



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

SISTEMAS DE NEUROMODULACIÓN INOTOCINÉRGICO, DOPAMINÉRGICO Y OCTOPAMINÉRGICO EN LA HORMIGA *POGONOMYRMEX BARBATUS* Y SU RELACIÓN CON EL POLIETISMO TEMPORAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

CARLOS RAFAEL ZAVALETA ZAMORA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. INGRID ANNETTE FETTER PRUNEDA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

DR. ADÁN OSWALDO GUERRERO CÁRDENAS
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Febrero, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE
INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA
Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Sistemas de Neuromodulación Inotocinérgico, Dopaminérgico y Octopaminérgico en la Hormiga *Pogonomyrmex barbatus* y su relación con el Polietismo Temporal,

que presenté para obtener el grado de ---Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con

el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Carlos Rafael Zavaleta Zamora
418058420

Miembros del jurado

Presidente: Dr. Rudolf Buijs

Secretaria: Dra. Diana María Escalante Alcalde

Vocal: Dr. Julio Morán Andrade

Vocal: Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza

Vocal: Dr. Luis Daniel Ríos Barrera

Agradecimientos

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA206922.

Este proyecto contó con el apoyo del Consorcio Global para la Longevidad Reproductiva y la Igualdad (*Global Consortium for Reproductive Longevity and Equality*) del Instituto Buck para la investigación en envejecimiento (*Buck Institute for Research on Aging*) (Clave: GCRLE-0620). Por lo cual, les muestro mis agradecimientos.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la Beca para estudios de posgrado a nivel de Maestría (CVU 1146622).

Expreso mis mayores muestras de gratitud a la Dra. Ingrid Annette Fetter Pruneda, por todo el tiempo que ha dedicado en este proyecto, en mí y en mi formación. Por la libertad que me permitió tener en el proyecto y la autonomía que procuró que yo siempre tuviera en su laboratorio. Y por su gran labor como científica, que admiro y respeto.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez y al Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas por su apoyo, consejos y comentarios sobre el proyecto, y sobre mi formación.

Muestro mi gratitud a la Dra. María Berenice Otero Díaz por su apoyo técnico en la estandarización y ejecución de los protocolos de hibridación *in situ* fluorescente e inmunofluorescencia. Sin su trabajo y apoyo, realizar este proyecto no habría sido posible.

Gracias a los sinodales que revisaron esta tesis, el Dr. Rudolf Buijs, la Dra. Diana María Escalante Alcalde, el Dr. Julio Morán Andrade, el Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza y el Dr. Luis Daniel Ríos Barrera, por las observaciones y comentarios que permitieron enriquecer este trabajo.

De igual manera, le doy gracias al Dr. Ruud Buijs que nos proporcionó amablemente el anticuerpo contra vasopresina que utilizamos en este trabajo.

A su vez, agradezco al Biól. César Maximiliano Vázquez Franco, que proporcionó las fotografías de los especímenes usados en este trabajo.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio, que con su ayuda, comentarios y aliento me apoyaron durante la realización del proyecto. Su compañía en el laboratorio es invaluable.

Agradezco enormemente a mis amigos Josué, Emilio, Nuri, Fernando, Michelle, Estefanía, Karla y Ángela que me han ayudado en todo momento. Admiro su lealtad, inteligencia, constancia y cariño. Valoro enormemente los momentos que hemos podido compartir juntos, incluso a veces a pesar de la distancia.

Le doy gracias infinitas a mis padres, Guadalupe y Carlos, que siempre me han apoyado en todo. Los amo muchísimo, son mi principal motivación en todo lo que hago.

Índice

Abstract	6
Resumen	7
Resumen Gráfico	8
Introducción	9
Hormigas y Eusocialidad	
Polietismo Temporal	
Neuroanatomía	
Neuromodulación	
Neuropéptidos	
Aminas Biogénicas	
Planteamiento del problema	
Preguntas de investigación	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
General	
Específicos	
Metodología	23
Mantenimiento y cuidado de hormigas	
Selección de hormigas	
Inmunofluorescencia contra inotocina	
Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) contra TH y TBH	
Microscopía Confocal	
Análisis de Imágenes	
Análisis estadístico	
Captura de imágenes de especímenes	
Resultados	29
Distribución Anatómica de neuromoduladores	
Localización de Células Inotocinérgicas	
Localización de Células Aminérgicas	
Comparación de la Distribución de Neuromoduladores según la edad	
Distribución de Inotocina en Obreras Jóvenes y Viejas	
Distribución de Aminas Biogénicas en Obreras Jóvenes y Viejas	
Discusión	43
Inotocina	
Aminas biogénicas	
Conclusiones	51
Perspectivas	52
Referencias	54

Índice de Figuras

Número de figura	Nombre de figura	Página
Figura 1	Hormigas <i>Pogonomyrmex barbatus</i> .	11
Figura 2	Polietismo temporal.	12
Figura 3	Neuroanatomía de la hormiga.	14
Figura 4	Inotocina	18
Figura 5	Rutas biosintéticas de las aminas biogénicas.	20
Figura 6	Neuronas inotocinérgicas en el cerebro de distintas etapas del desarrollo y castas de la hormiga <i>Pogonomyrmex barbatus</i> , vista posterior.	30
Figura 7	Neuronas dopaminérgicas en el cerebro de la hormiga <i>Pogonomyrmex barbatus</i> .	32
Figura 8	Neuronas octopaminérgicas en el cerebro de la hormiga <i>Pogonomyrmex barbatus</i> .	34
Figura 9	Localización de neuronas aminérgicas en cerebros de <i>Pogonomyrmex barbatus</i> .	36
Figura 10	En el cerebro de <i>Pogonomyrmex barbatus</i> no existen neuronas de tipo dopaminérgico-octopaminérgico.	37
Figura 11	La intensidad de inotocina en las neuritas es diferente con respecto a la edad, mientras que en los somas no hay cambios notables.	39
Figura 12	Las hormigas jóvenes tienen mayor cantidad de transcritos tanto de <i>TH</i> como de <i>TBH</i> comparado con las hormigas viejas.	41

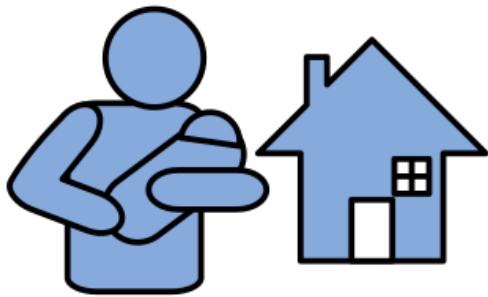
Abstract

Ants display complex social behavior, with a distinctive organization and division of labor among their colony members. The allocation of tasks within a colony is linked to the propensities of each individual to perform specific roles. This behavioral tendency is dependent predominantly on their age and is referred to as temporal polyethism. The extent and timing of behavioral change in ants are closely linked to neuromodulatory systems, which play a crucial role in providing flexibility to their neural circuits' dynamics. However, the anatomical organization of these systems and the neural mechanisms responsible for driving the temporal shifts in behavior remain unknown. In this thesis, I studied the neuropeptide inotocin, and the biogenic amines dopamine and octopamine, three neuromodulatory systems that constitute strong candidates for regulating changes of behavior in ants. We characterized their anatomical distribution in the brains of red harvester ants, identifying inotocinerbic neurons using immunofluorescence, as well as dopaminergic and octopaminergic neurons with fluorescent in situ hybridization, targeting the transcripts of their synthesis enzymes, tyrosine hydroxylase (TH) and tyramine β -hydroxylase (TBH), respectively. We also compared the fluorescence intensity in the brains of young and old adult worker ants to discern any age-related differences. Our findings revealed that older ants exhibit higher fluorescence intensity in the inotocinerbic neurites, indicating a positive correlation between inotocin expression and aging. Conversely, younger ants displayed greater fluorescence intensity from the mRNA of the aminergic synthesis pathways, TH and TBH, suggesting that their expression decreases with age. The anatomical description of inotocinerbic, dopaminergic, and octopaminergic neurons, coupled with a characterization of the alterations in neuromodulator distribution and quantities over time, represents a significant step toward unraveling the neural foundations of social behavior in ants.

Resumen

Las hormigas tienen conductas sociales complejas, con una organización característica y división de tareas entre los miembros de la colonia. El reparto de labores de una colonia está ligada a la propensión de cada individuo de realizar roles específicos. Esta tendencia conductual depende principalmente de la edad y se conoce como polietismo temporal. El grado y la temporalidad del cambio conductual en hormigas está ligado con los sistemas de neuromodulación, que tienen un papel crucial en dotar de flexibilidad en sus dinámicas a sus circuitos neuronales. Sin embargo, se desconocen tanto la organización anatómica de dichos sistemas, así como los mecanismos neuronales que ejecutan los cambios temporales en la conducta. En esta tesis, estudiamos el neuropéptido inotocina, y las aminas biogénicas dopamina y octopamina, neuromoduladores que son candidatos importantes para la regulación conductual en hormigas. Caracterizamos su distribución anatómica en los cerebros de las hormigas rojas cosechadoras de semillas. Identificamos a las neuronas inotocinérgicas con inmunofluorescencia, así como a las dopaminérgicas y octopaminérgicas mediante hibridación *in situ* fluorescente, para identificar los transcritos que codifican para sus enzimas de síntesis, tirosina hidroxilasa (*TH*) y tiramina β -hidroxilasa (*TBH*), respectivamente. Además, comparamos la intensidad de fluorescencia en el cerebro de obreras jóvenes y viejas para describir las diferencias relacionadas con la edad. Nuestros resultados muestran que las hormigas viejas presentan mayor intensidad de fluorescencia en las neuritas inotocinérgicas, lo que indica una correlación positiva entre la expresión de la inotocina con el envejecimiento. En cambio, las hormigas jóvenes muestran mayor intensidad de fluorescencia relacionada con mRNA de la vía sintética aminérgica, *TH* y *TBH*, por lo que se sugiere que los sistemas de aminas biogénicas varían con la edad. La descripción de la localización anatómica de las neuronas inotocinérgicas, dopaminérgicas y octopaminérgicas, junto con la caracterización de los cambios en la distribución de dichos neuromoduladores según la edad, representa un paso en el estudio de las bases neuronales del comportamiento social en hormigas.

Resumen Gráfico



Introducción

Hormigas y Eusocialidad

Las hormigas son insectos eusociales de la familia Formicidae, del orden de los himenópteros. Son de los animales más ubicuos del planeta, con presencia nativa en todos los continentes excepto en la Antártida, y se han establecido en la mayoría de los biomas terrestres (Hölldobler y Wilson, 1990; Ríos-Casanova, 2014; Ward, 2006).

La eusocialidad es considerada como uno de los comportamientos sociales más extremos en los animales. Se trata de un fenómeno en el cual existen tres características principales: una división de las labores reproductivas en una población, cuidado aloparental y sobrelape generacional (Hölldobler y Wilson, 1990). La primera característica se refiere a que uno o algunos miembros de la colonia se encargan exclusivamente de la reproducción, mientras que los demás no son capaces de hacerlo y desempeñan tareas como el cuidado de otros individuos del grupo, recolección de alimentos y defensa frente a amenazas. Las hormigas que no se reproducen son todas hembras, llamadas obreras, mientras que los individuos de la colonia que se especializan en la reproducción se conocen como machos, ginas (si son hembras), o reinas (ginas fecundadas). La segunda característica, el cuidado aloparental, hace referencia al cuidado de las crías (huevos, larvas y pupas) por parte de individuos distintos a los progenitores. La tercera, el sobrelape generacional, se refiere a la coexistencia de individuos de múltiples edades en un mismo nido (Fischer y O'Connell, 2017; Godfrey y Gronenberg, 2019; Hölldobler y Wilson, 1990; Wilson y Hölldobler, 2005).

La organización colonial, conducta colectiva y la coordinación estrecha entre individuos que logran desempeñar tareas complejas se puede relacionar con su éxito evolutivo, que es notable, por ejemplo, en la cantidad de especies y en su aporte a la biomasa global. Las hormigas representan un sistema de estudio de interés científico por su repertorio de conductas sociales complejas (Kamhi y Traniello, 2013). Además, la variabilidad morfofisiológica entre

organismos reproductivos y no reproductivos permite explorar, por ejemplo, preguntas relacionadas con la plasticidad en el desarrollo, a los mecanismos moleculares que influyen en la determinación de las castas, y al surgimiento de conductas diversas partiendo desde un fondo genético común (Fetter-Pruneda et al., 2021; Hölldobler y Wilson, 1990; Hoyer et al., 2005; Koto et al., 2019; Sorek y Berger, 2023).

Por su reducido tamaño y poca dificultad en su mantenimiento, son relativamente fáciles de estudiar en el laboratorio. Siguiendo la misma idea, la disección y manipulación de tejidos resulta tanto sencilla como económica, si se toman en cuenta los volúmenes de reactivos usados. La diversidad de especies de esta familia dota de un sinnúmero de posibilidades de estudio debido a las características particulares de cada una de ellas (Gordon, 2011; Hölldobler y Wilson, 1990; Ríos-Casanova, 2014).

La hormiga roja cosechadora de semillas *Pogonomyrmex barbatus* es uno de los organismos mejor estudiados de la familia de los formícidos (Friedman et al., 2020, 2018; Gordon, 2011, 1983; Gordon et al., 2013; Williams et al., 1965). Estas hormigas presentan una serie de posibilidades y ventajas para su estudio. La primera de ellas es que la división entre la casta reproductiva y la no reproductiva es marcada, pues tienen formas fácilmente distinguibles (Gordon, 2011). El rasgo más evidente es el tamaño, las reinas son más grandes que las obreras (Fig. 1). Entre estas últimas, no hay variabilidad morfológica considerable como en el caso de las especies que presentan polimorfismo de las obreras (Fig. 1), por lo que el estudio de la casta no reproductiva resulta más sencillo (Gordon, 2011).

La distribución de la hormiga roja cosechadora va desde el sur de los Estados Unidos hasta el Istmo de Tehuantepec en México (por lo tanto, está disponible para recolectar en la Ciudad de México y estados circundantes), principalmente en zonas áridas o semiáridas en las orillas de los desiertos, pastizales, o en matorrales (Gordon, 2011; Vásquez-Bolaños, 2011).

El medio ambiente en el que vive este organismo lo obliga a tomar decisiones complejas sobre la recolección de comida que depende del estado alimenticio colonial, los factores

ambientales extremos presentes en su hábitat natural, como las altas temperaturas y la baja humedad, y del contexto social, como lo es la edad promedio de los individuos en la colonia (Friedman et al., 2018; Gordon et al., 2013). Además, las obreras de esta especie presentan cambios conductuales con respecto a la edad (Gordon, 2011).

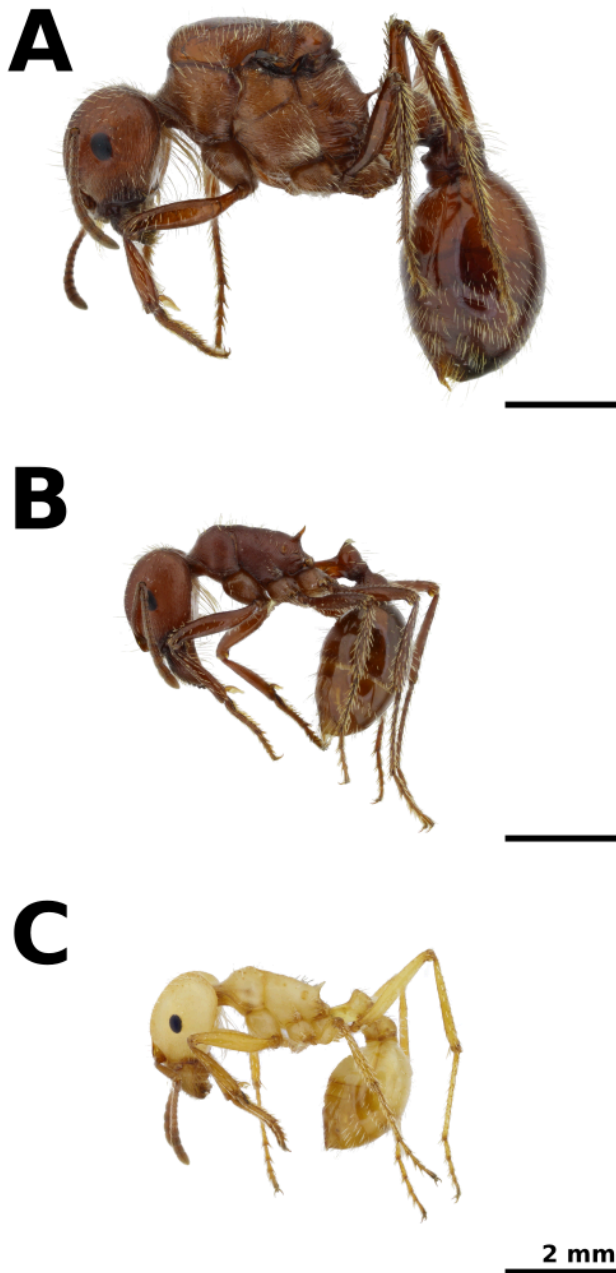


Fig. 1. Hormigas *Pogonomyrmex barbatus*. A: Reina. B: Obrera vieja. C: Obrera joven. Las barras de escala corresponden a 2 mm (Imágenes tomadas por Maximiliano Vázquez Franco).

