



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

---

Acetilación de la histona H3 en la lisina 27  
en tres castas de la hormiga *Pogonomyrmex*  
*barbatus*

**TESIS**

PRESENTA:

**GARCIA ESTRADA LEONARDO DANIEL**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ingrid Annette Fetter Pruneda



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme formación académica desde el bachillerato hasta la licenciatura en particular al Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Azcapotzalco, a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Dra. Ingrid Fetter Pruneda por abrirme las puertas de su laboratorio, por el apoyo otorgado en todos los sentidos, tiempo, comprensión, conocimientos y por siempre estar en disposición de ayudarme a mí y a los demás alumnos. Gracias por ayudarme a completar mi formación, como profesionista me llevo mucho aprendizaje de ti tanto personal como del aspecto profesional. Admiro tu trayectoria y sé que vienen cosas muy buenas para el laboratorio, gracias por dejarme formar parte de él, siempre estaré agradecido contigo.

A la Dra. Berenice Otero. Gracias por siempre estar en disposición de apoyarme y por compartir todos tus conocimientos de laboratorio y personales conmigo, infinitas gracias Bere no lo habría podido lograr sin tu ayuda.

A todos los integrantes del laboratorio de hormigas y plasticidad fenotípica del Instituto de Investigaciones Biomédicas he aprendido mucho de ustedes y son personas maravillosas, sé que lograrán todos sus objetivos, les deseo mucho éxito.

A los integrantes de mi comité sinodal. La Dra. Leticia Ríos Casanova, Dra. Myriam Campos Aguilar, el Dr. Juan Alberto Ponciano y el Dr. Jorge Contreras Garduño. Gracias por su tiempo y sus aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Miguel Tapia de la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones biomédicas por la ayuda proporcionada para el manejo del microscopio confocal, captura de imágenes y sugerencias para el proyecto.

Este proyecto pudo ser realizado gracias al financiamiento del Global Consortium for Reproductive Longevity and Equality (GCRLE-0620) otorgado a la Dra. Fetter Pruneda.

## Dedicatoria

A la memoria de mi madre. Me hubiera gustado mucho que pudieras presenciar este momento de mi vida, sé que si hoy te lo contara sería difícil de creer. Las palabras no son suficientes para agradecer todo lo que hiciste por mí, hasta ahora entiendo que el amor de una madre es único, espero algún día nos volvamos a encontrar.

A toda mi familia, gracias por siempre estar conmigo en todo momento y seguir creyendo en mí. A mi padre por todo lo que me has enseñado y por todo el apoyo que me has dado aun cuando no lo he merecido. A mis hermanas Arely y Mariela porque a pesar de que pensamos de manera diferente siempre me han apoyado. A mi sobrino Juan Darién, gracias por siempre estar conmigo. Sé que no he sido el mejor hijo, hermano o tío y por ello les agradezco por aceptarme como soy y seguir creyendo en mí. Les deseo mucho éxito a todos y que sean felices.

A todas las personas que me han acompañado durante estos años: amigos, profesores y compañeros. Les agradezco de todo corazón, gracias por darme ánimo cuando lo he necesitado, por todas las experiencias vividas durante la carrera y fuera de ella, han sido únicas y de cada una he aprendido lecciones muy valiosas, gracias por todo.

Finalmente dedico este trabajo a todo mi esfuerzo que puse para poder realizarlo, me propuse un nuevo reto que creí que no podría lograr y una vez más me demostré que sí es posible a pesar de todas las adversidades. Felicidades, Leo.

*Si no te gusta a dónde te diriges, no es vergonzoso retroceder y cambiar el rumbo.*

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	5
1. Resumen .....	6
2. Introducción .....	7
2.1 La organización social compleja en el reino animal.....	7
2.2 Regulación endocrina y mecanismos epigenéticos de la plasticidad fenotípica. .....	8
2.2.1 Regulación endocrina: Hormona juvenil y los corpora allata.....	9
2.2.2 Síntesis de la hormona juvenil. ....	11
2.2.3 La hormona juvenil y otras moléculas relacionadas con la diferenciación de castas. ....	12
2.2.4 Mecanismos epigenéticos de la diferenciación de castas.....	14
2.3 La hormiga roja cosechadora <i>Pogonomyrmex barbatus</i> como modelo de estudio. ....	18
3. Justificación.....	20
4. Pregunta de investigación.....	20
5. Hipótesis .....	20
6. Objetivos .....	21
7. Materiales y métodos.....	21
7.1 Obtención y cuidados de las hormigas.....	21
7.2 Disecciones de hormigas.....	22
7.3 Inmunofluorescencia.....	22
7.4 Captura y procesamiento de imágenes.....	23
7.5 Valores cuantitativos obtenidos.....	25
7.6 Extracción de RNA y análisis de expresión génica.....	25
7.7 Análisis estadístico.....	26
8. Resultados.....	27
8.1 H3K27ac está presente en los <i>corpora allata</i> en las tres castas de hormigas. 27	
8.2 Fluorescencia, volumen y cantidad de núcleos.....	28
8.3 Expresión génica.....	30
9. Discusión .....	31
10. Conclusiones y perspectivas .....	36
11. Referencias .....	37

## **Lista de abreviaturas**

BLAST: Por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool

CA: *Corpora allata*

CC: *Corpora cardiaca*

ChIP-seq: Secuenciación de inmunoprecipitación de la cromatina

CoREST: Co-represor para el factor de transcripción silenciador del elemento 1

Ct: Cycle threshold (por sus siglas en inglés), umbral de ciclos

DHS: Sitio hipersensible a la DNasa I

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FA: Ácido farnesóico

FPP: Pirofosfato de farnesilo

HAT: Histona acetil transferasa

HDAC's: Enzimas desacetilasas de histonas

hPTM: Modificaciones postraduccionales de histonas

JH: Hormona juvenil

Mfe: Metil farnesoato epoxidasa

qRT-PCR: PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico

ROI: Regions of interest (por sus siglas en inglés)

TOR: Target of rapamycin (por sus siglas en inglés)

TRX: Proteína tritorax

Vg: Vitelogenina

VPA: Ácido valpróico

## 1. Resumen

Los insectos eusociales muestran una división reproductiva del trabajo en la que uno o más individuos se reproducen, mientras que otros denominados obreras son estériles y realizan diversas tareas como el cuidado de las larvas, la defensa del nido y la búsqueda de alimento (forrajeo). Los mecanismos que subyacen al mantenimiento de la división de castas han sido mayormente estudiados por diferencias fisiológicas y transcriptómicas y en varios tejidos desde el cerebro hasta los cuerpos grasos.

La hormona juvenil (JH) juega un papel importante en la diferenciación de castas, tanto en su desarrollo como en la conducta. La JH se sintetiza en los corpora allata (CA) en la etapa temprana de cada estadio larvario y funciona como una hormona anti metamórfica para mantener el crecimiento de las larvas de insectos y evitar que las larvas experimenten una transición de desarrollo. En algunas especies de hormigas como *Camponotus floridanus* y *Harpegnathos saltator* se ha documentado que los niveles de JH varían en función de la división de trabajo. Las hormigas obreras forrajeras exhiben niveles más altos de JH mientras que las obreras cuidadoras del nido muestran niveles relativamente más bajos comparadas con las forrajeras. Para comprobar estas observaciones medimos de forma indirecta los niveles de JH en el cerebro mediante la cuantificación de expresión relativa de la enzima Jhepox, la cual es la encargada de llevar a cabo la última reacción de la síntesis de JH, además analizamos la expresión de los genes *Vg1* y *Vg2* vinculados con el potencial reproductivo y más recientemente con la división del trabajo.

Por otro lado, los mecanismos reguladores epigenéticos juegan un papel importante en la plasticidad fenotípica de los insectos sociales, sin embargo, han sido poco explorados. Las modificaciones postraduccionales de histonas (hPTM) se han asociado con las diferencias en la conducta y división de trabajo de hormigas obreras maduras y jóvenes. En la hormiga carpintera *C. floridanus*, Simola y colaboradores (2013) describieron que la acetilación de la histona 3 lisina 27 (H3K27ac) puede afectar la diferenciación de castas.

En este proyecto, estudiamos a la hormiga *Pogonomyrmex barbatus* para investigar las diferencias en los niveles de intensidad de fluorescencia de *H3K27ac* en los CA y la expresión relativa de los genes *Vg1*, *Vg2* y *Jhepox* en los cerebros de distintas castas.

## 2. Introducción

### 2.1 La organización social compleja en el reino animal.

Los animales de una misma especie tienen distintas interacciones entre ellos, dependiendo de la complejidad y la frecuencia de las interacciones se pueden diferenciar animales solitarios y animales sociales. Generalmente en los animales sociales las interacciones entre los individuos de la población van más allá de la reproducción y el cuidado parental por parte de los adultos (Alexander, 1974). La organización social se puede definir como un grupo de individuos de la misma especie organizados de manera cooperativa para lograr un fin común, donde conviven individuos de distintas generaciones y hay algún tipo de cuidado parental (Wilson, 2000; 2005).

La organización social se presenta con distintos grados de complejidad, por ello se han propuesto categorías para medir los niveles de las sociedades complejas. La clasificación está basada en la presencia o ausencia de cuidado parental, división de tareas y traslape de generaciones. Con base en estas características se postulan las siguientes categorías: sub-, quasi-, semi-, para-, pre- y eu-social (Wilson, 2000).

La subsocialidad es el nivel de organización menos derivado, consiste en grupos que muestran conductas de aprovisionamiento progresivo (la base evolutiva del cuidado parental); los organismos semisociales presentan cuidado parental, división de tareas y especialización de una casta reproductiva. Estas dos categorías son importantes porque marcan avances claros en el grado de complejidad social (Linksvayer, 2010). La eusocialidad es el máximo nivel de organización social y se define como el cuidado cooperativo de las crías que nacen de individuos reproductivos, pero son cuidados por individuos no reproductivos con generaciones superpuestas dentro de una colonia (Wilson, 1971; Yan *et al*, 2014). El grupo más representativo que presenta eusocialidad es el de los insectos eusociales, caracterizado principalmente por himenópteros (abejas, avispas y hormigas) e isópteros (termitas) (Wilson y Hölldobler, 2005). También existen otros animales no insectos que también presentan eusocialidad por ejemplo el mamífero *Heterocephalus glaber* (Burda *et al.*, 2000).

El proceso de establecimiento de la eusocialidad en un determinado grupo taxonómico inicia con la construcción y formación de un nido, el nido se establece si se alcanza un nivel de cohesión suficiente para que los individuos se reconozcan y protejan entre ellos mismos.

A medida que los niveles se vuelven socialmente más complejos, más características eusociales son obtenidas, a esto se le conoce como “peldaños de una escalera evolutiva” (Rehan y Thoth, 2015). Cuando se establece un nido, como segunda etapa puede surgir la división de tareas que es fundamental para la eusocialidad. La división de labores aparece cuando algunos miembros de la colonia realizan un trabajo y no comienzan otro hasta terminar el que tiene en progreso. Los otros miembros evitan realizar esa tarea y se encargan de otras tareas disponibles, esta señal se propaga rápidamente entre el nido hasta que se establece de forma definitiva la división de tareas. Si todo lo anterior causa un beneficio que supera los costos dentro del nido procede la tercera fase evolutiva que es el origen de alelos eusociales y con ello el establecimiento de la eusocialidad en un taxón (Nowak *et al*, 2010).

La eusocialidad es poco frecuente en los insectos porque solo está presente en 15 familias de las aproximadamente 2600 descritas (Wilson y Hölldobler, 2005). Sin embargo, la eusocialidad y los comportamientos altruistas ponen en ventaja a las hormigas sobre las especies solitarias, esto se puede observar en el dominio de hábitats. Las hormigas generalmente ocupan los hábitats más estables y centrales, mientras que las especies solitarias suelen encontrarse en las áreas periféricas del mismo hábitat (Hölldobler y Wilson, 1990). Parte fundamental del éxito ecológico de las hormigas es la división de castas, esta característica les otorga una gran ventaja porque, las hace resistentes a depredadores, al defenderse mediante estrategias organizadas y conseguir alimento se vuelve menos riesgoso al utilizar individuos de una sola casta para esa tarea, mientras que los otros individuos están a salvo dentro del nido (Wilson, 1971).

Las castas se dividen en una casta reproductiva (reina) y una estéril (obreras) (Hölldobler y Wilson, 1990). Dichas castas presentan diferencias en la morfología, esperanza de vida y comportamiento (Wheeler, 1986). La diferenciación de castas está influenciada por distintos factores como presiones ambientales, cambios en la dieta durante los estadios larvales y en menor medida por factores genéticos, sin embargo, esto no es una regla ya que en algunas especies de hormigas se ha observado la diferenciación de castas por determinación genética (Helms y Keller, 2003).

## **2.2 Regulación endocrina y mecanismos epigenéticos de la plasticidad fenotípica.**

La mayoría de las hormigas presenta polifenismos, es decir que generan castas (organismos con distintos fenotipos) a partir del mismo genoma (Simpson *et al.*, 2011) por

un proceso de plasticidad fenotípica. Los polifenismos surgen en respuesta a distintos factores como estímulos ambientales y variaciones en la dieta. Los insectos al estar expuestos a estos cambios activan mecanismos de regulación hormonal que, a su vez, están asociados con la regulación epigenética de la expresión génica (Evans y Wheeler, 2001).

### **2.2.1 Regulación endocrina: Hormona juvenil y los corpora allata.**

En las hormigas los estímulos ambientales son percibidos desde la etapa larvaria y esto puede determinar el fenotipo de un individuo adulto. Las distintas castas fenotípicas o polifenismos surgen por la regulación del sistema endocrino de los insectos sociales. La hormona juvenil (JH) es una de las principales hormonas relacionadas con la conducta en insectos. Esta hormona se ha estudiado desde hace décadas con la finalidad de entender la regulación de los mecanismos endocrinos asociados a distintos procesos fisiológicos, como la reproducción, la diapausa y la determinación de castas (Rachinsky y Hartfelder, 1990; Robinson y Vargo 1997; Norman y Huges, 2016).

