comparison to age data showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>, between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> and also between 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> sampling times. For Ctt, the age showed significance ( $p < 0.05$ ), without interaction ( $p = 0.86$ ). The 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> sampling times showed differences ( $p < 0.05$ ) and also the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> ( $p < 0.01$ ) in the all Pairwise Multiple Comparison. The last damage, Prf, had statistical differences in age data ( $p < 0.001$ ), without interaction between factors ( $p = 0.97$ ). The Pairwise Multiple Comparison to age data showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>, 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> and 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> sampling times. There was no difference on tympanal wear between reproductive conditions (Exc:  $p = 0.42$ ; Pqf:  $p = 0.17$ ; Fng:  $p = 0.80$ ; Ctt:  $p = 0.69$  and Prf:  $p = 0.73$ ).

## 4. Discussion

The rationale of this investigation was that the reproduction process would decrease the survival of females, with the stronger effect found in normal reproduction females than in late reproduction females. Moreover, it was presumed that normal reproduction females would accumulate neurolipofuscin faster than virgin females. Tympanal wear, as an important sense for reproduction, was expected to increase after reproductive age (senescence).

### 4.1. Survival analyses

Interestingly, in our results, the lowest initial mortality rate of virgin *Gryllus assimilis* females is compensated by the increase in the mortality rate late in life and, consequently, it reflects the highest mortality rate doubling time (MRDT) found for virgins. On the other hand, in females mated at normal ages, the highest initial mortality rate at 20 days was compensated by the lowest increases in mortality rate as females got older. Late reproductive females have both initial mortality and increases in mortality rates that are in intermediate conditions compared to the other reproductive conditions. As all three treatments did not differ in  $T_{max}$ , the initial mortality rates have been counterbalanced by middle age mortality rates. A possible explanation – in light of the disposable soma theory – for this finding is that, initially, in the absence of males, females would invest more resources in somatic maintenance. This has also been reported for true bugs *Apolygus lucorum* [29]. This premise may explain the delay in the exponential decay in survival in virgin females of *G. assimilis* when it compared to mated ones.

The lowest increases in mortality rate in mated females as they got older, can be explained by beneficial effects of copulation, which are also described in a cricket of the same genus, *G. texensis*, where the fluids transferred within spermatophore by males acted as an immune system stimulant in females, increasing its survival and resistance to pathogens [30]. Still in *Gryllus*, the work of Wagner *et al.* [31] showed that multiple copula increased survival of *Gryllus lineaticeps* females up to 32% when compared to females that had only a single copula. In this investigation, as no differences in maximum longevity were found, the possibility of beneficial effects of copulation would be related to the lowest increase in mortality observed in middle-aged mated females. However, in this experiment, it was not registered, for each female, whether multiple or single copulations occurred.

The assumption that virgin females do not lay eggs is at the core of the costs of reproduction idea, particularly impacting the maximum longevity. However, this assumption is incorrect since virgin females of *G. assimilis* do lay eggs. Dean's [11] study on grasshoppers showed that virgin females, although lived longer than mated females, produced a higher total number of eggs than mated females, suggesting that the costs of reproduction in this species is not related to the egg production. Some virgin females of different taxonomic groups also produce and lay eggs, even if not fertilised, such as the predatory pentatomid *Podisus nigrispinus* [32] and the seaweed fly *Coelopa frigida* [33], suggesting that the maturation of oocytes occurs independently of mate condition, perhaps related to low probability of these females to keep virgin in the field [33]. So, in the case of *G. assimilis* the costs of oogenesis and egg laying could not be demonstrated to be a factor interfering the maximum longevity, as no difference between virgins and mated females were identified in respect to egg laying behaviour.

Another approach to this subject is related to findings in Mediterranean fruit flies [34], in which the rate of decline of egg laying – and not the intensity of reproduction – predicted best the latter mortality. For this rationale, a slow declining in egg laying rates is related with a longer life span. Therefore, if *G. assimilis* females of the present investigation did not differ in the rate of decline of egg laying, no differences in  $T_{max}$  would be expected. This explanation is interesting because it has as consequence that the reproductive pattern of laying are coordinated with the physiological age of an individual [34], an issue that can be further explored using neurolipofuscin quantification.

No difference in  $T_{max}$  figures could be related to the experimental design. Recent investigations have suggested that the observation of trade-offs in laboratory studies are unlikely since organisms typically are reared in optimum conditions of feeding (*ad libitum*) and health [9,35-37]. Therefore, the animal would not have to divert energy reserves from maintenance to reproduction, because energy resources are not limited to support both physiological traits simultaneously, therefore masking possible trade-offs, expressed as different maximum longevity between reproductive treatments.

A trade-off could be observed in the life history of these cricket females in terms of the effects of reproduction, which were observed on early and middle age mortality rates, but not terms of maximum longevity, which seemingly compensated each other.

## **4.2. Neurolipofuscin accumulation and survival**

Our results report the first occurrence of morphological neurolipofuscin in *Gryllus assimilis*. As this pigment reflects the rate of physiological ageing, as a result of the production of by-products, such as free radicals, inevitably produced by metabolism and increased with higher metabolic rates [38-41]. Actually, this has been documented for crustaceans [42], in which increasing of rearing temperatures made lifespan shorter and increased neurolipofuscin accumulation rate in a freshwater crayfish. In insects, activity restriction increased the lifespan of houseflies and decreased the accumulation rate of neurolipofuscin [43].

Results of the present investigation showed a significant increase in neurolipofuscin at 37-38 days-old females of all treatments. While mortality at 20 days was negligible, at 37-38 days survival was no larger than 50% in all treatments, and neurolipofuscin accumulation reached the maximum, as in any treatment it was observed a significant difference between neurolipofuscin accumulated at 37-38 days and at 46-48 days. Therefore, the sharp increase in neurolipofuscin accumulation was observed during the same period of a clear drop in survival. The inverse relationship between post-maturity neurolipofuscin accumulation and survival is important because it reinforces the link between senescence – independently of the reproduction treatment – and adult death, as suggested by Fonseca *et al.* [27], and it can be related to the role of the nervous system in controlling invertebrate ageing and longevity [44-46].

The increase in neurolipofuscin accumulation was likely not related to the reproductive effort, as egg-laying was observed in all treatments. Two mechanisms could be suggested to explain it. The first is that the eggs production does not change metabolic rate in these insects. In insects, brain metabolic rate is coupled with the animal metabolic rate [47]. The second, as mentioned earlier [34], is that reproductive pattern of laying is in synchrony with the physiological age of an individual, therefore, the physiological age – as accrued by neurolipofuscin accumulation – is not dependent of the reproductive pattern, but otherwise, the reproductive pattern that is dependent of the physiological ageing.

## **4.3. Tympanum wear**

This study is a pioneer in the morphological identification of damages caused throughout the ageing process in cricket auditory organ. These organisms are extensively studied with a focus on bioacoustics [48-51], but no information about



tympanum wear is found. Lesions begin to appear early in many of the analysed females (~ 14 days) and accentuate mainly after the reproductive period (senescence) (~ 30-40 days). The posterior tympanal membrane, analysed in our study is the main structure responsible for capturing sound from the external environment being a fundamental requirement for hearing [52,53].

Although a single study reports contrary evidence regarding the role of the auditory system in reproductive behaviour [54], there is substantial evidence supporting the role hearing as an essential sense which enables females to identify and to choose males to mate based on the calling songs [55-58,21,59,60].

Abiotic factors were controlled during the experiment. Therefore in the environment these lesions may be even more serious, as they are faced with different stressors, such as predation and adverse climatic conditions. However, even with this control, the presence of fungi agglomerate covering partially or totally the posterior tympanic membrane was found, and may be the result of the lack in grooming behaviour of the place as they progress in ageing, taking account that middle and aged females had a significant increase in this damage, since it is a fundamental process for cleaning surfaces, including the sensorial ones [61]. The presence of fungi agglomerates likely impairs the normal functioning of this membrane during sound perception. It is known that locomotor activity and grooming decrease as a natural consequence of ageing [62,63], therefore fungi accumulation would be a natural process not counterbalanced by cleaning. On the other hand, since the excrescence is a superficial lesion, when alone, it should influence in a smaller scale.

Paton *et al.* [64] have shown that perforations in the posterior tympanic membrane or simply cover it with Vaseline® reduces the sensitivity of the auditory interneurons, decreasing sensory inputs in this place. In addition, the sensitivity threshold of the nerve cells of the injured site gradually increases with the perforations size until reaching a peak, resulting in loss of tuning. This demonstrates the importance of maintaining the integrity of this membrane [64]. Following this reasoning, since it is an irreversible lesion and tends to increase, it was considered the most serious lesion, including direct entry of pathogens and dust into the insect body, since there are nearby hemolymphatic channels and tracheas [65]. The same reasoning applies to the crack between the cuticle of tympanal and tibial membranes. In addition, the continuity of the tympanum cuticle with tibial cuticle is fundamental for the sensitivity of this system [66].