Polietismo Temporal

La división de tareas entre las obreras se encuentra estrechamente ligada con la edad, puesto que las obreras más jóvenes (recién emergidas de pupa, Fig. 1C) se suelen encargar de tareas dentro del nido (intranidales), tales como el cuidado de sus hermanas pre-imago y de la reina. En el caso de las obreras viejas (Fig. 1B) (~1 mes de la emergencia pupal en especies como *Pheidole dentata*), se observa que suelen desempeñar tareas fuera del nido (extranidales), como aquellas relacionadas con la defensa, y el forrajeo (búsqueda y recolección de alimentos). A este proceso de cambio conductual con respecto a la edad se le conoce como polietismo temporal (Fig. 2) (Hölldobler y Wilson, 1990; Seid et al., 2005). La diversidad de tareas que llevan a cabo los insectos eusociales requiere un alto grado de plasticidad en el tejido nervioso (Seid y Traniello, 2005; Seid et al., 2005; Bressan et al., 2015).

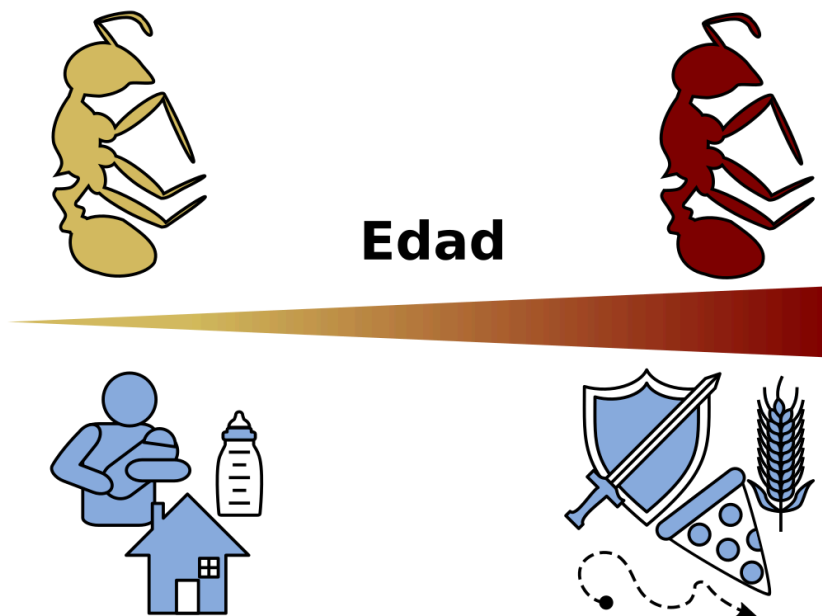


Fig. 2. Polietismo temporal. La edad de las hormigas se relaciona tanto con la pigmentación como con el cambio conductual. Las obreras jóvenes (pigmentación clara amarillenta) desempeñan tareas intranidales, como el cuidado de los individuos pre-imago y de la reina, mientras que las obreras viejas (marrón oscuro) se encargan de tareas extranidales como la defensa del nido y el forrajeo (Modificado de Seid et al., 2005).

Neuroanatomía

El sistema nervioso de los insectos se organiza por ganglios, que son aglomeraciones de los cuerpos y procesos de las neuronas motoras e interneuronas. En la corteza de estos cúmulos se encuentran los somas de estas células nerviosas, mientras que en el centro (llamado neuropilo) se disponen principalmente redes de las proyecciones neurales o neuritas. Los ganglios de estos organismos se disponen en forma de cadena, uno detrás de otro, unidos por fibras axonales y glía (Chapman et al., 2013). En la parte más rostral del organismo, y generalmente cerca de la cara dorsal de la pared corporal, se encuentra el cerebro. En el caso de los insectos holometábolos (que tienen metamorfosis completa, como las moscas, polillas, abejas y hormigas), el tejido nervioso de la cabeza tiene una forma toroidal debido a la fusión del proto, deuto, trito cerebros y el ganglio gnatal alrededor del esófago. Dicho conducto sirve como referencia para dividir a los tejidos situados por encima y por debajo de éste como zonas Supraesofágica (*Supraesophageal Zone, SPZ*) y Subesofágica (*Subesophageal Zone, SEZ*), respectivamente (Fig. 3A). Algunos de los neuropilos más relevantes en la zona Supraesofágica son los lóbulos antenales (*Antennal Lobes, AL*), los lóbulos ópticos (*Optic Lobes, OL*), los neuropilos del protocerebro (Pr), los cuerpos fungiformes (*Mushroom Bodies, MB*), el complejo central (*Central Complex, CX*). Estas regiones se relacionan a procesos como el procesamiento de entradas sensoriales primarias químicas y mecánicas (AL), visuales (OL); procesamiento secundario multimodal (Pr), procesos superiores como memoria, aprendizaje y navegación (MB, CX); control motor, conductas de alimentación, conductas sociales y regulación neuroendocrina (SEZ) (Fig. 3 B y C) (Chapman et al., 2013; Ito et al., 2014; Bressan et al., 2015; Richter et al., 2019; Habenstein et al., 2020).

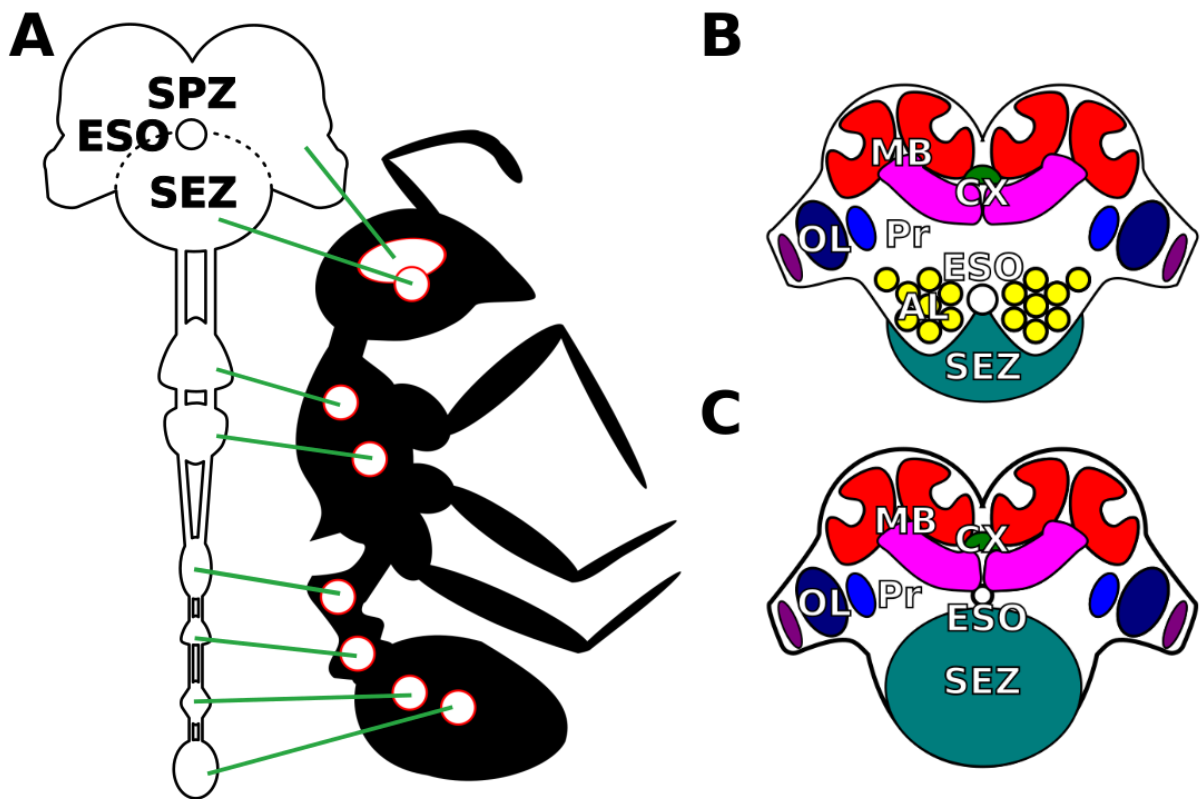


Fig. 3. Neuroanatomía de la hormiga. A: Ganglios y su disposición en el cuerpo de la hormiga. El cerebro se encuentra en la cabeza de la hormiga y se compone de la fusión de los dos primeros ganglios, que corresponden a la Zona Supraesofágica (SPZ) y la Zona Subesofágica (SEZ). El círculo corresponde al esófago (ESO). **B:** Esquema de la distribución de los principales neuropilos del cerebro de la hormiga en la cara anterior. **C:** Esquema de la distribución de los principales neuropilos del cerebro de la hormiga en la cara posterior. Los cuerpos fungiformes (MB) se presentan en rojo y rosa. El complejo central (CX) en verde. Los lóbulos ópticos (OL) en morado, azul marino y azul. Los lóbulos antenales (AL) en amarillo. La zona subesofágica (SEZ) en turquesa (Modificado de Choi et al., 2009; y Habenstein et al., 2020).

Neuromodulación

Los circuitos neuronales presentan tres principales formas de comunicación, neurotransmisión, neuromodulación y comunicación neuroendocrina. A diferencia de algunos neurotransmisores clásicos como acetilcolina, glutamato, GABA y glicina, que presentan una comunicación rápida (orden de milisegundos), de punto a punto (neurona a una célula blanco), y binaria (disparo o no disparo), algunas moléculas neuroactivas como los neuropéptidos y las aminas biogénicas actúan cambiando las propiedades de los circuitos, lo que promueve una reconfiguración funcional de éstos, conocida como neuromodulación. La acción de estos moduladores está caracterizada por interacciones mediadas por receptores acoplados a proteínas G (*G Protein Coupled Receptors*, GPCRs) y segundos mensajeros (Katz, 1999).

La temporalidad en la que estos sistemas actúan es de décimas de segundos a horas. En cuanto a la dinámica espacial, pueden actuar en una o varias células blanco. El resultado de la interacción de estas moléculas con los receptores de las células postsinápticas no es necesariamente un potencial de acción, sino que promueve la ocurrencia de cambios fisiológicos diversos y simultáneos en la célula blanco. En algunos casos, estas mismas moléculas pueden funcionar como neurotransmisores o ser liberadas en el sistema circulatorio de los organismos y actuar como neurohormonas al activar receptores en células diana lejanas (Katz, 1999; Nadim y Bucher, 2014).

Neuropéptidos

Los neuropéptidos son cadenas cortas de aminoácidos que son sintetizados, modificados, almacenados y liberados por neuronas. Una vez liberados tienen efectos sobre receptores de otras células, tanto adyacentes como alejadas de la neurona que libera las moléculas. Al igual que otras proteínas y péptidos, la expresión de sus genes consiste en la regulación de su transcripción, la traducción de sus mensajeros por los ribosomas, que dan lugar a péptidos precursores y que requieren procesamiento para que finalmente se produzcan

los péptidos neuroactivos. Este procesamiento está mediado por enzimas, pues la activación depende de características estructurales específicas. Se han descrito más de cien distintos neuropéptidos, entre ellos la sustancia P, el neuropéptido F (Y en vertebrados), la oxitocina y la vasopresina (Burbach, 2011).

Los primeros sistemas de péptidos descritos fueron los de vasopresina (AVP) y oxitocina (OXT). A sus primeras funciones descritas relacionadas con procesos fisiológicos (vasopresión, antidiuresis; tonicidad del útero y actividad promotora de lactación, respectivamente) les siguieron en poco tiempo otras relacionadas con la regulación de conductas reproductivas y sociales, así como con memoria y aprendizaje (Donaldson y Young, 2008; McCall y Singer, 2012, en Muratspahić et al., 2020; Odekunle y Elphick, 2020). Ambos péptidos están compuestos por nueve residuos. En su primera y sexta posición contienen cisteínas que forman un puente disulfuro y promueven la formación de una estructura cíclica característica (Fig. 4). La mayoría de los péptidos relacionados con oxitocina y vasopresina (OT/VP) descritos hasta el momento comparten estas propiedades (Muratspahić et al., 2020; Odekunle y Elphick, 2020).

Los péptidos relacionados con OT/VP y sus receptores se originaron en algún ancestro común de los animales bilaterales. En los vertebrados, la combinación de duplicaciones del genoma o de genes particulares, así como la pérdida de algunos genes, dio lugar a una gran variedad de péptidos y receptores en distintos linajes, muchas veces con correspondencia distinta a uno, como es el caso del péptido AVP y sus tres receptores. En cambio, en los invertebrados protostomados se suelen encontrar solamente un binomio de péptido y receptor (Stafflinger et al., 2008; Odekunle y Elphick, 2020). Se considera que los péptidos relacionados con OT/VP y sus receptores se encuentran altamente conservados y existen reportes de su presencia en invertebrados deuterostomados, anélidos, moluscos, tardígrados, nemátodos, y artrópodos como miriápodos, crustáceos e insectos (Odekunle y Elphick, 2020).

En los insectos, el péptido relacionado con OT/VP se conoce como inotocina (Fig. 4) (Muratspahić et al., 2020). El estudio de este sistema en los insectos es reciente. Los primeros estudios de este sistema, a finales del siglo XX, se basaron en inmunotinciones usando anticuerpos contra oxitocina y vasopresina. Se trata de un sistema poco estudiado en insectos y es probable que esto se deba a la ausencia de inotocina en los principales sistemas modelo de insectos, tales como *Drosophila melanogaster* y *Apis mellifera* (Muratspahić et al., 2020; Odekunle y Elphick, 2020). Se ha propuesto que en los varios casos de insectos que perdieron estos sistemas de señalización OT/VP, otros sistemas de comunicación peptidérgica han suplido sus funciones. Algunos candidatos son las hormonas adipocinéticas, los péptidos cardioactivos de crustáceos y la corazonina, que están relacionados evolutivamente. Estos péptidos y la inotocina comparten algunas funciones fisiológicas y es posible que uno supla al otro en caso de la pérdida de alguno de los genes relacionados con el sistema ausente (Stafflinger et al., 2008). Se daba por hecho que los himenópteros carecían del sistema inotocinérgico por su ausencia en abejas, pero en años recientes se describió que están presentes en los genomas de una especie de avispas (Stafflinger et al., 2008) y de varias especies de hormigas (Gruber y Muttenthaler, 2012).

En las hormigas, se ha propuesto que los niveles de inotocina y su receptor están relacionados con la edad y con la división de labores. Se han explorado los niveles de expresión del transcrito del péptido y del receptor en distintas etapas del desarrollo, y se ha descrito la localización de los precursores y del péptido en obreras adultas (Liutkevičiūte et al., 2018; Koto et al., 2019; Fetter-Pruneda et al., 2021). Con respecto a su función, se ha encontrado que este péptido está implicado en el metabolismo de los hidrocarburos cuticulares (Koto et al., 2019), una capa de lípidos cerosa compuesta principalmente de alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos grasos de cadena larga e hidrocarburos de cadena larga (Holze et al., 2021); que además de prevenir la desecación de los organismos, son usados en el

reconocimiento de pares e intrusos, un proceso básico entre las conductas de los organismos sociales (Greene y Gordon, 2003; Guerrieri et al., 2009).

En experimentos en los que se ha reducido la expresión del gen de inotocina mediante RNA de interferencia se han notado cambios en varios procesos metabólicos de las hormigas, tales como el metabolismo de DNA, proteínas y de ácidos grasos. A su vez, se describe que la reducción de la inotocina por este método se relaciona con caminar por más tiempo y mayores distancias (Liutkevičiūtė et al., 2018). En contraste, se ha descrito que, posterior a la administración de inotocina las hormigas aumentan sus recorridos, pero solamente si éstas son hormigas viejas en presencia de larvas o si son hormigas jóvenes en presencia de pupas. Entonces, este cambio en el desplazamiento no es simplemente por una variación en el estado de locomoción, sino en respuesta al contexto social de la colonia (presencia de larvas o pupas) y a los requerimientos energéticos de la misma (Fetter-Pruneda et al., 2021).