La JH fue descubierta en 1934 por Vince Wigglesworth en la chinche *Rhodnius prolixus*, esta hormona inicialmente se describió como un factor que prevenía la metamorfosis de las ninfas a estadios adultos, posteriormente se demostró que era necesaria para la maduración de los huevos (Wigglesworth, 1934; 1936). En 1967 se obtuvo el primer homólogo de JH y posteriormente su estructura química (Röller *et al.*, 1967). A partir de extractos lipídicos de la polilla de *Hyalophora cecropia*, Röller y su grupo de trabajo (1967) pudieron obtener por primera vez la estructura sesquiterpenoide (2E,6E,10-cis)-10,11-epoxy-7-ethyl-3,11-dimethyl-2,6-tridecadienoate, característica de este grupo de hormonas. Este homólogo de JH es nombrado JH I, ya que fue el primero en ser descubierto (Röller *et al.*, 1967; Riddiford, 2008).

Todos los homólogos de JH son sintetizados y secretados hacia la hemolinfa a partir de un par de glándulas endocrinas llamadas *corpora allata* (CA) las cuales son de origen ectodérmico y surgen en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Inicialmente surgen como agregados celulares formando pliegues entre la región mandibular y maxilar. Conforme el organismo se desarrolla, las CA migran dorsalmente hasta asociarse con los sacos celómicos de las antenas. La ruta final de migración es variada pero finalmente, en la mayoría de órdenes de insectos se ubican en posición laterodorsal al esófago en la región posterior de la cabeza y quedan asociadas junto con elementos del sistema nervioso

estomatogástrico como el *corpora cardiaca* (CC) y el ganglio hipocerebral. En la mayoría de los insectos los CA se conectan con nervios del cerebro y el ganglio subesofágico. La forma común de las glándulas es ovoide o redonda pero también pueden ser delgadas y alargadas. El tamaño de las CA es muy variable entre las especies e incluso dentro de ellas, así mismo se han detectado diferencias marcadas entre sexos y entre individuos de distintas edades (Tobe y Stay, 1985).

Los CA pueden producir cualquier forma de JH, sin embargo, algunos tipos son específicos de ciertos órdenes de insectos, por ejemplo, la JH 0 y la 4-metil-JH son exclusivas de lepidópteros (Riddiford, 2008). Lo que diferencia a los homólogos entre sí son sus características químicas y fisiológicas y con base en esto existen ocho formas de hormonas juveniles (figura 1) (Gilbert, 2011).

La JH III es el homólogo que tiene mayor presencia en los insectos y por ello es uno de los más estudiados. JH III fue descrita por primera vez en la oruga de *Manduca sexta* y aislado a partir de los CA. Este homólogo se diferencia de los demás por su estructura del esqueleto de carbono y los grupos funcionales que posee, en el C3, C7 y C11 posee grupos metilo y un solo carbono quiral C10. Sin embargo, conserva la geometría de 2E,6E, los análisis estereoquímicos han arrojado que en la naturaleza la molécula se presenta con configuración espacial 10R la cual es la misma configuración que posee JH I. (Goodman y Cusson, 2012). Mediante ensayos de cromatografía de gases y espectrometría de masas se ha confirmado que en *Pogonomyrmex* JH III es el homólogo primario de JH en la especie *P. californicus* (Dolezal *et al.*, 2009).

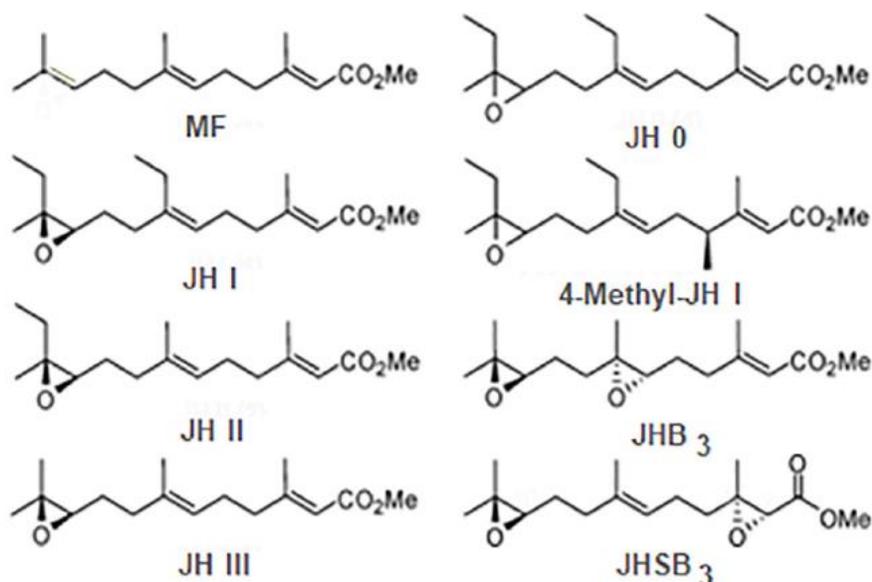


Figura 1. Estructura química de los homólogos de JH, todos comparten la estructura sesquiterpenoide (Tomado y modificado de Riddiford, 2020)

### 2.2.2 Síntesis de la hormona juvenil.

La ruta de síntesis consta de 13 reacciones enzimáticas. La síntesis de JH inicia de la misma forma que la vía de síntesis del colesterol (aunque los insectos han perdido la capacidad de sintetizar colesterol). Ambas inician con dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA), la cual se reduce a través de una serie de reacciones enzimáticas hasta formar 5-pirofosfomevalonato (5-PPM). A pesar de que hasta este punto la vía del mevalonato (MVAP) se comparte entre insectos y vertebrados, se especula que los mecanismos reguladores de la vía difieren entre ambos grupos. Las reacciones posteriores se comparten hasta el punto de inflexión que es el pirofosfato de farnesilo (FPP), a partir de esa molécula se puede sintetizar colesterol y JH por lo tanto la vía tiene dos ramificaciones. En insectos, una vez que se formó el FPP una pirofosfatasa lo hidroliza para formar farnesol, posteriormente interviene una oxidasa que forma farnesal, este se oxida por una deshidrogenasa para formar ácido farnesoico (FA) (figura 2) (Bellés *et al.*, 2005).

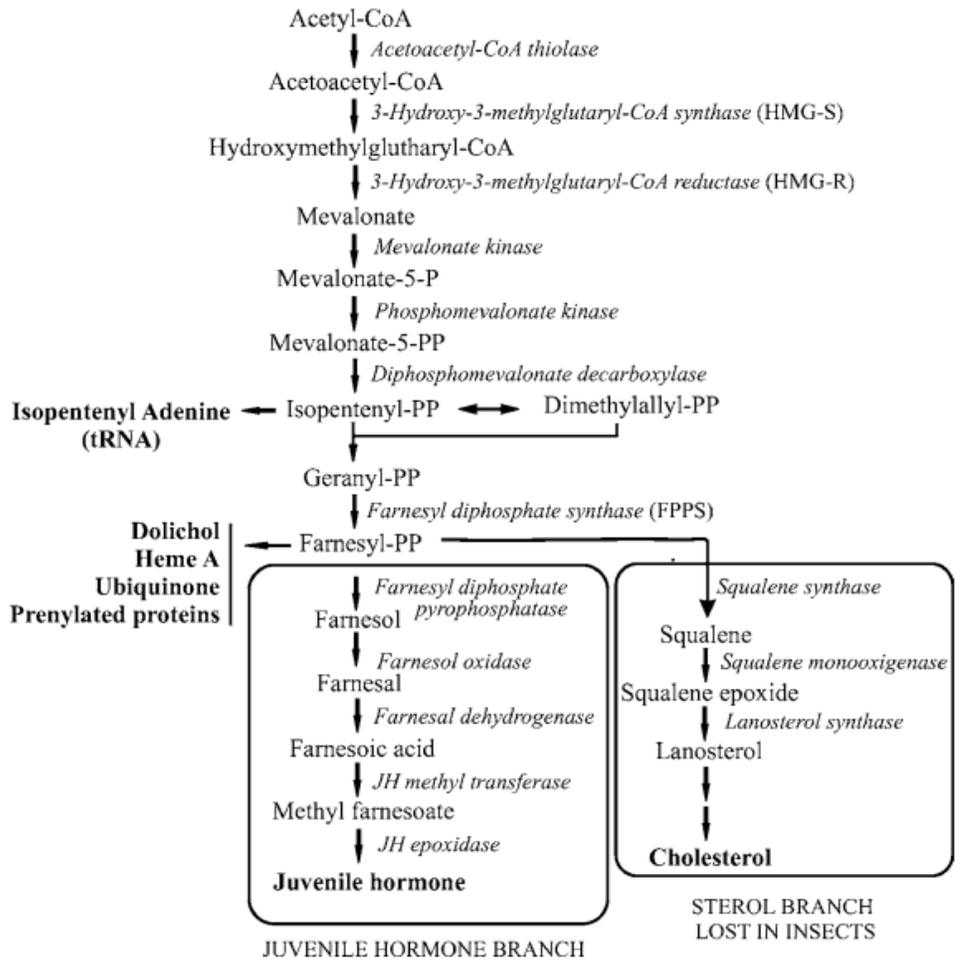


Figura 2. Diagrama de la vía del MVAP con la ramificación del colesterol y JH, se muestran sus productos y enzimas intermediarias, se inicia con dos moléculas de Acetil-CoA que se reduce en diversos compuestos isoprenoides hasta finalizar con JH (Tomado de Bellés et al, 2005).

Como la mayoría de las rutas metabólicas presenta variaciones en ella dependiendo del orden del insecto y el tipo de JH que se sintetice (DeFelipe et al., 2011). Una de estas variantes se encuentra en lepidópteros en los primeros pasos de la vía donde se sustituye el propionil-CoA por un acetil-CoA (Goodman y Cusson, 2012). Otra variación en la ruta es en el orden de las dos últimas reacciones, en general estas reacciones consisten en una metilación seguida de una epoxidación, sin embargo, en ortópteros la esterificación del FA ocurre antes de la epoxidación, lo antes mencionado resulta de interés porque pone en debate la importancia de los últimos pasos de la reacción para formar un producto de JH específico (DeFelipe et al., 2011).

### **2.2.3 La hormona juvenil y otras moléculas relacionadas con la diferenciación de castas.**

En el apartado anterior describimos la ruta de síntesis de JH y vimos que en ella hay más de una enzima y productos implicados. La JH no es codificada por un gen, por ello, los intermediarios involucrados en su síntesis han tomado relevancia para estudiar los mecanismos moleculares que involucran la regulación de la señalización por JH. Tal es el caso de la última enzima de la ruta de síntesis de JH, la metil farnesoato epoxidasa (MFE) que es utilizada para medir de forma indirecta los niveles de JH en un determinado tejido (Sheng et al, 2008; Cardoso-Júnior et al., 2017). Dicha enzima fue descrita por primera vez en la cucaracha *Diploptera punctata* y es codificada por el gen CYP15A1 perteneciente a la superfamilia de genes citocromo P450. Esta enzima se encarga de catalizar la reacción de conversión de metil farnesoato (MF) a JH con una alta tasa de estereoselectividad lo que le impide metabolizar otros compuestos similares al MF como el farnesol y el ácido farnésico. La MFE se expresa específicamente en los CA en el momento de máxima producción de JH. Está presente en todos los insectos excepto en lepidópteros y actúa de manera específica con el MF (Helvig, et al., 2004; Daimon y Shinoda, 2013).

En el género de hormigas *Pogonomyrmex* la MFE se ha identificado (o al menos la que cataliza la última reacción de la síntesis de JH) bajo el nombre de JHEPOX (Smith et al., 2011). El estudio de los niveles de expresión de la última enzima de la síntesis de JH no solo se ha empleado en hormigas si no también en otros himenópteros como son las abejas

*M. scutellaris* donde se corrobora que la enzima se expresa de forma exclusiva en las CA y además se sustenta que los niveles de transcripción de la mfe están correlacionados de manera proporcional con los títulos de JH en hemolinfa. Por lo tanto, medir la expresión de esta enzima es una buena aproximación para conocer los niveles de JH (Helvig *et al.*, 2004; Cardoso-Júnior *et al.*, 2017).

La función descrita de la JH es diversa, regula aspectos fisiológicos, reproductivos y conductuales, incluidos el desarrollo embrionario, producción de feromonas, cortejo, maduración sexual, cuidados parentales, cuidados aloparentales, agresión y la división del trabajo (Robinson y Vargo, 1997; Norman y Hughes, 2016).

En hormigas se ha asociado JH con la conducta de forrajeo, generalmente las obreras que desempeñan esta tarea suelen tener niveles más elevados de JH que las que llevan a cabo otro tipo de tareas como cuidados parentales o defensa. Esto se puede observar en diversas especies, en *C. floridanus* las hormigas minors, que realizan más tareas de cuidado presentan niveles más altos de JH respecto a los niveles de las majors que realizan tareas de defensa (Simola *et al.*, 2013; 2016). En las hormigas obreras de *Harpegnathos saltator* se ha observado algo similar, las obreras que realizan la búsqueda de alimento presentan mayor cantidad de JH en hemolinfa que las obreras que están dentro del nido (Penick *et al.*, 2011). Particularmente resulta de nuestro interés lo reportado para *P. californicus*, para esta especie los cambios en los niveles de JH están asociados con la edad y la transición de la división de labores de mantenimiento del nido al forrajeo (Dolezal *et al.*, 2012).