A great variability of results was found in the present investigation, preventing the observation of significant differences between middle aged females and older females. However, formation of fungi agglomerate, excrescence and perforation increased significantly in relation to the chronological age, characterising the morphological ageing of the posterior tympanic membrane and the consequent loss of efficiency. Apparently, the peak in wear is not observed at the oldest animals, but it is already found in middle aged females. Considering the reproductive process, this is exactly the relevant period, as these females from 15 to 30 days old (from imaginal moult) are those reproductively active.

In this way, more detailed comparative studies involving parameters such as behaviour should be done in order to relate the damages identified in the tympanum to the reproductive success of females. Ultrastructural analysis in transmission electron microscopy also makes an interesting approach for the identification of structural changes at the cellular and tracheal level throughout insect senescence.

Based on discussion above, we conclude that a no traditional trade-off could be observed in the life history of cricket females. This trade-off was not in terms of maximum longevity, but, instead, the effects of reproduction were observed on early and middle age mortality rates, which apparently compensated each other. Moreover, a decrease in survival was clearly inversely related to neurolipofuscin accumulation, similar to the profile described for other Orthoptera. Lastly, the worsened wear on the posterior tympanal membrane coincided with the reproductive senescence in *Gryllus assimilis* females.

## **5. Acknowledgements**

We are thankful to the CEME-Sul/FURG for the assistance with SEM images, and the support of Brazilian agencies - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - for the fellowship of Limberger, G. M. We also thank MSc. Luciano de Pinho Martins for help in specie identification.

## **6. References**

1. Flatt T. 2011 Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 46(5), 369–375. (doi:10.1016/j.exger.2010.10.008)

2. Beverton RJH, Holt, SJ. 1959 A review of the lifespans and mortality rates of fish in nature, and their relation to growth and other physiological characteristics, pp. 142–180. (doi:10.1002/9780470715253.ch10)
3. Bourliere F. 1959 Lifespans of mammalian and bird populations in nature, pp. 90–105. (doi:10.1002/9780470715253.ch7)
4. Maynard-Smith J. 1959 The Rate of Ageing in *Drosophila Subobscura*, pp. 269–301. (doi:10.1002/9780470715253.ch15)
5. Zera AJ, Harshman LG. 2001 The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 95–126. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006)
6. Prowse N, Partridge L. 1997 The effects of reproduction on longevity and fertility in male *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43(6), 501–512. (doi:10.1016/S0022-1910(97)00014-0)
7. Williams GC. 1966 Natural Selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's Principle. *The American Naturalist*, 100(916), 687–690. (doi:10.1086/282461)
8. Kirkwood TBL. 2005 Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120(4), 437–447. (doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027)
9. De Loof A. 2011 Longevity and aging in insects: Is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the “trade-off” concept. *Journal of Insect Physiology*, 57(1), 1–11. (doi:10.1016/j.jinsphys.2010.08.018)
10. Dao A, Kassogue Y, Adamou A, Diallo M, Yaro AS, Traore SF, Lehmann T. 2010 Reproduction-longevity trade-off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 47(5), 769–777. (doi:10.1603/ME10052)
11. Dean JM. 1981 The relationship between lifespan and reproduction in the grasshopper *Melanoplus*. *Oecologia*, 48(3), 385–388. (doi:10.1007/BF00346499)
12. Luckinbill LS, Arking R, Clare MJ, Cirocco WC, Buck SA. 1984 Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 38(5), 996. (doi:10.2307/2408433)
13. Holliday R. 1995 Understanding Ageing. Cambridge University Press. (doi:10.1098/rstb.1997.0163)
14. Froy H, Lewis S, Nussey DH, Wood AG, Phillips, RA. 2017 Contrasting drivers of reproductive ageing in albatrosses. *Journal of Animal Ecology*, 86(5), 1022–1032. (doi:10.1111/1365-2656.12712)

15. Reed TE, Kruuk LEB, Wanless S, Frederiksen M, Cunningham EJA, Harris, MP. 2008 Reproductive senescence in a long-lived seabird: rates of decline in late-life performance are associated with varying costs of early reproduction. *The American Naturalist*, 171(2), E89–E101. (doi:10.1086/524957)
16. Williams GC. 1957 Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*, 11(4), 398–411. (doi:10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x)
17. Prosser MR, Murray A-M, Cade WH. 1997 The influence of female age on phonotaxis during single and multiple song presentations in the field cricket, *Gryllus integer* (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Insect Behavior*, 10(3), 437–449. (doi:10.1007/BF02765609)
18. Pacheco K, Dawson JW, Jutting M, Bertram SM. 2013 How age influences phonotaxis in virgin female Jamaican field crickets (*Gryllus assimilis*). *PeerJ*, 1, e130. (doi:10.7717/peerj.130)
19. Yack JE. 2004 The structure and function of auditory chordotonal organs in insects. *Microscopy Research and Technique*, 63(6), 315–337. (doi:10.1002/jemt.20051)
20. Gerhardt HC, Huber F. 2002 Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions. Chicago Univ. Press, Chicago
21. Bertram SM, Rook V. 2012 Relationship between condition, aggression, signaling, courtship, and egg laying in the field cricket, *Gryllus assimilis*. *Ethology*, 118(4), 360–372. (doi:10.1111/j.1439-0310.2011.02019.x)
22. Terman A, Brunk UT. 1998 Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*, 106(1–6), 265–276. (doi:10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x)
23. Wang Y, Salmon AB, Harshman LG. 2001 A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 36(8), 1349–1359. (doi:10.1016/S0531-5565(01)00095-X)
24. Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Sorci G. 2004 Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, 7(5), 363–368. (doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00594.x)
25. Rush B, Sandver S, Bruer J, Roche R, Wells M, Giebultowicz J. 2007 Mating increases starvation resistance and decreases oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* females. *Aging Cell*, 6(5), 723–726. (doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00322.x)

26. Finch CE. 1990 Longevity, senescence and the genome. University of Chicago Press, Chicago.
27. Fonseca DB, Brancato CL, Prior AE, Shelton PM, Sheehy MRJ. 2005 Death rates reflect accumulating brain damage in arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1575), 1941–1948. (doi:10.1098/rspb.2005.3192)
28. Sheehy MRJ, Caputi N, Chubb C, Belchier M. 1998 Use of lipofuscin for resolving cohorts of western rock lobster (*Panulirus cygnus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(4), 925–936. (doi:10.1139/f98-016)
29. Li W, Yuan W, Zhao X, Li Y, Wu K. 2017 Effects of mating on ovarian development and oviposition of *Apolygus lucorum*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(4), 1442–1446. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.10.013>
30. Worthington AM, Kelly CD. 2016 Females gain survival benefits from immune-boosting ejaculates. *Evolution*, 70(4), 928–933. (doi:10.1111/evo.12890)
31. Wagner WE, Kelley RJ, Tucker KR, Harper CJ. 2001 Females receive a life-span benefit from male ejaculates in a field cricket. *Evolution*, 55(5), 994–1001. (doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00616.x)
32. Soares MA, Batista JD, Zanuncio JC, Lino Neto J, Serrão JE. 2011 Ovary development, egg production and oviposition for mated and virgin females of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(4). <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i4.6694>
33. Dunn DW, Sumner JP, Goulson D. 2005 The benefits of multiple mating to female seaweed flies, *Coelopa frigida* (Diptera: Coelpidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(2), 128–135. (doi:10.1007/s00265-005-0922-x)
34. Muller H-G, Carey JR, Wu D, Liedo P, Vaupel JW. 2001 Reproductive potential predicts longevity of female Mediterranean fruitflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1466), 445–450. (doi:10.1098/rspb.2000.1370)
35. Metcalfe NB, Monaghan P. 2013 Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(6), 347–350. (doi:10.1016/j.tree.2013.01.015)
36. Speakman JR, Garratt M. 2014 Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays*, 36(1), 93–106. (doi:10.1002/bies.201300108)