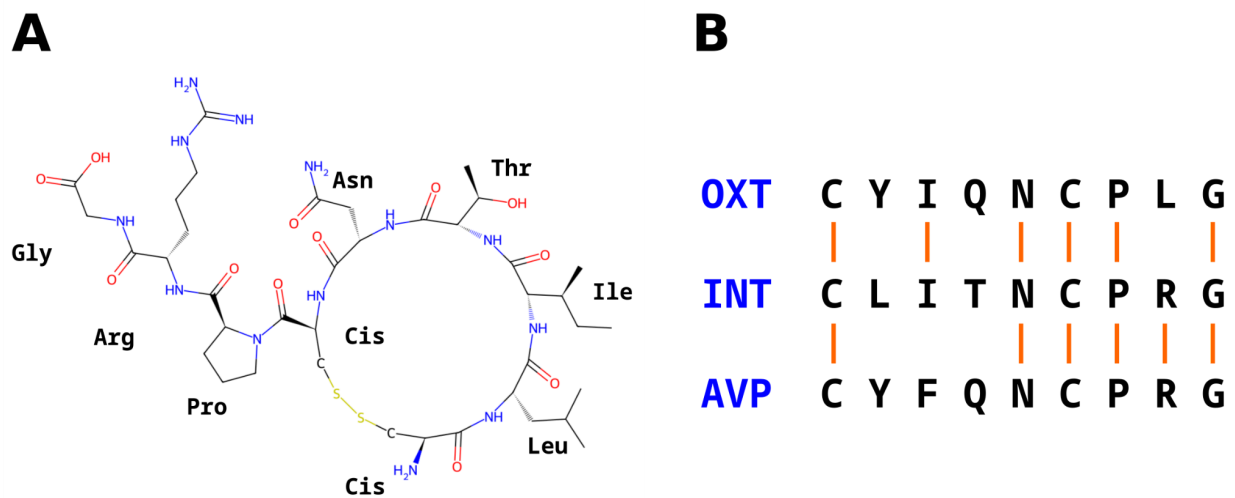


Fig. 4. Estructura del péptido Inotocina. A: Representación del péptido inotocina en 2D. B: Alineamiento de las secuencias de los péptidos oxitocina (OXT) y vasopresina (AVP) con inotocina (INT). En naranja se muestran los residuos homólogos.

Aminas Biogénicas

Las aminas biogénicas son otro sistema de neuromodulación relevante en el sistema nervioso. Éstas son moléculas generadas a partir del metabolismo de los aminoácidos y entre ellas destacan las monoaminas como las feniletilaminas, catecolaminas y las indolaminas. Las reacciones necesarias en su síntesis son mediadas por enzimas características (Trendelenburg y Weiner, 1989). Muchas especies de animales presentan estas sustancias en distintos tejidos, y su importancia radica en su función de mensajero químico en la comunicación celular. En los insectos, se ha descrito que pueden funcionar como neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas. Los compuestos más relevantes en estos animales son la dopamina (DA), serotonina (5HT), tiramina, octopamina (OA) e histamina (Fig. 5) (Monastirioti, 1999; Meissner et al., 2019). Estas moléculas están relacionadas estrechamente con la dominancia reproductiva, división de labores entre obreras, además de conductas de agresión, reconocimiento de compañeras, protección del nido y conductas relacionadas con la alimentación, como el caso del forrajeo (Vander Meer et al., 2008; Kamhi y Traniello, 2013; Kamhi et al., 2015; Shimoji et al., 2017; Friedman et al., 2018).

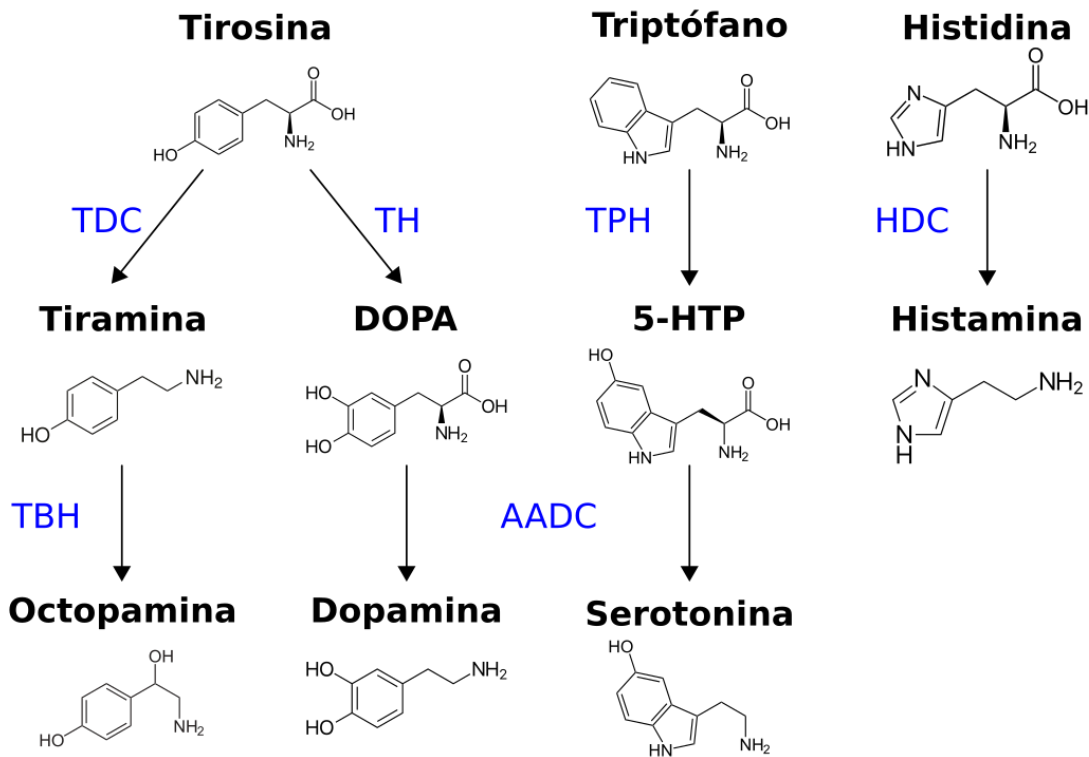


Fig. 5. Rutas biosintéticas de las aminas biogénicas. Enzimas: TDC, Tirosina Descarboxilasa; TBH, Tiramina Beta Hidroxilasa; TH, Tirosina Hidroxilasa; AADC, Aminoácido Aromático Descarboxilasa; TPH, Triptófano Hidroxilasa; HDC, Histidina Descarboxilasa (Modificado de Monastiriotti, 1999).

En el caso de las hormigas recolectoras de semillas *P. barbatus* se sabe que existe una relación entre los niveles de transcritos de enzimas relacionadas con la síntesis de DA (Tirosina Hidroxilasa, *TH*) y OA (Tiramina Beta Hidroxilasa, *TBH*) y la sensibilidad a la humedad así como la reducción de salidas a forrajear. Además, al administrar dopamina farmacológicamente, las hormigas tienden a incrementar sus salidas a forrajear, mientras que la administración de 3-yodotirosina (inhibidor de DA) reduce las salidas (Friedman et al., 2018). Se ha descrito también que en las hormigas *Pheidole dentata* existe una correlación positiva de los niveles endógenos de DA en cerebros de hormigas con respecto a la edad. En el caso de OA, no se reportan diferencias (Seid y Traniello, 2005).

Planteamiento del problema

Se ha demostrado que las diversas conductas de las hormigas están estrechamente relacionadas con la modulación de distintos sistemas de comunicación del tejido nervioso. Este proceso es mediado por neuromoduladores peptidérgicos, como la inotocina, y aminérgicos, como la dopamina y la octopamina. Sin embargo, se desconoce la distribución de las neuronas que producen y almacenan estas tres moléculas en el tejido nervioso de las hormigas *Pogonomyrmex barbatus*. En el caso de las dos aminos biogénicas, se desconoce la localización de dichas neuronas en hormigas en general. Por último, se ignora si existen cambios en la distribución de estos neuromoduladores o transcritos de proteínas relacionadas a su síntesis con respecto a la edad de las hormigas, relacionada a su vez con los cambios conductuales propios del polietismo temporal.

Preguntas de investigación

- ¿Dónde se localizan las neuronas que producen y almacenan los neuromoduladores inotocina, dopamina y octopamina?
- ¿Existen diferencias en la distribución y cantidades relativas de neuromoduladores (inotocina, transcritos de enzimas de síntesis de dopamina (*TH*) y octopamina (*TBH*)) en el cerebro de las hormigas *Pogonomyrmex barbatus* entre adultas jóvenes, que presentan una mayor propensidad a realizar conductas intranidal y adultas viejas, que tienden a llevar a cabo conductas extranidales?

Hipótesis

Los neuromoduladores inotocina, dopamina, y octopamina se localizan en neuronas específicas de las zonas supra y sub esofágicas, y sus cantidades relativas están correlacionadas con el polietismo temporal, en específico al cambio conductual de tareas intranidales a extranidales de la hormiga roja recolectora de semillas *Pogonomyrmex barbatus*.

Objetivos

General

Localizar los cuerpos neuronales que producen y almacenan los neuromoduladores Inotocina, Dopamina y Octopamina en la hormiga *Pogonomyrmex barbatus*, y comparar la distribución y cantidades relativas de los neuromoduladores en el tejido nervioso de las hormigas *Pogonomyrmex barbatus* entre adultas jóvenes y adultas viejas.

Específicos

1. Identificar neuronas peptidérgicas (inotocina) y aminérgicas (dopamina y octopamina) en el cerebro de la hormiga *Pogonomyrmex barbatus* mediante la detección del péptido por inmunofluorescencia y los transcritos de las enzimas de síntesis aminérgicas por Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH).
2. Cuantificar y comparar intensidad de fluorescencia de inotocina y de transcritos (mRNA) de las enzimas de síntesis de Dopamina (*TH*) y Octopamina (*TBH*), en el tejido nervioso de la hormiga, entre obreras adultas jóvenes y viejas.

Metodología

Mantenimiento y cuidado de hormigas

Para los experimentos de inotocina se mantuvieron colonias de *Pogonomyrmex barbatus* de seis meses desde su captura después del vuelo nupcial a temperatura constante de 27 °C (± 1 °C), de las cuales se seleccionaron nueve de manera aleatoria. Las colonias se alimentaron con semillas de chía y alpiste.

Para los experimentos de aminos biogénicos, se utilizaron dos colonias de *Pogonomyrmex barbatus* mantenidas a temperatura constante de 27 °C (± 1 °C). Las colonias se alimentaron con semillas de chía, girasol, alpiste, polen de abeja e insectos liofilizados molidos. La edad aproximada de ambas colonias es de 2 años.

El cambio de dieta se realizó debido a sugerencias de expertos en cuidado de hormigas y no influye en los experimentos, pues los experimentos de inotocina y los de aminos biogénicos son independientes.

Selección de hormigas

En el caso de los experimentos de inotocina, se seleccionaron 30 hormigas *P. barbatus*. Las hormigas eran de 9 colonias distintas y se escogieron 8 hormigas adultas jóvenes, 9 viejas, 9 reinas y 4 pupas. El parámetro de discriminación entre adultas jóvenes y viejas consistió en el color de la cutícula, siendo las jóvenes las de menor pigmentación (Fig. 1).

En cuanto al experimento de aminos biogénicos, se seleccionaron 8 hormigas *Pogonomyrmex barbatus* por grupo de la siguiente manera: jóvenes colonia A, jóvenes colonia B, viejas colonia A y viejas colonia B (Total Jóvenes = 16, Total Viejas = 16, Total A = 16, Total B = 16, Total Hormigas = 32). Se definieron las hormigas jóvenes como aquellas que tenían una pigmentación clara, además de estar cerca de la progenie en el nido, mientras que las hormigas viejas fueron aquellas que estaban fuera del nido cerca de los depósitos de semillas.

Inmunofluorescencia contra inotocina

Se anestesiaron a las hormigas con hielo (4 °C) por 30 s, posteriormente se sumergieron en etanol helado (4 °C) para retirar los hidrocarburos cuticulares por 90 s. Después, se colocaron en una solución de PBS (phosphate-buffered saline 1X) fría (4 °C) y se extrajeron los cerebros de los animales. Se les retiraron las tráqueas y otros tejidos distintos al de interés y de manera inmediata, los tejidos extraídos se sumergieron en paraformaldehído al 4% en PBS frío (4 °C) (PFA) y se fijaron por la noche. Todos los tejidos fueron procesados de manera simultánea. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS 1X a temperatura ambiente (25 °C). Se lavó y se permeabilizó el tejido en PBS + Tritón X100 (PBT) 0.5% tres veces por 20 min. Posteriormente, se bloqueó en PBT + Albúmina Sérica Bovina (BSA) 1% por 30 min a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con PBS 1X + Tween 20 al 0.01% por 5 min y se procedió a incubar en el anticuerpo primario (anti Arginina Vasopresina (AVP) policlonal 1:10k) (proporcionado amablemente por el Dr. Rudolf Buijs; Buijs et al., 1989) en solución de PBT + BSA 1% por la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados en PBS + Tween 20 al 0.01% de 10 min cada uno a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo secundario (burro anti-conejo IgG) marcado con Alexa Fluor 488 (1:500) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.; Ref. A21206; Lot. 2376850) en PBT por dos horas junto con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich, Israel; Ref. D9542-1MG; Lot. 098M4004V) (1:1000) + Faloidina-Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.; Ref. A22287; Lot. 2575967) (1:400), y a partir de este paso se cubrió de la luz. A continuación, se realizaron cinco lavados de 10 min cada uno con PBS 1X. Se estabilizó en medio de montaje VectaShield Plus (Vector Laboratories, EE. UU.; Ref. H-1900; Lot. Z J0401) por la noche a 4 °C. Por último, se montó en el mismo medio y se observó al microscopio.

Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) contra TH y TBH

Se usó el protocolo de hibridación *in situ* fluorescente (Fluorescent *In Situ* Hybridization, FISH) de RNA basado en la Reacción en Cadena de Hibridación (*Hybridization Chain Reaction*, HCR RNA-FISH, Molecular Instruments) (Choi et al., 2014; Meissner et al., 2019; Fetter-Pruneda et al., 2021). El protocolo se llevó a cabo en un ambiente libre de RNAsas (soluciones, herramientas) para mantener la integridad de los transcritos. Se realizaron las disecciones en PBS a 4 °C y se fijaron inmediatamente en PFA a 4 °C por al menos dos horas. Todos los tejidos fueron procesados de manera simultánea. Después se realizaron lavados en PBT 0.05% 5 iteraciones de 10 min cada una. Más adelante se deshidrató en series de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%, 100%) 10 min por paso y se dejó por la noche en etanol al 100% a 4 °C. Al día siguiente se rehidrató en serie inversa (90%, 70%, 50%, 30%) 10 min cada paso. Posteriormente, se incubó en ácido acético fresco al 5% por 5 min a 4 °C. Se hicieron cinco lavados de 10 min con PBT 0.05% y se realizaron tres lavados de diez min en borohidruro de sodio (NaBH₄) a 4 °C. Después se lavó cinco veces por 5 min cada iteración en PBS a 4 °C. Inmediatamente se incubó en solución amortiguadora pre-hibridación (*pre-hybr HCR Probe Hybridization buffer*, Molecular Instruments, EE. UU.; Lot. BPH02923) a 45 °C por 30 min, y se preparó la solución de las sondas para *TH* y *TBH* (HCR Probe Set, Organism: *P. barbatus*, Target: *TH*, Amplifier: B1, Molecular Instruments, EE. UU.; Lot. PRL287. Target: *TBH*, Amplifier: B2; Lot. PRL288) (1:500 en amortiguador de hibridación, HCR Probe Hybridization buffer). Posteriormente, se agregó dicha solución a los tejidos y se incubó por la noche a 45 °C. Los siguientes pasos se hicieron a 45 °C. Se lavó en solución amortiguadora de lavado (WB; HCR Probe Wash Buffer, Molecular Instruments, EEUU; Lot. BPW03123) al 100% por 10 min, acto seguido se lavó por 15 min en series de WB con solución salina de citrato de sodio 5x (SSC) + Tritón X100 0.06% (SSCT) en concentraciones de 75% WB/25% SSCT, 50% WB/50% SSCT, 25% WB/75% SSCT. Más adelante se hicieron dos lavados en SSCT 100%, el primero por 15 min y el segundo por 30 min. A partir de este paso, el protocolo se siguió a temperatura

ambiente. Se preparó la solución de las horquillas (HCR Amplifier B1-h1 + Alexa Fluor 546, Molecular Instruments, EE UU; Lot. S038923. B1-h2 + Alexa Fluor 546, Lot. S038723. B2-h1 + Alexa Fluor 647, Lot. S039723. B2-h2 + Alexa Fluor 647, Lot. S039423) por el método de *snap-cooling* (calentar a 95 °C por 90 s y templar por 30 min en un cajón a temperatura ambiente). Se agregaron las horquillas templadas en solución amortiguadora de amplificación (1:50; HCR Amplification Buffer, Molecular Instruments, EE. UU.; Lot. BAM02723), se agregó la solución de las horquillas al tejido y se incubó por la noche cubierto de la luz a temperatura ambiente. Al día siguiente se hicieron cinco lavados de 10 min cada uno en SSCT y se transfirió a medio de montaje SlowFade Diamond (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.; Ref. S36963; Lot. 2199092) donde se mantuvo por la noche a 4 °C. El último día se montaron los tejidos en el mismo medio para su observación en el microscopio.