La JH interactúa con otras moléculas y vías de señalización como es la vía de TOR (por sus siglas en inglés Target of rapamycin), la vitelogenina (Vg) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en conjunto estas moléculas regulan el crecimiento y la diferenciación de tejido en insectos sociales (Corona *et al.*, 2016). En cuanto a la Vg. Su función principal y más conocida es en la reproducción y el desarrollo ovárico en insectos hembra. Debido a que esta molécula interactúa dentro de la red de regulación endocrina de la conducta en insectos sociales, se ha investigado más sobre su papel más allá del contexto de la reproducción (Corona *et al.*, 2016). En abejas obreras de *A. mellifera* la Vg se relaciona de manera inversa con la JH, a medida que los niveles de Vg disminuyen el comportamiento de forrajeo y la síntesis de JH aumentan (Guidugli *et al.*, 2005). Con base en estas observaciones se ha propuesto que la Vg pudiera ser parte de los mecanismos

que controlan la conducta de forrajeo en insectos sociales que presentan castas obreras estériles (Bloch *et al.*, 2002) como en el caso de *P. barbatus* (Khila y Abouheif, 2010).

Uno de los hallazgos que dio pauta a estudiar la Vg es que se ha reportado que los genomas de distintas especies de hormigas albergan más de un gen de Vg (Smith *et al.*, 2011; Wurum *et al.*, 2011). Esto hace ideales a las hormigas para estudiar las posibles funciones de la Vg sobre la regulación de la conducta, ya que se ha propuesto que las copias han perdido la función principal y han adquirido una subfuncionalización que hasta ahora es desconocida. En el caso particular de *P. barbatus* se han identificado dos copias de vitelogenina *Vg1* y *Vg2* y se ha sugerido que, en esta especie, la *Vg2* posiblemente ha adquirido funciones reguladoras en la conducta (Corona *et al.*, 2013).

#### **2.2.4 Mecanismos epigenéticos de la diferenciación de castas.**

El término epigenética fue empleado por primera vez por el biólogo Conrad H. Waddington en 1942, este surgió al combinar las palabras genética y epigénesis mientras estudiaba el desarrollo embrionario. Definió el concepto como cambios en el fenotipo conservando el genotipo, con esto se establecieron las bases de una nueva disciplina que combinaba la embriología y la genética. Actualmente la epigenética se define como la ciencia que estudia la herencia de los rasgos fenotípicos causados por cambios en la expresión de genes sin alterar la secuencia de nucleótidos, así como la activación o represión de genes que se da por alteraciones químicas que actúan sobre la estructura de la cromatina (Ospelt, 2022).

Los mecanismos epigenéticos son reguladores clave de la determinación de castas en insectos sociales. Las principales alteraciones relacionadas con la regulación de la conducta en insectos incluyen la metilación del DNA, la remodelación de la cromatina, los ARN no codificantes y las modificaciones postraduccionales de histonas (hPTM) (Bonasio *et al.*, 2010).

En el núcleo eucarionte la cromatina se encuentra conformada por nucleosomas (Cutter y Hayes, 2015). Los nucleosomas son la unidad básica de la cromatina, estas estructuras se encuentran formadas por aproximadamente 145 pares de bases de DNA superenrolladas alrededor de un octámero de histonas conformados por dos copias de cada una de las histonas medulares conocidas como H2A, H2B, H3 y H4 (Turner, 1993). Las proteínas histonas son altamente básicas y poseen dominios amino y carboxilo terminales los cuales son objetivos para modificaciones postraduccionales de histonas (hPTM) ya que

son regiones que quedan expuestas fuera del nucleosoma y están propensas a ser modificadas por enzimas (figura 3 A), en los que se agregan grupos funcionales como metilo o acetilo, que posteriormente son reconocidos por proteínas efectoras que pueden estimular o reprimir la transcripción (Taverna *et al.*, 2007).

La distribución y la densidad de los nucleosomas a lo largo del DNA pueden afectar la accesibilidad de la cromatina a la maquinaria transcripcional y, en consecuencia, los niveles de expresión génica. La cromatina se puede presentar en dos estados, de forma laxa que se le denomina eucromatina y permite el reconocimiento y ensamblaje con otras proteínas o de forma condensada que se le conoce como heterocromatina, este estado se considera transcripcionalmente inactivo debido a la poca interacción con otras proteínas (Grunstein, 1997)

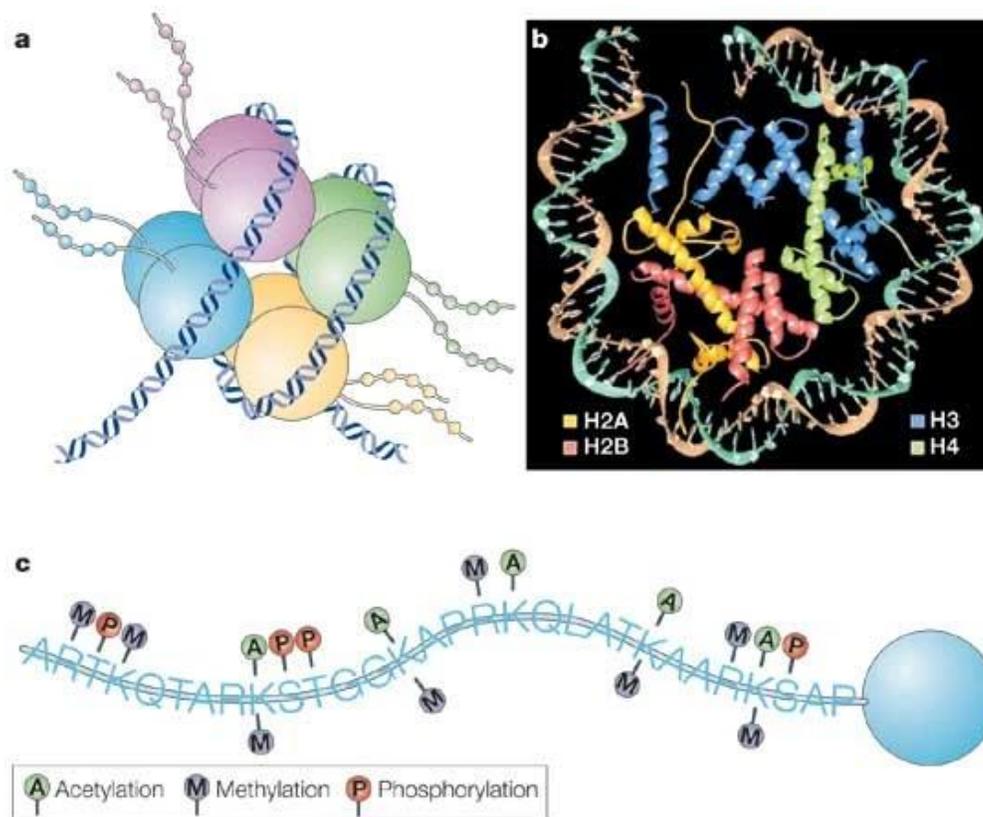


Figura 3. a) Estructura de un nucleosoma formado por el tetrámero  $H3_2-H4_2$  y dos dímeros  $H2A-H2B$ , los extremos amino de las histonas se proyectan fuera del núcleo del nucleosoma ( $H2A$  se muestra en amarillo,  $H2B$  en violeta,  $H3$  en azul y  $H4$  en verde). b) Estructura cristalina del nucleosoma en interacción con el octámero de histonas. c) Extremo amino de la histona  $H3$  humana con los primeros 30 aminoácidos que la componen, se muestran algunas de las marcas epigenéticas más comunes y sus posibles sitios de unión (Tomado de Leveson y Sweatt, 2005).

Los estudios de los mecanismos epigenéticos involucrados en la conducta social se han enfocado principalmente en el análisis de proteínas nucleares que producen alteraciones en la cromatina y a modificaciones postraduccionales de las histonas (hPTMs) (Chittka *et al.*, 2012; Levenson y Sweatt, 2005). Estas modificaciones incluyen distintas marcas químicas, las principales son la acetilación, la metilación, la fosforilación (figura 3 C) y la butirilación de las histonas (Bannister y Kouzarides, 2011). Aunque existen otras modificaciones éstas son las de mayor importancia en el estudio del comportamiento social en insectos debido a que, en organismos como *A. mellifera*, se ha reportado que son las más abundantes y algunas desempeñan funciones moduladoras de la conducta (Yan *et al.*, 2014).

La acetilación se produce por enzimas histona acetiltransferasas (HAT) que actúan sobre residuos de lisina en las histonas, transfiriendo un grupo acetilo desde una molécula de acetil-CoA. Este mecanismo altera la actividad génica, de manera directa cambiando la estructura de la cromatina o de manera indirecta estableciendo una superficie de unión para el reclutamiento de proteínas efectoras. (Berger, 1999).

La marca epigenética que resulta interesante para este trabajo es la acetilación de H3 en la lisina 27 (*H3K27ac*), el motivo por el cual se eligió fue por tres principales razones: 1) El auge de los insectos sociales como modelo de estudio para entender la epigenética de la conducta ha causado que hasta hace unos años atrás se estudien marcas de metilación de histonas y metilación de DNA, dejando a las otras modificaciones de histonas con mayor sesgo (Chittka *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014). 2) Se sabe que la *H3K27ac* es característica de los enhancers y promotores activos que determinan el andamiaje de los factores de transcripción que regulan la expresión génica tanto en vertebrados, mamíferos (Creyghton *et al.*, 2010) e insectos (Tie *et al.*, 2009) y finalmente 3) Estudios desarrollados en hormigas han propuesto a esta marca como posible regulador de las funciones cerebrales que modulan los cambios en el comportamiento y la identidad de casta (Simola *et al.*, 2013; Glastad *et al.*, 2019). A continuación, se describen con mayor detalle los puntos mencionados:

Se ha documentado que modificaciones ligadas con la transcripción activa como *H3K27ac*, se presentan con mayor frecuencia en eucariontes menos complejos, como en *Tetrahymena thermophila* que es un ciliado unicelular, sin embargo, desde los eucariontes menos complejos hasta los más complejos, la mayoría de lisinas en la histona H3 tienden a estar metiladas o acetiladas, el grado de modificación dependerá del organismo en

concreto, se pueden encontrar marcas como H3K9ac y *H3K27ac* ligadas con la transcripción activa, mientras que en mamíferos hay una mayor abundancia de marcas asociadas con el silenciamiento de genes y en caso de que se presente *H3K27ac* se asocia con promotores activos de transcripción (Garcia *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). En mamíferos se ha reportado que *H3K27ac* es necesaria para reclutar a la ARN polimerasa II en una amplia variedad de genes (Jin *et al.*, 2011).

Tie y colaboradores estudiaron *in vivo* e *in vitro* *H3K27ac* en *Drosophila* y demostraron que la proteína de unión a Creb (CBP, por sus siglas en inglés) es la responsable de la acetilación en *H3K27* en insectos. Dicha acetilación junto con la proteína Trithorax (TRX) mantienen estados transcripcionalmente activos durante el desarrollo y antagonizan el silenciamiento del grupo de proteínas Polycomb implicados en el silenciamiento epigenético de genes (Tie *et al.*, 2009).

En la hormiga carpintera de Florida *Camponotus floridanus*, Simola y colaboradores (2013; 2016) han investigado ampliamente el papel de las hPTMs en la modulación de la identidad social de las castas. Han encontrado que los cambios en la estructura de la cromatina entre las castas de hormigas adultas de dicha especie están coordinados entre los tejidos y modulados por *H3K27ac*. El trabajo de estos investigadores se ha centrado en entender cómo se regulan las diferencias de conducta en la casta obrera de *C. floridanus*, particularmente la conducta de forrajeo. En estas hormigas se presentan dos subcastas obreras: majors y minors, la casta mayor se dedica principalmente a desempeñar tareas de defensa del nido y patrullaje, mientras que las minors realizan tareas de búsqueda de alimento y forrajeo. En un primer estudio observaron que *H3K27ac* discrimina genes expresados diferencialmente entre castas obreras y que los patrones epigenéticos de cromatina establecidos durante el desarrollo podrían conservarse hasta la edad adulta. (Simola *et al.*, 2013).

Recientemente lograron demostrar que cambiar la acetilación de las histonas tenía un fuerte impacto en los cambios de conducta relacionados con el forrajeo en las hormigas inyectadas en el cerebro con inhibidores de la acetilación como lo es el tratamiento con ácido valproico (VPA) y tricostatina A (TSA). Es decir, las obreras con comportamiento de forrajeo se pueden reprogramar hacia el comportamiento del cuidado del nido y viceversa, mediante la manipulación basada en la cromatina (Simola, 2016).

En otros estudios al investigar más sobre la reprogramación de la conducta en *C. floridanus* se ha demostrado que esta programación del comportamiento está mediada por el co-represor neuronal CoREST (*H3K27ac* está asociada con la activación de CoREST) y el factor de unión al ADN tramtrack (ttk) a través de la regulación de la expresión génica. Con esta información los autores establecen que *H3K27ac* a través de CoREST podría funcionar como un mecanismo de regulación de JH en el cerebro. En majors induce el forrajeo similar al de minors al suprimir las enzimas que degradan JH (Glastad *et al.*,2019).

### **2.3 La hormiga roja cosechadora *Pogonomyrmex barbatus* como modelo de estudio.**

Los insectos son los organismos que se han utilizado para desarrollar los principales estudios sobre la conducta, la diferenciación morfológica y los mecanismos evolutivos que actúan para moldear la plasticidad fenotípica. *Apis mellifera* ha sido la especie eusocial más estudiada, de hecho, el primer genoma completo de un insecto social que se pudo secuenciar es de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

En este trabajo se utilizó a la hormiga cosechadora roja *Pogonomyrmex barbatus* (Smith, 1858) como modelo de estudio para saber si existen diferencias epigenéticas y de expresión génica relativa entre castas. Esta especie presenta dos castas femeninas: Reinas y obreras, la reina genera descendencia en la colonia, por su parte, las obreras realizan distintas tareas dentro y fuera del nido. En algunas colonias puede haber princesas que son hembras con capacidad reproductiva pero no están fecundadas. En vida silvestre las obreras presentan al menos cinco tipos de tareas: forrajeo, mantenimiento del nido, patrullaje, trabajo en el basurero y de reunión en pequeños grupos para acicalarse. Las tareas se realizan en mayor o menor medida con base en las necesidades de la colonia y un mismo individuo puede encargarse de distintas tareas (no al mismo tiempo) dependiendo de factores como la hora del día, edad y disponibilidad de alimento (Gordon, 1986).