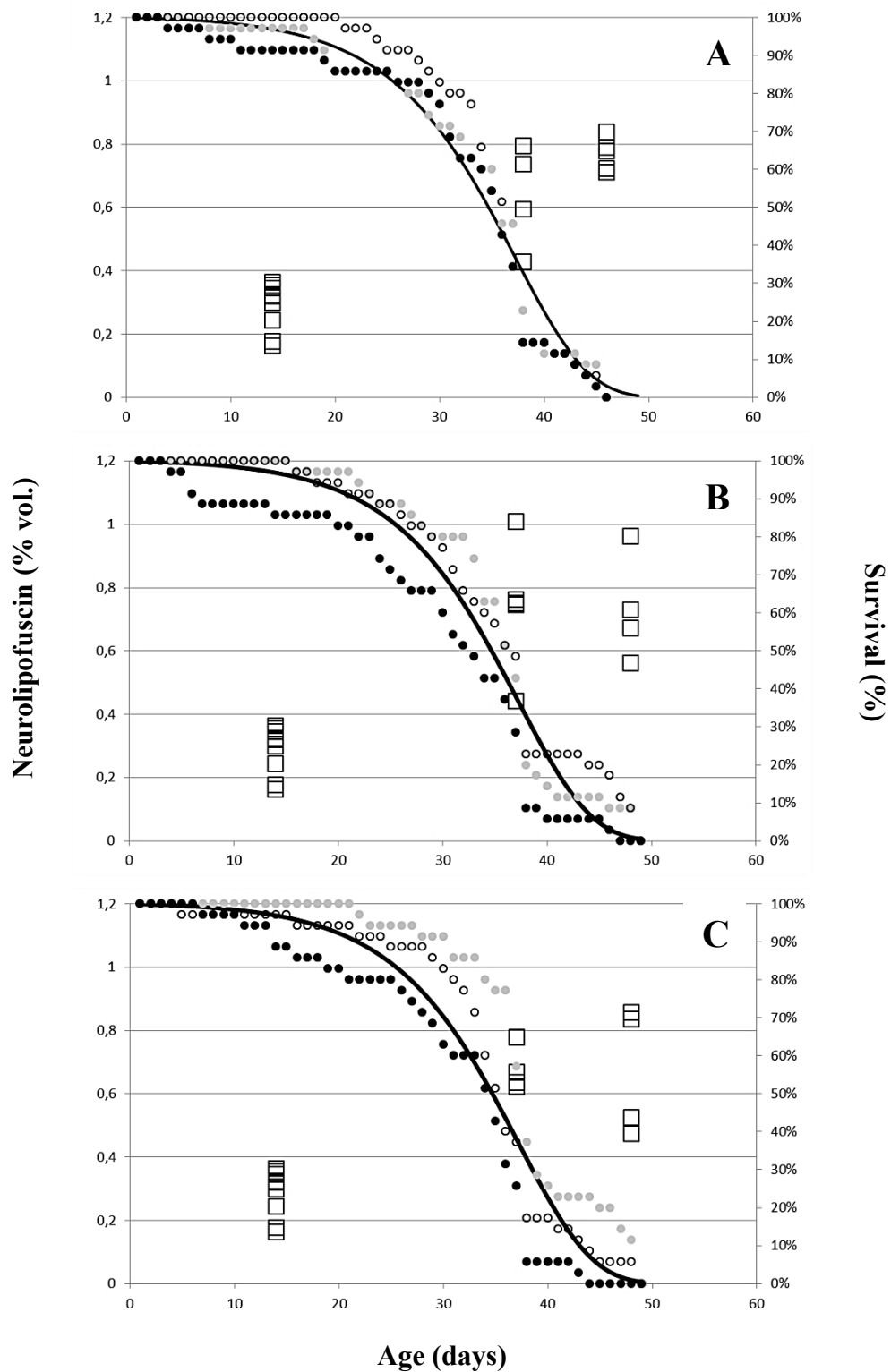
37. Beaulieu M, Geiger RE, Reim E, Zielke L, Fischer K. 2015 Reproduction alters oxidative status when it is traded-off against longevity. *Evolution*, 69(7), 1786–1796. (doi:10.1111/evo.12697)
38. Sohal RS, Brunk UT. 1990 Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. In: Lipofuscin and Ceroid Pigments (E.A. Porta, ed.), pp. 17- 29. New York: Plenum Press.
39. Fleming JE, Reveillaud I, Niedzwiecki A. 1992 Role of oxidative stress in *Drosophila* aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3–6), 267–279. (doi:10.1016/0921-8734(92)90031-J)
40. Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Suzuki K. 1998 A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, 394(6694), 694–697. (doi:10.1038/29331)
41. Sitte N, Merker K, Grune T, von Zglinicki T. 2001 Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts *in vitro*: an indicator of oxidative stress. *Experimental Gerontology*, 36(3), 475–486. (doi:10.1016/S0531-5565(00)00253-9)
42. Sheehy MRJ, Greenwood JG, Fielder DR. 1995 Lipofuscin as a record of “rate of living” in an aquatic poikilotherm. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 50A(6), B327–B336. (doi:10.1093/gerona/50A.6.B327)
43. Sohal RS, Donato H. 1979 Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*. *Journal of Gerontology*, 34(4), 489–496. (doi:10.1093/geronj/34.4.489)
44. Boulianne G. 2001 Neuronal regulation of lifespan: clues from flies and worms. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(9), 883–894. (doi:10.1016/S0047-6374(01)00245-7)
45. Mattson M. 2002 How does the brain control lifespan? *Ageing Research Reviews*, 1(2), 155–165. (doi:10.1016/S1568-1637(01)00003-4)
46. Wolkow CA. 2002 Life span: getting the signal from the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 25(4), 212–216. (doi:10.1016/S0166-2236(02)02133-1)
47. Kern MJ. 1986 Brain aging in insects. *Insect Aging: Strategies and Mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 90-105. (doi:10.1007/978-3-642-70853-4).

48. Kostarakos K, Hedwig B. 2012 Calling song recognition in female crickets: temporal tuning of identified brain neurons matches behavior. *Journal of Neuroscience*, 32(28), 9601–9612. (doi:10.1523/JNEUROSCI.1170-12.2012)
49. Pollack GS, Kim JS. 2013 Selective phonotaxis to high sound-pulse rate in the cricket *Gryllus assimilis*. *Journal of Comparative Physiology A*, 199(4), 285–293. (doi:10.1007/s00359-013-0792-z)
50. Hennig RM, Heller K-G, Clemens J. 2014 Time and timing in the acoustic recognition system of crickets. *Frontiers in Physiology*, 5. (doi:10.3389/fphys.2014.00286)
51. Godthi V, Pratap R. 2015 Dynamics of cricket sound production. *Journal of Vibration and Acoustics*, 137(4), 41019. (doi:10.1115/1.4030090)
52. Kleindienst H-U, Wohlers DW, Larsen ON. 1983 Tympanal membrane motion is necessary for hearing in crickets. *Journal of Comparative Physiology A*, 151(4), 397–400. (doi:10.1007/BF00605455)
53. Imaizumi K, Pollack GS. 1999 Neural coding of sound frequency by cricket auditory receptors. *The Journal of Neuroscience*, 19(4), 1508 LP-1516. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/19/4/1508>
54. Vedenina VY, Pollack GS. 2012 Recognition of variable courtship song in the field cricket *Gryllus assimilis*. *Journal of Experimental Biology*, 215(13), 2210–2219. (doi:10.1242/jeb.068429)
55. Simmons LM. 1991 Female choice and the relatedness of mates in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Animal Behaviour*, 41(3), 493–501. (doi:10.1016/S0003-3472(05)80852-8)
56. Wagner WE, Reiser MG. 2000 The importance of calling song and courtship song in female mate choice in the variable field cricket. *Animal Behaviour*, 59(6), 1219–1226. (doi:10.1006/anbe.1999.1428)
57. Stumpner A, von Helversen D. 2001 Evolution and function of auditory systems in insects. *Naturwissenschaften*, 88(4), 159–170. (doi:10.1007/s001140100223)
58. Rebar D, Bailey NW, Zuk M. 2009 Courtship song's role during female mate choice in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*. *Behavioral Ecology*, 20(6), 1307–1314. (doi:10.1093/beheco/arp143)
59. Shestakov LS, Vedenina VY. 2015 Broad selectivity for courtship song in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Ethology*, 121(10), 966-976. (doi:10.1111/eth.12409)