Microscopía Confocal

Se tomaron imágenes en el microscopio confocal de barrido láser Nikon A1R+ STORM, con el programa NIS Elements AR (v5.0). Todas las imágenes correspondientes a cada uno de los experimentos fueron tomadas en condiciones idénticas. Para la captura de las imágenes se usaron los objetivos 20X (Nikon Plan Apo Lambda, NA = 0.75) o 40X (Nikon CFI Plan Fluor inmersión en aceite, NA = 1.3). Se usaron láseres de estado sólido (*solid state*) a 405, 488, 561, y 647 nm para excitar DAPI, y Alexa Fluor 488, 546 y 647. La emisión fue detectada con filtros pasa bandas de 425-475, 500-550, 570-620 y 663-738, respectivamente.

Para las imágenes capturadas con el objetivo de 20X, se capturó a una profundidad de ~70 μm y los pasos en Z para estas imágenes son de 1.1 μm . Además, se usaron los canales con los parámetros descritos a continuación. Para el primer canal, la longitud de onda de excitación del láser fue de 405 nm, con una potencia de 6.2 μW , desviación (*offset*) de -5 y ganancia de 95. Para el segundo canal, la longitud de onda de excitación del láser fue 488 de nm, con una potencia de 0.7 μW , desviación (*offset*) de -65 y ganancia de 65. Por último, para el

tercer canal, la longitud de onda de excitación del láser fue 647 nm, con una potencia de 62.1 u, desviación (*offset*) de 10 y ganancia de 105.

En el caso de las imágenes a 40X, se tomó únicamente la región de la zona subesofágica (SEZ), con una profundidad de ~100 μm , con un paso en Z de 0.2 μm . En dicho caso, se capturó solamente el canal con longitud de onda de excitación del láser de 488 nm, con una potencia de 0.8 u, desviación (*offset*) de 25 u y ganancia de 40 u.

En cuanto al experimento de aminos biogénicas, se tomaron imágenes con el objetivo de 20X. Para la cara anterior, se tomaron imágenes a una profundidad de 150 μm mientras que la de la cara posterior fue de 100 μm , ambos casos con un paso de 1.1 μm . La longitud de onda de excitación del láser usado para el primer canal fue de 561 nm, con una potencia de 3.0 u, desviación (*offset*) de -30 u y ganancia de 63 u. En el caso del segundo canal se usó el láser con longitud de onda de excitación de 647 nm, potencia de 22.0 u, desviación (*offset*) de 8 u y ganancia de 113 u.

Análisis de Imágenes

Se usó el programa FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*) para la observación, la generación de figuras y el análisis de imágenes. Para todas las imágenes, se usaron filtros de eliminación de manchas (*Despeckle*) y de Difuminación Gaussiana en 3D (*Gaussian Blur 3D*) para generar las máscaras previo a la identificación de los cuerpos de interés. Se usó el plugin *3D Objects Counter* para segmentar los cuerpos de interés por umbralización y medir la Densidad Integrada (*Integrated Density*) de éstos, que corresponde a la intensidad de la fluorescencia.

En los casos de los experimentos de inotocina, donde se capturaron las imágenes a profundidades distintas, se escogieron el mismo número de rebanadas ópticas para las figuras o para la cuantificación de fluorescencia. En el caso de las imágenes capturadas con el objetivo 20x se tomaron 50 u, mientras que para las imágenes tomadas con el objetivo de 40x se tomaron 225 u.

Para las figuras, se realizaron ajustes de brillo y contraste, se usaron filtros de eliminación de manchas y sustracción de fondo, además de proyecciones de máxima intensidad en varios ejes. Todas las imágenes se procesaron usando exactamente los mismos parámetros de ajuste.

Análisis estadístico

En cuanto al análisis estadístico y generación de gráficos, se usó el Software GraphPad Prism 9. Se usó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, y se usaron las pruebas de muestras independientes t de Student y U de Mann-Whitney según el caso.

Captura de imágenes de especímenes

Se colectaron tres hormigas *P. barbatus* (reina; obreras adultas, una joven y una vieja), se mantuvieron en etanol al 70%. Se montaron en una pestaña de papel y posteriormente se capturaron las imágenes con una cámara digital Canon 1300D, un objetivo Amscope 4X Plan Achromatic (modelo PA4XK-V300), sobre un riel micrométrico. Para la captura de los especímenes y edición de imágenes se usaron los programas Zerene Stacker, Lightroom, Photoshop, GIMP y FIJI.

Resultados

Distribución Anatómica de neuromoduladores

Localización de Células Inotocinérgicas

Con el objetivo de localizar a las células que producen inotocina así como la distribución del neuropéptido en el cerebro de la hormiga, realizamos experimentos de inmunofluorescencia (Fig. 6). En concordancia con trabajos previos (Liutkevičiūtė et al., 2018; Koto et al., 2019; Fetter-Pruneda et al., 2021), en el tejido de obreras jóvenes (Fig. 6B), obreras viejas (Fig. 6C) y reinas (Fig. 6D) encontramos dos somas correspondientes a las neuronas inotocinérgicas en la región extrema ventral medial de la SEZ, con simetría respecto a la línea media.

En los dos tercios superiores de la SEZ, observamos una serie de puntos, también distribuidos simétricamente con respecto al eje Y, que corresponden a las neuritas de las células inotocinérgicas, que se disponen en forma de cuentas, característico de las varicosidades presentes en los sistemas nerviosos de invertebrados (Giachello et al., 2012). Adicionalmente, notamos que el péptido está distribuido de manera dispersa en forma de puntos muy pequeños en el cerebro (tanto en la SEZ como en la SPZ) de la hormiga *P. barbatus* en pupas, obreras jóvenes, obreras viejas y reinas (Fig. 6). Es necesario enfatizar que, previo a este trabajo, desconocíamos la distribución del péptido en el caso de la reina (Fig. 6D) y las pupas (Fig. 6A). En este último caso, los cuerpos neuronales positivos a inotocina no son distinguibles. Sin embargo, observamos puntos de marca en todo el cerebro. Se requiere explorar más al respecto de la función de estas células y del péptido durante la metamorfosis.

Con base en los resultados que obtuvimos, podemos concluir que en la SEZ de las hormigas *P. barbatus* existen dos neuronas que producen inotocina tanto en obreras jóvenes y viejas, así como en reinas. Las proyecciones de estas células se distribuyen principalmente en la SEZ. En el caso de las pupas, los cuerpos neuronales positivos a inotocina no se alcanzan a detectar, lo cual podría sugerir que existe variabilidad en la expresión y posiblemente en la liberación de dicho neuropéptido durante el desarrollo.

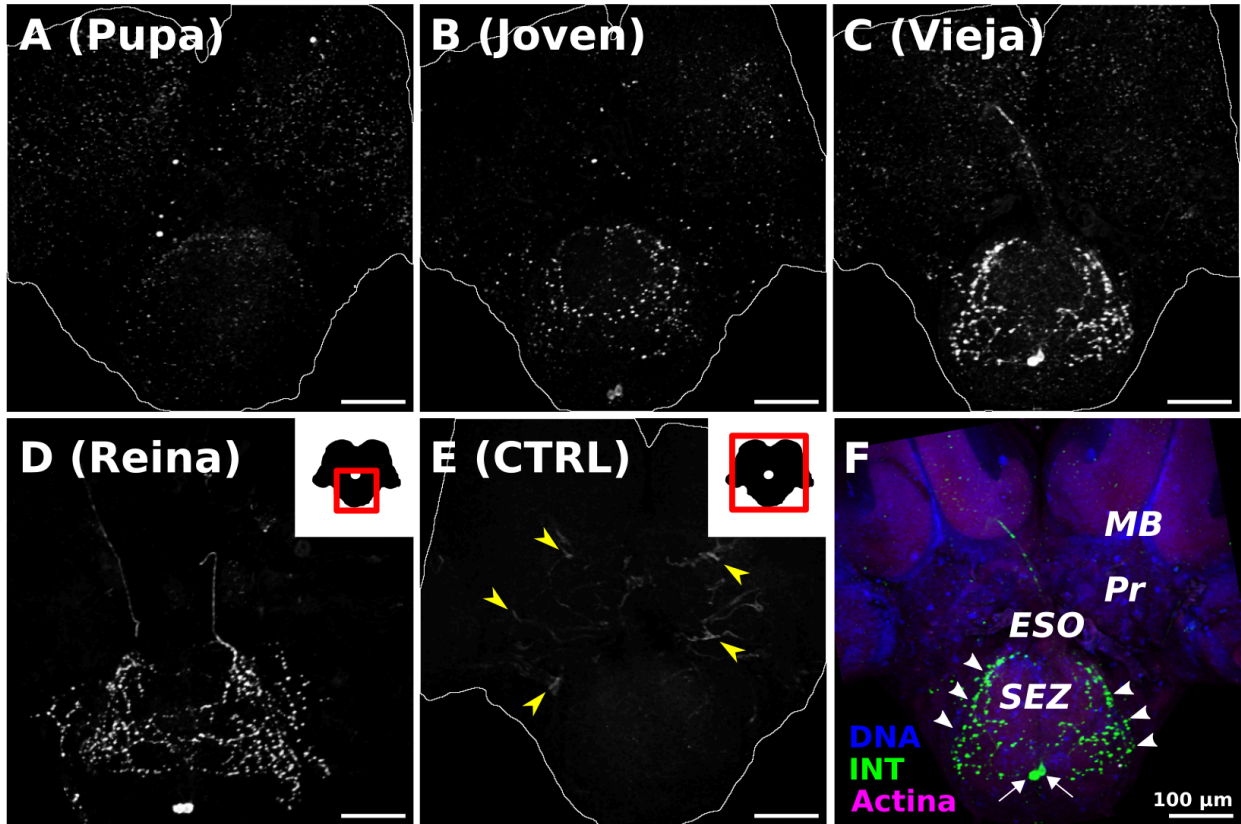


Fig. 6. Neuronas inotocinérgicas en el cerebro de distintas etapas del desarrollo y castas de la hormiga *Pogonomyrmex barbatus*, vista posterior. Inmunofluorescencia contra inotocina en tejido nervioso. Cada panel muestra una proyección de máxima intensidad de imágenes apiladas (stack) de microscopía confocal, con objetivo de 20x, 60 secciones ópticas. A: Cerebro de pupa. Se muestra en el tejido marca en forma de puntos distribuidos de manera dispersa, los somas no son distinguibles. B: Cerebros de Obreras Adultas Jóvenes. C: Cerebros de Obreras Adultas Viejas. D: Cerebro de Reinas. Además de la distribución dispersa vista en A, se pueden notar dos cuerpos de mayor tamaño en la parte inferior del SEZ correspondientes a los somas de las neuronas inotocinérgicas. En la parte superior de la SEZ se notan una serie de puntos distribuidos de manera simétrica con respecto al eje Y, de mayor tamaño que en los neuropilos de la SPZ, correspondientes a las varicosidades de las proyecciones de las neuronas inotocinérgicas. En D y E, el esquema muestra la región del tejido capturada (el cerebro de las hormigas reina es de mayor tamaño). E: Control. El tejido no recibió anticuerpo primario. Las cabezas de flecha amarillas muestran tejido con autofluorescencia correspondiente a tráqueas. F: Mismo tejido que C mostrando contratinación usando DAPI (DNA, Azul) y Faloidina (Actina, Magenta), en verde se muestra Inotocina (INT). Las flechas marcan los somas de las neuronas inotocinérgicas. Las puntas de flecha corresponden a las neuritas. Las barras de escala corresponden a 100 µm. Abreviaturas: MB, *Mushroom Bodies*, Cuerpos Fungiformes; Pr, Protocerebro; SEZ, *Subesophageal Zone*, Zona Sub Esofágica; SPZ, *Supraesophageal Zone*, Zona Supra Esofágica.

Localización de Células Aminérgicas

Para identificar las neuronas productoras de dopamina y octopamina, marcamos los transcritos de las enzimas de síntesis de estas aminas biogénicas (Tirosina Hidroxilasa, *TH*; Tiramina Beta Hidroxilasa, *TBH*; respectivamente). El experimento de FISH para transcritos de *TH* en tejido nervioso del cerebro de las hormigas muestra que los somas de las neuronas dopaminérgicas se encuentran distribuidos en conjuntos en dos principales neuropilos: el protocerebro y la SEZ (Fig. 7). La nomenclatura usada en este trabajo describe a los conjuntos de acuerdo con su posición anatómica en los distintos neuropilos de los principales ganglios del sistema nervioso, tal como se usa en otros insectos como *Drosophila melanogaster*, *Periplaneta americana* y *Apis mellifera* (Sinakevitch et al., 2005; Sinakevitch y Strausfeld, 2006; Mao y Davis, 2009; White et al., 2010; Tedjakumala et al., 2017).

De acuerdo con lo anterior, se observaron seis conjuntos de neuronas en el protocerebro, de los cuales corresponden a dos anteriores (PAM, Protocerebral Anterior Medial; PAL, Protocerebral Anterior Lateral) (Fig. 7 A y B) y cuatro posteriores (PPM 1 y 2, Protocerebral Posterior Medial; PPL 1 y 2, Protocerebral Posterior Lateral) (Fig. 7 C y D). El conjunto PAL consta de un par de somas, mientras que PAM se compone de algunas decenas. En la SEZ (Fig. 7 C y D), se observan somas de mayor tamaño que las protocerebrales. Su distribución es principalmente en dos regiones: sobre la línea media de la SEZ se pueden distinguir las Neuronas Ventrales no apareadas Mediales (*Ventral Unpaired Medial Neurons*, VUM), y las Ventrales Apareadas Mediales (*Ventral Paired Medial Neurons*, VPM) y en la región periesofágica que está en los extremos laterales de la SEZ se encuentran las Neuronas Ventrales Laterales (*Ventral Lateral Neurons*, VL). Se pueden observar alrededor de 4 somas correspondientes a las VUM y cerca de 14 somas por lado pertenecientes al grupo de VL.

El presente trabajo representa un avance importante en el estudio de la distribución anatómica de las neuronas dopaminérgicas en hormigas, pues existen pocos reportes sobre

este tema (Hoyer et al., 2005). En otros trabajos en insectos (Mao y Davis, 2009; Tedjakumala et al., 2017; White et al., 2010), el uso de organismos que expresan proteínas fluorescentes en conjunto con inmunofluorescencia hace notar que hay cuerpos en los que no existe colocalización, lo cual es muestra del nivel de la especificidad de estas técnicas en marcar a las neuronas dopaminérgicas. El sistema de FISH-HCR usado en el presente trabajo muestra una especificidad mayor y más confiable por los principios de ésta, lo que permite cuantificar fielmente la abundancia de los transcritos de interés (Meissner et al., 2019).