En condiciones de laboratorio las hormigas están expuestas a menos presiones ambientales, las necesidades de las colonias son distintas y por lo tanto algunas tareas no son tan frecuentes y es difícil observarlas. Lo que se tiene documentado es que las obreras más jóvenes realizan tareas de cuidados parentales dentro del nido y conforme son más viejas se encargan del forrajeo, a esta particular manera de división de tareas se le conoce como polietismo de edad (Gordon, 1989), mientras que a la transición de labores conforme avanza la edad de una hormiga se le llama maduración conductual y es lo que genera subcastas obreras (Figura 4) (Winston, 1991).

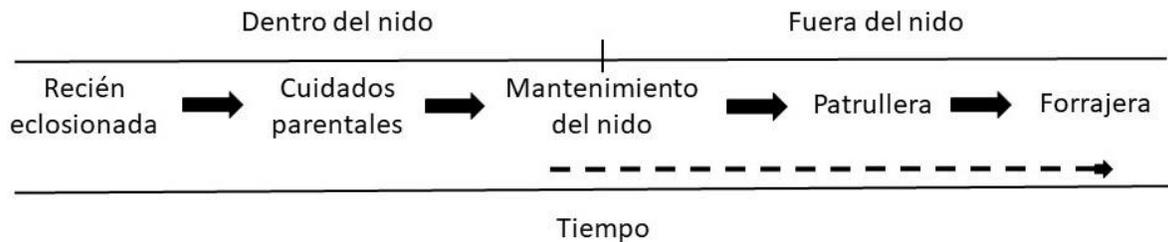


Figura 4. Secuencia de las tareas que realiza una hormiga obrera de *P. barbatus silvestre* a lo largo de su vida. De izquierda a derecha: Inicia con el individuo adulto recién eclosionado (*callow*) hasta que se vuelve forrajera, la flecha punteada indica que puede darse la transición de mantenimiento del nido a forrajera sin necesidad de pasar por patrullera. (Tomada y modificada de Ingram *et al.*, 2005).

En cuanto a la determinación de castas algunas poblaciones presentan un sistema de determinación genético donde los individuos antes de eclosionar ya poseen un programa genético para desarrollarse en una casta específica. Esta determinación de castas está presente en linajes específicos de *P. barbatus* posiblemente por la hibridación ancestral con *P. rugosus*. En estas poblaciones los factores ambientales han perdido influencia sobre la determinación en comparación de otras especies de hormigas donde el medio es el principal determinante de la casta (Cahan *et al.*, 2004).

Se sabe que en *Pogonomyrmex* la determinación genética de casta no es una regla. Mediante experimentos de crianza cruzada, se ha reportado que en las reinas los efectos maternos relacionados con la edad están fuertemente vinculados a la determinación de la casta femenina (Schwander *et al.*, 2008). Respecto a los factores ambientales el tratamiento de exposición al frío afecta la señalización hormonal particularmente la insulina, la hormona juvenil (JH) y la vitelogenina (Vg). Las reinas al estar expuestas al frío presentan cambios en la expresión de genes relacionados con estas vías, esto a su vez se relaciona con la producción de huevos haciendo que estén predispuestos al desarrollo de nuevas reinas (Libbrecht *et al.*, 2013).

En la última década han aumentado los estudios en *P. barbatus*, un claro ejemplo es que se obtuvo el borrador del genoma completo (Smith *et al.*, 2011). Al tener más conocimiento sobre la biología y la conducta de esta especie resulta fácil estudiar los distintos mecanismos que regulan la conducta y por ello se ha elegido como modelo de estudio (Corona *et al.*, 2013; Dolezal *et al.*, 2009). Adicionalmente, es relativamente sencillo criar hormigas de esta especie en el laboratorio y dichas hormigas son fáciles de manipular experimentalmente (por ejemplo, hacer disecciones de los diversos tejidos para su estudio),

en comparación con hormigas de otras subfamilias, porque presentan un tamaño corporal grande (Jaffe y Perez, 1989; Hölldobler y Wilson, 1990).

### 3. Justificación

Las hormigas muestran un diverso repertorio de comportamientos y una organización altamente compleja. Actualmente ya se conocen algunos genes, péptidos y vías de señalización que difieren entre castas. Sin embargo, queda por resolver si hay diferencias en tejidos específicos y en las marcas epigenéticas que se mantienen después del desarrollo. Específicamente consideramos importante a la marca *H3K27ac* por su relación con la regulación endocrina y a las glándulas CA por ser las encargadas de secretar JH, una hormona que está involucrada en conductas como el forrajeo y a la vez está relacionada con otras moléculas importantes para el desarrollo de castas como es el caso de la Vg. Al existir diferencias en el comportamiento, proponemos que también existen diferencias epigenéticas en el órgano encargado de secretar a la JH, ya que se ha establecido que hay diferencias en el volumen nuclear de dichas glándulas en insectos sociales (Schumann *et al.*, 2019).

Dados estos antecedentes, en este trabajo analizamos la acetilación de histonas en los *corpora allata*, así como diferencias en la expresión de genes reguladores de la conducta como *Jhepox* y las vitelogeninas entre castas conductuales de hormigas basadas en la edad, en *P. barbatus*. Además, incluimos muestras de la casta reina en los experimentos de expresión génica relativa para conocer si *Jhepox* se expresa en el tejido cerebral de esta casta y si una de las copias de Vg podría estar implicada en procesos que van más allá de la reproducción.

### 4. Pregunta de investigación

¿Cuáles son los niveles de intensidad de fluorescencia de *H3K27ac* en los *corpora allata* y cuáles son los niveles de expresión relativa de los genes *Vg1*, *Vg2* y *Jhepox* en muestras de tejido de cabezas de castas jóvenes y viejas de hormigas adultas de *P. barbatus*?

### 5. Hipótesis

La intensidad de *H3K27ac* será mayor en los *corpora allata* en obreras viejas que realizan las tareas de forrajeo en la colonia en comparación con obreras jóvenes que realizan tareas

de cuidado y mantenimiento del nido. La expresión relativa de *Jhepox* será mayor en obreras viejas, que son más propensas a forrajear en comparación con obreras jóvenes que realizan más tareas de cuidado. La expresión relativa de *Vg1* será mayor en reinas que en obreras ya que este gen está asociado con la reproducción. Por su parte *Vg2* será mayor en obreras jóvenes que realizan tareas dentro del nido respecto a obreras viejas que tienden a forrajear.

## 6. Objetivos

Objetivo general:

Cuantificar y comparar la intensidad de fluorescencia de *H3K27ac* entre castas, en los *corpora allata* de *P. barbatus*. Cuantificar y comparar la expresión relativa de los genes *Vg1*, *Vg2* y *Jhepox* en muestras de RNA extraídas de cabezas de reinas y obreras de diferentes edades y castas conductuales de *P. barbatus*.

Objetivos particulares:

- 1) Cuantificar los niveles de *H3K27ac* entre castas y obreras de distintas edades en los núcleos de las glándulas CA.
- 2) Realizar una descripción anatómica del número de núcleos y el volumen de las células que conforman las glándulas *corpora allata* de cada casta.
- 3) Cuantificar y comparar la expresión relativa de los genes *Vg1*, *Vg2* y *Jhepox* en cabezas completas de reinas y obreras de diferentes edades de *P. barbatus*.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Obtención y cuidados de las hormigas.

Las hormigas se obtuvieron a partir de colonias disponibles en el Laboratorio de Hormigas y Plasticidad Fenotípica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las colonias se mantuvieron en cajas de plástico con tubos de agua colocadas en incubadora a 29°C y una humedad relativa de 85%, se alimentaron de forma semanal con una mezcla de semillas, larvas disecadas y una mezcla de leche con miel.

Las cajas se limpiaban cada vez que fuera necesario, dicha limpieza consistía en retirar los restos de comida y hormigas muertas del basurero, limpiar los tubos de agua y cambiar el

algodón de succión. En caso de observar presencia de ácaros se mudaba la colonia completa a una caja nueva y se aislaba de las colonias libres de ácaros hasta dejar de observar la presencia de éstos.

## **7.2 Disecciones de hormigas.**

Las disecciones se realizaron en hormigas obreras, las cuales se clasificaron en dos grupos, viejas y jóvenes. La clasificación se hizo con base en el comportamiento, color y dureza de la cutícula, las hormigas que se encontraban dentro de los tubos de ensayo con las pupas y presentaban cutículas más claras y blandas se consideraron como jóvenes. Por su parte, las hormigas que se encontraban fuera de los tubos de ensayo realizando tareas de limpieza o acarreo de semillas y presentaban cutícula oscura y rígida pertenecieron al grupo de hormigas viejas.

Para iniciar la disección las hormigas se anestesiaron en hielo por 5 minutos, posteriormente se colocaron en tubos eppendorf con etanol al 96%, durante 5 minutos, para eliminar los hidrocarburos cuticulares. Después de esto se realizó la disección con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los organismos se colocaron en un plato de disección con solución PBS 1x, se sujetó a las hormigas del tórax con pinzas blandas de punta roma y se realizó un corte en cada una de las mandíbulas para poder retirar la cutícula que rodea la cabeza, posteriormente se extirpó el cerebro. Una vez realizada la extracción del tejido se puso en solución de paraformaldehído (PFA) 4% para fijar el tejido.

## **7.3 Inmunofluorescencia.**

Las tinciones se realizaron en cerebros completos de hormigas en etapa adulta de tres colonias independientes, las tres colonias utilizadas tenían reina, larvas y pupas que habían sido criadas bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura. Así mismo se usaron tres reinas independientes de las colonias de las cuales se tomaron obreras. Se utilizaron los anticuerpos policlonales *anti-H3K27ac* (primario) y donkey anti-rabbit *Alexa Fluor 488* (secundario) (Invitrogen) que permiten la detección de *H3K27ac*, siguiendo el protocolo de inmunotinción descrito en (Chandra *et al.*, 2018).

Para realizar las inmunotinciones, en los tejidos previamente obtenidos y fijados, se utilizó el protocolo desarrollado por el laboratorio de hormigas y plasticidad fenotípica. El protocolo consiste en la realización de 3 lavados con PBS-Tritón al 0.5% durante 15 minutos a

temperatura ambiente. A continuación, se realizó el bloqueo en una solución PBS-Tritón 0.5% y BSA 4% durante 30 minutos. Una vez realizado el bloqueo, los tejidos se incubaron en el anticuerpo primario dirigido a *H3K27ac* diluido en PBS-Tritón 0.5%+BSA 1% con proporción de 1:1000 durante 24 horas a 4°C.

Posteriormente se realizaron 3 lavados en PBS-Tween 0.01% para poder incubar en el anticuerpo secundario (donkey anti-rabbit *Alexa Fluor 488*) en una proporción 1:500 combinado con DAPI 1:1000 y faloidina 1:400 diluidos en PBS-Tritón 0.5%. Finalmente, para montar el tejido se realizaron 5 lavados en PBS 1x durante 10 minutos. Los tejidos se colocaron con 30 microlitros de medio de montaje (Vectashield) a 4°C. Al día siguiente se montaron en un portaobjetos con 20 microlitros de medio de montaje. Después del montaje las laminillas se dejaron reposar 24 horas a temperatura ambiente y finalmente se sellaron con una ligera capa de esmalte de uñas.

#### **7.4 Captura y procesamiento de imágenes.**

Para cuantificar la señal de marcadores fluorescentes que ayudan a visualizar marcas epigenéticas en tejidos específicos se utiliza el procesamiento y análisis de imágenes digitales. El primer paso es capturar las imágenes de interés, en el área de las ciencias biológicas resulta conveniente tomar las imágenes mediante microscopía confocal ya que ofrece la opción de capturar imágenes tridimensionales mediante la reconstrucción de diversas secciones ópticas con distintas profundidades, esto resulta muy conveniente para capturar la intensidad de señal de fluoróforos debido a que la señal se obtiene a través de distintos ángulos del plano focal (Smith, 2011).

Después de que se han obtenido las imágenes, el siguiente paso es el procesamiento y análisis. Para realizar esta tarea se han desarrollado softwares específicos, en este trabajo utilizamos Fiji, una distribución de ImageJ de acceso libre que se ha desarrollado con el fin de estudiar imágenes provenientes de muestras biológicas que no se pueden analizar con programas enfocados a procesar imágenes convencionales (Schindelin *et al.*, 2012). En los siguientes párrafos describimos la metodología empleada para capturar nuestras imágenes y cuantificar los parámetros de interés, los resultados obtenidos dependen de este flujo de trabajo.

Se utilizó un microscopio confocal Nikon A1R+ STORM, de la unidad de microscopía del Instituto de investigaciones biomédicas, para observar y capturar las imágenes de las muestras obtenidas. Por cada laminilla se tomaron imágenes con los aumentos 10x, 20x y 60x. La profundidad de las imágenes con mayor resolución se determinó de forma cualitativa, se enfocó la muestra y se capturó desde que aparecía en la pantalla el primer punto brillante de los núcleos celulares hasta que se dejaba de observar, el promedio de imágenes que conforman las capturas 3D de todas las castas es de 95 imágenes.

El análisis y procesamiento de las imágenes se realizó con el software ImageJ Fiji versión v1.53t. Todas las imágenes utilizadas para los análisis cuantitativos fueron las de aumento 60x. Para el análisis nos enfocamos únicamente en el canal verde que muestra anti-*H3K27ac*. El primer paso fue delimitar las regiones de interés (ROI) de forma manual tomando en cuenta las partículas mayores a 8 micras (valor promedio obtenido arbitrariamente tras medir 20 de las células de interés). Por imagen se deberían tener dos ROI debido a que las CA son glándulas pares, sin embargo, en algunas imágenes solo se obtuvo una ROI.

