



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad Morelia

IMPORTANCIA DE LA  
OCTOPAMINA COMO MODULADOR DE  
LA RESPUESTA INMUNITARIA ANTE  
LA PRESENCIA DE UN PARÁSITO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADA EN ECOLOGÍA**

P R E S E N T A

FRIDA MARLEN DIANA RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO (ENES UNIDAD MORELIA)      ENERO, 2025



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# LICENCIATURA EN ECOLOGÍA

Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad Morelia

IMPORTANCIA DE LA  
OCTOPAMINA COMO MODULADOR DE  
LA RESPUESTA INMUNITARIA ANTE  
LA PRESENCIA DE UN PARÁSITO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN ECOLOGÍA

P R E S E N T A

FRIDA MARLEN DIANA RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO (ENES UNIDAD MORELIA)

ENERO, 2025

## **Agradecimientos institucionales**

Agradezco a todas las y los docentes de la licenciatura en Ecología de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, ENES, Unidad Morelia por compartir su conocimiento y experiencias a través de las clases que nos vuelven apasionadas y apasionados por nuestra profesión.

A PAPIIT, DGAPA, UNAM por otorgarme una beca de estudios (Clave IN226324 y folio de beca aceptada 274524) y por financiar este proyecto.

A los sinodales por el tiempo destinado a revisar y hacer valiosos comentarios que aportaron a mi trabajo. Gracias por seguirme enseñando.

## Agradecimientos personales

Todo propósito es parte de una promesa. Dios, gracias.

Tal vez mi curiosidad por la naturaleza comenzó cuando mis abuelas me enseñaron a cuidar de las plantas, tal vez experimente una intensa felicidad cuando mi papá y abuelo me llevaron de viaje por primera vez y tal vez mi amor por los bichos comenzó cuando mi mamá me llevaba a capturar luciérnagas en la noche y me enseñó que siempre había que liberarlas y cuidarlas. No cabe duda que estoy hecha de muchos pedacitos de ustedes.

Papas, vale más que les demuestre siempre lo agradecida que estoy por sus vidas y por la familia que formaron a solo escribirlo.

“Escucha el mandamiento de tu papá y no ignores la enseñanza de tu mamá, átalos a tu cuello, escríbelos en tu corazón, te guiarán por donde quiera que vayas, te cuidarán cuando duermas y te hablarán cuando despiertes” Proverbios 6: 20-22.

Papá, siempre que hablo de ti con alguien le cuento lo orgullosa que estoy de ti, el honor que siento de que seas mi padre y les presumo tus cualidades que son mis favoritas. Sin duda me haces sentir un amor genuino y sincero, me muestras que siempre puedo contar contigo, con tu valentía y tu sabiduría. Gracias por enseñarme valores, disciplina y por siempre resolver mis dudas. Mamá para mí tú eres el mejor ejemplo de fortaleza e inteligencia. Gracias por hacerme sentir amada con cada palabra que me dices, gracias por cuidarme y por estar incondicionalmente conmigo. Gracias por ser una mujer esforzada y aconsejarme siempre con sabiduría. La mejor parte de mis días siempre es llegar a casa y contarte mi día y preguntarte por el tuyo.

A mis abuelas y abuelo, gracias por enseñarme el valor de la educación, por consentirme como nadie y siempre reconocer mis logros. Abuelita Alicia, siempre que siento que no puedo lograr algo pienso que si crecí contigo algo debí haber aprendido sobre fortaleza y resiliencia. No tengo palabras para agradecer y plasmar todo el amor que siento por ti, estás siempre presente en mí.

Hermanos, son mis personas favoritas en todo el mundo y quienes me sostienen en todo momento. Hermana, no hay manera alguna en que pueda describir la relación tan única y especial que tenemos, desde siempre eres mi ejemplo, mi fuerza y mi alegría. Gracias por enseñarme de empatía, tienes un corazón muy valioso y la manera en la que ayudas a todos sin importar qué es lo que me asombra y me hace admirarte cada día. Gracias a tu increíble familia por escucharme hablar de la tesis durante el desayuno, aunque no siempre entienden de lo que les hablo y a bebé por acompañarme (dormido) en las noches y tardes de estudio y escritura. Hermano, tu nobleza me hace sentir mucha ternura, tampoco puedo describir todo el amor que siento por ti y el ejemplo que eres para mí, gracias por siempre acompañarme, eres una parte esencial para mi vida porque haces que cada día se sienta como un día feliz de playita.

Es complejo ir por un camino profesional distinto al que se ha seguido en la familia, pero todas y todos ustedes me han acompañado en todo momento y ahora me enorgullece decirles que tienen una hija, nieta, hermana y tía científica.

Al doctor Jorge Contreras por todo el conocimiento y apoyo brindado, pero sobre todo, le agradezco las charlas en las que me motiva a seguir, le agradezco que me hablará sobre la emoción de obtener tus primeros resultados y ser la primera persona en tener conocimiento nuevo porque me ha mantenido expectante y también por la confianza que ha puesto en mí.

A todo el grupo SSEI del laboratorio de Ecología Evolutiva de la ENES, Morelia por el apoyo académico, por las charlas en el insectario, por ser un gran equipo que te ayudan a prepararte antes de una presentación y por su amistad.

A todas mis amistades que cada momento con ustedes se siente suavcito, gracias por su apoyo, cariño y complicidad. Gracias a las amistades que conocí en la licenciatura por todas las risas que compartimos, por ser mi red de apoyo en campo y por hacer estos años más ligeritos. Agradezco especialmente a Beth, Laura y Carlos porque su amistad es un abracito al corazón y a Nazly porque me acompañas a la distancia y pasar por este proceso juntas me hace sentir menos incertidumbre. Gracias a ustedes por enseñarme que la amistad va más allá de hablar todos los días, estar cerca o solo en los buenos momentos, les quiero muchísimo.