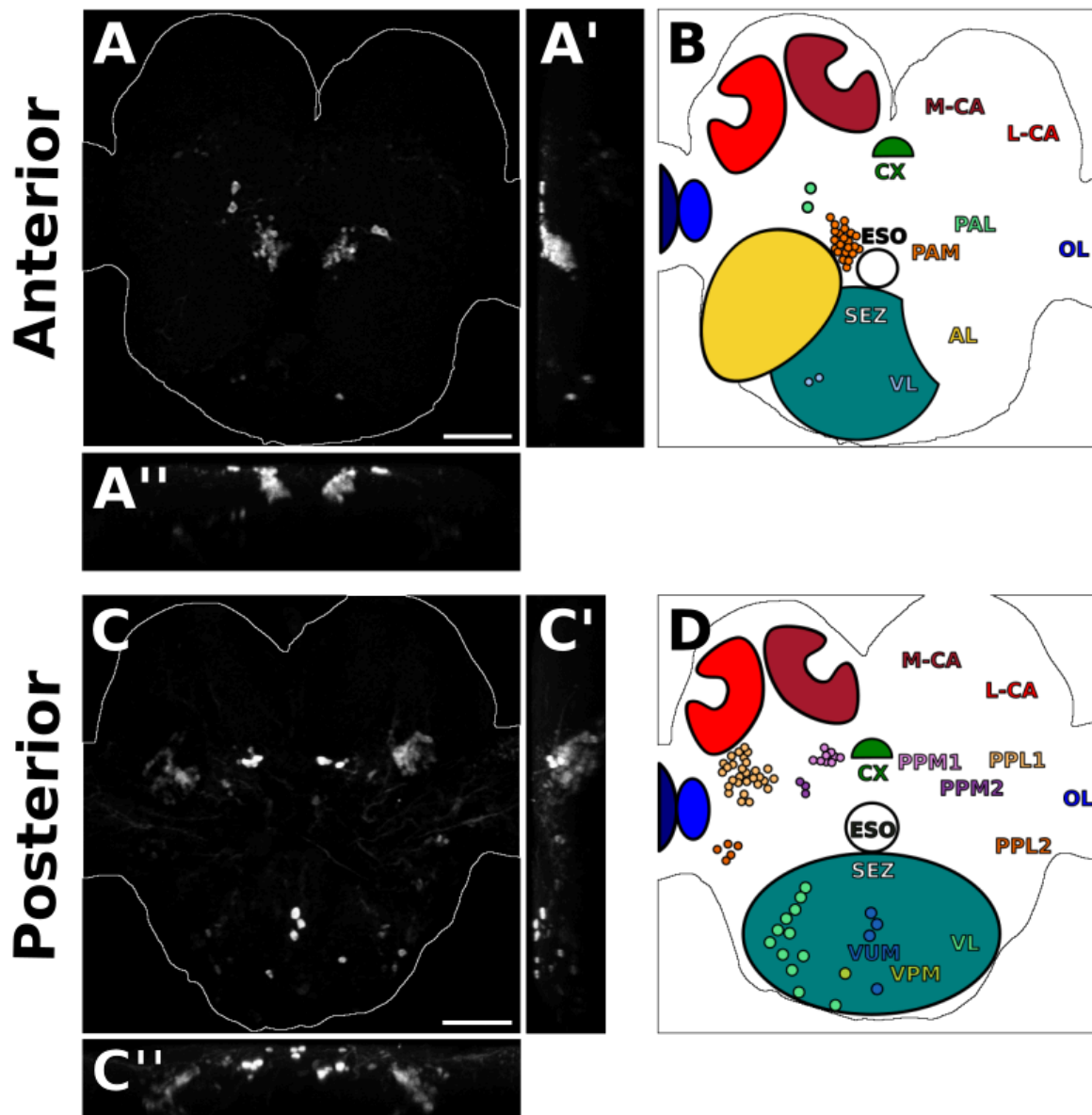


Fig. 7. Neuronas dopaminérgicas en el cerebro de la hormiga *Pogonomyrmex barbatus*. Distribución de transcritos de *TH* en tejido nervioso (Hibridación *In Situ* Fluorescente, FISH), vista anterior (A, B) y posterior (C, D). A y C proyección de máxima intensidad de imágenes apiladas (stack) de microscopía confocal, objetivo de 20x en el eje Z, A' y C' en el eje Y, A'' y C'' en el eje X. Se pueden observar somas distribuidos principalmente en la cara anterior (A) en el protocerebro, en su región medial y lateral. En la posterior (C), el protocerebro, por debajo de los MBs y en la SEZ, en la parte medial y lateral. B y D muestran los esquemas de la localización de los conjuntos de neuronas positivas a transcritos de *TH* (dopaminérgicas). En A la distancia total capturada fue de 150 μm mientras que en C fue de 100 μm . Las barras de escala corresponden a 100 μm . Abreviaturas: M-CA, Cáliz medial de los cuerpos fungiformes, *Medial Calix*; L-CA, Cáliz lateral de los cuerpos fungiformes, *Lateral Calix*; OL, Lóbulos ópticos, *Optic Lobes*; PAL, Conjunto Protocerebral Anterior Lateral; PAM, Conjunto Protocerebral Anterior Medial; AL, Lóbulos antenales, *Antennal Lobes*; ESO, Esófago; SEZ, Zona sub Esofágica, *Subesophageal Zone*; VUM, Neuronas Ventrales no apareadas mediales, *Ventral Unpaired Medial Neurons*; VPM, Neuronas Ventrales Apareadas Mediales, *Ventral Paired Medial Neurons*; VL, Neuronas Ventrales Laterales, *Ventral Lateral Neurons*; PPM1, Conjunto Protocerebral Posterior Medial 1; PPM 2, Conjunto Protocerebral Posterior Medial 2; PPL1, Conjunto Protocerebral Posterior Lateral 1; PPL2, Conjunto Protocerebral Posterior Lateral 2.

De manera similar a lo observado en las neuronas dopaminérgicas, el ensayo de FISH para transcritos de *TBH* en el cerebro de *Pogonomyrmex barbatus* muestra células octopaminérgicas distribuidas en el Pr y en la SEZ, con la adición de conjuntos celulares positivos en los lóbulos antenales (Fig. 8). Se destacan, por lo tanto, tres regiones con somas positivos a transcritos en la cara anterior (Fig. 8 A y B): G3 (Grupo 3, de acuerdo con la nomenclatura de Sinakevitch et al., 2005) en AL, dispuestas en la parte medial periesofágica de este neuropilo; en la SEZ encontramos las VPM y las VUM. Estas últimas se encuentran en la región más inferior de la SEZ. El número de somas del G3 es cercano a 7, el de las VPM es solamente de un par de cuerpos celulares, mientras que se pueden observar alrededor de 5 somas para las VUM. En la parte posterior (Fig. 8 C y D), se observan cerca de 10 somas por lado de los somas de las neuronas del protocerebro posterior medial (PPM). En el SEZ, podemos notar la existencia de cerca de 16 cuerpos distribuidos en la línea media, correspondientes a las VUM. Además, se pueden encontrar un par de neuronas por lado correspondientes a las VPM.

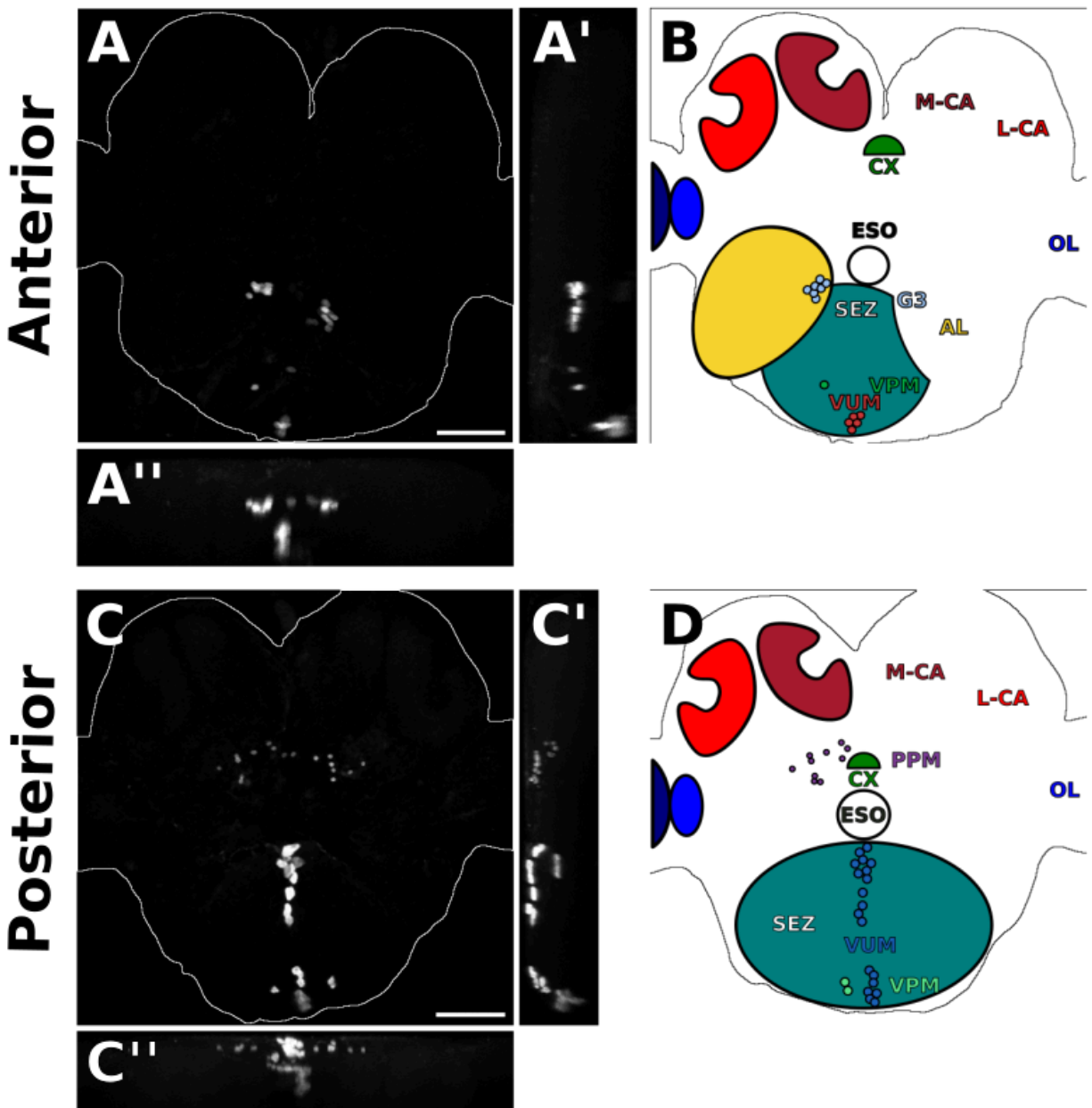


Fig. 8. Neuronas octopaminérgicas en el cerebro de la hormiga *Pogonomyrmex barbatus*. Distribución de transcritos de *TBH* en tejido nervioso (Hibridación In Situ Fluorescente, FISH), vista anterior (A, B) y posterior (C, D). A y C corresponden a proyecciones de máxima intensidad de imágenes apiladas (stack) de microscopía confocal, objetivo de 20x en el eje Z, A' y C' en el eje Y, A'' y C'' en el eje X. Se observa que en la porción anterior (A), los cuerpos se localizan en la región medial de los lóbulos antenales y en la zona subesofágica. En el caso de la posterior (C), los cuerpos se localizan principalmente en la zona medial del protocerebro, justo por debajo de los cuerpos fungiformes, y en la zona sub esofágica en la región medial. B y D muestran los

esquemas de la localización de los conjuntos de neuronas positivas a transcritos de TBH (octopaminérgicas). En A la distancia total capturada fue de 150 μm mientras que en C fue de 100 μm . Las barras de escala corresponden a 100 μm . Abreviaturas: M-CA, Cáliz medial de los cuerpos fungiformes, Medial Calix; L-CA, Cáliz lateral, Lateral Calix; OL, Lóbulos ópticos, Optic Lobes; PAM, Conjunto Protocerebral Anterior Medial; AL, Lóbulos antenales, Antennal Lobes; ESO, Esófago; SEZ, Zona sub Esofágica, Subesophageal Zone; VUM, Neuronas Ventrales no apareadas mediales, Ventral Unpaired Medial Neurons; VPM, Neuronas Apareadas Mediales, Ventral Paired Medial Neurons; G3, Neuronas del Grupo 3.

Los somas de las neuronas aminérgicas se distribuyen en el protocerebro y en la SEZ principalmente (Fig. 9). Algunas células aminérgicas se encuentran próximas entre sí, pero no existe colocalización entre ellas (Fig. 10). Con los datos obtenidos podemos afirmar que estas neuronas son exclusivamente dopaminérgicas u octopaminérgicas. Se debe explorar, en cambio, si existen neuronas multi-tipo con otras moléculas neuroactivas, como por ejemplo otras aminas biogénicas, aminoácidos, o neuropéptidos.

Notamos también que tanto la distribución de las neuronas dopaminérgicas como la de las octopaminérgicas de las hormigas tiene similitud con otros insectos (Sinakevitch et al., 2005; Sinakevitch y Strausfeld, 2006; Mao y Davis, 2009; White et al., 2010; Tedjakumala et al., 2017), distribuidas en el protocerebro por debajo de los MBs. De igual manera, encontramos somas de mayor tamaño en los neuropilos correspondientes a la SEZ. En el caso de las neuronas octopaminérgicas, también aparecen en los AL. Por ello, podemos asumir que la disposición anatómica de estas células podría estar altamente conservada entre los insectos.

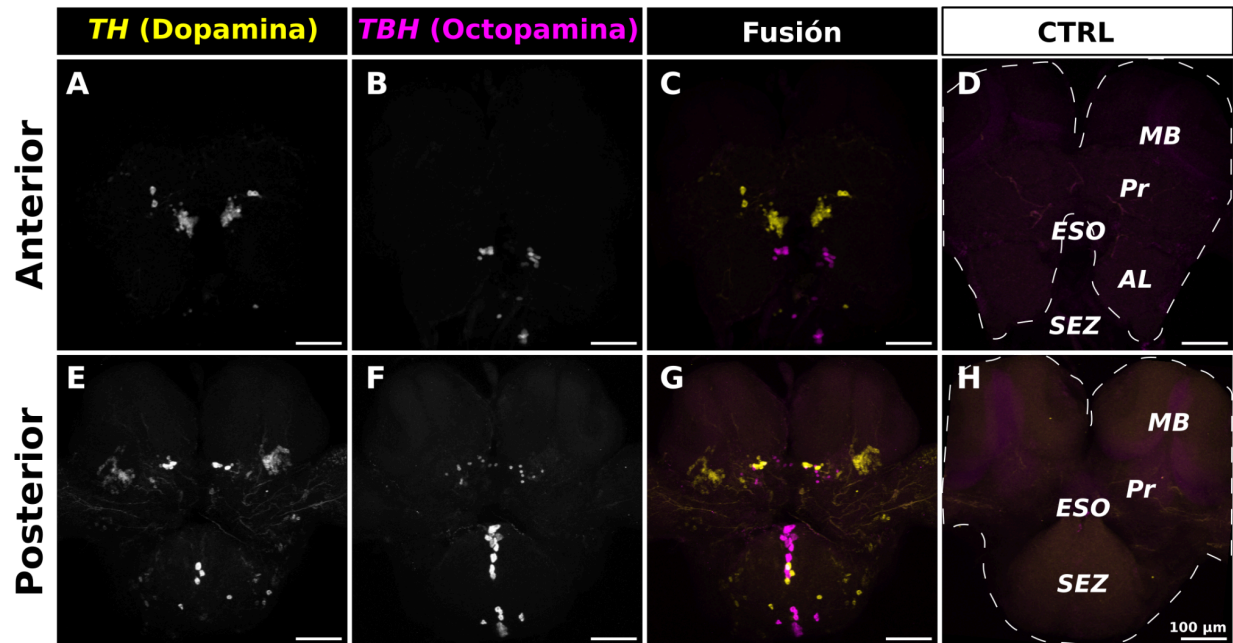


Fig. 9. Localización de neuronas aminérgicas (tanto Dopaminérgicas como Octopaminérgicas) en cerebros de *Pogonomyrmex barbatus* (FISH). Los somas de las neuronas aminérgicas marcadas se distribuyen principalmente en el protocerebro (por debajo de los cuerpos fungiformes) y en la zona sub esofágica. A-D muestran la cara anterior del cerebro, mientras que E-H la posterior. A y E corresponden a TH, B y F corresponden a TBH. C y G corresponden al empalme de las imágenes de A y B, F y G, respectivamente. En amarillo, TH y en magenta TBH. D y H muestran el Control, correspondiente a tejidos sin sonda de reconocimiento. Las barras de escala corresponden a 100 µm. Abreviaturas: MB, Cuerpos Fungiformes, *Mushroom Bodies*; AL, Lóbulos antenales, *Antennal Lobes*; ESO, Esófago; SEZ, Zona sub Esofágica, *Subesophageal Zone*.