Durante la captura de imágenes puede haber variaciones entre la intensidad de fluorescencia en las muestras al igual que en los valores de profundidad del eje z por lo cual es necesario tener un método de segmentación estándar para todas las imágenes independientemente de la casta o los valores de profundidad, por ello se utilizó el auto threshold con el método Otsu (Otsu, 1979) que proporciona Fiji. Este método se eligió de entre los demás ya que en la literatura está reportado que es un método adecuado para segmentar imágenes de muestras biológicas en el área biomédica (Win y Choomchuay, 2017). Finalmente, para obtener el volumen, la intensidad de fluorescencia y el número de núcleos por glándula se utilizó la herramienta de contador de objetos 3D (3D objects counter) y se seleccionaron solamente los parámetros de interés (Figura 5) (Bolte y Cordelières, 2006).

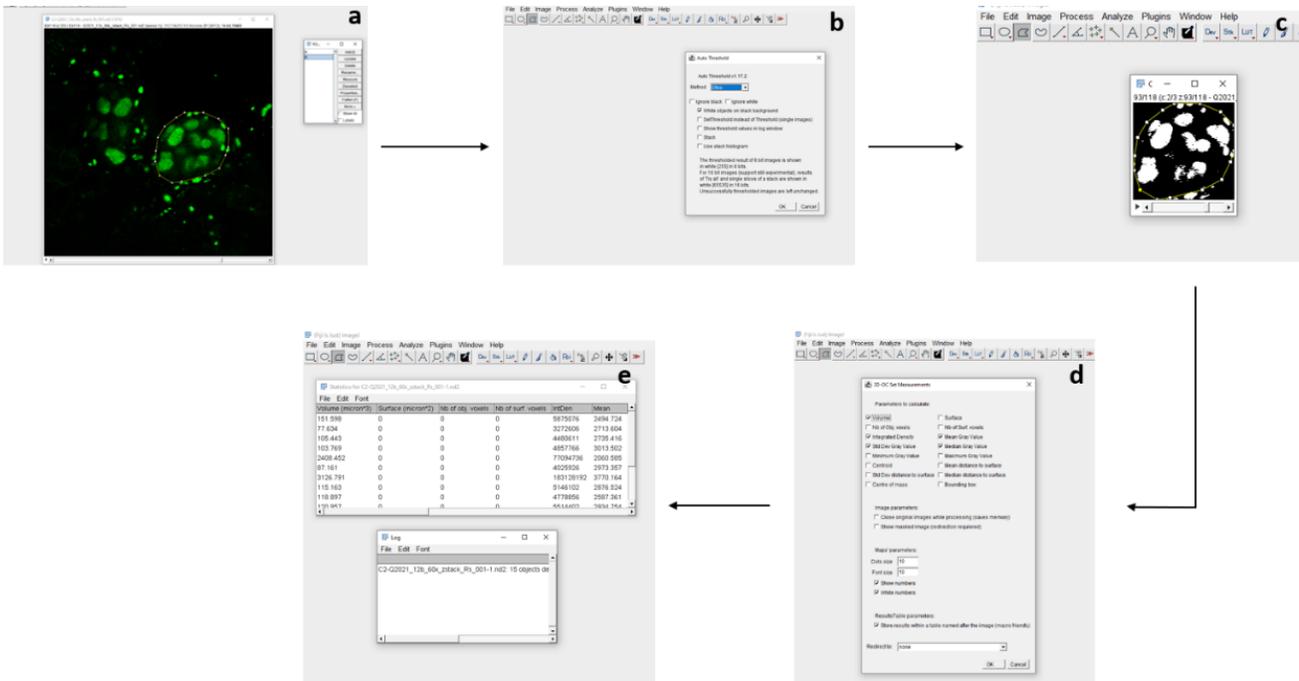


Figura 5. Diagrama de flujo del análisis de imágenes de microscopía confocal. a) Delimitación de ROI, b) Selección del método de umbralización Otsu, c) Obtención de la imagen con la ROI y la umbralización seleccionada, d) Elección de parámetros a calcular con el plugin 3D OC, e) Tabla de resultados con los valores calculados.

### 7.5 Valores cuantitativos obtenidos.

Los datos obtenidos por medio de Fiji fueron volumen ( $\mu\text{m}^3$ ), densidad integrada (integrated density) que es la suma de los valores de los píxeles que componen un objeto en este caso un núcleo y número de núcleos detectados por glándula, que es el valor numérico de observaciones de volumen y densidad integrada, de cada núcleo contabilizado corresponde un valor de volumen y uno de densidad integrada.

Debido a que en algunas imágenes solo se pudo observar una glándula y no el par como debería de ser, de cada individuo se obtuvo la sumatoria del total de los valores obtenidos y si presentaban ambas glándulas el valor total de la suma se dividió entre dos, en caso de solo observar una glándula se consideró solo la sumatoria sin aplicar división. Esta serie de pasos se aplicó tanto para volumen, densidad integrada y número de núcleos.

### 7.6 Extracción de RNA y análisis de expresión génica.

Para tener más certeza sobre si hay diferencias en las CA entre castas, en particular en la expresión génica, probamos cómo se comporta la expresión del gen *Jhepox* junto con *Vg1* y *Vg2* que corresponden a los dos parálogos de vitelogenina identificados en *P. barbatus* y

que se ha reportado cómo se comporta la expresión relativa entre las castas de esta especie (Corona *et al.*, 2013).

Las extracciones de RNA para obreras se realizaron a partir de cabezas de individuos de cada casta. Se utilizaron 7 cabezas por casta de obreras para generar pools de tejido, esto se hizo para 3 colonias independientes. Para la casta reina se utilizó solo un pool de 4 cabezas de reinas. Se utilizó el kit de extracción RNeasy y la integridad del RNA se cuantificó en nano drop one (Thermo Fisher Scientific). El mRNA se cuantificó mediante qRT-PCR con el kit Quantinova SYBR Green RT-PCR y el uso del equipo qiaquant 96. Se utilizaron 200 ng de RNA total para cada una de las muestras. Los valores de ct (cycle threshold) se normalizaron a partir del gen control *RP49* correspondiente a la proteína ribosomal 60s que se ha utilizado como control en otros estudios en la misma especie (Corona *et al.*, 2013, Libbrecht *et al.*, 2013). Las secuencias de cebadores de *RP49*, *Vg1* y *Vg2* se obtuvieron a partir de las secuencias reportadas en Corona *et al.*, 2013 y *Jhepox* de Libbrecht *et al.*, 2013 (Tabla 1).

Finalmente, los niveles de expresión relativa se cuantificaron mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  (Livak y Schmittgen, 2001). Las comparaciones se hicieron directamente contra el gen control *RP49*.

Tabla 1. Cebadores usados para qRT-PCR en dirección 5'-3'

Gen	Forward	Reverse
<i>RP49</i>	CGATAGATATGACAAACTCAAACGCAAC	GTATTGGCCCTTGAAACGTCTGCG
<i>Jhepox</i>	ATACTTCAAGCCGAGTTGGAC	AAAGCTTCCGTCATTGGCAAG
<i>Vg1</i>	ACAGGACGATGTTGTTTCGGAATTA	TCGTACGGATGATTGAATGGTATAT
<i>Vg2</i>	TCTAATGATGGAGTTCTTTCGAGATCA	ACGGAAGACTGAATAGTGAAGCGTT

## 7.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron con Rstudio (<http://www.r-project.org/>). Los datos de volumen de núcleos e intensidad de fluorescencia entre castas se analizaron mediante pruebas de ANOVA. Para realizarlas primero probamos si los datos tenían una distribución normal con la prueba de Shapiro; los datos de volumen, fluorescencia y número de núcleos presentaron distribuciones normales. Posteriormente se aplicó la prueba de Levene para

verificar la homocedasticidad de las varianzas y finalmente se aplicó la prueba de ANOVA entre castas.

El análisis estadístico de los valores de expresión relativa se realizó con una prueba t para muestras independientes. Primero se verificó la normalidad de los datos y posteriormente se aplicó la prueba. En este estadístico no se incluyó al grupo de reinas debido a que no tuvimos réplicas biológicas de este grupo. Para todas las pruebas se consideró significativa una  $p < 0.05$ . Las gráficas se realizaron con el paquete ggplot2 de R (Wickham, 2016).

## **8. Resultados**

### **8.1 H3K27ac está presente en los *corpora allata* en las tres castas de hormigas.**

Con el objetivo de caracterizar diferencias en la marca de *H3K27ac* en los CA de distintas castas morfológicas y conductuales de hormigas, realizamos experimentos de inmunofluorescencia en tejido cerebral completo. Observamos la presencia de *H3K27ac* en la mayoría de los núcleos de las células del cerebro, así como en todos los núcleos pertenecientes a las glándulas CA. Dicha marca se encuentra presente en las tres castas analizadas en este trabajo (reinas, obreras jóvenes y obreras viejas) (Figura 6). En algunas de las laminillas generadas encontramos una sola glándula CA, debido a que son glándulas que fácilmente se separan del tejido nervioso al realizar las disecciones. En el caso de las glándulas de las reinas encontramos unos núcleos pequeños y con una marca para *H3K27ac* muy intensa, rodeando a las glándulas. Dichos núcleos no fueron observados en las glándulas de las hormigas obreras (Figura 6 d-f).

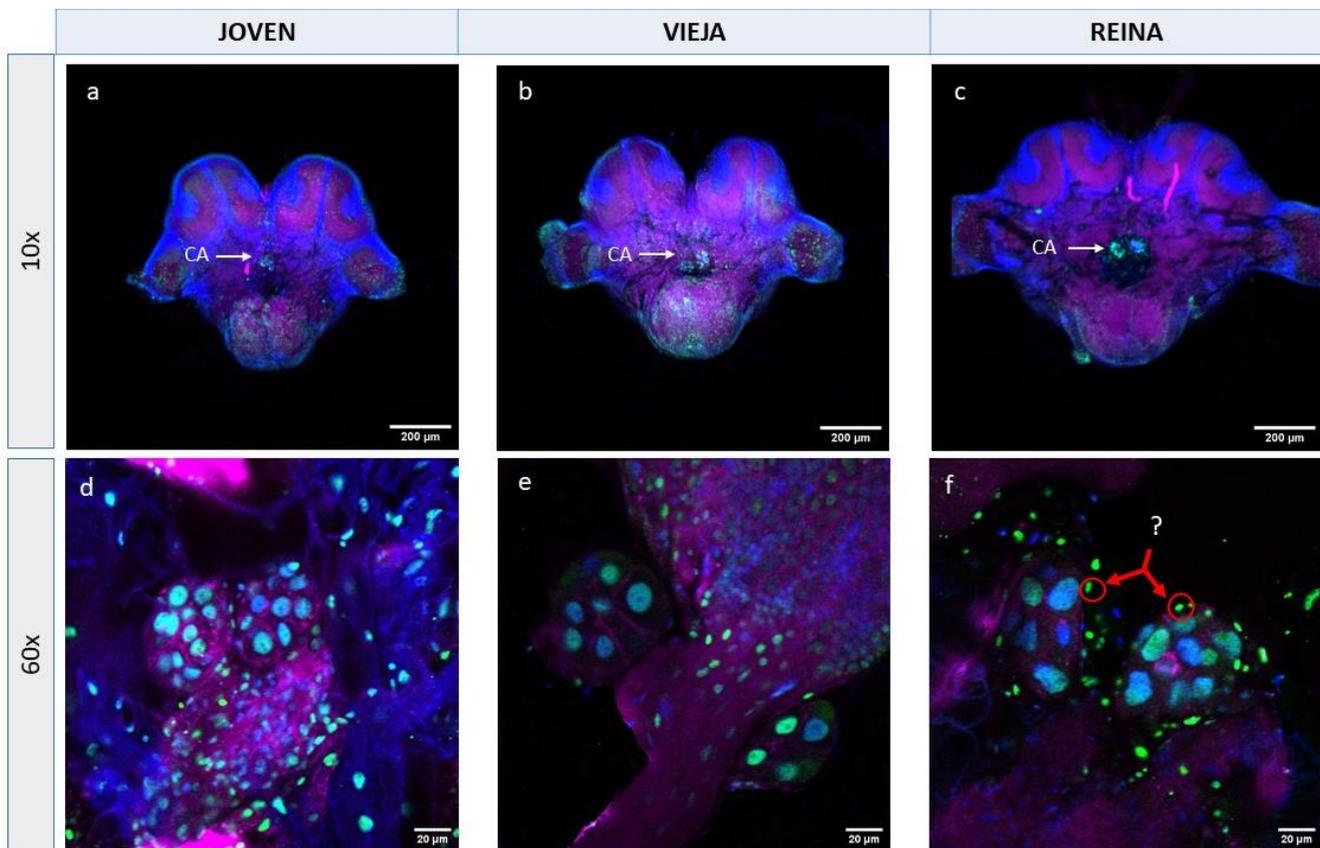


Figura 6. Imágenes capturadas con microscopio confocal de la inmunofluorescencia realizada en las tres castas de *P. barbatus*. En color azul se observa DAPI que contratiñe los núcleos, en magenta faloidina que tiñe actina y en verde el anticuerpo que marca la *H3K27ac*. En el panel superior (a, b y c) las flechas marcan las CA, en el panel inferior (d, e y f) se muestran las glándulas de cada casta en magnificación 60x. El signo de interrogación en el panel f indica las estructuras teñidas con anti-*H3K27ac* que parecen estar rodeando la periferia de las glándulas y que solo fueron observadas en reinas.

## 8.2 Fluorescencia, volumen y cantidad de núcleos.

Con el objetivo de saber si existen diferencias cuantitativas en los niveles de *H3K27ac* entre hormigas de distintas castas, realizamos un análisis de cuantificación de intensidad de fluorescencia utilizando el software de Fiji. Al cuantificar la intensidad de fluorescencia (por núcleo sobre el total de la glándula) de una muestra de imágenes de microscopía confocal de hormigas obreras jóvenes  $n=9$ , obreras viejas  $n=9$  y reinas  $n=3$  no encontramos diferencias significativas para la marca *H3K27ac* entre obreras jóvenes y viejas, así como reinas en los núcleos de los CA (Figura 7).