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
<b>3 OBJETIVO</b> .....	<b>12</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>12</b>
<b>PREDICCIONES</b> .....	<b>12</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
4.1 COLECTA Y MANTENIMIENTO DE LARVAS DE GALLINA CIEGA Y NEMATODOS.....	13
4.2 EXPERIMENTO DE TOXICIDAD.....	14
4.3 EXPERIMENTO DE INFECCIÓN.....	14
4.4 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	14
4.5 DILUCIONES SERIADAS .....	15
4.6 SUPERVIVENCIA .....	15
4.7 NÚMERO DE HEMOCITOS .....	15
4.8 ACTIVIDAD LÍTICA.....	15
4.9 FENOLOXIDASA.....	16
4.10 PROTEÍNA .....	16
4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	16
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
5.1 SUPERVIVENCIA .....	18
5.2 NÚMERO DE HEMOCITOS .....	18
5.3 ACTIVIDAD LÍTICA.....	19
5.4 FENOLOXIDASA.....	20
5.5 PROTEÍNA .....	20
<b>6 DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
6.1 TOXICIDAD .....	21
6.1.1 LA OCTOPAMINA SE LIBERA ANTE ESTÍMULOS ESTRESANTES .....	21
6.1.2 EFECTOS DEPENDIENTES DE LA DOSIS Y CONCENTRACIÓN DE OCTOPAMINA Y FENTOLAMINA .....	22
6.1.3 RECONFIGURACIÓN DE VÍAS FISIOLÓGICAS.....	22
6.2 INFECCIÓN.....	23
6.2.1 CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO .....	23
6.2.2 RESISTENCIA A LA INFECCIÓN.....	24
6.2.3 MANIPULACIÓN DE VÍAS FISIOLÓGICAS POR PARÁSITOS .....	24
6.3 PERSPECTIVAS A FUTURO .....	25
<b>7 CONCLUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>8 REFERENCIAS</b> .....	<b>27</b>

## Resumen

La respuesta anticipatoria establece que los animales incrementan su defensa antes de enfrentar una amenaza por depredación o parasitismo. Para evadir el riesgo, tienen respuestas relacionadas con el miedo ocasionadas por cambios fisiológicos o conductuales. En invertebrados, la octopamina una hormona del estrés, podría anticipar el ataque de parásitos porque permite una conexión bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. Por esta razón, en este trabajo nos preguntamos cuál es la importancia de la octopamina como modulador de la respuesta inmunitaria anticipatoria contra todos los parásitos. Planteamos la hipótesis de que la octopamina activa la respuesta inmunitaria cuando los insectos detectan la presencia de un parásito. Para probar esto, realizamos experimentos piloto con larvas de *Phyllophaga polyhylla* para determinar si la octopamina y la fentolamina tópicos son tóxicos y/o alteran parámetros inmunológicos y fisiológicos. Encontramos que los reactivos no son tóxicos para las larvas y no activan la respuesta inmunitaria, pero sí alteran la concentración de proteína en la hemolinfa. Posteriormente en un segundo experimento, analizamos la respuesta inmunitaria de larvas expuestas al nemátodo *Rhabditis regina* mediante cuatro grupos experimentales: uno Control, sin ningún tratamiento ni infección; uno Testigo, con infección y sin agregar ningún reactivo; uno con Octopamina; y uno con Fentolamina. Registramos la supervivencia, el número de hemocitos, la concentración de fenoloxidasa, la actividad lítica y la concentración de proteínas. Encontramos que los insectos tratados con octopamina murieron antes y tuvieron menos hemocitos viables que el grupo con fentolamina y el grupo testigo. En contraste, no encontramos diferencias en la concentración de fenoloxidasa, actividad lítica y proteínas. Estos resultados resaltan la importancia de los parásitos en la acción de los inmunomoduladores y que no todos los parámetros de la respuesta inmunitaria son afectados. Proponemos usar distintas dosis para saber si la octopamina aumenta la respuesta inmunitaria ante el ataque de nematodos.

## Abstract

The anticipatory response establishes that animals increase their defense before facing a threat by predation or parasitism. To evade risk, they have fear-related responses caused by physiological or behavioral changes. In invertebrates, octopamine, a stress hormone, could anticipate the attack of parasites because it allows a bidirectional connection between the central nervous system and the immune system. For this reason, in this work we ask what is the importance of octopamine as a modulator of the anticipatory immune response against all parasites. We hypothesize that octopamine activates the immune response when insects detect the presence of a parasite. To test this, we performed pilot experiments with *Phyllophaga polyhylla* larvae to determine if topical octopamine and phentolamine are toxic and/or alter immunological and physiological parameters. We found that the reagents are not toxic to the larvae and do not activate the immune response, but they do alter the protein concentration in the hemolymph. In a second experiment, we analyzed the immune response of larvae exposed to the nematode *Rhabditis regina* using four experimental groups: a Control group, without any treatment or infection; a Control group, with infection and without the addition of any reagent; one with Octopamine; and one with Phentolamine. We recorded survival, the number of hemocytes, the concentration of phenoloxidase, the lytic activity, and the concentration of proteins. We found that the insects treated with octopamine died earlier and had fewer viable hemocytes than the group with phentolamine and the control group. In contrast, we found no differences in the concentration of phenoloxidase, lytic activity, and proteins. These results highlight the importance of parasites in the action of immunomodulators and that not all parameters of the immune response are affected. We propose using different doses to determine whether octopamine increases the immune response to nematode attacks.

# 1 Introducción

La teoría de la ecología del miedo, ahora conocida como respuesta anticipatoria (Lopes, 2022) analiza el impacto de la depredación y del parasitismo sobre los organismos a nivel de población, comunidad y ecosistema (Zanette y Clinchy, 2020). El miedo, desde el punto de vista ecológico, se refiere a una respuesta adaptativa ante situaciones que amenazan la supervivencia. El miedo involucra la liberación de hormonas del estrés (Boissy, 1995), que a su vez, inducen cambios fisiológicos y comportamientos como la huida, cuando el organismo detecta una amenaza (Adamo y Shoemaker, 2000; Zanette y Clinchy, 2019). Además, el miedo es un protector, ya que, evita que los animales se expongan a daños potenciales. Cuando el miedo es excesivo reduce la reproducción, supervivencia y/o cuidado de las crías (en vertebrados). Los cambios fisiológicos generados por el miedo imponen costos permanentes en la adecuación de los individuos. Las dos fuentes más importantes de miedo son la depredación y el parasitismo (Zanette y Clinchy, 2020). Para reducir o evitar los costos del miedo, es importante que el hospedero pueda diferenciar entre una amenaza real y una no real. Las amenazas deben ser dirigidas del emisor a un receptor y el receptor aprende por ensayo y error a reconocer una amenaza real (Cant, 2010), aunque dichas respuestas también podrían ser innatas.