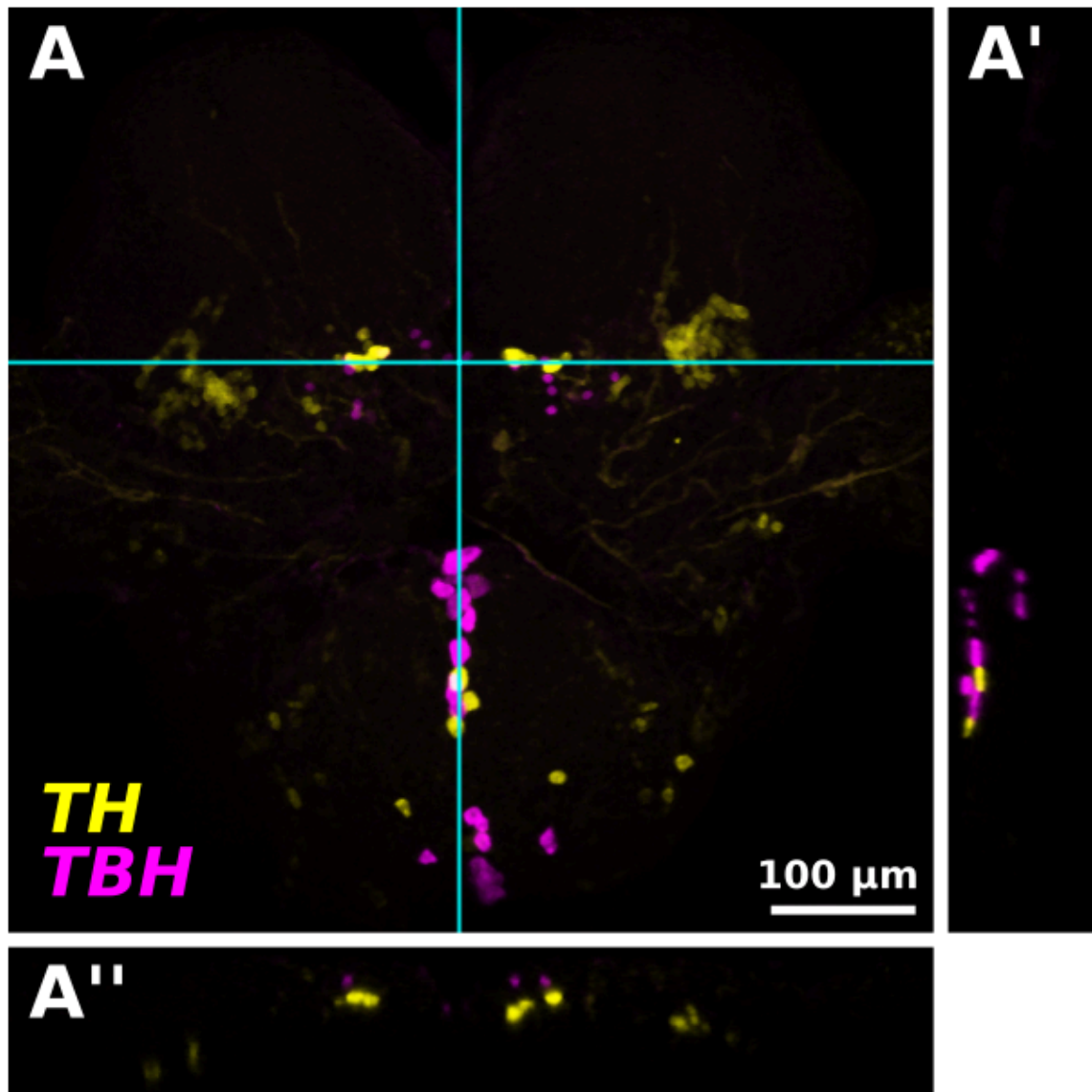


Fig. 10. En el cerebro de *Pogonomyrmex barbatus* no existen neuronas de tipo dopaminérgico-octopaminérgico (tipo dual). A: Proyecciones de máxima intensidad de imágenes apiladas (stack) de microscopía confocal, objetivo de 20x. No existe colocalización en los cuerpos de estos dos tipos neuronales. En amarillo, transcritos de *TH* y en magenta de *TBH*. A' y A'' representan las vistas ortogonales de los planos correspondientes a las líneas color cian de A. La distancia total capturada (Z) fue de 100 μm. La barra de escala corresponde a 100 μm.

Comparación de la Distribución de Neuromoduladores según la edad

Distribución de Inotocina en Obreras Jóvenes y Viejas

Para estudiar la neuromodulación relacionada con el polietismo temporal, comparamos imágenes de inmunofluorescencia contra inotocina del SEZ de obreras jóvenes contra obreras viejas (Fig. 11, A y B). Medimos la intensidad de fluorescencia en ambos grupos y encontramos que existen diferencias en los puntos correspondientes a las neuritas de las células (Fig. 11D). Además, hallamos que no existen diferencias en los somas (Fig. 11C), en contraste con trabajos anteriores (ver Fetter-Pruneda et al., 2021). Esto puede estar relacionado con el crecimiento en los compartimentos presinápticos relacionado con la edad, en donde además se reporta que existe un mayor número de vesículas sinápticas cargadas con moléculas neuroactivas. Proponemos que este crecimiento incrementa la eficacia de la comunicación sináptica en ciertas regiones (ver Seid et al., 2005).

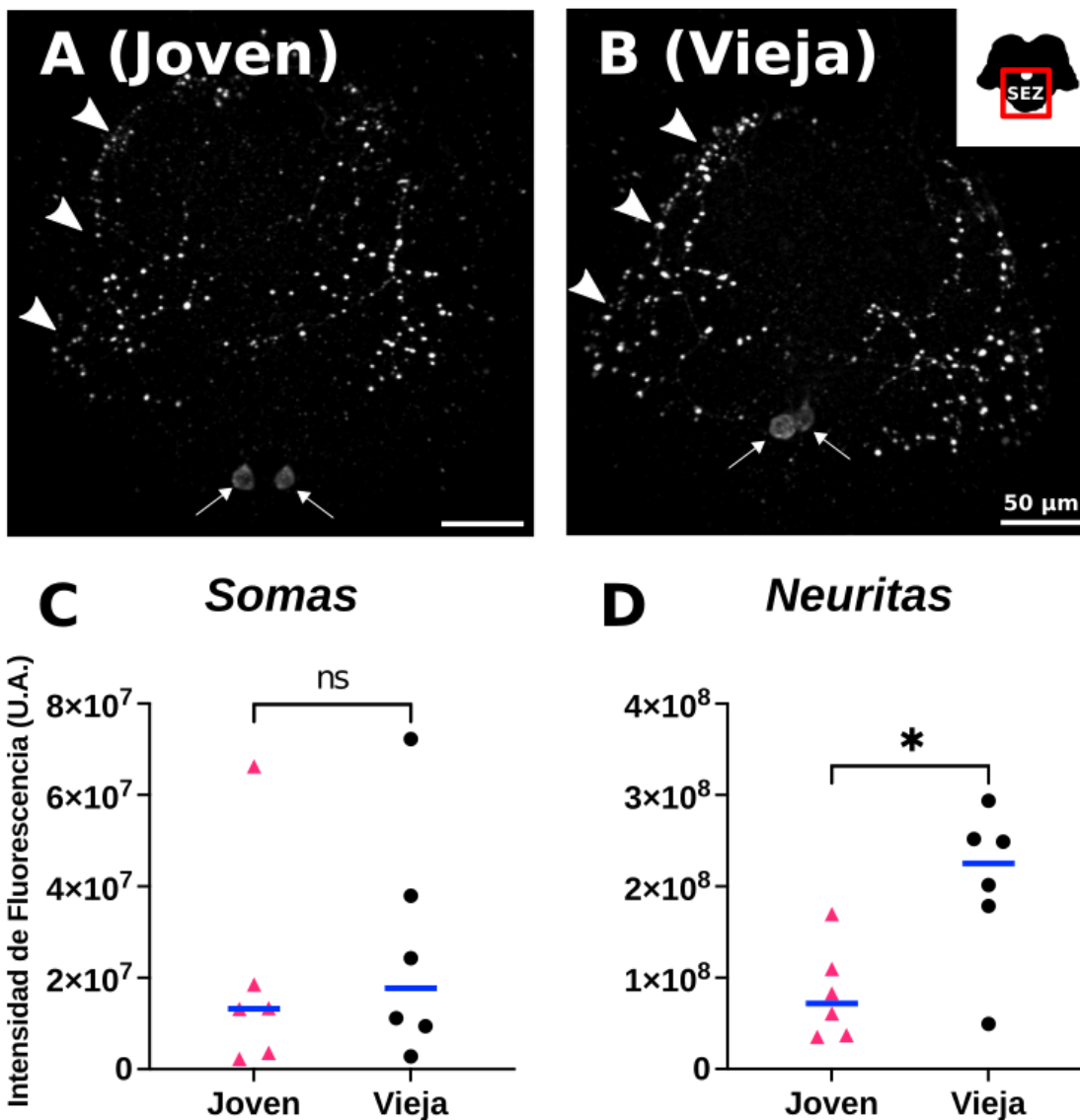


Fig. 11. La intensidad de inotocina en las neuritas es diferente con respecto a la edad, mientras que en los somas no hay cambios notables. Diferencia de intensidad de fluorescencia de neuronas inotocinérgicas con respecto a la edad. A y B: Neuronas Inotocinérgicas en la SEZ. Con énfasis en los somas (flechas) y los puntos positivos a neuropéptido correspondiente a las neuritas de estas células (puntas de flecha) en obreras jóvenes (A) y viejas (B). Inmunofluorescencia contra inotocina en tejido nervioso. Se muestra una proyección de máxima intensidad de imágenes apiladas (stack) de microscopía confocal usando un objetivo de 40x. En B el esquema anatómico representa la porción del tejido capturada. C: No existen diferencias en la cantidad de péptido presente en los somas de las neuronas inotocinérgicas (n = 6; Prueba U de Mann-Whitney, p = 0.699). D: Las neuritas de las células inotocinérgicas de las obreras viejas tienen mayor cantidad de inotocina. (n = 6; Prueba t de Student, *p = 0.014). Las barras azules corresponden a la mediana. Las barras de escala corresponden a 50 μ m.

Distribución de Aminas Biogénicas en Obreras Jóvenes y Viejas

Exploramos también si existen cambios en la distribución de las aminas biogénicas con la edad. Para ello, cuantificamos la intensidad de fluorescencia de los somas encontrados y comparamos entre los grupos de obreras jóvenes y viejas. Observamos que existe una reducción significativa en el número de transcritos de *TH* y *TBH* relacionada con la edad, en ambas caras del cerebro (Fig. 12). El cambio observado se puede relacionar con los cambios en la plasticidad neuronal necesarios en la transición conductual característica del polietismo temporal.

Nuestros experimentos muestran que las hormigas jóvenes, que predominantemente desempeñan tareas intranidales, tienen mayor cantidad de transcritos de enzimas de síntesis de aminas biogénicas. En el trabajo del grupo de Gordon (Friedman et al., 2018), que está enfocado en la variabilidad existente en la conducta de forrajeo con respecto a los niveles de humedad relativa ambiental, las colonias de hormigas que más reducen las salidas del nido muestran mayor expresión de genes relacionados con las enzimas presentes en las vías de síntesis de dopamina, tiramina y octopamina (Fenilalanina hidroxilasa y *TBH*). Podemos sugerir entonces que las aminas biogénicas influyen en la probabilidad individual de desempeñar tareas dentro o fuera del nido, y que una cantidad alta de mensajeros de sus enzimas biosintéticas se relaciona a una preferencia por las tareas intranidales.

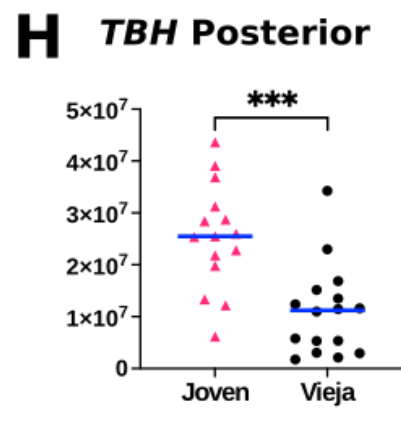
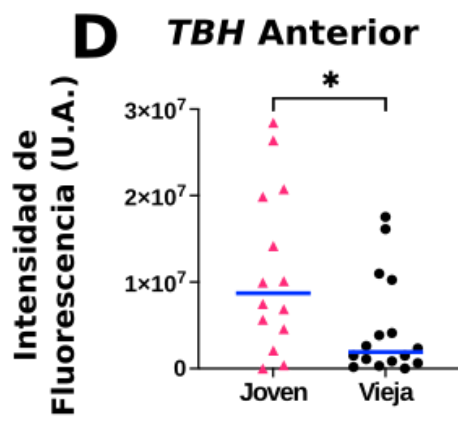
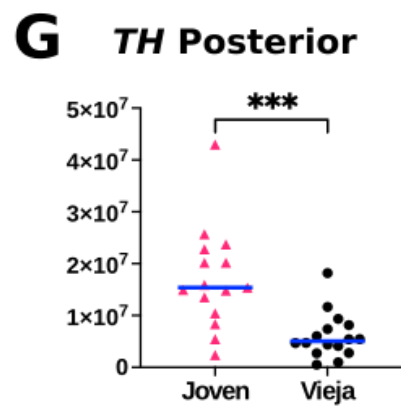
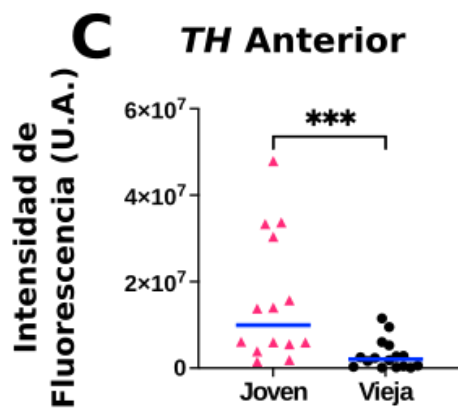
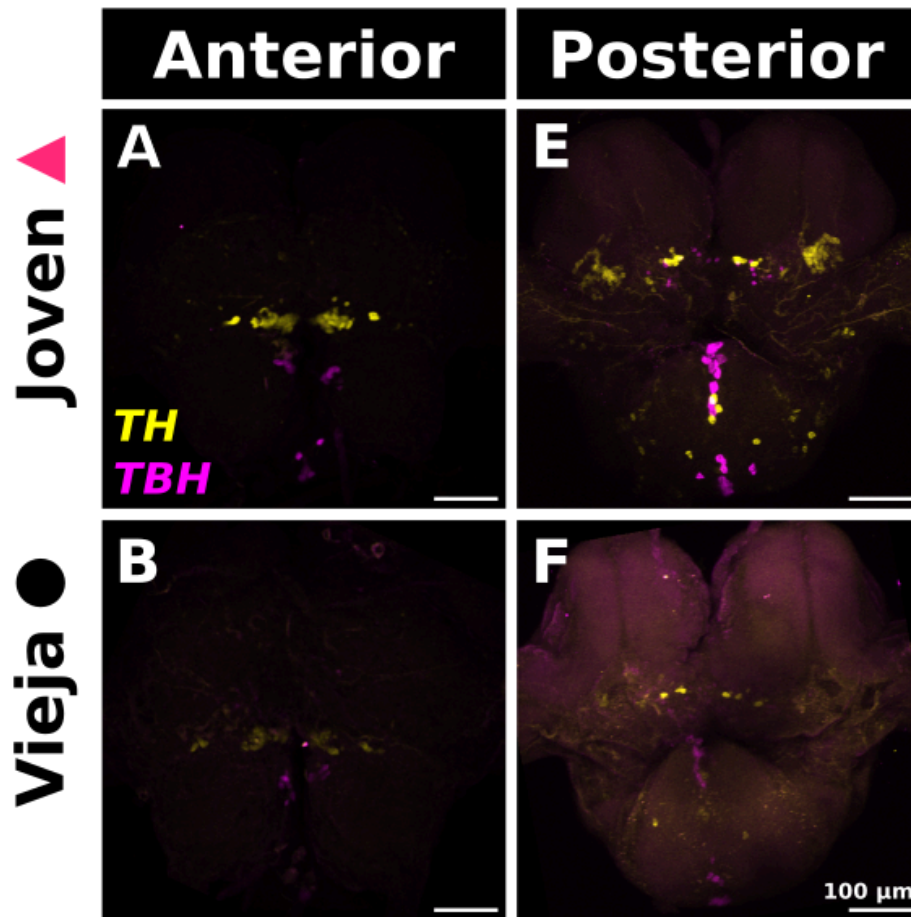