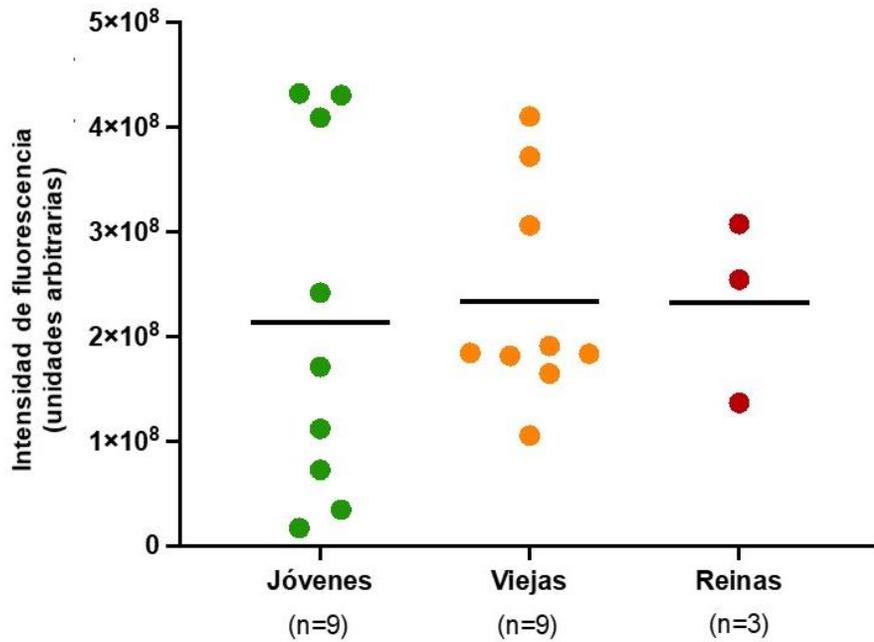


Figura 7. Gráfica de distribución de los valores de intensidad de fluorescencia de anti-H3K27ac. Al aplicar la prueba de ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.073$ )

Respecto a las mediciones realizadas para conocer el volumen y el número de núcleos (Figura 8) que conforman las glándulas CA, no encontramos diferencias en el volumen entre castas ( $p=0.095$ ).

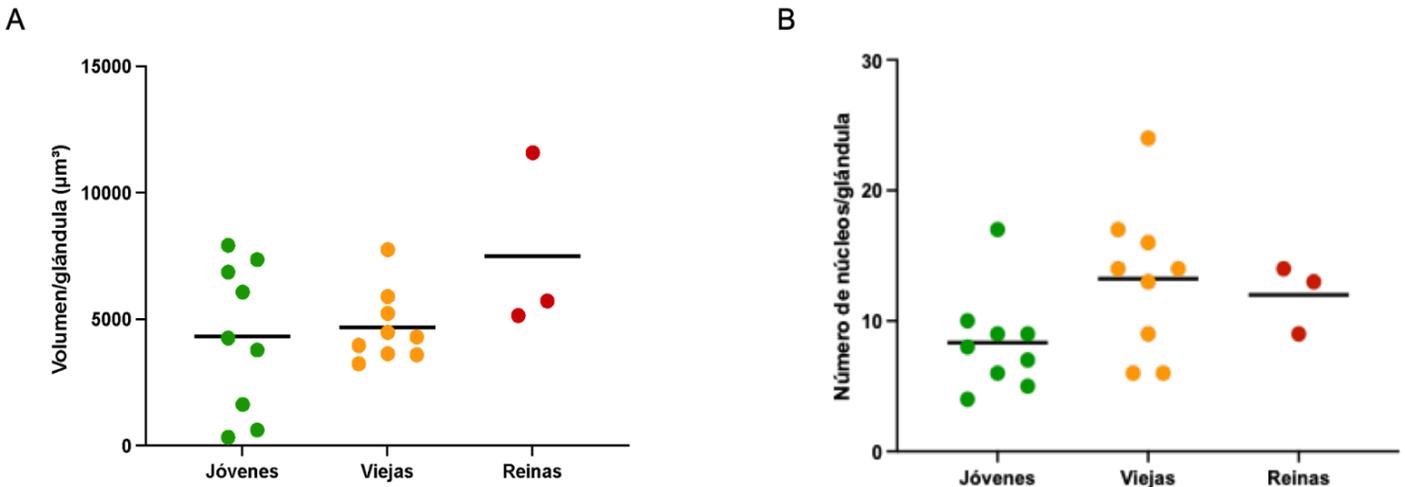


Figura 8. Volumen y número de núcleos en las glándulas corpora allata. A) Gráfica de distribución de los valores obtenidos de volumen. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre castas (ANOVA,  $p=0.095$ ) (Jóvenes  $n=9$ , Viejas  $n=9$ , Reinas  $n=3$ ) B) Gráfica de distribución de los valores obtenidos de número de núcleos por giándula. Se observó una tendencia marginalmente significativa entre castas (ANOVA,  $p=0.054$ ) seguido de una prueba post hoc de Tukey se observó diferencia entre jóvenes y viejas ( $p=0.042$ ) (Jóvenes  $n=9$ , Viejas  $n=9$ , Reinas  $n=3$ ).

### 8.3 Expresión génica.

Para probar si existe una relación entre genes y conductas características de las castas realizamos un análisis cuantitativo de expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes *Vg1*, *Vg2* y *Jhepox* en cabezas completas de las hormigas. El gen *Vg1* está asociado con la reproducción en reinas, el gen *Vg2* aún no se conoce exactamente cuál es su función en la hormiga *P. barbatus* y *Jhepox* que recientemente ha sido objeto de estudio por ser un posible predictor de los niveles de JH en hemolinfa en insectos sociales.

Los experimentos se realizaron utilizando pools de cada casta (para cada casta obrera 7 individuos y para la reina un solo pool de 3 individuos) de la casta obreras jóvenes, obreras viejas y reinas de las distintas colonias. Para los análisis estadísticos se excluyó el grupo de la reina ya que no se contaba con repeticiones biológicas de la muestra teniendo una  $n=1$ .

La expresión relativa de *Jhepox* se comporta de forma similar en obreras jóvenes y viejas, obtuvimos dos valores por debajo de la media y un valor por encima de la media. En las obreras jóvenes los valores son menores con respecto a las obreras viejas, pero no muestran diferencias significativas ( $p=0.97$ ).

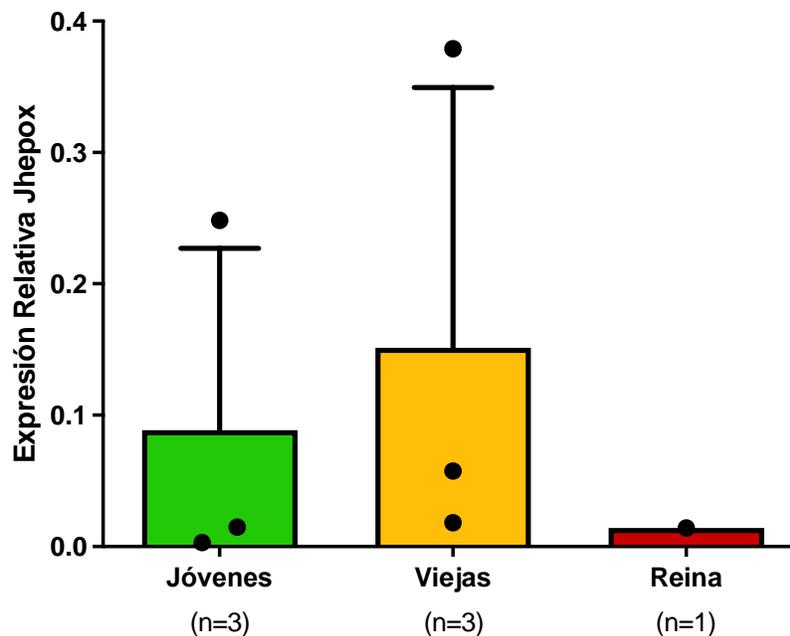


Figura 9. Expresión relativa de *Jhepox*. Las hormigas jóvenes y viejas muestran un patrón de expresión similar entre ellas, dos pools están por debajo de la media y uno está por arriba de la media. La casta reina muestra una expresión cercana a cero. Las barras muestran la media y la desviación estándar de los datos (Jóvenes  $n=3$ , Viejas  $n=3$ , Reina  $n=1$ )

En cuanto la expresión de *Vg1* observamos que las obreras las jóvenes muestran una tendencia de expresión más alta respecto a las viejas sin embargo las diferencias no son significativas.

Por su parte el gen *Vg2* mostro diferencias de expresión ( $p=0.024$ ) entre obreras jóvenes y viejas, siendo las obreras viejas las que muestran una mayor expresión. Las reinas no se incluyeron en este análisis, sin embargo, en otros estudios esta casta ha mostrado diferencias significativas respecto a las obreras.

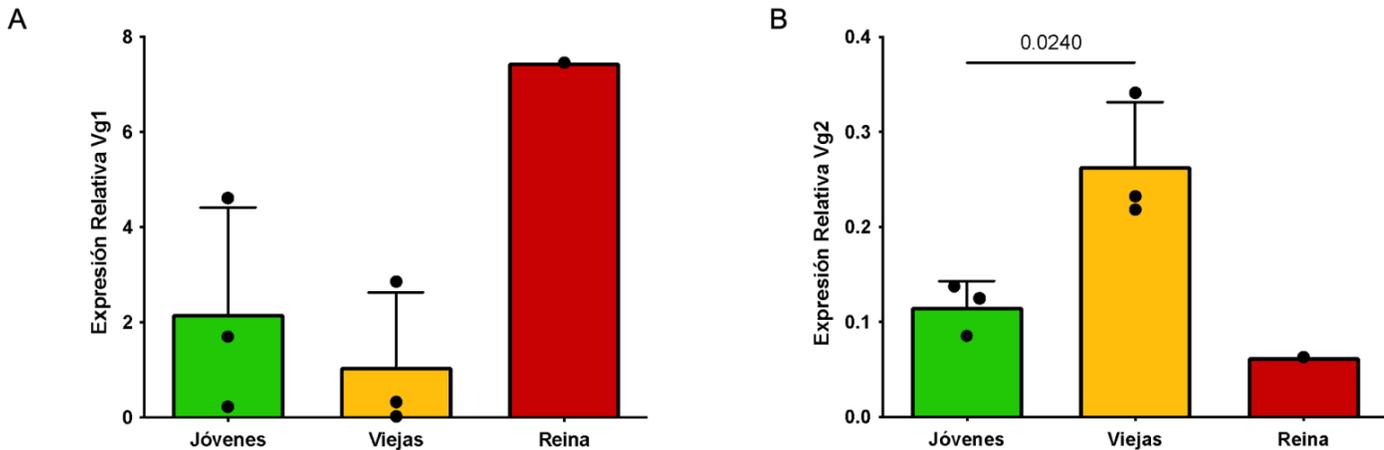


Figura 10. Expresión relativa *Vg1* y *Vg2*. A) Gráfica de expresión del gen *Vg1*. No se observan diferencias significativas (ANOVA,  $p=0.97$ ) (Jóvenes  $n=3$ , Viejas  $n=3$ , Reina  $n=1$ ). B) Gráfica de expresión del gen *Vg2*. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre hormigas obreras jóvenes y viejas ( $p=0.024$ ) (Jóvenes  $n=3$ , Viejas  $n=3$ , Reina  $n=1$ ). La casta reina presenta niveles de expresión más altos en comparación a las castas obreras ( $p=0.066$ ). Las barras muestran la media y la desviación estándar de los datos.

## 9. Discusión

Este trabajo se realizó con el fin de comprender más sobre cómo se regula la conducta de forrajeo entre castas en insectos sociales. Por una parte, estudiamos los aspectos hormonales, dentro de ellos las glándulas CA y el gen *Jhepox*. El otro mecanismo que estudiamos es la epigenética, específicamente la marca *H3K27ac* debido a sus antecedentes como posible modulador de la conducta de forrajeo en hormigas *C. floridanus*. Decidimos abordar el estudio de estos dos aspectos de forma integrativa, esto lo hicimos a través de experimentos de inmunofluorescencia en tejido cerebral y análisis de expresión génica en cabezas de hormigas.

El estudio de cómo influyen los mecanismos epigenéticos en la conducta de hormigas se ha centrado principalmente en entender si los mecanismos juegan un papel en la determinación de castas, poco se sabe sobre si las marcas epigenéticas se mantienen después del desarrollo o cambian sus niveles de enriquecimiento conforme pasa el tiempo en los organismos adultos, esto es importante para organismos como *P. barbatus* que presenta castas basadas en edad; se sabe que esto es una de las características de las hormigas formicoides (grupo al que pertenece este género). En este grupo hay una marcada diferencia en morfología, fisiología y conducta entre reinas y las distintas castas obreras (Ward, 2014).

Las imágenes capturadas de las inmunotinciones visualmente muestran diferencias de tinción entre las CA de obreras y reinas. Particularmente en las reinas identificamos un patrón de tinción de puntos verdes que rodean las CA (observado en 2 de 3 imágenes capturadas) (Figura 6). Esta observación nos hace pensar que efectivamente existen diferencias morfológicas en los CA. En insectos sociales se han reportado diferencias en la composición estructural de CA en particular en la membrana que cubre las glándulas (Van Laere y Lagasse, 1973).

En este trabajo utilizamos un tamaño de muestra relativamente pequeño para obtener los datos de fluorescencia comparado con otros estudios que aplican la misma técnica en hormigas (Bolder *et al.*, 2022), a pesar de esto nos permitió tener una aproximación de dónde podrían encontrarse las diferencias. El número de núcleos exhibió una tendencia hacia diferencias significativas, creemos que al aumentar el tamaño de muestra podríamos encontrar diferencias marcadas.