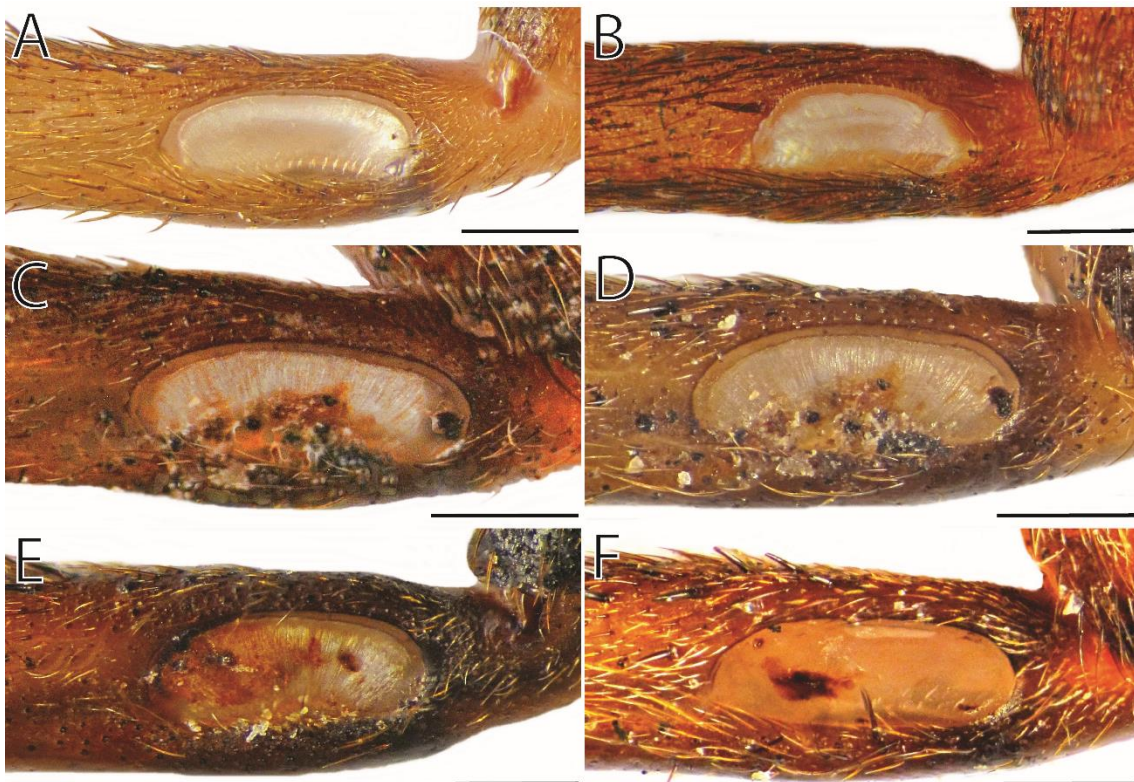
60. Botha LM, Jones TM, Hopkins, GR. 2017 Effects of lifetime exposure to artificial light at night on cricket (*Teleogryllus commodus*) courtship and mating behaviour. *Animal Behaviour*, 129, 181–188. (doi:10.1016/j.anbehav.2017.05.020)
61. Zhukovskaya M, Yanagawa A, Forschler B. 2013 Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. *Insects*, 4(4), 609–630. (doi:10.3390/insects4040609)
62. Scimonelli T, Marucco M, Celis M. 1999 Age-related changes in grooming behavior and motor activity in female rats. *Physiology & Behavior*, 66(3), 481–484. (doi:10.1016/S0031-9384(98)00314-X)
63. Ridgel AL, Ritzmann RE. 2005 Insights into age-related locomotor declines from studies of insects. *Ageing research reviews*, 4(1), 23-39. (doi:10.1016/j.arr.2004.08.002)
64. Paton JA, Capranica RR, Dragsten PR, Webb WW. 1977 Physical basis for auditory frequency analysis in field crickets (Gryllidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 119(3), 221–240. (doi:10.1007/BF00656635)
65. Friedman MH. 1972 An electron microscopic study of the tympanal organ and associated structures in the foreleg tibia of the cricket, *Gryllus assimilis*. *Journal of Morphology*, 138(3), 329–347. (doi:10.1002/jmor.1051380303)
66. Ball EE, Cowan AN. 1978 Ultrastructural study of the development of the auditory tympana in the cricket *Teleogryllus commodus* (Walker). *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 46; 75-87.



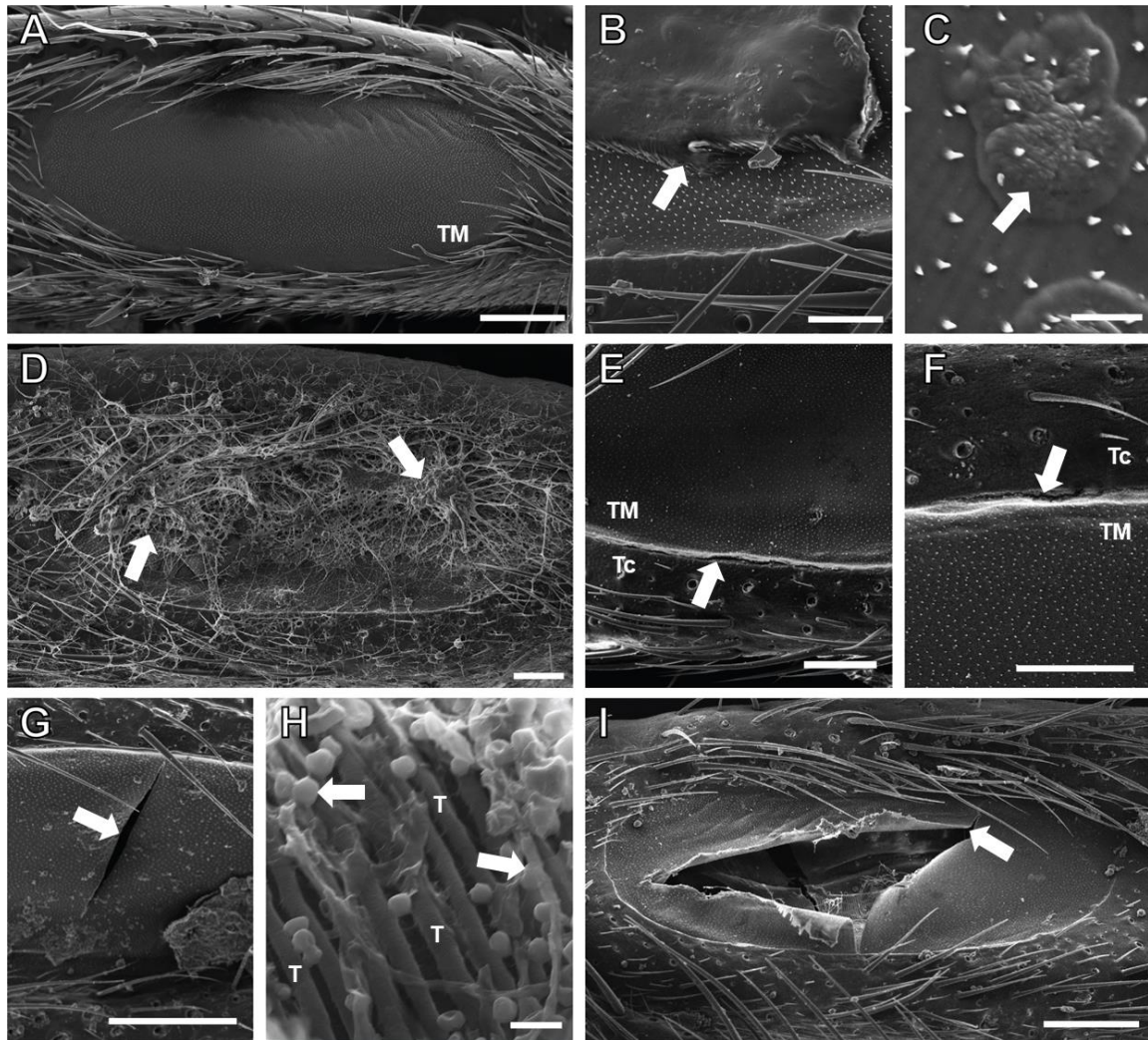
**FIGURES**



**Figure 1- Survival curves and scatter plot of neurolipofuscin accumulation. Virgins (A), normal (B) and late reproduction females (C). Circles: replicates per group (reproductive treatment). Cubic symbols: neurolipofuscin samples. Solid line: Gompertz model fitted.**



**Figure 2-** Macroscopic aspects of posterior tympanal membrane of *G. assimilis* in coloured images. A - B: 14 days old females. C - F: 30 days old females. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3- Eletromicrography of posterior tympanal membrane (TM) of *G. assimilis* females. A: Posterior tympanum surface at 14 days old; B: plaque formation (arrow); C: excrescence (setae); D: fungi agglomerate (arrow); E and F: crack between foretibial cuticle (Tc) and tympanal membrane (TM) (arrow); G: perforation (arrow); H: magnification of tracheoles (T) within TM perforation. Fungal colonization of auditory tracheoles (arrows). I: Severe perforation (arrow). B, C, D, E, F, G, H and I: senescent females (37-48 days old). Scale bars = 200, 50, 10, 100, 100, 100, 200, 5 and 200  $\mu$ m, respectively.**

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1-** Survival curves and scatter plot of neurolipofuscin accumulation. Virgins (A), normal (B) and late reproduction females (C). Circles: replicates per group (reproductive treatment). Cubic symbols: neurolipofuscin samples. Solid line: Gompertz model fitted.

**Figure 2-** Macroscopic aspects of posterior tympanal membrane of *G. assimilis* in coloured images. A - B: 14 days old females. C - F: 30 days old females. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3-** Elettromicrography of posterior tympanal membrane (TM) of *G. assimilis* females. A: Posterior tympanum surface at 14 days old; B: plaque formation (arrow); C: excrescence (arrow); D: fungi agglomerate (arrow); E and F: crack between foretibial cuticle (Tc) and tympanal membrane (TM) (arrow); G: perforation (arrow); H: magnification of tracheoles (T) within TM perforation. Fungal colonization of auditory tracheoles (arrows). I: Severe perforation (arrow). B, C, D, E, F, G, H and I: senescent females (37-48 days old). Scale bars = 200, 50, 10, 100, 100, 100, 200, 5 and 200  $\mu\text{m}$ , respectively.

### 3. DISCUSSÃO GERAL

Seguindo nosso raciocínio para esta pesquisa, a reprodução iria acarretar no decréscimo na sobrevivência de fêmeas acasaladas, com maior efeito a ser percebido no grupo de reprodução normal comparado ao de reprodução tardia. Assim, fêmeas virgens seriam mais longevas. Neste viés, fêmeas reprodutivamente ativas acumulariam neurolipofuscina mais rápido que as virgens, explicado pelo aumento metabólico provocado pelo processo reprodutivo (e.g. produção e postura dos ovos). O agravamento do desgaste da membrana timpanal posterior, como sendo um sentido fundamental para a reprodução, foi esperado após a idade reprodutiva normal (~30 dias de vida adulta), quando os animais tornam-se senescentes.