En la naturaleza, los parásitos representan una amenaza constante para los organismos y causan un efecto negativo en su adecuación. El parasitismo es una interacción biológica donde el parásito usa al hospedero como fuente de alimento para su reproducción y/o supervivencia (Schmid-Hempel, 2008; Schmid-Hempel, 2021). Por ejemplo, los acantocéfalos merman la adecuación de su hospedero intermediario, provocando la disminución de la fertilidad y conducen al crustáceo *Gammarus pulex* a exponerse a su depredador, el hospedero final del acantocéfalo (Cornet et al., 2008). La avispa parasitoide *Cotesia congregata* oviposita sus huevos en el cuerpo de la oruga del tabaco *Manduca sexta*, cuando los huevos eclosionan, las crías se alimentan de la oruga viva desde adentro, además, *C. congregata* induce anorexia en *M. sexta* en periodos específicos de su desarrollo (Miles et al., 2023). La manipulación por parte de los parásitos hacia su hospedero es fascinante, ya que brinda explicaciones adaptativas a las relaciones coevolutivas (Poulin, 2000) y permite entender por qué los hospederos experimentan conductas relacionadas con el miedo. Además, la manipulación por parte de un parásito tiene un costo implícito, pues implica un gran gasto energético para ambos interactuantes (Poulin et al., 2004). Sin embargo, no se sabe qué ocurre con la respuesta anticipatoria ante un parásito que manipule la respuesta inmunitaria de su hospedero.

En insectos, el Sistema Nervioso Central (SNC) contiene sustancias químicas tales como la octopamina (OA), una amina biogénica que en insectos actúa como neurotransmisor, neurohormona, inmunomodulador y neuromodulador (Adamo y Shoemaker, 2000). La octopamina se relaciona con patrones motores, integración sensorial y memoria, y con la habituación de los organismos, por esto ha sido propuesta como un modulador general en el SNC (Adamo, 2012a). La octopamina es la hormona del estrés en invertebrados y tiene una función similar a la norepinefrina de vertebrados. En un estudio en el que se aplicaron estímulos estresantes de tipo mecánico, térmico y químico en invertebrados, se encontró un aumento en los niveles de octopamina en la hemolinfa (Davenport y Evans, 1984). En *Drosophila melanogaster* se encontró que la octopamina desempeña un papel clave como

neuromodulador en la locomoción y conductas de aseo (Farooqui, 2007). Además, el incremento en los niveles de octopamina en respuesta al estrés, propicia conductas de huida, de lucha, locomoción y alimentación (Davenport y Evans, 1984; Adamo, 2012). Cuando un insecto está bajo estrés es menos susceptible a enfermedades debido a que hormonas como la octopamina, podrían ayudar a restaurar la homeostasis del sistema inmunitario. Por ejemplo, esta hormona induce la fagocitosis de partículas externas por parte de los hemocitos (células inmunitarias con receptores de octopamina) (Demas y Nelson, 2012). También, el aumento del nivel de octopamina, disminuye la resistencia a enfermedades, lo que plantea que el aumento de octopamina puede afectar la inmunosupresión de los organismos infectados (Adamo y Parsons, 2006; Adamo, 2010). Junto con la octopamina, la hormona adipocinética (AKH) se encarga de regular el equilibrio energético y de movilizar lípidos y carbohidratos en insectos. La actividad de la AKH es crucial en la respuesta al estrés porque participa en la síntesis de proteínas en periodos de alta demanda energética y en la respuesta inmunitaria porque se une a receptores transmembranales que activan cascadas de señalización intracelulares y participa en la síntesis de inmunoproteínas (i.e. proteínas antimicrobianas) (Adamo, 2012 c; Černý et al., 2024). En general, planteamos que el miedo a la infección puede inducir la actividad de octopamina en el insecto hospedero y así, se podría activar la respuesta inmunitaria cuando el insecto detecta un riesgo de infección contra nematodos.

## 2 Antecedentes

Un buen sistema de estudio para conocer más sobre la acción de la octopamina, es el parasitismo entre las larvas de gallinas ciegas y los nematodos entomopatógenos (EPN). Los coleópteros de la familia Melolonthidae de la especie *Phyllophaga polyphilla*, conocidos comúnmente como gallinas ciegas, son larvas edafícolas y rizofágas que se alimentan de las raíces de plantas de maíz y están ampliamente distribuidos en México. Son holometábolos, su ciclo de vida consta de cuatro fases: 1) Huevo. Los huevecillos son depositados a 20 cm de profundidad entre las raíces del maíz. 2) Larva. Las larvas tienen una cutícula blanda de color blanco que conforme crecen se torna ligeramente amarillenta y tienen mandíbulas muy fuertes que les permiten alimentarse. Estos organismos atraviesan tres estadios larvales. Durante el primer instar, las larvas permanecen a aproximadamente un metro de profundidad. A medida que avanzan al segundo y tercer instar, emergen progresivamente hacia la superficie (Jiménez et al., 2016). Posteriormente, completan su desarrollo a través de las etapas de pupa y, finalmente, adulto. Durante la fase larvaria estos coleópteros son más susceptibles a ser infectados por parásitos pues se encuentran dentro del suelo (Marín y Bujanos, 2008).

Uno de los enemigos naturales de las gallinas ciegas en su etapa larvaria son los EPN como *Rhabditis regina*. Estos nematodos se distinguen por tener una relación mutualista con bacterias, adquiridas al alimentarse del suelo o de materia orgánica en descomposición (Schulte y Poinar., 1991). En la simbiosis entre EPN y bacterias, los nematodos se favorecen en su desarrollo y reproducción porque utilizan los cadáveres de sus hospederos, quienes mueren por la alta virulencia adquirida gracias a las bacterias. Los nematodos transportan a las bacterias de la hemolinfa de un insecto a otro, favoreciendo el crecimiento de las bacterias y las protegen de peligros ambientales del suelo (Trejo-Meléndez et. al., 2024).