Fig. 12. Las hormigas jóvenes tienen mayor cantidad de transcritos tanto de *TH* como de *TBH* comparado con las hormigas viejas. La intensidad de fluorescencia correspondiente a la marca de transcritos está diferenciada con respecto a la edad en cerebros de *Pogonomyrmex barbatus* (Hibridación *In Situ* Fluorescente, FISH). A, B, E, F corresponden a proyecciones de máxima intensidad de imágenes apiladas (*stack*) de microscopía confocal, objetivo de 20x, vista anterior (A, B) y posterior (E, F). A y E corresponden a hormigas jóvenes, mientras que las hormigas viejas aparecen en B y F. Las secciones C, D, G y H corresponden a las gráficas de intensidad de fluorescencia. C ($n \geq 14$; Prueba U de Mann-Whitney $*p = 0.0006$). D ($n \geq 14$; Prueba U de Mann-Whitney, $*p = 0.039$). G ($n \geq 15$; Prueba U de Mann-Whitney, $***p = 0.0002$). H ($n \geq 15$; Prueba U de Mann-Whitney, $***p = 0.0003$). Las barras azules corresponden a la mediana. Las barras de escala corresponden a 100 μm .**

Discusión

Las hormigas son consideradas como un superorganismo con un grado de organización entre individuos similar a la coordinación existente entre órganos y tejidos de otros seres vivos. Esto se debe a la presencia de comportamientos sofisticados que permiten una división de labores bien establecida y de estricta regulación, conocidos como conducta colectiva. Esta es una propiedad emergente que no es posible explicar a partir de las conductas aisladas de cada uno de los individuos, sino que es producto de la interacción de los componentes del sistema. El procesamiento de las señales sociales y ambientales necesario para este complejo repertorio conductual tiene como fundamento diversos procesos neuronales y moleculares que han sido poco estudiados en estos animales. Un paso fundamental para entender las conductas complejas sociales es estudiar la anatomía básica de los sistemas de neuromodulación que permiten la plasticidad encontrada en las hormigas. Además, comparar los sistemas de neuromodulación en distintas edades y castas nos permite hacer inferencias sobre el polietismo temporal, proceso esencial en la división de labores de los himenópteros. En este trabajo identificamos las neuronas que producen inotocina, dopamina y octopamina en el cerebro de la hormiga *P. barbatus* mediante inmunofluorescencia e hibridación *In Situ* fluorescente. Describimos la localización anatómica de las neuronas inotocinérgicas en la hormiga *Pogonomyrmex barbatus*, y esta descripción coincide con descripciones previas en otras hormigas (*Lasius niger*, *Lasius neglectus*, *Camponotus fellah*, *Ooceraea biroi*) (Liutkevičiūte et al., 2018; Koto et al., 2019; Fetter-Pruneda et al., 2021).

Trabajos previos (Liutkevičiūte et al., 2018; Koto et al., 2019) reportan diferencias en los niveles de expresión relativa del péptido de inotocina entre obreras adultas, pupas y reinas, pero se desconocía la ubicación del péptido en el tejido nervioso en los últimos casos. La descripción de pupas y reinas realizada en esta tesis es necesaria para comprender las diferencias morfofuncionales entre castas y etapas del desarrollo, que dan pie a las diferencias

en la conducta. También describimos los somas de las neuronas dopaminérgicas y octopaminérgicas. Encontramos diferencias entre las cantidades relativas del péptido de inotocina y los mensajeros de enzimas de síntesis de dopamina (*TH*) y octopamina (*TBH*), entre las obreras jóvenes y viejas. El estudio de la disposición de las neuronas en el sistema nervioso de la hormiga roja cosechadora representa un paso fundamental en la descripción del correlato de la estructura y la función del sistema nervioso. Este trabajo hace posible el estudio de los sistemas de neuromodulación descritos a partir de otras técnicas que requieren el conocimiento previo de la anatomía del organismo, como electrofisiología, imagen de calcio y administración farmacológica precisa. Tomando en cuenta los resultados obtenidos, podemos considerar que los cambios a nivel celular y molecular en las células relacionadas con la neuromodulación representan algunos de los mecanismos neuronales básicos relacionados con el polietismo temporal, presente en muchas especies de himenópteros sociales. Hasta el momento, los datos obtenidos en estudios moleculares (Seid y Traniello, 2005; Friedman et al., 2018; Koto et al., 2019) habían explorado los cambios de expresión de genes relacionados con la neuromodulación y al cambio conductual. A pesar del gran aporte que representan, el fenómeno del cambio de conducta por la edad no estaba fielmente descrito. Con la aportación de este trabajo, podemos asumir que existe un cambio en las cantidades de los neuromoduladores propiamente o mensajeros relacionados con éstos, con respecto a la edad, lo que contribuye al cambio en la propensión de los individuos en una colonia a realizar tareas intranidales o extranidales, propias del polietismo temporal. Esta especialización en la ejecución de las tareas es fundamental en las sociedades complejas de himenópteros y es probable que haya contribuido a su éxito en sus respectivos nichos ecológicos.

Los factores ambientales adversos y cambiantes presentes en los hábitats con climas extremos, como el caso de las zonas áridas o semiáridas donde se encuentran las hormigas *P. barbatus*, exige a los organismos flexibilidad en la toma de decisiones para la supervivencia (Gordon, 2011; Vásquez-Bolaños, 2011). Las colonias de esta especie de hormigas regulan de

manera distinta sus salidas a forrajear con respecto a la humedad relativa ambiental, y las que regulan mejor sus salidas en días secos, tienen más probabilidades de supervivencia (Gordon, 2011; Friedman et al., 2018). La distribución de neuromoduladores parece estar relacionada con la percepción de la colonia con su entorno y a la toma de decisiones al comparar los estímulos ambientales con factores relevantes del estado de la colonia, como en el caso de la cantidad de alimentos disponible. El cambio de dicha distribución con respecto a la edad podría significar una percepción ambiental distinta entre obreras adultas jóvenes y viejas, que promueve la salida del nido de los individuos mayores, pero con la posibilidad de que las obreras jóvenes suplan a sus hermanas mayores si ellas llegaran a desaparecer. Esta capacidad de variación en la respuesta conductual es solamente posible a través de la regulación precisa de los distintos neuromoduladores que promueven cambios morfofuncionales en los circuitos neuronales.

De esta manera, la localización de las neuronas que producen inotocina, dopamina y octopamina permite entender cómo estas células se conectan y se comunican, por lo que la descripción anatómica en este trabajo es fundamental para la caracterización de los sistemas de neuromodulación en insectos sociales. Se ha demostrado que a partir del análisis de los conectomas se pueden hacer aseveraciones de los procesos que los distintos circuitos llevan a cabo, incluso sin la necesidad de registros electrofisiológicos (Seung, 2023), por lo que aportaciones sobre la localización de los grupos de neuronas en el cerebro de la hormiga pueden ser usados para inferir los procesos en los que están involucrados, como podrían ser las conductas básicas para la sofisticada convivencia en grupo, propia de los himenópteros sociales.

Por otro lado, la mayoría de los insectos estudiados tradicionalmente, como *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Locusta migratoria*, por mencionar algunos, carecen de conductas sociales complejas, por lo que su vida suele ser solitaria o colectiva simple. Además, pocos son los vertebrados convencionalmente estudiados que presentan conductas sociales complejas. El

uso de organismos poco convencionales, como las hormigas, nos permite estudiar fenómenos ausentes en las especies mencionadas. La comparación de los sistemas de comunicación neuronal, como es la de los neuromoduladores estudiados en este trabajo, nos permite hacer inferencias sobre su función con respecto a conductas divergentes. El estudio de estos procesos en distintos animales representativos, tanto invertebrados como vertebrados, nos permitirá entender los fundamentos celulares y moleculares que permiten la gran variedad conductual presente en distintos filos, encontrar generalidades relacionadas con la presencia de estas características en sistemas nerviosos primitivos, así como diferencias que permitan explicar las distintas variantes existentes entre organismos, su conducta y sus tejidos nerviosos.

Inotocina

La concordancia de la localización de las neuronas inotocinérgicas en *Pogonomyrmex barbatus* (especie representativa de la subfamilia *Myrmicinae*) con especies representativas de las subfamilias *Formicinae* (*Lasius niger*, *Lasius neglectus*, Liutkevičiūte et al., 2018; *Camponotus fellah*, Koto et al., 2019) y *Dorylinae* (*Ooceraea biroi*, Fetter-Pruneda et al., 2021), nos permite afirmar que el sistema de inotocina está conservado en hormigas. Por otro lado, en *Ooceraea biroi* sí hay cambios en la intensidad de fluorescencia en los somas de las neuronas inotocinérgicas (ver Fetter-Pruneda et al., 2021), mientras que en *P. barbatus* no se encuentra tal cambio de intensidad. Esto podría deberse a las diferencias propias de estas dos especies, por ejemplo, que este cambio en la presencia del péptido en el soma pudiera estar relacionado con la transición de estados reproductivos en *O. biroi*; y que en *P. barbatus*, al tener castas fijas, no exista esta diferencia. En moscas, se ha propuesto que los niveles de neuropéptidos en los somas se relacionan de forma inversa con la cantidad de liberación de los mismos. Esto significa que a menor marca en el soma, existe mayor liberación peptidérgica (Géminard et al., 2009). Por lo tanto, podría suponerse que a pesar de no haber diferencias en los somas,

existen diferencias tanto en las neuritas, como se observó en este trabajo, o en otros tejidos, como podría ser la hemolinfa.

Los sistemas OT/VP tienen funciones muy diversas en la fisiología animal, y se les ha relacionado, entre otros procesos, con las conductas sexuales y sociales (Odekunle y Elphick, 2020). A pesar de que su estudio comenzó a finales del siglo XIX, estos sistemas siguen siendo poco estudiados en animales distintos a los mamíferos, y se ignora en especial el caso de los invertebrados. El entendimiento de la fisiología de los sistemas OT/VP, en específico de las proteínas y péptidos involucrados, requiere de una perspectiva evolutiva y por ello se requiere conocer más sobre su funcionamiento en especies animales poco estudiadas, en especial en invertebrados. El estudio de la inotocina en los himenópteros permite responder si estos sistemas se encuentran involucrados en conductas complejas sociales, tales como el cuidado aloparental, la división de labores y el polietismo temporal. De ser así, esto permitirá caracterizar los mecanismos neuronales básicos que subyacen a estas conductas.

Aminas biogénicas

Las aminas biogénicas son sustancias presentes en muchos organismos, desde bacterias, hongos, plantas y animales (Roshchina, 2010; en Verlinden, 2018). Sin embargo, probablemente los primeros organismos que presentan sistemas de modulación funcionales (con sistemas de síntesis, transporte, recepción e inactivación) son los animales bilaterales (Goulty et al., 2023). Su función parece haber estado relacionada desde el principio con la regulación del movimiento, y a partir del surgimiento de sistemas más complejos, en la regulación del sueño y la vigilia, el aprendizaje, la memoria, la motivación y estados emocionales (Goulty et al., 2023; Verlinden, 2018; Verlinden et al., 2010). La presencia de estos sistemas aminérgicos en muchas especies de animales hacen que el estudio de su estructura y función en hormigas se pueda generalizar a otros organismos.

La dopamina es una de las aminas biogénicas con más presencia en animales (Goulty et al., 2023). La función de la dopamina parece estar conservada en varios taxones y en insectos se puede relacionar a conductas de alimentación, búsqueda de recompensas, aprendizaje, memoria, estados de alerta (*arousal*), así como interacciones sociales (Verlinden, 2018). Por otro lado, la octopamina es una de las aminas biogénicas más abundantes en invertebrados y se considera como contraparte de la norepinefrina de los vertebrados, por la similitud de éstas en estructura y función. Se considera como una señal de estrés, que permite a los organismos hacer uso de distintos recursos para huir o pelear. También se ha descrito que la octopamina suele incrementar la sensibilidad de receptores de estímulos sensoriales varios, además de estar relacionada con el aprendizaje y la memoria (Verlinden et al., 2010).

En el caso de las neuronas dopaminérgicas, y tomando en cuenta lo reportado en mosca y abeja (Mao y Davis, 2009; Tedjakumala et al., 2017) podemos inferir sobre los neuropilos con los que estas células tienen interacción. La localización de estas células y su parecido con la disposición en los otros insectos mencionados permite suponer que los grupos neuronales PAM, PAL, PPM1 y 2 de *P. barbatus* corresponden a los C1 y C2 de *Apis mellifera* y a PAM y PPM3 de *D. melanogaster*. Estas neuronas tienen proyecciones a los lóbulos mediales y verticales de los MBs. En cuanto a PPL1 en *P. barbatus*, se sugiere la correspondencia con C3 de *A. mellifera*, que tienen proyecciones tanto al lóbulo vertical de manera contralateral, así como al cuerno lateral de manera ipsilateral; y PPL1, PPL2, y PPM3 de *D. melanogaster*, que proyectan al cuerpo en forma de abanico, a los cálices de los MBs y al CX, respectivamente. Por último, PPL2 de *Pogonomyrmex barbatus* parece corresponder al grupo C4 de *Apis mellifera*, que se conecta con los cálices de los MBs y con los OLs.

Reportes previos (Seid y Traniello, 2005) realizados en cerebro de *Pheidole dentata* donde por medio de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) encontraron que existe un aumento de la concentración de las aminas biogénicas como 5HT y DA con respecto a la edad de las hormigas, mientras que no observan

cambios significativos para la concentración de OA. Por otro lado, también se ha descrito que usando la misma técnica de cuantificación en cerebros de abejas *Apis mellifera*, la concentración de OA aumenta con la edad (Schulz y Robinson, 1999, en Spivak et al., 2003; Wagener-Hulme et al., 1999, en Spivak et al., 2003). También se sabe que las hormigas presentan más conductas agresivas (relacionadas con tareas extranidales) después de la administración de OA (Kamhi et al., 2015). El presente trabajo no es directamente comparable con los artículos mencionados debido a que, en este trabajo, cuantificamos los transcritos de las enzimas de síntesis de las aminas biogénicas, que no necesariamente se comparan con la concentración de los neuromoduladores, obtenida por HPLC.

En relación con el punto anterior, existen muchos puntos de regulación que podrían estar involucrados en la síntesis de aminas biogénicas. Se deben de tomar en cuenta aspectos como las tasas de transcripción y traducción, la vida media de los mensajeros, así como la de las enzimas mismas. Puede existir también algún tipo de regulación postraduccional. Además, procesos como los desfases temporales (cambio en estado transcripcional) y espaciales (derivado del transporte de proteínas a otras regiones celulares) pueden favorecer a la baja correlación entre abundancia de transcritos y proteínas (Buccitelli y Selbach, 2020).

Por otro lado, es importante considerar la presencia suficiente de los aminoácidos precursores, es decir, los sustratos correspondientes a TH y TBH; y de la inhibición por retroalimentación de los productos que el proceso de síntesis de las aminas biogénicas estudiadas pudieran tener. De igual manera, se deben tomar en cuenta aspectos referentes a procesos como el transporte, liberación, recaptura, y degradación de las aminas biogénicas (Monastirioti, 1999; Rosikon et al., 2023).

Sin embargo, las diferencias encontradas en los niveles de transcritos en esta tesis, podrían apuntar a que existen diferencias moleculares entre individuos de distintas edades, que se relacionan a cambios conductuales como los procesos observados en el polietismo temporal y que están relacionadas con la regulación propia de los neuromoduladores. De esta manera,

podemos sugerir que la presencia de enzimas como TH y TBH entre hormigas jóvenes y viejas es distinta, además de que las concentraciones de la dopamina y octopamina varían según la edad.

Conclusiones

En este trabajo se muestra la distribución de la inotocina en el cerebro de la hormiga *Pogonomyrmex barbatus* en diferentes castas y etapas del desarrollo. La ubicación del péptido en el cerebro de esta especie era hasta ahora desconocida. Además, no se había descrito en ninguna otra especie de hormigas la localización anatómica de la inotocina por inmunofluorescencia en individuos en el estadio de pupa, ni en la reina.