#### 3.1. Análise de sobrevivência

Em nossos resultados, a taxa de mortalidade inicial mais baixa das fêmeas virgens de *Gryllus assimilis* é compensada pelo aumento da taxa de mortalidade em fêmeas de meia-idade e, conseqüentemente, reflete no aumento do tempo da duplicação da taxa de mortalidade (MRDT). Por outro lado, nas fêmeas acasaladas em idades normais, mortalidades iniciais mais altas aos 20 dias são compensadas por menores aumentos da taxa de mortalidade à medida que envelhecem. As fêmeas tardias têm tanto mortalidades iniciais e aumentos na taxa de mortalidade que encontram-se em situações intermediárias às outras duas condições reprodutivas. Como todos os tratamentos não diferiram na longevidade máxima, a taxa de mortalidade inicial foi contrabalançada por taxas de mortalidade intermediárias. Isso pode ser explicado tendo em vista a teoria da soma descartável – em que fêmeas na ausência de machos irão investir mais energia na manutenção somática do que para a reprodução. Isto foi encontrado para fêmeas do mirídeo *Apolygus lucorum*, que na ausência de machos investem mais em manutenção somática do que no crescimento dos ovários, elevando a longevidade e a conseqüente probabilidade de encontrar um futuro acasalamento (Li, et al., 2017). Esta premissa pode explicar o atraso na queda exponencial da sobrevivência em fêmeas virgens de *G. assimilis*, quando comparadas aos grupos que acasalaram.

O menor aumento na taxa de mortalidade de fêmeas acasaladas à medida que avançam no envelhecimento pode ser explicado pelos efeitos benéficos da cópula, que já foram encontrados para um grilo do mesmo gênero deste trabalho, *G. texensis*, em que substâncias transferidas pelos machos juntamente com o espermátóforo, atuaram como estimulantes do sistema imune nas fêmeas (Shoemaker, et al., 2006; Worthington

& Kelly, 2016), aumentando a sobrevivência e a resistência a patógenos. Ainda com *Gryllus*, o trabalho de Wagner et al. (2001), mostrou que múltiplas cópulas elevaram a sobrevivência de fêmeas de *Gryllus lineaticeps* em até 32% quando comparado com fêmeas que tiveram somente uma única cópula. Em nosso experimento, não tivemos controle de quantas vezes cada fêmea copulou, pois ficaram durante sete dias em contato com machos no mesmo ambiente, no entanto, quando consideramos o menor declínio da mortalidade dos grupos reprodutivos, podemos estabelecer uma relação com estas substâncias transmitidas durante a cópula, pois embora efeitos da cópula não interfiram na longevidade máxima, pode modular a história de vida das fêmeas reprodutivas, atrasando a senescência reprodutiva. Este fato foi encontrado por Reinhardt, et al. (2009), para o percevejo-da-cama *Cimex lectularius*, que teve a senescência reprodutiva atrasada dependendo da quantidade de ejaculado experimentalmente administrados às fêmeas.

Por outro lado, ao relacionar o *trade-off* entre a reprodução e manutenção/sobrevivência neste grupo de animais, os mais diversos resultados emergem. Trabalhos como o de Dean (1981), com gafanhotos, mostrou que fêmeas virgens apesar de mais longevas que fêmeas acasaladas, produziram um maior número total de ovos, indicando que os custos da reprodução nesta espécie não estão relacionados com a produção de ovos. Embora o número total de ovos por grupo não tenha sido considerado, Dunn, et al. (2005), não encontraram relação entre o número de ovos postos e o tamanho das fêmeas com a taxa de mortalidade, independente de serem virgens ou submetidas a diferentes condições de acasalamento, utilizando como modelo a mosca *Coelopa frigida*. Algumas fêmeas virgens de insetos de diferentes grupos taxonômicos também possuem a característica de produzir e por ovos, mesmo não fecundados, como por exemplo, o pentatomídeo predador *Podisus nigrispinus* (Soares, et al., 2011) e a mosca das algas *C. frigida* (Dunn, et al., 2005), sugerindo que a maturação dos oócitos ocorre independente da condição reprodutiva e que isso talvez esteja relacionado com a baixa probabilidade destas fêmeas se manterem não fecundadas (virgens) no ambiente (Dunn, et al., 2005). Ainda, no caso de *G. assimilis* os custos da ovogênese e da postura não se mostraram fatores que interferem na longevidade máxima entre virgens e acasaladas.

Outra abordagem relativa aos nossos resultados foi encontrada na mosca do mediterrâneo (Muller et al., 2001), em que a taxa de declínio da postura dos ovos (e não a intensidade da reprodução) antecedeu a mortalidade. Neste sentido, o lento declínio na

taxa de produção de ovos está relacionado com maior tempo de vida. Assim, as fêmeas de *G. assimilis*, neste trabalho, não apresentaram diferenças na taxa de declínio da postura de ovos e conseqüentemente diferenças na longevidade máxima não seriam esperadas. Esta explicação torna-se interessante, pois o padrão da postura de ovos ocorre coordenadamente com a idade fisiológica de um indivíduo (Muller et al., 2001), sendo esta uma questão que pode ser explorada mais afundo utilizando a quantificação de neurolipofuscina.

Nossos resultados de sobrevivência também podem estar relacionados ao desenho experimental. Trabalhos recentes sugerem que a observação do *trade-off* em laboratório é dificultada, haja vista que os organismos permanecem mantidos em condições ótimas de temperatura, alimentação (*ad libitum*) e saúde durante a experimentação (De Loof, 2011; Metcalfe & Monaghan, 2013; Speakman & Garratt, 2014; Beaulieu, et al., 2015). Neste viés, o animal não terá que direcionar as reservas energéticas para a reprodução ou para a manutenção (e.g. reparos, sistema imunitário), pois dispõe de recursos para sustentar ambos os processos fisiológicos em simultâneo, mascarando ou atenuando possíveis *trade-offs* entre estes fatores, demonstrado pela ausência de diferenças entre a longevidade máxima encontrada. Vale ressaltar que apesar disto, esta situação bioenergética também pode ser observada no ambiente.

### **3.2. Acúmulo de neurolipofuscina e sobrevivência**

Nosso estudo reporta pela primeira vez a ocorrência/análise de neurolipofuscina em grilos. Este pigmento reflete a taxa de envelhecimento fisiológico, como resultado da produção de subprodutos, como espécies reativas de oxigênio, inevitavelmente produzidas pelo metabolismo (Sohal & Brunk, 1990; Fleming et al., 1992; Ishii et al., 1998; Sitte et al., 2001). Isto já foi documentado para crustáceos (Sheehy et al., 1995), em que o aumento das temperaturas de cultivo diminuiu o tempo de vida e aumentou a taxa de acúmulo de neurolipofuscina em um lagostim de água doce (*Cherax quadricarinatus*). Em insetos, como na mosca doméstica (*Musca domestica*), a restrição de atividades físicas aumentou a sobrevivência e diminuiu a taxa de acúmulo de neurolipofuscina (Sohal & Donato, 1979).

Os resultados do nosso trabalho mostram um aumento significativo no acúmulo de neurolipofuscina aos 37-38 dias para todos os grupos experimentais. Considerando a sobrevivência aos 20 dias, a mortalidade é praticamente insignificante, enquanto aos 37-38 dias (segundo momento amostral), a sobrevivência não foi maior que 50% para todos



os tratamentos, e o acúmulo de neurolipofuscina alcançou seu pico máximo. Não foram encontradas diferenças no acúmulo de neurolipofuscina entre os tratamentos aos 37-38 e 46-48 dias. Portanto, o aumento acentuado no acúmulo deste pigmento foi observado durante o mesmo período em que houve uma clara queda da sobrevivência dos grupos. Uma relação inversa entre o acúmulo de neurolipofuscina e a sobrevivência é importante por reforçar a ligação entre senescência (independente da condição reprodutiva imposta) e a morte de ortópteros adultos, como sugerido por Fonseca et al. (2005). Adicionalmente, esta observação pode ser relacionada com o papel do sistema nervoso controlando o processo de envelhecimento e a longevidade de invertebrados (Boulianne, 2001; Mattson et al., 2002; Wolkow, 2002).

A taxa de acúmulo de neurolipofuscina provavelmente não está relacionada ao esforço reprodutivo, como a produção de ovos observada em todos os tratamentos. Dois mecanismos podem ser sugeridos para explicar este fato. O primeiro é que a produção de ovos não altera a taxa metabólica nestes insetos. Em insetos, a taxa metabólica do cérebro acompanha a taxa metabólica do animal (Kern, 1986). O segundo mecanismo, como mencionado anteriormente (Muller et al., 2001), está relacionado a sincronização da produção de ovos com a idade fisiológica do indivíduo, assim, a idade fisiológica (demonstrada pelo acúmulo de neurolipofuscina) não é dependente do padrão reprodutivo do animal, mas sim o padrão reprodutivo que é dependente da idade fisiológica. Isto sugere que a cópula, incluindo possíveis substâncias transferidas pelos machos, e a idade da reprodução (normal ou tardiamente) não modulam o acúmulo de neurolipofuscina em grilos.