El proceso de infección en las gallinas ciegas comienza con los nematodos entrando por la boca, espiráculos o ano de las larvas. Una vez dentro, se conducen a la hemolinfa para liberar a las bacterias patógenas y provocar la muerte de la gallina ciega. Posteriormente, los nemátodos se alimentan de las bacterias que se multiplican y del tejido del insecto procesado por las mismas para crecer y reproducirse (Kaya y Gaugler, 1993; Kaya, 1990; Boemare, 2002). Las larvas de gallinas ciegas de distintos géneros despliegan conductas agresivas al enfrentar el ataque de nematodos: realizan movimientos bruscos para limpiarse de los parásitos e intentan morderlos (Castelo y Crespo, 2012), esta respuesta conductual junto con la cutícula son la barrera no inmunitaria de los invertebrados. Además de barreras no inmunitarias, los invertebrados en general también tienen barreras inmunitarias. El sistema inmunitario de los invertebrados tiene componentes humorales, como los péptidos antimicrobianos, enzimas líticas, componentes celulares (hemocitos) que realizan funciones como la fagocitosis, liberación de sustancias antimicrobianas y encapsulación (Loker et al., 2004). Ante la infección por parásitos y patógenos, los hospederos pueden producir enzimas como la fenoloxidasa y otras sustancias químicas en defensa ante infecciones. La actividad de la fenoloxidasa es una respuesta inmunitaria innata que protege a los insectos de lesiones e infecciones en el que se produce melanina que encapsula y aísla a patógenos y parásitos. La melanización también participa en procesos de cicatrización de heridas y esclerotización de la cutícula para hacerla más resistente ante daños o posibles infecciones y en el proceso de melanización se producen especies reactivas de oxígeno que atacan a

patógenos y parásitos (Nakhleh et al., 2017). También como parte de la respuesta inmunitaria innata se induce la actividad lítica que se activa ante patógenos o daño celular. Los hemocitos pueden fagocitar células de patógenos y liberar enzimas líticas o sustancias tóxicas que rompen a las células. En la hemolinfa se encuentran lisosomas que hidrolizan enlaces glucosídicos y provocan la lisis de la pared celular bacteriana (Eleftherianos et al., 2021). Además, la respuesta inmunitaria de los invertebrados en general está relacionada con las proteínas porque participan en la defensa ante patógenos y parásitos, resistencia a la infección y son marcadores de activación inmunitaria (Coates et al., 2022; Cubillo-Martínez et al., 2022). En interacciones parasíticas donde existe una amenaza dirigida al hospedero se puede conocer el mecanismo fisiológico detrás de su respuesta ante situaciones estresantes (i.e. miedo), el costo (energético, desarrollo, reproducción) y el impacto de responder ante la amenaza.

La interacción entre las gallinas ciegas y los nematodos entomopatógenos prevalece en campo (Jiménez-Cortés et al., 2016) y los nematodos tienen una virulencia alta contra sus hospederos (Trejo-Meléndez et al., 2023), además, se ha visto que el riesgo a la infección, es suficiente para estimular la actividad de hemocitos. Por eso, este proyecto plantea saber si el riesgo a la infección con el nematodo *R. regina*, induce la activación de la respuesta inmunitaria de *P. polyphylla* y si este fenómeno está mediado por la octopamina como mecanismo modulador.



### **3 Objetivo**

Conocer si la octopamina modula la respuesta inmunitaria de *Phyllophaga polyphylla* ante el riesgo a la infección por *Rhabditis regina*.

### **Hipótesis**

La octopamina activa la respuesta inmunitaria cuando los insectos detectan la presencia de un parásito (riesgo a la infección).

### **Predicciones**

- Las gallinas ciegas expuestas a los nematodos a los que se les agrega octopamina tendrán una mejor respuesta inmunitaria que el grupo testigo, sin octopamina.
- Los individuos infectados a los que se les inhiba la octopamina tendrán una respuesta inmunitaria menos eficiente que el grupo testigo, sin el inhibidor.
- El grupo control (tratado solo con el vehículo utilizado para el agonista y antagonista) tendrá menor respuesta inmunitaria que el grupo testigo (infectado con nematodos)

## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Colecta y mantenimiento de larvas de gallina ciega y nematodos

Las larvas fueron colectadas de un campo de maíz en el estado de Guanajuato, México en el municipio de Jerécuaro ( $20^{\circ} 08' 58''$  N,  $100^{\circ} 30' 34''$  W). Se utilizó un tractor para remover la tierra, y una vez expuestas se colectaron larvas de aspecto saludable (Jiménez-Cortés et al., 2016). Después fueron colocadas en recipientes individuales con peat moss húmedo en un cuarto oscuro y a temperatura ambiente para monitorear la supervivencia durante un periodo de cuarentena (Trejo-Meléndez et al., 2023). El monitoreo consistió en observar cada tercer día a las larvas para separar aquellas infectadas con nematodos de *R. regina*, esto se realizó por tres meses (Lara-Reyes et al., 2021). Al final del periodo de cuarentena trabajamos únicamente con larvas no infectadas. Los nematodos que emergían de los cadáveres se recolectaron con trampas White y se mantuvieron en dos colonias: una mantenida con trozos de carne y la otra con pupas de *Tenebrio molitor* en cámaras Lumistel, en oscuridad a  $26^{\circ}\text{C}$  (Trejo-Meléndez et al., 2023). Ambas colonias están disponibles en el laboratorio de ecología evolutiva en la Escuela Nacional de Estudios Superiores, ENES, Unidad Morelia. Para realizar los experimentos utilizamos los nematodos obtenidos directamente de las trampas White.



Figura 1. Mapa del sitio de colecta. El sitio de colecta es un campo de maíz por el que pasa un cauce del río Lerma.

## 4.2 Experimento de toxicidad

Realizamos este experimento de manera independiente a los otros experimentos. Creamos tres grupos de 20 larvas de *P. polyphylla*. Nuestro primer grupo, el control, no recibió ningún tratamiento. Al segundo grupo, agonista, le inyectamos 2 µl de octopamina con una concentración de 10 nM a cada larva. Al tercer grupo, antagonista, le inyectamos 2 µl de Fentolamina con una concentración de 10 nM a cada larva. La fentolamina es un antagonista del receptor OA (octopamina) que suprime la respuesta inmunitaria de las células en insectos (Stanley & Kim, 2019). Después de la aplicación de los tratamientos, colocamos a las larvas de gallina ciega en cajas de seis pozos (Corning Inc.), cada pozo contenía 4 ml de agar-agar por pozo, el agar mantiene la humedad en el ambiente para las larvas y facilita el movimiento de los nematodos, evitando que ambos mueran por desecación. Registramos la supervivencia de las larvas cada 24 horas.