Con relación a la intensidad de fluorescencia, se ha reportado que la pérdida de histonas ocurre durante el envejecimiento (O'sullivan *et al.*, 2010). La reducción en las histonas podría impactar en una reducción de las modificaciones postraduccionales o al menos es lo que se esperaría. Sin embargo, no encontramos diferencias en la fluorescencia de anti-H3K27ac. Esto puede deberse a varias razones que se describen a continuación:

La primera es el flujo de trabajo que utilizamos para el análisis de imágenes. En este paso se pueden generar variaciones al momento de obtener las medidas cuantitativas. Se han propuesto estrategias metodológicas para el análisis de este tipo de experimentos y lo ideal es analizar las imágenes con aprendizaje automático (machine learning) (Kan, 2017). El objetivo principal de este trabajo no fue generar una metodología automatizada para el

análisis de imágenes, pero un objetivo secundario fue hacer una aproximación a generar un flujo de trabajo que pueda ser replicable, por esta razón se utilizó un método de auto umbralización ya que estos métodos proporcionan la posibilidad de poder aplicarse a otras imágenes en comparación con la umbralización manual que depende de lo que pueda observar el investigador (Bolder *et al.*, 2022).

La segunda causa puede deberse como tal a la biología de la especie. En primer lugar, se ha descrito que la plasticidad conductual en insectos sociales está regulada principalmente por neuromoduladores por ejemplo las aminas biogénicas (Kamhi y Traniello, 2013). Sin embargo, recientemente se les ha otorgado crédito a los mecanismos epigenéticos por formar parte en esta plasticidad (Simola *et al.*, 2013; Alvarado *et al.*, 2015 Simola *et al.*, 2016). Las hormigas que utilizamos estaban en etapa adulta, y posiblemente por esto no logramos observar diferencias marcadas en la intensidad de fluorescencia de *H3K27ac* ya que se ha reportado que las diferencias epigenéticas generalmente están más marcadas durante los estadios larvarios en otras especies de hormiga como *C. floridanus* (Alvarado *et al.*, 2015). Es importante mencionar que el objetivo principal de este trabajo fue detectar diferencias en la intensidad de fluorescencia de la marca epigenética en hormigas adultas con casta ya establecida, no debe confundirse con saber si *H3K27ac* influye en la determinación de castas ya que este proceso se da durante el desarrollo larvario (Wheeler, 1991).

Otra de las causas puede deberse a que la edad de las hormigas no difiera lo suficiente para reflejar diferencias en *H3K27ac*. Una de las características del epigenoma es que es dinámico y cambia con base en la edad y el envejecimiento, por lo que las hormigas al encontrarse en el mismo rango de edad tendrán un epigenoma similar entre ellas (Sen *et al.*, 2016).

En cuanto al volumen de núcleos, en la abeja *M. scutellaris* se observó que el volumen difiere entre obreras recién eclosionadas y reinas recién eclosionadas (Schumann *et al.*, 2019). Con nuestros resultados no pudimos observar esas diferencias, probablemente por lo descrito en los párrafos anteriores, sería interesante investigar si se pueden observar diferencias al realizar los experimentos con hormigas recién eclosionadas comparándolas entre distintas colonias. Con estos factores controlados tal vez podría encontrarse diferencias en el volumen de los CA ya que las hormigas y las abejas regulan la división de labores de manera similar a pesar de que la sociabilidad en ambos grupos evolucionó de manera independiente (Anderson, 1984; Corona *et al.*, 2013).

El número de núcleos que componen la CA podría variar entre las castas, incluso dentro de la misma casta podrían existir variaciones. En la hormiga *Pachycondyla striata* se han observado diferencias histológicas en la composición celular entre reinas y obreras, también se han registrado diferencias en el volumen de los núcleos, los de las reinas suelen ser más grandes y tienen una composición química distinta donde predominan los lípidos, aunque las diferencias en volumen no han sido estadísticamente significativas (Forester y Camargo, 2002). Con esta información proponemos que probablemente sí existen diferencias en la composición celular de las glándulas en *P. barbatus*. El reto podría estar en saber si están lo suficientemente diferenciadas para ser estadísticamente significativas y conocer qué implicaciones tiene este fenómeno en la regulación de castas.

La expresión relativa de *Jhepox* fue homogénea entre las castas, pero sigue el patrón de expresión esperado, las hormigas viejas presentan mayor expresión en comparación a las jóvenes (Figura 10), con base en esta observación se puede proponer que *Jhepox* predice los niveles de JH (desconocemos con qué nivel de correlación) y que JH está asociada con la conducta de forrajeo en *P. barbatus*. Para conocer si hay variaciones en la síntesis de JH entre castas se podría medir directamente la hormona de la hemolinfa, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo, aunque esto podría significar un gran reto ya que las metodologías para medir JH son complejas y requieren un mayor esfuerzo de investigación (Hartfelder *et al.*, 2013). Las diferencias de expresión de *Jhepox* se han reportado en reinas de *P. rugosus* expuestas al tratamiento de exposición al frío (hibernación) (Libbrecht *et al.*, 2013), este tratamiento ha demostrado regular al alza los niveles de expresión de la enzima, en un futuro podríamos probar si este tratamiento funciona de la misma forma en *P. barbatus*.

La última posible causa por la cual la expresión fue similar entre castas podría atribuirse a que el mRNA del que se cuantificó la expresión relativa no corresponde a nuestro gen de interés. Como se mencionó anteriormente el genoma de esta especie ya fue secuenciado, pero no todos los genes se encuentran anotados, por esta razón es que podría ser que los niveles de expresión que observamos corresponden a otro gen, aunque esto es poco probable ya que la secuencia fue corroborada mediante BLAST y el resultado arrojado coincide con el gen *methyl farnesoate epoxidase like* (lo esperado sería *Jhepox*) pero esto podría ser solo una variación en la nomenclatura del nombre de los genes debido a que el genoma aún no está caracterizado por completo y de algunos genes se desconoce su función biológica. La mayoría de las hormigas poseen una única copia del gen que codifica

para esta enzima y aparte las secuencias codificantes están bien conservadas en la filogenia de los insectos por lo cual haber evaluado la expresión de otra enzima sería poco probable (Daimon y Shinoda, 2013).

Respecto a la expresión los niveles de *Vg1* y *Vg2* obtenidos (Figura 10) siguen el mismo patrón que el reportado por Corona y colaboradores, 2013; *Vg1* se expresa más en reinas que en obreras y *Vg2* se expresa más en obreras viejas que en reinas. En ese trabajo se midieron niveles de expresión en cuerpo completo, aquí nosotros reportamos que *Vg1* y *Vg2* se expresan en la cabeza de las hormigas probablemente en el cerebro con patrones de expresión similares. De forma similar a las marcas epigenéticas, sobre los patrones de expresión específicos de casta, se ha observado que generalmente están más marcados durante el desarrollo, esto se ha descrito en hormigas que presentan una alta plasticidad en el fenotipo morfológico y conductual como *Solenopsis*, aunque es importante resaltar que también se han observado diferencias en la expresión, principalmente en reinas maduras comparadas con obreras (Ometto *et al.*, 2011).

Las funciones de ambos genes de Vg aún no se han descrito de manera exacta en *Pogonomyrmex*, se piensa que la *Vg1* está relacionada con funciones reproductivas dados los niveles de expresión observados más altos en reinas y menores en obreras (Corona *et al.*, 2013). Lo que sabemos de forma general es que la Vg está asociada con la actividad de los ovarios en reinas y la esperanza de vida (Corona *et al.*, 2007), en las hormigas esta información necesita ser más específica ya que varias especies albergan varias copias de Vg en su genoma como *S. invicta* que tiene 4 copias (Wurm *et al.*, 2011). El conocer la función biológica de cada uno de estos genes, analizar las similitudes de función y expresión entre especies y conocer los procesos evolutivos que han dado origen a la formación de múltiples copias ha sido un reto que aún no se ha podido culminar, pero poco a poco se ha ido descifrando (Corona *et al.*, 2013; Feldmeyer *et al.*, 2014).

En los análisis de expresión en insectos sociales resulta muy importante la especificidad de órganos y tejidos debido a la variación morfológica que presentan las castas, en *S. invicta* los dos receptores de insulina muestran niveles de expresión distintos en cerebros y ovarios de individuos adultos (Lu y Pietrantonio, 2011). *A. mellifera* también presenta este tipo de variación ya que se observó que hay cerca de 2000 genes expresados diferencialmente en el cerebro entre reinas y obreras (Grozinger *et al.* 2007). En esta misma especie se ha observado que la edad afecta los niveles de expresión de Vg en cabeza, tórax y abdomen en reinas y obreras (Corona *et al.*, 2007). Con nuestros resultados mostramos que tanto

*Jhepox* y ambas vitelogeninas se expresan en la cabeza de reinas y obreras de *P. barbatus*, un próximo hallazgo que podría ser relevante es saber si *Jhepox* se expresa en otros tejidos y comparar los niveles de expresión.

Al estar relacionada la vía de JH, insulina y Vg en el desarrollo y diferenciación de castas (Corona *et al.*, 2016) se podría comprender mejor sobre la conducta de estos insectos al conocer cómo funcionan estas redes de regulación una vez que ya se ha definido la casta y si estas redes tienen relevancia en el mantenimiento e identidad de casta.

## 10. Conclusiones y perspectivas

Con este trabajo proponemos una forma de análisis para el estudio de CA mediante el uso de microscopía confocal en la hormiga *P. barbatus*. Con base en este flujo de trabajo nuestros resultados muestran que la intensidad de fluorescencia de la marca epigenética *H3K27ac* y el volumen de los núcleos en los CA, son homogéneos en todas las castas que analizamos. Sin embargo, revelamos que se pueden identificar tendencias en diferencias del número de núcleos que componen las glándulas CA.

A nivel de expresión de genes encontramos que *Vg1* se expresa más en reinas respecto a obreras y *Vg2* se expresa más en obreras viejas respecto a reinas y obreras jóvenes. Al evaluar la expresión de vitelogenina mostramos que ambas copias de este gen se expresan en la cabeza de castas de *P. barbatus*. Esto es relevante ya que estudios anteriores habían reportado diferencias similares, pero a partir de muestras obtenidas de la hormiga completa. Así mismo, reportamos la expresión de *Jhepox* en ambas castas de obreras y no encontramos diferencias en los niveles de expresión. Con la información recabada en este trabajo y los resultados obtenidos postulamos que, en esta especie de hormiga sería interesante continuar estudiando *Jhepox* para conocer si se puede establecer como un predictor de los niveles de JH en hemolinfa como se ha observado en otros insectos eusociales.

Consideramos que un buen método para conocer de manera específica los niveles de enriquecimiento de *H3K27ac* en CA de cada casta se podría analizar mediante ChIP-seq esto permitiría conocer de manera exacta los niveles de acetilación en las células de las glándulas y los genes a las que esta marca está asociada.

Para los análisis de expresión génica se podrían realizar comparaciones entre distintas muestras de tejido entre castas, una manera de hacerlo sería medir los niveles de expresión

en cerebro y compararlos contra abdomen o gáster en casta obrera de distintas edades. Otra comparación podría ser medir niveles de expresión en individuos de colonias silvestres de vida libre e individuos de colonias criadas en laboratorio, que en estas últimas la división de labores puede no estar tan diferenciada como en las colonias de vida silvestre.

## 11. Referencias

Alexander, R. D. 1974. The evolution of social behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), 325-383.

Alvarado, S., Rajakumar, R., Abouheif, E., y Szyf, M. 2015. Epigenetic variation in the *Egfr* gene generates quantitative variation in a complex trait in ants. *Nature communications*, 6(1), 1-9.

Anderson, M. 1984. The evolution of eusociality. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15(1), 165-189.

Bannister, A. J., y Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381-395.

Bellés, X., Martín, D., y Piulachs, M. D. 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology*, 50, 181-199.

Berger, S. L. 1999. Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Current Opinion in Cell. Biology*, 11(3), 336-341.

Berger, S.L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 477(7143), 407-412.

Bloch, G., Wheeler, D. E., y Robinson, G. E. 2002. Endocrine influences on the organization of insect societies. *Hormones, Brain and Behavior*, 195-235.

Bolder, M. F., Jung, K., y Stern, M. 2022. Seasonal variations of serotonin in the visual system of an ant revealed by immunofluorescence and a machine learning approach. *Royal Society Open Science*, 9(2), 210932.

Boite, S. y Cordelières, F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), 213-232.

Bonasio, R., Tu, S., y Reinberg, D. 2010. Molecular Signals of Epigenetic States. *Science*, 330(6004), 612-616.

Bonasio, R. 2014. The role of chromatin and epigenetics in the polyphenisms of ant castes. Briefings in *Functional Genomics*, 12(3), 235-245.

Burda, H., Honeycutt, R. L., Begall, S., Locker-Grütjen, O., y Scharff, A. 2000. Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47, 293-303.

Burnette, W. N. 1981. "Western Blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112(2), 195-203.

Cahan, S. H., Julian, G. E., Rissing, S. W., Schwander, T., Parker, J. D., y Keller, L. 2004. Loss of phenotypic plasticity generates genotype-caste association in harvester ants. *Current Biology*, 14(24), 2277-2282.

Cahan, S. H., Graves, C. J., y Brent, C. S. 2011. Intergenerational effect of juvenile hormone on offspring in *Pogonomyrmex* harvester ants. *Journal of Comparative Physiology B*, 181(8), 991-999.

Cardoso-Júnior C.A.M., Silva R. P., Borges N. A., de Carvalho W. J., Walter S. L., Paulino Z. L., Gentile M. M., Ueira C., Bonetti A. M. y Hartfelder K. 2017. Methyl farnesoate epoxidase (*mfe*) gene expression and juvenile hormone titers in the life cycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Journal of Insect Physiology*. 101, 185–194.

Cazal, P. 1948. Les glandes endocrines rétro-cérébrales des insectes:(étude morphologique) (Vol. 32). Laboratoire d'évolution des êtres organisés.