### **3.3. Desgaste do tímpano**

Este estudo é pioneiro na identificação morfológica de lesões causadas ao longo do processo de envelhecimento no aparelho auditivo de Gryllidae. Estes organismos são extensivamente estudados com foco em bioacústica, nas suas bases eletrofisiológicas e de comportamentos diversos, incluindo aqueles derivados do chamado dos machos para a cópula (*calling song*) e da resposta de fêmeas a este chamado (Popov & Shuvalov, 1977; Wohlers & Huber, 1982; Schöneich & Hedwig, 2010; Kostarakos & Hedwig, 2012; Harrison, et al., 2013; Pollack & Kim, 2013; Henning, et al., 2014; Godthi & Pratap, 2015; Fukutomi, et al., 2015), porém referente ao desgaste do sistema auditivo deste grupo, nomeadamente da membrana timpanal, não haviam informações científicas disponíveis. As lesões começam a aparecer desde cedo em muitas das fêmeas analisadas



(~14 dias) e acentuam-se principalmente após o período reprodutivo (senescência) (~30-40 dias). A membrana timpanal posterior, analisada em nosso trabalho, é a principal estrutura responsável pela captação do som proveniente do meio externo nestes animais (Kleindienst et al., 1983; Imaizumi & Pollack, 1999).

Embora um único estudo tenha relatado evidência contrária sobre o papel da audição no comportamento reprodutivo de grilos (Vedenina & Pollack, 2012), existe um grande suporte na literatura a respeito da utilização da audição pelas fêmeas na identificação e escolha de machos para a cópula, baseado nos sons de chamado (Simmons, 1986; Wagner & Reiser, 2000; Stumpner & von Helversen, 2001; Rebar et al., 2009; Bertram & Rook, 2012; Shestakov & Vedenina, 2015; Botha et al., 2017).

Fatores abióticos foram controlados durante o experimento, portanto, no ambiente estas lesões podem ser ainda mais graves, pois estão sujeitas a diferentes estressores, como predação e condições climáticas adversas. Todavia, mesmo com este controle, a presença dos fungos cobrindo parcial ou totalmente a membrana timpanal posterior foi encontrada, podendo ser resultado da falta de limpeza (*grooming*) do local à medida que avançam no envelhecimento, uma vez que não foram encontrados em fêmeas jovens e agravou-se significativamente no segundo (37-38 dias de vida adulta) e terceiro (46-48 dias de vida adulta) momentos amostrais, tendo em vista que este é um processo fundamental para a limpeza de superfícies, incluindo as sensoriais (Zhukovskaya, et al., 2013). A presença de fungos provavelmente dificulta o funcionamento adequado da membrana timpânica durante a percepção sonora. Sabe-se que com o avanço da idade, a atividade locomotora e o *grooming* diminuem como consequência natural do envelhecimento (Scimonelli, et al., 1999; Ridgel & Ritzmann, 2005). Logo, o acúmulo de fungos seria um processo natural que não é compensado pela limpeza. Sendo a excrescência uma lesão superficial na membrana timpanal, quando sozinha, deve influenciar em menor escala no processo vibratório.

Paton et al. (1977) mostraram que perfurações na membrana timpanal posterior ou simplesmente cobri-la com Vaselina®, diminuiu a sensibilidade dos interneurônios auditivos, reduzindo os *inputs* sensoriais neste local. Além disso, o limiar de sensibilidade das células nervosas do local lesionado aumenta gradativamente conforme o tamanho da perfuração, até alcançar um pico, acarretando na perda da sintonia do som (*tuning*); Isto demonstra a importância de manter a integridade desta membrana (Paton et al., 1977). Seguindo este raciocínio, por ser uma lesão irreversível e que tende a aumentar, foi considerada a lesão mais grave, inclusive por permitir/facilitar a entrada

direta de patógenos e impurezas para o interior do corpo do inseto, uma vez que neste local existem canais hemolinfáticos próximos e também inúmeras traqueias/traquéolas (Friedman, 1972), tornando-o mais suscetível. O mesmo raciocínio se aplica para a rachadura entre a cutícula das membranas timpanais e tibiais. Além disso, a continuidade da cutícula do tímpano com a da tibia é fundamental para a sensibilidade deste sistema (Ball & Cowan, 1978).

Uma grande variabilidade de resultados foi encontrada, impedindo que se estabelecessem relações entre os danos entre fêmeas de idade média e avançada. Contudo, a formação de aglomerados fúngicos, de excrescência e perfurações aumentaram significativamente em relação ao avanço da idade cronológica, designando ligações diretas com o envelhecimento morfológico da membrana timpanal posterior e a consequente provável perda da eficiência. Aparentemente, o pico do desgaste desta membrana não é observado nos animais mais velhos, mas já é visto em fêmeas de meia-idade. Considerando o processo reprodutivo, este é exatamente o período mais relevante, pois as fêmeas de 15-30 dias de vida adulta estão reprodutivamente ativas.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

Baseado nas discussões acima, conclui-se que o *trade-off* entre reprodução e sobrevivência pode ser observado na história de vida das fêmeas de *Gryllus assimilis*, graças a manifestação de um retardo na queda exponencial da sobrevivência ocorrido nas fêmeas virgens quando comparadas as copuladas, ou seja, investiram na manutenção somática na ausência da cópula. Além disso, o decréscimo da sobrevivência foi inversamente relacionado com o acúmulo de neurolipofuscina, similar ao perfil descrito para outro ortóptero. Por fim, a piora dos danos na membrana timpanal posterior coincidiu com a senescência reprodutiva nesta espécie de grilo.

Para a melhor compreensão do fenômeno de *trade-off* entre reprodução e sobrevivência neste grupo de insetos, anexar estressores exógenos nos diferentes grupos experimentais como a restrição alimentar e a exposição a patógenos parece uma interessante vertente para a pesquisa em laboratório, haja vista que terão acesso restrito a fonte energética e custos extras envolvidos com o sistema imunitário (manutenção). Nestas situações (escassez alimentar + reprodução e/ou patologias) o *trade-off*, eventualmente, se sobressairá e poderá ser melhor entendido. Além disso, os efeitos da cópula nesta espécie serão melhor compreendidos/detalhados. Para isto, análises bioquímicas, principalmente envolvendo enzimas do sistema antioxidante e do sistema

imune, serão úteis durante o ciclo de vida das fêmeas, bem como o acompanhamento das taxas de oviposição nos diferentes grupos estabelecidos.

Concernente ao acúmulo de neurolipofuscina (envelhecimento fisiológico), outras áreas do cérebro podem ser exploradas, principalmente as células de Kenyon, bem evidentes em *G. assimilis*. Com isso, novas relações podem ou não ser estipuladas, relacionando o acúmulo do pigmento com processos biológicos fundamentais, como a reprodução, crescimento e envelhecimento.

Ao nos referirmos aos danos morfológicos do tímpano (envelhecimento morfológico), estudos mais detalhados envolvendo parâmetros importantes como o comportamento devem ser feitos, com intuito de relacionar os danos identificados no tímpano com o sucesso das fêmeas no encontro de machos com boa condição reprodutiva. Análises ultraestruturais em microscopia eletrônica de transmissão (MET) também se faz uma interessante abordagem para a identificação de modificações estruturais a nível celular e traqueal ao longo da senescência, uma vez que o envelhecimento morfológico de insetos é pobremente estudado.

## 5. REFERÊNCIAS

- ACKERT, J. E. & WADLEY, F. M. (1921). Observations on the distribution and life history of *Cephalobium microbivorum* Cobb and of its host, *Gryllus assimilis* Fabricius. Transactions of the American Microscopical Society. 40 (3): 97-115.
- AKAI, H. & KING, R. C. (1982). Insect Ultrastructure. Vol. 1, Springer Science + Business Media. New York New York.
- ALEXANDER R. D. (1962). Evolutionary change in cricket acoustical communication. Evolution. 16:443–467.
- ALEXANDER, R. (1961). Aggressiveness, territoriality, and sexual behavior in field crickets (Orthoptera: Gryllidae). Behaviour. 17 (2/3): 130-223.
- ALONSO-ALVAREZ, C.; BERTRAND, S.; DEVEVEY, G.; PROST, J.; FAIVRE, B. & SORCI, G. (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. Ecology Letters. 7(5): 363–368.
- ARKING, R. (1998). Biology of aging: observations and principles. Sinauer Associates Publisher, 2ª ed. Sunderland, Massachusetts, USA.
- BALL, E. E. & COWAN, A. N. (1978). Ultrastructural study of the development of the auditory tympana in the cricket *Teleogryllus commodus* (Walker). Journal of Embryology and Experimental Morphology. 46; 75-87.
- BARBOSA, L. R.; IEDE, E. T. & SANTOS, F. (2009). Caracterização de danos de *Gryllus sp.* em plantas de eucalipto, em laboratório. Pesquisa Florestal Brasileira. 59: 63-68.
- BARROSO, F. G.; SÁNCHEZ-MUROS, M.; SEGURA, M.; MOROTE, E.; TORRES, A.; RAMOS, R. & GUIL, J. (2017). Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. Journal of Food Composition and Analysis. 62: 8-13.
- BEAULIEU, M.; GEIGER, R. E.; REIM, E.; ZIELKE, L.; FISCHER, K. (2015). Reproduction alters oxidative status when it is traded-off against longevity. Evolution. 69 (7):1786-96.
- BERTRAM, S. M. & ROOK, V. (2012). Relationship between condition, aggression, signaling, courtship, and egg laying in the field cricket, *Gryllus assimilis*. Ethology, 118(4), 360–372.