## 4.3 Experimento de infección

Para este experimento establecimos cuatro grupos de 20 larvas de *P. polyphylla* cada uno. Al primer grupo, el control, le aplicamos 15 µl tópicos de solución de Ringer, nuestro segundo grupo, el testigo, nos permite conocer la respuesta inmunitaria de las larvas de *P. polyphylla* ante la infección natural en campo por *R. regina*. Al grupo testigo le inyectamos 2 µl de solución de Ringer, al tercer grupo, el agonista, le inyectamos 2 µl de Octopamina a una concentración de 10 nM y al cuarto grupo, el antagonista, le inyectamos 2 microlitros de Fentolamina a una concentración de 10 nM. A los grupos testigo, agonista y antagonista después de 10 minutos les aplicamos 20 nematodos tópicos en 15 µl de solución Ringer para que los nematodos pudieran infectar a las larvas de gallina ciega. Después de aplicar los tratamientos las larvas fueron colocadas en cajas de seis pozos (Corning Inc) con 4 ml de agar-agar por pozo. Registramos la supervivencia de las larvas 24 horas después de la aplicación de los tratamientos.

## 4.4 Preparación de reactivos

Amortiguador de solución salina (PBS, Phosphate-buffered saline): Utilizamos las pastillas de Sigma Aldrich que se mantienen almacenadas a temperatura ambiente. Pusimos una pastilla en 250 ml de agua destilada a temperatura ambiente y revolvimos manualmente hasta que se disolviera la pastilla. Autoclavamos la solución y la almacenamos a 4°C.

Solución Ringer: Utilizamos pastillas de Sigma Aldrich que se mantienen almacenadas a temperatura ambiente. Pusimos una pastilla en 500 ml de agua destilada para obtener una solución con pH de 7 y revolvimos manualmente hasta que se disolviera la pastilla. Autoclavamos y almacenamos a 4°C.

Octopamina: Usamos el reactivo en polvo Octopamine hydrochloride de Sigma Aldrich que se mantiene almacenado a -4°C. Para obtener una concentración de 10 nM pesamos 0.001g de octopamina, hicimos una dilución seriada (ver apartado 4.5) en tubos eppendorf de 1000 µl con solución de Ringer. Almacenamos la solución preparada a -4°C y, al momento de trabajar con el reactivo lo mantuvimos en hielo.

Fentolamina (phentolamine): Usamos Phentolamine de Sigma Aldrich. Al preparar la solución de Fentolamina y al aplicar los tratamientos a las larvas es necesario trabajar en

condiciones de poca luz, ya que, el reactivo es fotosensible. Para una concentración de 10 nM pesamos 0.031g de Fentolamina y la colocamos en un vial de 1000 µl con solución de Ringer. Almacenamos la solución de Fentolamina en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. La fentolamina es un antagonista del receptor OA (octopamina) que suprime la respuesta inmunitaria de las células en insectos (Stanley & Kim, 2019).

Las concentraciones propuestas y la cantidad de Octopamina y Fentolamina están basadas en la evidencia obtenida en experimentos hechos con *Chilo suppressalis* (Huang et al., 2012).

#### **4.5 Diluciones seriadas**

Utilizamos seis viales de 1000 µl. El primer vial contenía 1000 µl de solución de ringer a temperatura ambiente. Los cinco viales restantes solo contenían 900 µl de solución ringer a temperatura ambiente. Al primer vial se agregan los gramos de cada reactivo pesado previamente, se mezclan con un vortex durante 30 segundos. Etiquetamos este vial como nuestro stock. Tomamos 100 µl del vial con el reactivo ya preparado y los colocamos en un segundo vial con 900 µl de solución ringer, los mezclamos con un vortex durante 30 segundos. Repetimos el mismo procedimiento con los viales 3-6. Utilizamos el reactivo del sexto vial ya que era el que tenía una concentración de 10 nM.

#### **4.6 Supervivencia**

Registramos la supervivencia de las larvas de *Phyllophaga polyphylla* 24 horas después de la aplicación de los tratamientos en cada experimento hasta la muerte de todos los individuos (Lara-Reyes et al., 2021).

#### **4.7 Número de hemocitos**

Extrajimos hemolinfa a cada larva 24 horas después de la aplicación de los tratamientos. Con una lanceta ACCU-CHECK Softclix hicimos una punción en la base de la tercera pata y tomamos 30 µl de hemolinfa y la colocamos en tubos eppendorf de 0.5 ml llenados previamente con 250 µl de PBS estéril. Hicimos dos pulsaciones en el vórtex para mezclar la hemolinfa con el PBS a una intensidad 2 para evitar lisis celular. Utilizamos el contador celular Automated Cell Counter-Bio-Rad TC20 y dual-chamber slides para conocer la cantidad total de hemocitos y la cantidad de hemocitos activos. Se utilizaron 5 µl de muestra y se mezclaron con 5 µl de azul de tripano (sirve para teñir muestras histológicas), en total se colocaron 10 µl en cada placa para su lectura. Las muestras se colocaron durante 10 minutos en la centrífuga a 5°C a 10,000 rpm para obtener una pastilla del tejido en la muestra. Separamos las muestras de las pastillas de tejido. Todas las muestras se preservaron a -70 °C para hacer pruebas de fenoloxidasa (PO) y actividad lítica, concentración de proteína para conocer los parámetros de la respuesta inmune.

#### **4.8 Actividad lítica**

Medimos la actividad lítica colocando 30 µl de muestra y 200 µl de *Micrococcus lysodeikticus* por pozo a 490 nm. En el software SkanIt (Thermo Scientific, 2015) establecimos el siguiente protocolo: agitación previa de 15 segundos con lecturas de cinco minutos durante media hora (Nicoletti et. al., 2020).