Encontramos también cambios en la distribución de la inotocina conforme el organismo envejece, observados como un aumento en la cantidad de péptido en las neuritas de las neuronas inotocinérgicas. Además, este estudio representa la primera caracterización de la distribución de neuronas tanto dopaminérgicas como octopaminérgicas en *Pogonomyrmex barbatus*. De igual forma, describimos las diferencias en la cantidad de los transcritos de enzimas de síntesis de dopamina (*TH*) y octopamina (*TBH*) con respecto a la edad, pues la presencia de estos mensajeros disminuye cuando el organismo se hace más viejo.

Los resultados de la comparación por edades de los sistemas aminérgicos, junto con los de inotocina, representan un avance importante en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares implicados en el polietismo temporal y en las conductas sociales en general, pues la presencia diferenciada de neuromoduladores y mensajeros en los cerebros de las hormigas se podría relacionar con la diversidad conductual presente en los distintos grupos etarios.

Esta investigación contribuye al conocimiento de la anatomía y función de los sistemas de neuromodulación inotocinérgico, dopaminérgico y octopaminérgico en las hormigas y su relación con las conductas sociales. La descripción anatómica realizada en esta tesis nos permite diseñar estudios funcionales sobre los sistemas estudiados y su interacción con otros, con técnicas como las descritas a continuación en las perspectivas. Esto permitirá comprender de mejor manera los principios del funcionamiento del cerebro de los insectos sociales y de los animales en general, abriendo nuevas vías para el estudio del comportamiento social.

Perspectivas

Buscando entender mejor los sistemas aminérgicos, se deben contemplar no solamente la presencia de los transcritos, sino que también la de las enzimas en que resultan de éstos y las aminas biogénicas propiamente. Todo esto es posible si se realizan experimentos con el uso simultáneo de inmunofluorescencia y FISH. Además, se pueden cuantificar algunas moléculas de interés (mensajeros, aminas biogénicas) en ciertos tejidos a partir de técnicas como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa y métodos cromatográficos (HPLC). De esta manera, obtendríamos información sobre sus dinámicas y puntos de regulación.

Con el objetivo de describir los circuitos que componen los sistemas de neuromodulación, es decir, cómo se conectan unas neuronas con otras, se deben seguir las proyecciones de las neuronas. A través de métodos como la inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra las enzimas sintéticas o las aminas biogénicas propiamente, junto con el marcado de sus membranas, se podría obtener información sobre el tipo neuronal, la estructura de sus neuritas, su distribución en el tejido y sus conexiones con otras células. Además, se podría complementar con el marcado presináptico contra alguna proteína característica de esta región, como la sinapsina o Bruchpilot. Por último, la microinyección de dextranos conjugados a fluoróforos en estas células nos permitiría caracterizar de manera más fiel su morfología y disposición anatómica.

La caracterización de otros sistemas aminérgicos es fundamental para entender las bases moleculares que regulan las conductas complejas necesarias para la eusocialidad. Es por ello que se deben caracterizar otros sistemas aminérgicos relevantes, tales como la serotonina, histamina y tiramina. A su vez, para entender mejor los sistemas estudiados, se deben explorar otros transcritos y proteínas de interés como son los receptores, transportadores y enzimas de degradación.

Así mismo, es importante examinar técnicas de clarificado de tejidos o de microscopía de expansión con la finalidad de incrementar la relación señal/ruido de los tejidos, de manera que se obtengan imágenes de los sistemas estudiados con mayor resolución.

A fin de investigar las conductas complejas sociales de una manera más integral, es necesario incluir experimentos de análisis de conducta por video, así como intervenciones farmacológicas que permitan explorar la acción de agonistas o antagonistas directamente sobre algunas de las conductas estereotípicas que presenta esta especie.

El estudio anatómico de los circuitos neuronales debe ser complementado con el estudio funcional de sus dinámicas. Esto es posible por medio de técnicas como la imagenología de calcio o la electrofisiología, que ahora son viables al tener un mapa anatómico de tres principales neuromoduladores en la hormiga *Pogonomyrmex barbatus*.

Referencias

- Bressan, J.M.A., Benz, M., Oettler, J., Heinze, J., Hartenstein, V., Sprecher, S.G., 2015. A map of brain neuropils and fiber systems in the ant *Cardiocondyla obscurior*. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00166>
- Buijs, R.M., Pool, C.W., Heerikhuizen, J.J. van, Sluiter, A.A., Sluis, P.J. van der, Ramkema, M., Woude, T.P. van der, Beek, E. van der, 1989. Antibodies to small transmitter molecules and peptides: production and application of antibodies to dopamine, serotonin, GABA, vasopressin, vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y, somatostatin and substance P. *Biomed. Res. Tokyo Jpn.* 10, 213–221.
- Burbach, J.P.H., 2011. What Are Neuropeptides?, in: Merighi, A. (Ed.), *Neuropeptides, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–36. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-310-3_1
- Chapman, R.F., Simpson, S.J., Douglas, A.E., 2013. *The insects: structure and function*, Fifth edition. ed. Cambridge University Press, New York.
- Choi, H.M.T., Beck, V.A., Pierce, N.A., 2014. Next-Generation *in Situ* Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. *ACS Nano* 8, 4284–4294. <https://doi.org/10.1021/nn405717p>
- Choi, M.-Y., Raina, A., Vander Meer, R.K., 2009. PBAN/pyrokinin peptides in the central nervous system of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Cell Tissue Res.* 335, 431–439. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0721-6>
- Donaldson, Z.R., Young, L.J., 2008. Oxytocin, Vasopressin, and the Neurogenetics of Sociality. *Science* 322, 900–904. <https://doi.org/10.1126/science.1158668>
- Fetter-Pruneda, I., Hart, T., Ulrich, Y., Gal, A., Oxley, P.R., Olivos-Cisneros, L., Ebert, M.S., Kazmi, M.A., Garrison, J.L., Bargmann, C.I., Kronauer, D.J.C., 2021. An oxytocin/vasopressin-related neuropeptide modulates social foraging behavior in the clonal raider ant. *PLOS Biol.* 19, e3001305. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001305>
- Fischer, E.K., O'Connell, L.A., 2017. Modification of feeding circuits in the evolution of social behavior. *J. Exp. Biol.* 220, 92–102. <https://doi.org/10.1242/jeb.143859>
- Friedman, D.A., Pilko, A., Skowronska-Krawczyk, D., Krasinska, K., Parker, J.W., Hirsh, J., Gordon, D.M., 2018. The Role of Dopamine in the Collective Regulation of Foraging in Harvester Ants. *iScience* 8, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.09.001>
- Friedman, D.A., York, R.A., Hilliard, A.T., Gordon, D.M., 2020. Gene expression variation in the brains of harvester ant foragers is associated with collective behavior. *Commun. Biol.* 3, 100. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0813-8>
- Géminard, C., Rulifson, E.J., Léopold, P., 2009. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metab.* 10, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.002>
- Giachello, C.N.G., Montarolo, P.G., Ghirardi, M., 2012. Synaptic Functions of Invertebrate Varicosities: What Molecular Mechanisms Lie Beneath. *Neural Plast.* 2012, e670821. <https://doi.org/10.1155/2012/670821>
- Godfrey, R.K., Gronenberg, W., 2019. Brain evolution in social insects: advocating for the comparative approach. *J. Comp. Physiol. A* 205, 13–32. <https://doi.org/10.1007/s00359-019-01315-7>
- Gordon, D., 2011. *Ants At Work: How An Insect Society Is Organized*. Free Press.
- Gordon, D.M., 1983. The Relation of Recruitment Rate to Activity Rhythms in the Harvester Ant, *Pogonomyrmex barbatus* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* 56, 277–285.
- Gordon, D.M., Dektar, K.N., Pinter-Wollman, N., 2013. Harvester Ant Colony Variation in Foraging Activity and Response to Humidity. *PLOS ONE* 8, e63363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063363>

- Goultly, M., Botton-Amiot, G., Rosato, E., Sprecher, S.G., Feuda, R., 2023. The monoaminergic system is a bilaterian innovation. *Nat. Commun.* 14, 3284.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-39030-2>
- Greene, M.J., Gordon, D.M., 2003. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature* 423, 32–32. <https://doi.org/10.1038/423032a>
- Gruber, C.W., Muttenthaler, M., 2012. Discovery of Defense- and Neuropeptides in Social Ants by Genome-Mining. *PLOS ONE* 7, e32559.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032559>
- Guerrieri, F.J., Nehring, V., Jørgensen, C.G., Nielsen, J., Galizia, C.G., d’Ettorre, P., 2009. Ants recognize foes and not friends. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 2461–2468.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1860>
- Habenstein, J., Amini, E., Grübel, K., El Jundi, B., Rössler, W., 2020. The brain of *CATAGLYPHIS* ants: Neuronal organization and visual projections. *J. Comp. Neurol.* 528, 3479–3506.
<https://doi.org/10.1002/cne.24934>
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Holze, H., Schrader, L., Buellesbach, J., 2021. Advances in deciphering the genetic basis of insect cuticular hydrocarbon biosynthesis and variation. *Heredity* 126, 219–234.
<https://doi.org/10.1038/s41437-020-00380-y>
- Hoyer, S.C., Liebig, J., Rössler, W., 2005. Biogenic amines in the ponerine ant *Harpegnathos saltator*: serotonin and dopamine immunoreactivity in the brain. *Arthropod Struct. Dev.* 34, 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2005.03.003>
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L.L., Rössler, W., Simpson, J.H., Strausfeld, N.J., Strauss, R., Vosshall, L.B., 2014. A Systematic Nomenclature for the Insect Brain. *Neuron* 81, 755–765.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.017>
- Kamhi, J.F., Nunn, K., Robson, S.K.A., Traniello, J.F.A., 2015. Polymorphism and division of labour in a socially complex ant: neuromodulation of aggression in the Australian weaver ant, *Oecophylla smaragdina*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282, 20150704.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0704>
- Kamhi, J.F., Traniello, J.F.A., 2013. Biogenic Amines and Collective Organization in a Superorganism: Neuromodulation of Social Behavior in Ants. *Brain. Behav. Evol.* 82, 220–236. <https://doi.org/10.1159/000356091>
- Katz, P.S. (Ed.), 1999. *Beyond neurotransmission: neuromodulation and its importance for information processing*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Koto, A., Motoyama, N., Tahara, H., McGregor, S., Moriyama, M., Okabe, T., Miura, M., Keller, L., 2019. Oxytocin/vasopressin-like peptide inotocin regulates cuticular hydrocarbon synthesis and water balancing in ants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 5597–5606.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1817788116>
- Liutkevičiūtė, Z., Gil-Mansilla, E., Eder, T., Casillas-Pérez, B., Di Giglio, M.G., Muratspahić, E., Grebien, F., Rattei, T., Muttenthaler, M., Cremer, S., Gruber, C.W., 2018. Oxytocin-like signaling in ants influences metabolic gene expression and locomotor activity. *FASEB J.* 32, 6808–6821. <https://doi.org/10.1096/fj.201800443>
- Mao, Z., Davis, R., 2009. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front. Neural Circuits* 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.005.2009>
- Meissner, G.W., Nern, A., Singer, R.H., Wong, A.M., Malkesman, O., Long, X., 2019. Mapping Neurotransmitter Identity in the Whole-Mount *Drosophila* Brain Using Multiplex High-Throughput Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Genetics* 211, 473–482.
<https://doi.org/10.1534/genetics.118.301749>

- Monastiriotti, M., 1999. Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech* 45, 106–121.
- Muratspahić, E., Monjon, E., Duerrauer, L., Rogers, S.M., Cullen, D.A., Vanden Broeck, J., Gruber, C.W., 2020. Oxytocin/vasopressin-like neuropeptide signaling in insects, in: *Vitamins and Hormones*. Elsevier, pp. 29–53. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.08.011>
- Nadim, F., Bucher, D., 2014. Neuromodulation of neurons and synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 29, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.05.003>
- Odekunle, E.A., Elphick, M.R., 2020. Comparative and Evolutionary Physiology of Vasopressin/Oxytocin-Type Neuropeptide Signaling in Invertebrates. *Front. Endocrinol.* 11, 225. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00225>
- Richter, A., Keller, R.A., Rosumek, F.B., Economo, E.P., Hita Garcia, F., Beutel, R.G., 2019. The cephalic anatomy of workers of the ant species *Wasmannia affinis* (Formicidae, Hymenoptera, Insecta) and its evolutionary implications. *Arthropod Struct. Dev.* 49, 26–49. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.02.002>
- Ríos-Casanova, L., 2014. Biodiversidad de hormigas en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 392–398. <https://doi.org/10.7550/rmb.32519>
- Rosikon, K.D., Bone, M.C., Lawal, H.O., 2023. Regulation and modulation of biogenic amine neurotransmission in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*. *Front. Physiol.* 14, 970405. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.970405>
- Seid, M.A., Harris, K.M., Traniello, J.F.A., 2005. Age-related changes in the number and structure of synapses in the lip region of the mushroom bodies in the ant *Pheidole dentata*. *J. Comp. Neurol.* 488, 269–277. <https://doi.org/10.1002/cne.20545>
- Seid, M.A., Traniello, J.F.A., 2005. Age-related changes in biogenic amines in individual brains of the ant *Pheidole dentata*. *Naturwissenschaften* 92, 198–201. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0610-8>
- Seung, H.S., 2023. Insights into vision from interpretation of a neuronal wiring diagram. <https://doi.org/10.1101/2023.11.15.567126>
- Shimoji, H., Aonuma, H., Miura, T., Tsuji, K., Sasaki, K., Okada, Y., 2017. Queen contact and among-worker interactions dually suppress worker brain dopamine as a potential regulator of reproduction in an ant. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 71, 35. <https://doi.org/10.1007/s00265-016-2263-3>
- Sinakevitch, I., Niwa, M., Strausfeld, N.J., 2005. Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: Comparable organization in the brain and subesophageal ganglion. *J. Comp. Neurol.* 488, 233–254. <https://doi.org/10.1002/cne.20572>
- Sinakevitch, I., Strausfeld, N.J., 2006. Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J. Comp. Neurol.* 494, 460–475. <https://doi.org/10.1002/cne.20799>
- Sorek, M., Berger, S.L., 2023. Neuromodulators and neuroepigenetics of social behavior in ants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1528, 5–12. <https://doi.org/10.1111/nyas.15055>
- Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., Mesce, K.A., 2003. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol.* 55, 341–354. <https://doi.org/10.1002/neu.10219>
- Stafflinger, E., Hansen, K.K., Hauser, F., Schneider, M., Cazzamali, G., Williamson, M., Grimmelikhuijzen, C.J.P., 2008. Cloning and identification of an oxytocin/vasopressin-like receptor and its ligand from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3262–3267. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710897105>
- Tedjakumala, S.R., Rouquette, J., Boizeau, M.-L., Mesce, K.A., Hotier, L., Massou, I., Giurfa, M., 2017. A Tyrosine-Hydroxylase Characterization of Dopaminergic Neurons in the Honey Bee Brain. *Front. Syst. Neurosci.* 11, 47. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00047>
- Trendelenburg, U., Weiner, N. (Eds.), 1989. *Catecholamines II, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

- <https://doi.org/10.1007/978-3-642-73551-6>
- Vander Meer, R.K., Preston, C.A., Hefetz, A., 2008. Queen regulates biogenic amine level and nestmate recognition in workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Naturwissenschaften* 95, 1155–1158. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0432-6>
- Vásquez-Bolaños, M., 2011. Lista de especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) para México. *Dugesiana* 18, 95–133.
- Verlinden, H., 2018. Dopamine signalling in locusts and other insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 97, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.04.005>
- Verlinden, H., Vleugels, R., Marchal, E., Badisco, L., Pflüger, H.-J., Blenau, W., Broeck, J.V., 2010. The role of octopamine in locusts and other arthropods. *J. Insect Physiol., Locust Research in the Age of Model Organisms In honor of M.P. Pener's 80th Birthday* 56, 854–867. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.018>
- Ward, P.S., 2006. *Ants. Curr. Biol.* 16, R152–R155. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.054>
- White, K.E., Humphrey, D.M., Hirth, F., 2010. The Dopaminergic System in the Aging Brain of *Drosophila*. *Front. Neurosci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fnins.2010.00205>
- Williams, M.W., Williams, C.S., DeWitt, G.R., 1965. Temperature and subspecies variation on the oxygen consumption of the desert ant,. *Life Sci.* 4, 603–606. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(65\)90271-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(65)90271-7)
- Wilson, E.O., Hölldobler, B., 2005. Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13367–13371. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102>