- BOTHA, L. M.; JONES, M. T. & HOPKINS, G. R. (2017). Effects of lifetime exposure to artificial light at night on cricket (*Teleogryllus commodus*) courtship and mating behaviour. *Animal Behaviour*. 129: 181-188.
- BOULIANNE, G. L. (2001). Neuronal regulation of lifespan: clues from flies and worms. *Mechanisms of Ageing and Development*. 122: 883-894.
- CALOW, P. (1987). *Evolutionary Physiological Ecology*. Cambridge University Press.
- CIGLIANO, M. M.; BRAUN, H.; EADES, D. C. & OTTE, D. (2018). Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. [26/01/2018]. <http://Orthoptera.SpeciesFile.org>.
- CRANKSHAW, O. S. (1979). Female choice in relation to calling and courtship songs in *Acheta domesticus*. *Animal Behaviour*. 27: 1274-1275.
- DAO, A.; KASSOGUE, Y.; ADAMOU, A.; DIALLO, M.; YARO, A. S.; TRAORE, S. F. & LEHMANN, T. (2010). Reproduction-longevity trade-off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 47(5): 769-777.
- DE LOOF, A. (2011). Longevity and aging in insects: Is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the “trade-off” concept. *Journal of Insect Physiology*. 57(1): 1–11.
- DEAN, J. M. (1981). The relationship between lifespan and reproduction in the grasshopper *Melanoplus*. *Oecologia*. 48: 385-388.
- DEROY, O. (2015). Eat insects for fun, not to help the environment. *Nature*. 521:395.
- DUNN, D. W.; SUMNER, J. P. & GOULSON, D. (2005). The benefits of multiple mating to female seaweed flies, *Coelopa frigida* (Diptera: Coelpidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 58: 128–135.
- ELLERS, J. (1996). Fat and eggs: an alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*. 46 (3-4): 227-235.
- ETTERSHANK, G.; MACDONNELL, I. & CROFT, R. (1983). The accumulation of age pigment by the Fleshfly *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *Australian Journal of Zoology*. 31: 131-138.
- FLATT, T. (2001). Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*. 46 (5): 369-375.
- FLEMING, J. E.; REVEILLAUD, I. & NIEDZWIECKI, A. (1992). Role of oxidative stress in *Drosophila* aging. *Mutation Research*. 275: 267-79.

- FONSECA, D. B.; BRANCATO, C. L.; PRIOR, A. E.; SHELTON, P. M. J. & SHEEHY, M. R. J. (2005). Death rates reflect accumulating brain damage in arthropods. *Proceeding of the Royal Society B*. 272: 1941–1947.
- FRIEDMAN, M. H. (1972). An electron microscopic study of the tympanal organ and associated structures in the foreleg tibia of the cricket, *Gryllus assimilis*. *Journal of Morphology*. 138: 329–347.
- FROY, H.; LEWIS, S.; NUSSEY, D. H.; WOOD, A. G. & PHILLIPS, R. A. (2017). Contrasting drivers of reproductive ageing in albatrosses. *Journal of Animal Ecology*. 86(5), 1022–1032.
- FUKUTOMI, M.; SOMEYA, M. & OGAWA, H. (2015). Auditory modulation of wind-elicited walking behavior in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Experimental Biology*. 218: 3968-3977.
- GAVRILOV, L. A. & GAVRILOVA, N. S. (2002). Evolutionary Theories of Aging and Longevity. *The Scientific World Journal*. 2: 339–56.
- GERHARDT, H. C. & HUBER, F. (2002). Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions. Chicago Univ. Press, Chicago.
- GODTHI, V. & PRATAP, R. (2015). Dynamics of cricket sound production. *Journal of Vibration and Acoustics*. 137(4): 041019.
- GRATTON, M. A. & VÁZQUEZ, A. E. (2003). Age-related hearing loss: current research. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 11(5): 367-71.
- GRODZKI, R. M. (1972). *Gryllus assimilis*: Danos causados e métodos de combate. Floresta. vol. 4. n:2.
- HARMAN, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*. 11: 298-300.
- HARRISON, S. J.; THOMSON, I. R.; GRANT, C. M., & BERTRAM, S. M. (2013). Calling, courtship, and condition in the fall field cricket, *Gryllus pennsylvanicus*. *PLoS ONE*, 8 (3): e60356.
- HARSHMAN, L. G. & ZERA, A. J. (2007). The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends in Ecology and Evolution*. 22(2):80–6.
- HENNING, R. M.; HELLER, K. G & CLEMENS. (2014). Time and timing in the acoustic recognition system of crickets. *Frontiers in Physiology*. 5: 286.

- HÖHN, A. & GRUNE, T. (2013). Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biology*. 1(1): 140–144.
- HOLLIDAY, R. (1995). *Understanding Ageing*. Cambridge University Press.
- HOY, R. R.; ROBERT, D. (1996) Tympanal hearing in insects. *Annual review of entomology*. 41: 433–450.
- IMAIZUMI, K. & POLLACK, G. S. (1999). Neural coding of sound frequency by cricket auditory receptors. *The Journal of Neuroscience*. 19(4): 1508–1516.
- ISHII, N.; FUJII, M.; HARTMAN, P.; TSUDA, M.; YASUDA, K.; SENOO-MATSUDA, N.; YANASE, S.; AYUSAWA, D. & SUZUKI, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*. 394: 694-697.
- KERN, M. J (1986). Brain aging in insects. *Insect Aging: Strategies and Mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 90-105.
- KIRKWOOD, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*. 120: 437–447.
- KLEINDIENST, H. U. WOHLERS, D. W. & LARSEN, O. N. (1983). Tympanal membrane motion is necessary for hearing in crickets. *Journal of Comparative Physiology*. 151 (4): 397-400.
- KOSTARAKOS, K., HEDWIG, B. (2012). Calling song recognition in female crickets: temporal tuning of identified brain neurons matches behavior. *Journal of Neuroscience*. 32(28): 9601–9612.
- KOTIAHO, J. S. & SIMMONS, L. W. (2003). Longevity cost of reproduction for males but no longevity cost of mating or courtship for females in the male-dimorphic dung beetle *Onthophagus binodis*. *Journal of Insect Physiology*. 49: 817–822.
- KUJOTH, G. C.; HIONA, A.; PUGH, T. D.; SOMEYA, S.; PANZER, K.; WOHLGEMUTH, S. E.; HOFER, T.; SEO, A. Y.; SULLIVAN, R.; JOBLING, W. A.; MORROW, J. D.; VAN REMMEN, H.; SEDIVY, J. M.; YAMASOBA, T.; TANOKURA, M.; WEINDRUCH, R.; LEEUWENBURGH, C. & PROLLA, T. A. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 309: 481–484.
- LEONARD, A. S. & HEDRICK, A. V. (2010). Long-distance signals influence assessment of close range mating displays in the field cricket, *Gryllus integer*. *Biological Journal of the Linnean Society*. 100: 856–865.

- LI, W.; YUAN, W.; ZHAO, X.; LI, Y. & KONGMING, W. (2017). Effects of mating on ovarian development and oviposition of *Apolygus lucorum*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 20(4): 1442-1446.
- LOPEZ-OTIN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. & KROEMER, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*. 153:1194–1217.
- LOSCHIAVO, S. R. (1968). Effect of oviposition on egg production and longevity in *Trogoderma parabile* (Coleoptera: Dermestidae). *The Canadian Entomologist*. 100: 86-89.
- LUCKINBILL, L. S.; ARKING, R.; CLARE, M. J.; CIROCCO, W. C. & BUCK, S. A. (1984) Selection of delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 38: 996–1003.
- MACDOUGALL, D. A. (1996). The effect of diet and parasite load on female phonotaxis in the Texas field cricket, *Gryllus integer*. [Master thesis - Biological Sciences], Brock University. St. Catharines, Ontario.
- MATTSON, M. P., DUAN, W. Z. & MASWOOD, N. (2002). How does the brain control lifespan? *Ageing Research Reviews*. 1: 155-165.
- MAYNARD-SMITH, J. M. (1959). The rate of ageing in *Drosophila subobscura*. In *Ciba Foundation Symposium-The Lifespan of Animals (Colloquia on Ageing), Volume 5* (pp. 269-301). John Wiley & Sons, Ltd
- MEGIDO, R. C.; POELAERT, C.; ERNENS, M.; LIOTTA, M.; BLECKER, C. DANTHINE, S.; TYTECA, E.; HAUBRUGE, E.; ALABI, T.; BINDELLE, J.; FRANCIS, F. (2018). Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms (*Tenebrio molitor* L. 1758). *Food Research International*. 106: 503-508.
- METCALFE, N. B.; MONAGHAN, P. (2013). Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends in Ecology & Evolution*. 28: 347–50.
- MISHRA, G. & OMKAR. (2006). Ageing trajectory and longevity trade-off in an aphidophagous ladybird, *Propylea dissecta* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*. 103: 33–40.
- MULLER, H-G.; CAREY, J. R; WU, D.; LIEDO, P & VAUPEL, J, W. (2001). Reproductive potential predicts longevity of female Mediterranean fruit flies. *Proceedings of Royal Society of London B*. 268: 445-450.