## 4.9 Fenoloxidasa

Para la prueba de PO colocamos 10  $\mu$ l de L-DOPA junto con la muestra en cada pozo de la microplaca de 96 pozos y medimos en un lector de microplacas a 490 nm. Utilizamos el mismo protocolo que seguimos para la actividad lítica establecido en Skalt (Nicoletti et. al., 2020).

## 4.10 Proteína

Usamos el Pierce BCA Protein Assay Kit de Thermo Scientific para obtener la concentración de proteína en  $\mu$ g/mL. Preparamos 30.28 mL del reactivo A+B en una proporción de 50:1 (2%) del reactivo A: B, colocando 29.69 mL del reactivo A y 594  $\mu$ L del reactivo B. En una microplaca hicimos la curva de estándares con concentraciones conocidas, la concentración final de albúmina de suero bovino (BSA) en cada pozo (A-H) fue: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 y 25  $\mu$ g/mL. En los pozos utilizados para medir la proteína de cada muestra colocamos 40  $\mu$ L de PBS + 150  $\mu$ L del reactivo A+B + 5  $\mu$ L de la curva de estándares + 5  $\mu$ L de muestra. Dejamos incubar por 25 minutos a temperatura ambiente e hicimos la lectura en el espectrofotómetro a 562 nm con agitación previa de 15 segundos en el software Skalt (Nicoletti et. al., 2020; Vara et al., 2015)

## 4.11 Análisis estadísticos

Analizamos los resultados en Rstudio y Past4.08, reportamos la media y  $\pm$  error estándar. Para cada parámetro que analizamos ajustamos los valores a un modelo lineal generalizado con probabilidad de distribución Gamma y una función logarítmica. El ajuste se hizo transformando la variable independiente a  $x + 1$  para disminuir los ceros y poder usar la función logarítmica. Hicimos pruebas post hoc con corrección de Bonferroni y probamos el efecto de los modelos con una prueba de  $\chi^2$ , con un nivel de significancia de 0.05 (Nicoletti et. al., 2020). Utilizamos los siguientes paquetes de Rstudio para hacer los modelos lineales generalizados: tidyverse (v1.3.0; Wickham et al., 2019), car(v3.1.3; Fox y Weisberg, 2019), FSA (v0.9.6; Ogle et al., 2025), ggpubr (v0.6.0.999; Kassambara, 2023), lme4 (v1.1.26; Bates et al., 2015) y sjPlot (v2.7.18; Lüdecke, 2024). Los datos de supervivencia los analizamos con la prueba de Log Rank y los paquetes de Rstudio: dplyr (v1.1.4; Wickham et al., 2023), survival (v3.2.7; Therneau, 2020), survminer (v0.5.0.999; Kassambara et al., 2024) y ggplot2 (v3.3.3; Wickham, 2016). Reportamos el valor de la prueba, los grados de libertad y el valor de significancia.

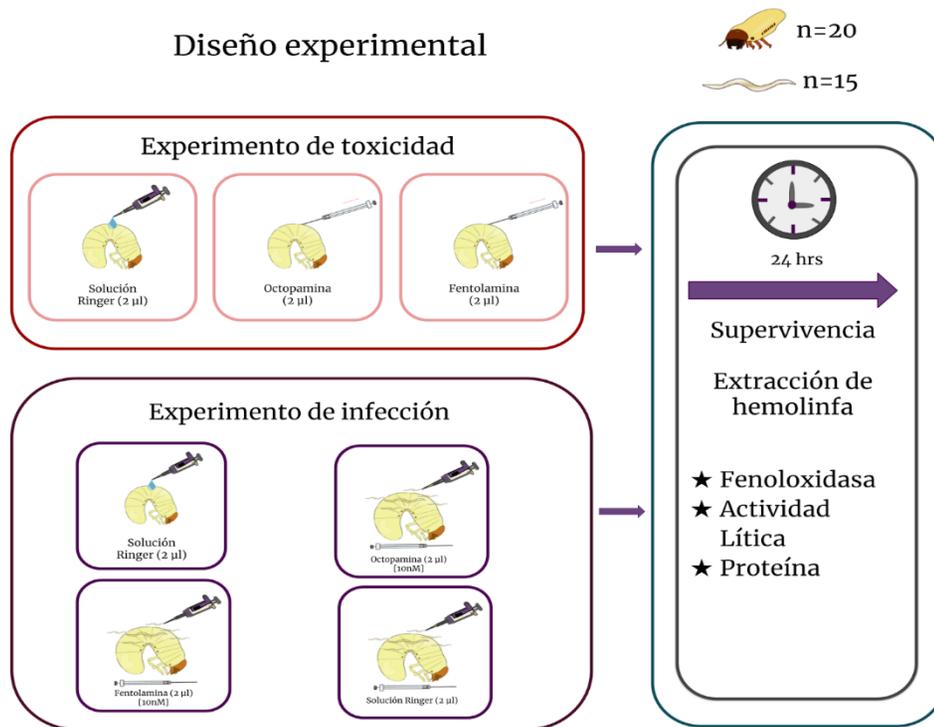


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental. Experimento de toxicidad: el grupo control recibió solución Ringer de manera tópica y los dos grupos experimentales (octopamina y fentolamina, respectivamente), recibieron el tratamiento inyectado. Experimento de infección el grupo control recibió solución Ringer de manera tópica y los dos grupos experimentales (octopamina y fentolamina), recibieron el tratamiento inyectado y nematodos tópicos, el grupo testigo sólo se infectó con nematodos tópicos. Se muestran los análisis que hicimos para conocer la respuesta inmune y cantidad de proteína.

## 5 Resultados

### 5.1 Supervivencia

En ausencia de infección, no encontramos diferencias significativas en la supervivencia de las larvas de *P. polyphylla* entre el grupo control y las larvas que recibieron el tratamiento con octopamina (agonista) o fentolamina (antagonista) (Log rank test = 2.47, d.f. = 2, p = 0.3). Sin embargo, al infectarlas con nematodos, el grupo tratado con octopamina vivió menos que el grupo testigo (Log rank test = 5.06, d.f. = 1, p = 0.02), pero no hubo diferencias entre el grupo testigo y el grupo con fentolamina (Log rank test = 0.6, d.f. = 1, p = 0.4).