Chandra, V., Fetter-Pruneda, I., Oxley, P. R., Ritger, Al. L., McKenzie, S. K., Libbrecht, R., y Kronauer, D. J. 2018. Social regulation of insulin signaling and the evolution of eusociality in ants. *Science*, 361(6400), 398-402.

Choi, H., M. T., Schwarzkopf, M., Fornace, M. E., Acharya, A., Artavanis, G., Stegmaier, J., Cunha, A. y Pierce, N. A. 2018. Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. *Development*, 145(12), dev165753.

Chittka, A., Wurm, Y., y Chittka, L. 2012. Epigenetics: the making of ant castes. *Current Biology*, 22(19), R835-R838.

Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., y Robinson, G. E. 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128-7133.

Corona, M., Libbrecht, R., Wurm, Y., Riba-Grognuz, O., Studer, R. A., y Keller, L. 2013. Vitellogenin underwent subfunctionalization to acquire caste and behavioral specific expression in the harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003730.

Corona, M., Libbrecht, R., y Wheeler, D. E. 2016. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in social insects. *Current Opinion in Insect Science*, 13, 55-60.

Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., y Boyer, L. A. 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21931-21936.

Cutter, A.R. y Hayes, J.J. 2015. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*, 589(2000), 2914-2922.

Daimon, T., y Shinoda, T. 2013. Function, diversity, and application of insect juvenile hormone epoxidases (CYP15). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(1), 82-91.

Defelipe, L. A., Dolgih, E., Roitberg, A. E., Nouzova, M., Mayoral, J. G., Noriega, F. G., y Turjanski, A. G. 2011. Juvenile hormone synthesis: “esterify then epoxidize” or “epoxidize then esterify”? Insights from the structural characterization of juvenile hormone acid methyltransferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 228–235.

Dolezal, A. G., Brent, C. S., Gadau, J., Hölldobler, B., y Amdam, G. V. 2009. Endocrine physiology of the division of labour in *Pogonomyrmex californicus* founding queens. *Animal Behaviour*, 77(5), 1005-1010.

Dolezal, A. G., Brent, C. S., Hölldobler, B., y Amdam, G. V. 2012. Worker division of labor and endocrine physiology are associated in the harvester ant, *Pogonomyrmex californicus*. *Journal of Experimental Biology*, 215(3), 454-460.

Evans, J.D. y Wheeler, D.E. 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays*, 23(1), 62-68.

Feldmeyer, B., Elsner, D., y Foitzik, S. 2014. Gene expression patterns associated with caste and reproductive status in ants: worker-specific genes are more derived than queen-specific ones. *Molecular Ecology*, 23(1), 151-161.

Forster Figueira, C. R., y Camargo Mathias, M. I. 2002. Histological, histochemical and morphometric study of female corpora allata of *Pachycondyla striata* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Sociobiology*, 77-87.

Garcia, B. A., Hake, S. B., Diaz, R. L., Kauer, M., Morris, S. A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B. D., Allis, C. D. y Hunt, D. F. 2006. Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7641–7655.

Gilbert, L. I. 2011. *Insect endocrinology*. Academic Press.

Glastad, K. M., Graham, R. J., Ju, L., Roessler, J., Brady, C. M., y Berger, S. L. 2019. Epigenetic Regulator CoREST Controls Social Behavior in Ants. *Molecular Cell*, 77(2), 338-35.

Goodman, W.G. y Cusson, M., 2012. The juvenile hormones. In: Gilbert, L.I. (Ed.) *Insect Endocrinology*, 310–365.

Gordon, D. M. 1986. The dynamics of the daily round of the harvester ant colony (*Pogonomyrmex barbatus*). *Animal Behaviour*, 34(5), 1402-1419.

Gordon, D. M. 1989. Dynamics of task switching in harvester ants. *Animal Behaviour*, 38(2), 194-204.

Grozinger C.M., Fan Y., Hoover S.E.R, Winston M.L. 2007 Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 16(22), 4837–4848.

Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649), 349–352.

Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L., y Hartfelder, K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS letters*, 579(22), 4961-4965.

Hartfelder, K., Bitondi, M.G., Brent, C.S., Guidugli-Lazzarini, K., Simões, Z.L.P., Stabentheiner, A., Tanaka, E.D., Wang, Y., 2013. Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 52(1), 1-47.

Helms Cahan S. y Keller L. 2003. Complex hybrid origin of genetic caste determination in harvester ants. *Nature*, 424(6946), 306-309.

Helvig, C., Koener, J. F., Unnithan, G. C., & Feyereisen, R. 2004. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4024-4029.

Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931-949.

Hölldobler, B., y Wilson, E. O. 1990. The ants. Harvard University Press.

Ingram, K. K., Oefner, P., y Gordon, D. M. 2005. Task-specific expression of the foraging gene in harvester ants. *Molecular Ecology*, 14(3), 813-818.

Jaffe, K. y Perez, E. 1989. Comparative Study of Brain Morphology in Ants. *Brain, Behavior and Evolution*, 33(1), 25–33.

Jin, Q., Yu, L. R., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L. H., Lee, J. E., ... y Ge, K. 2011. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *The EMBO journal*, 30(2), 249-262.

Kan, A. 2017. Machine learning applications in cell image analysis. *Immunology and Cell Biology*, 95(6), 525-530.

Kamhi J. F., y Traniello J. F. A. 2013 Biogenic amines and collective organization in a superorganism: neuromodulation of social behavior in ants. *Brain, Behavior and Evolution*, 82(4), 220–236.

Khila, A., y Abouheif, E. 2010. Evaluating the role of reproductive constraints in ant social evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1540), 617-630.

Levenson, J. M. y Sweatt, J. D. 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 108-118.

Libbrecht, R., Corona, M., Wende, F., Azevedo, D. O., Serrão, J. E., y Keller, L. 2013. Interplay between insulin signaling, juvenile hormone, and vitellogenin regulates maternal effects on polyphenism in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 11050-11055.

- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, H. L., y Pietrantonio, P. V. 2011. Insect insulin receptors: insights from sequence and caste expression analyses of two cloned hymenopteran insulin receptor cDNAs from the fire ant. *Insect Molecular Biology*, 20(5), 637-649.
- Norman, V. C., y Hughes, W. O. H. 2016. Behavioural effects of juvenile hormone and their influence on division of labour in leaf-cutting ant societies. *The Journal of Experimental Biology*, 219(1), 8-11.
- Nowak, M. A., Tarnita, C. E., y Wilson, E. O. 2010. The evolution of eusociality. *Nature*, 466(7310), 1057-1062.
- Ometto, L., Shoemaker, D., Ross, K. G., y Keller, L. 2011. Evolution of gene expression in fire ants: the effects of developmental stage, caste, and species. *Molecular Biology and Evolution*, 28(4), 1381-1392.
- Ospelt, C. 2022. A brief history of epigenetics. *Immunology Letters*, 249, 1-4.
- O'sullivan, R. J., Kubicek, S., Schreiber, S. L., & Karlseder, J. 2010. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(10), 1218-1225.
- Otsu, N. 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9(1), 62-66.
- Penick, C. A., Liebig, J., y Brent, C. S. 2011. Reproduction, dominance, and caste: endocrine profiles of queens and workers of the ant *Harpegnathos saltator*. *Journal of Comparative Physiology A*, 197, 1063-1071.
- Rachinsky, A., y Hartfelder, K. 1990. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Journal of Insect Physiology*, 36(3), 189-194.
- Rehan, S. M., y Toth, A. L. 2015. Climbing the social ladder: the molecular evolution of sociality. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(7), 426-433.
- Riddiford, L. M. 2008. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 895-901.

Riddiford, L. M. 2020. Rhodnius, golden oil, and Met: A history of juvenile hormone research. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 679.

Robinson, G. E., y Vargo, E. L. 1997. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 35(4), 559-583.

Röller, H., Dahm, K.H., Sweeley, C.C., Trost, B.M., 1967. The structure of the juvenile hormone. *Angewandte Chemie, International Edition* 6, 179–180.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., James, D., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., y Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682.

Schumann, N. A. B., Cardoso-Junior, C. A. M., Silva, E. H., Ueira-Vieira, C., Beletti, M. E., Franco, M. B., Bezerra-Laure M., Araujo G. R., Travençolo B. A. N. y Bonetti, A. M. 2019. Three-dimensional reconstruction of corpora allata nucleus reveals insights into epigenetic mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. *Apidologie*, 50(3), 330-339.

Schwander, T., Humbert, J. Y., Brent, C. S., Cahan, S. H., Chapuis, L., Renai, E., y Keller, L. 2008. Maternal effect on female caste determination in a social insect. *Current Biology*, 18(4), 265-269.

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., y Berger, S. L. 2016. Epigenetic mechanisms of longevity and aging. *Cell*, 166(4), 822-839.

Sheng, Z., Ma, L., Cao, M. X., Jiang, R. J., y Li, S. 2008. Juvenile hormone acid methyl transferase is a key regulatory enzyme for juvenile hormone synthesis in the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 69(3),143-154.

Smith, C. L. 2011. Basic Confocal Microscopy. *Current Protocols in Neuroscience*, 56(1), 2-2.

Smith, C. R., Smith, C. D., Robertson, H. M., Helmkamp, M., Zimin, A., Yandell, M., et al., y Gadau, J. 2011. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5667-5672.

Simola, D. F., Ye, C., Mutti, N. S., Dolezal, K., Bonasio, R., Liebig, J., Reinberg D., y Berger, S.L. 2013. A chromatin link to caste identity in the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Gen Research*, 23(3), 486-496.

Simola, D. F., Wissler, L., Donahue, G., Waterhouse, R. M., Helmkampf. M., Roux, J., Nygaard, S., Glastad, K. M., Hagen, D. E., Viljakainen, L., Reese, J. T., Hunt, B. G., Graur, D., Elhaik, E., Kriventseva, E. V., Wen, J., Parker, B. J., Cash, E., Privman, E., Childers, C. P., Muñoz-Torres, M. C., Boomsma, J. J., Bornberg-Bauer, E., Currie, C. R., Elsik, C. G., Suen, G., Goodisman, M. A., Keller, L., Liebig, J., Rawls, A., Reinberg, D., Smith, C. D., Smith, C. R., Tsutsui, N., Wurm, Y., Zdobnov, E. M., Berger S. L., y Gadau, J. 2013. Social insect genomes exhibit dramatic evolution in gene composition and regulation while preserving regulatory features linked to sociality. *Gen Research*, 23(8), 1235-47.

Simola, D. F., Graham, R. J., Brady, C. M., Enzmann, B. L., Desplan, C., Ray, A., Zwiebel L. J., Bonasio R., Reinberg D., Liebig J. y Berger, S. L. 2016. Epigenetic (re) programming of caste-specific behavior in the ant *Camponotus floridanus*. *Science*, 351(6268), aac6633.

Simpson, S. J., Sword, G. A., Lo, N. 2011. Polyphenism in insects. *Current Biology*, 21(18), R738-R749.

Taverna, S. D., Ueberheide, B. M., Liu, Y., Tackett, A. J., Díaz, R. L., Shabanowitz J. y Allis, C. D. 2007. Long-distance combinatorial linkage between methylation and acetylation on histone H3 N termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2086-2091.

Taylor, J. P., Taye, A. A., Campbell, C., Kazemi-Esfarjani, P., Fischbeck, K. H., y Min, K. T. 2003. Aberrant histone acetylation, altered transcription, and retinal degeneration in a *Drosophila* model of polyglutamine disease are rescued by CREB-binding protein. *Genes and Development*, 17(12), 1463-1468.

Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C. A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Díaz, M. O., Scacheri, P. C., y Harte, P. J. 2009. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development*, 136(18), 3131-3141.

Tobe, S. S., y Stay, B. 1985. Structure and regulation of the corpus allatum. *Advances in Insect Physiology*, 18, 305-432.

Turner, B. M. 1993. Decoding the nucleosome. *Cell*, 75(1), 5-8.

Van Laere, O. y Lagasse, A. 1973. Ultrastructure of the *Corpora Allata* in the Honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 12(2), 99-109.

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Zhao, K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics*, 40(7), 897-903.

Ward, P. S. 2014. The phylogeny and evolution of ants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45(1), 23-43.

Wheeler, D.E. 1986. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: Evolutionary implications. *The American Naturalist*, 128(1), 13-34.

Wheeler, D. E. 1991. The developmental basis of worker caste polymorphism in ants. *The American Naturalist*, 138(5), 1218-1238.

Wheeler D.E. y Nijhout H.F. 1981 Soldier determination in ants: new role for Juvenile Hormone. *Science*, 213(4505), 361-363.

Wickham, H., Chang, W., y Wickham, M. H. 2016. Package 'ggplot2'. *Create elegant data visualisations using the grammar of graphics*. Version, 2(1), 1-189.

Wigglesworth, V.B., 1934. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Journal of Cell Science*, 2(306), 191-222.

Wigglesworth, V.B., 1936. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 79, 91-121.

Wilson, E. O. 1971. The insect societies. Cambridge, Massachusetts, USA, Harvard University Press [Distributed by Oxford University Press.

Wilson, E. O. 2000. Sociobiology: The new synthesis. Harvard University Press.

Wilson, E. O. 2005. The effects of complex social life on evolution and biodiversity. *Handbook of Evolution: The Evolution of Living Systems (including Hominids)*, 47-56.

Wilson, E. O., y Hölldobler, B. 2005. Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13367-13371.

Win, K. Y. y Choomchuay, S. 2017. Automated segmentation of cell nuclei in cytology pleural fluid images using OTSU thresholding. *2017 International Conference on Digital Arts, Media and Technology (ICDAMT)*.

Winston, M.L. 1991. *The biology of the honeybee*, 2nd ed. Harvard University Press, Cambridge, MA

Wurm, Y., Wang, J., Riba-Gognuz, O., Corona, M., Nygaard, S., Hunt, B. G., ... y Keller, L. 2011. The genome of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5679-5684.

Yan, H., Simola, D. F., Bonasio, R., Liebig, J., Berger, S. L., y Reinberg, D. 2014. Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. *Nature Reviews Genetics*, 15(10), 677–688.