- MÜNCH, D.; KREIBICH, C. D. & AMDAM, G. V. (2013). Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *The Journal of Experimental Biology*. 216: 1638-1649.
- PACHECO, K.; DAWSON, J. W.; JUTTING, M. & BERTRAM, S. M. (2013). How age influences phonotaxis in virgin female Jamaican field crickets (*Gryllus assimilis*). *Peer J*. 1:e130.
- PARTRIDGE, L.; FOWLER, K.; TREVITT, S. & SHARP, W. (1986). An examination of the effects of males on the survival and egg-production rates of female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 32(11): 925-929.
- PATON, J. A.; CAPRANICA, R. R.; DRAGSTEN, P. R.; WEBB, W. W. (1977). Physical basis for auditory frequency analysis in field crickets (Gryllidae). *Journal of Comparative Physiology*. 119: 221-240.
- PIANKA, E. R. 1994. *Evolutionary ecology*. HarperCollins, New York. pp 486.
- POLLACK, G. S. & KIM, J. S. (2013) Selective phonotaxis to high sound-pulse rate in the cricket *Gryllus assimilis*. *Journal of Comparative Physiology A*. 199: 285–293.
- POPOV, A. V. & SHUVALOV, V. F. (1977). Phonotactic behavior of crickets. *Journal of Comparative Physiology*. 119: 111-126.
- PROSSER, M. R.; MURRAY A. M. & CADE W, H. (1997). The influence of female age on phonotaxis during single and multiple song presentations in the field cricket, *Gryllus integer* (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Insect Behavior*. 10: 437–449.
- PROWSE, N. & PARTRIDGE, L. (1997). the effects of reproduction on longevity and fertility in male *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 43(6): 501–512.
- REBAR, D.; BAILEY, N. W. & ZUK, M. (2009). Courtship song's role during female mate choice in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*. *Behavioral Ecology*. 20: 1307 -1314.
- REED, T. E.; KRUUK, L. E. B.; WANLESS, S.; FREDERIKSEN, M.; CUNNINGHAM, E. J. A. & HARRIS, M. P. (2008). Reproductive senescence in a long-lived seabird: Rates of decline in late-life performance are associated with varying costs of early reproduction. *The American Naturalist*. 171: E89–E101.

- REINHARDT, K.; NAYLOR, R. A. & SIVA-JOTHY, M. T. (2009). Ejaculate components delay reproductive senescence while elevating female reproductive rate in an insect. *PNAS*. 106 (51): 21743-21747.
- RIDGEL, A. L., & RITZMANN, R. E. (2005). Insights into age-related locomotor declines from studies of insects. *Ageing research reviews*. 4(1): 23-39.
- ROBSON, S. K. A. & CROZIER, R. H. (2009). An evaluation of two biochemical methods of age determination in insects (pteridines and lipofuscins) using the ant *Polyrhachis sexpinosa* Latrielle (Hymenoptera: Formicidae). *Australian Journal of Entomology*. 48: 102–106.
- RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; GOLDMAN, M. B. (2009). Impact of oxidative stress on female fertility. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 21(3): 219–22.
- RUSH, B.; SANDVER, S.; BRUER, J.; ROCHE, R.; WELLS, M. & GIEBULTOWICZ, J. (2007). Mating increases starvation resistance and decreases oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* females. *Aging Cell*. 6: 723–726.
- SCHÖNEICH, S. & HEDWIG, B. (2010) Hyperacute directional hearing and phonotactic steering in the cricket (*Gryllus bimaculatus* deGeer). *PLoS One*. 5(12):e15141.
- SCIMONELLI, T.; MARUCCO, M. & CELIS, M. E. (1999). Age-related changes in grooming behavior and motor activity in female rats. *Physiology & Behavior*. 66 (3): 481–484.
- SHEEHY, M. R. J.; GREENWOOD, J. G. & FIELDER, D. R. (1995). Lipofuscin as a record of “rate of living” in an aquatic poikilotherm. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 50A(6): 327–336.
- SHESTAKOV, L. S. & VEDENINA, V. YU. (2015). Broad selectivity for courtship song in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Ethology*. 121: 966–976.
- SHOEMAKER, K. L.; PARSONS, N. M & ADAMO, S. A. (2006). Mating enhances parasite resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Animal Behaviour*. 71: 371–380.
- SIMMONS, L. W. (1986). Female choice in the field cricket *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Animal Behaviour*. 34 (5): 1463–1470.

- SITTE, N.; MERKER, K.; GRUNE, T. & VON ZGLINICKI, T. (2001). Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Experimental Gerontology*. 36: 475-486.
- SNELL, T. W. & KING, C. E. (1977). Lifespan and fecundity patterns in rotifers: the cost of reproduction. *Evolution*. 31(4): 882-890.
- SOARES, M. A.; BATISTA, J. D.; ZANUNCIO, J. C.; LINO-NETO, J. & SERRÃO, J. E. (2011). Ovary development, egg production and oviposition for mated and virgin females of the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Acta Scientiarum. Agronomy*. 33(4): 597-602.
- SOHAL, R. S. & BRUNK, U. T. (1990). Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. In: *Lipofuscin and Ceroid Pigments* (E.A. Porta, ed.), pp. 17- 29. New York : Plenum Press.
- SOHAL, R. S. & DONATO, H. (1979). Effect of experimental prolongation of lifespan on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*. *Journal of Gerontology*. 34: 489-496.
- SOHAL, R. S. (1981). Relationship between metabolic rate, lipofuscin accumulation and lysosomal enzyme activity during aging in the adult housefly, *Musca domestica*. *Experimental Gerontology*. 16(4): 347–355.
- SPEAKMAN, J. R.; GARRATT, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays*. 36: 93–106.
- STUMPNER, A.; von HELVERSEN, D. (2001) Evolution and function of auditory systems in insects. *Naturwissenschaften*. 88: 159–170.
- TERMAN, A. & BRUNK, U. T. (1998), Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*, 106: 265–276.
- TERMAN, A. & BRUNK, U. T. (2004). Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: 1400–1404.
- TETLAK, A. G.; BURNETT, J. B.; HAHN, D. A. & HATLE, J. D. (2015). Vitellogenin-RNAi and ovariectomy each increase lifespan, increase protein storage, and decrease feeding, but are not additive in grasshoppers. *Biogerontology*. 16: 761–774.
- van HUIS, A. (2016). Edible insects are the future? *Proceedings of the Nutrition Society*. 75: 294–305.

- VEDENINA, V. YU. & POLLACK, G. S. (2012). Recognition of variable courtship song in the field cricket *Gryllus assimilis*. *Journal of Experimental Biology*. 215: 2210–2219.
- WAGNER, W. E. & REISER, M. G. (2000). The importance of calling song and courtship song in female mate choice in the variable field cricket. *Animal Behaviour*. 59: 1219-1226.
- WAGNER, W. E. J., KELLEY, R. J., TUCKER, K. R. & HARPER, C. J. (2001). Females receive a life-span benefit from male ejaculates in a field cricket. *Evolution*. 55(5): 994-1001.
- WANG, Y.; SALMON, A. B. & HARSHMAN, L. G. (2001). A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*. 36: 1349–1359.
- WEISSMAN, D. B.; WALKER, T. J. & GRAY, D. A. (2009). The field cricket *Gryllus assimilis* and two new sister species (Orthoptera: Gryllidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 102 (3): 367–380.
- WILLIAMS, G. C. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*. 11(4): 398–411.
- WILLIAMS, G. C. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*. 100: 687–690.
- WOHLERS, D. W. & HUBER, F. (1982). Processing of sound signals by six types of neurons in the prothoracic ganglion of the cricket *Gryllus campestris*. *Journal of Comparative Physiology*. 146: 161–174.
- WOLKOW, C. A. (2002). Life span: getting the signal from the nervous system. *Trends in Neurosciences*. 25: 212-216.
- WORTHINGTON, A. M. & KELLY, C. D. (2016). Females gain survival benefits from immune-boosting ejaculates. *Evolution*. 70 (4): 928–933.
- YACK, J. E. (2004). The structure and function of auditory chordotonal organs in insects. *Microscopy Research and Technique*. 63: 315–337.
- ZERA, A. J. & HARSHMAN, L. G. (2001). Physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 32, 95–126.
- ZHENG, Q. Y.; JOHNSON, K. R.; ERWAY, L. C. (1999). Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing Research*. 130 (1-2): 94-107.

ZHUKOVSKAYA, M.; YANAGAWA, A.; FORSCHLER, B. T. (2013). Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. *Insects*. 4: 609–630.