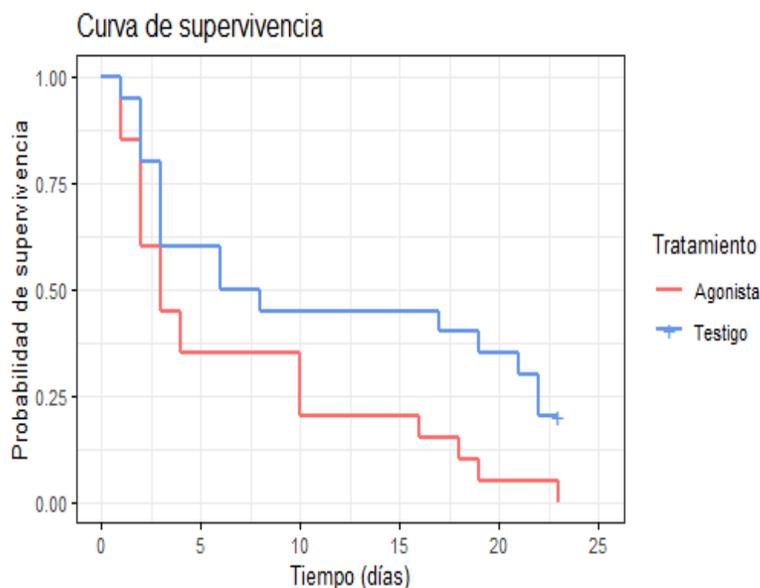


Figura 3. Curva de supervivencia de las larvas infectadas con nematodos del grupo tratado con octopamina (línea roja) y el grupo testigo (línea azul).

### 5.2 Número de hemocitos

En el experimento toxicidad no encontramos diferencias significativas en el número de hemocitos totales entre los grupos control ( $1079900 \pm 208332.7$  células/ $\mu\text{L}$ ), octopamina ( $1239930 \pm 498793.1$  células/ $\mu\text{L}$ ) y fentolamina ( $763220.1 \pm 240530.3$  células/ $\mu\text{L}$ ;  $\chi^2 = 2.74$ , d.f. = 55, p = 0.4), solamente hubo una diferencia significativa marginal en el porcentaje de hemocitos vivos entre los grupos control ( $1.86 \pm 1.53$  células/ $\mu\text{L}$ ), octopamina ( $0.33 \pm 0.04$  células/ $\mu\text{L}$ ) y fentolamina ( $0.29 \pm 0.04$  células/ $\mu\text{L}$ ;  $\chi^2 = 9.8014$ , d.f. = 55, p = 0.05). Sin embargo, al enfrentar a los insectos a nematodos, encontramos diferencias significativas en el número de hemocitos totales ( $\chi^2 = 9.89$ , d.f. = 57, p = 0.01) y en el porcentaje de hemocitos vivos ( $\chi^2 = 0.19$ , d.f. = 54, p = 0.01).

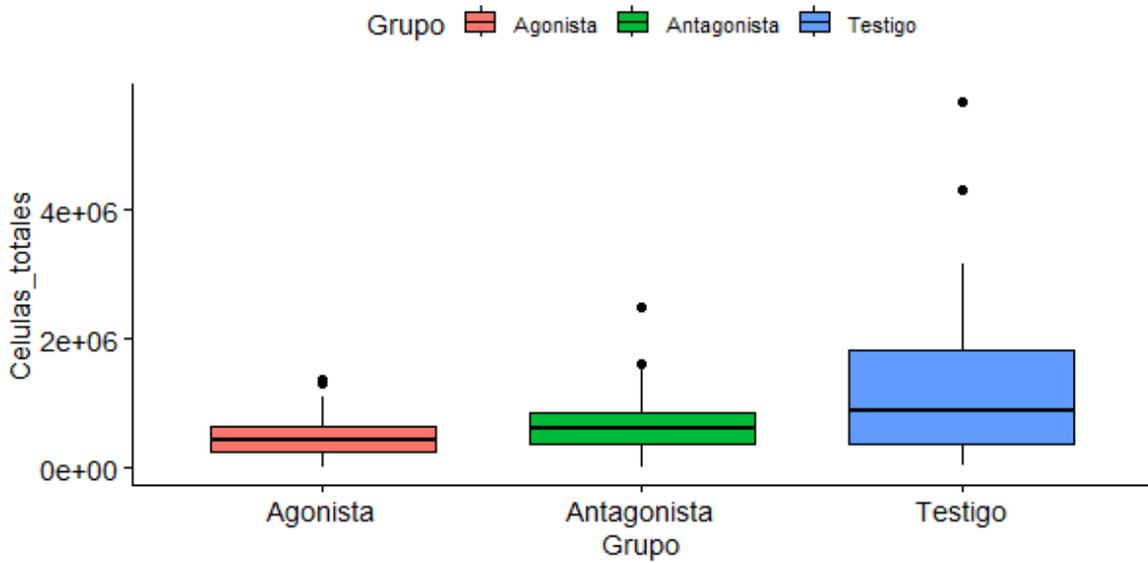


Figura 4. Número de hemocitos totales de las larvas del experimento de infección de los grupos tratados con octopamina ( $514000 \pm 84229.54$  células/ $\mu\text{L}$ ), fentolamina ( $723450 \pm 134338.8$  células/ $\mu\text{L}$ ) y el grupo testigo ( $1354950 \pm 337020.7$  células/ $\mu\text{L}$ ), 24 horas después de aplicar los tratamientos y nematodos.

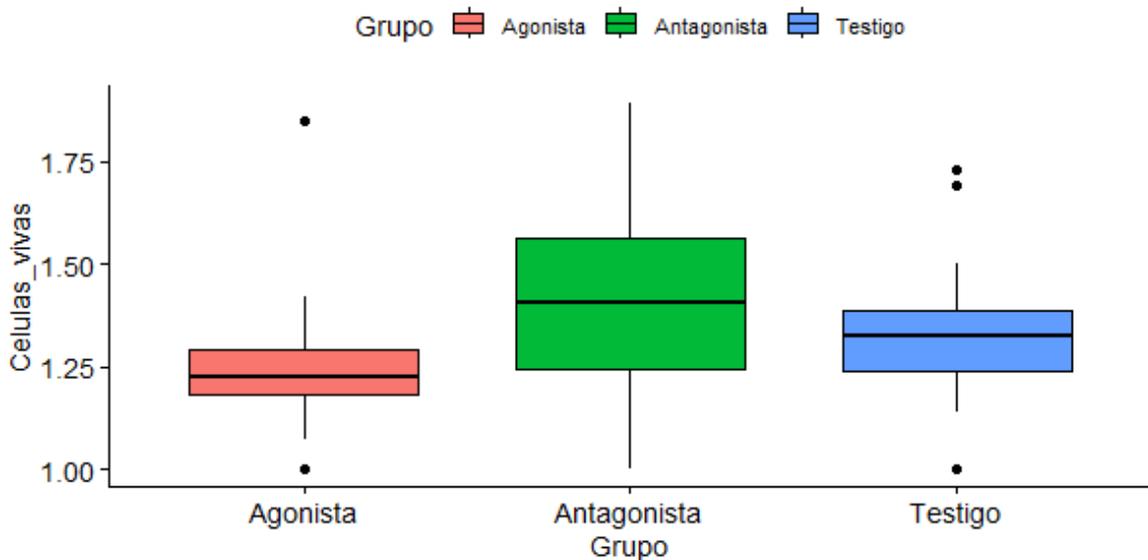


Figura 5. Porcentaje de hemocitos vivos de las larvas del grupo octopamina ( $0.24 \pm 0.03$  células/ $\mu\text{L}$ ), fentolamina ( $0.42 \pm 0.05$  células/ $\mu\text{L}$ ) y el grupo testigo ( $0.33 \pm 0.03$  células/ $\mu\text{L}$ ), del experimento de infección 24 horas después de aplicar los tratamientos y nematodos.

### 5.3 Actividad lítica

No encontramos diferencias significativas entre los grupos agonista ( $1.0031 \pm 0.0007$ ), antagonista ( $1.0048 \pm 0.001$ ) y control ( $1.004 \pm 0.001$ ) del experimento de toxicidad ( $\chi^2 = 2.72e-05$ , d.f. = 57,  $p = 0.4$ ). Tampoco encontramos diferencias significativas entre los grupos agonista ( $1.004 \pm 0.0007$ ), antagonista ( $1.003 \pm 0.0004$ ), testigo ( $1.00341 \pm 0.0004$ ) y control ( $1.003 \pm 0.0004$ ) del experimento de infección ( $\chi^2 = 1.11e-05$ , d.f. = 57,  $p = 0.3$ ).

## 5.4 Fenoloxidasa

No encontramos diferencias significativas entre grupos en el experimento de toxicidad entre grupo agonista ( $1.002 \pm 0.001$ ), antagonista ( $1.003 \pm 0.001$ ) o control ( $1.003 \pm 0.0009$ ), ( $\chi^2 = 8.04e-06$ , d.f. = 57,  $p = 0.8$ ). Tampoco hubo diferencias significativas ( $\chi^2 = 0.0003$ , d.f. = 57,  $p = 0.3$ ) entre los grupos agonista ( $1.008 \pm 0.007$ ), antagonista ( $1.01 \pm 0.003$ ), testigo ( $1.003 \pm 0.0033$ ) y control ( $1.02 \pm 0.007$ ) del experimento de infección.

## 5.5 Proteína

Encontramos diferencias significativas en la concentración de proteínas del experimento de toxicidad ( $\chi^2 = 2.81$ , d.f. = 57,  $p = 0.01$ ), entre el grupo agonista ( $0.84 \pm 0.06 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ) y el control ( $1.4 \pm 0.18 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ), pero, no entre el antagonista ( $0.98 \pm 0.09 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ) respecto al control. No detectamos diferencias entre los grupos agonista ( $0.53 \pm 0.05 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ), antagonista ( $0.65 \pm 0.07 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ), testigo ( $0.71 \pm 0.05 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ) y control ( $0.73 \pm 0.05 \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ) del experimento de infección ( $\chi^2 = 0.89$ , d.f. = 57,  $p = 0.1$ ).

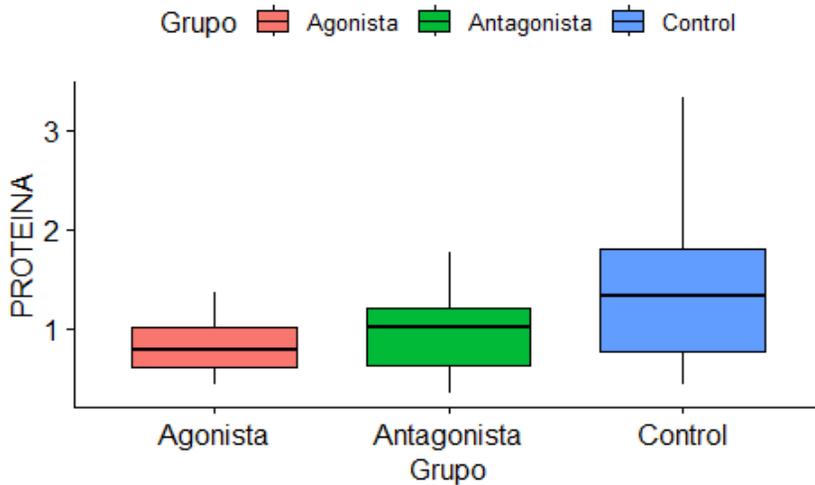


Figura 6. Concentración de proteína de las larvas del experimento de toxicidad tratadas solo con octopamina y fentolamina.

## 6 Discusión

### 6.1 Toxicidad

Nuestros resultados muestran que las larvas de *Phyllophaga polyphylla* que recibieron el tratamiento con octopamina y fentolamina no mueren por toxicidad de los reactivos, y no tienen un efecto en el número de hemocitos, actividad lítica o fenoloxidasa pero sí hubo diferencias significativas con la proteína. Esto es muy importante porque muestra que los tratamientos experimentales no afectan la respuesta inmunitaria de los hospederos en ausencia de infección, y porque los reactivos en las dosis que usamos no son tóxicos como para matar a los insectos. Este resultado se respalda con varios trabajos en los que utilizan fentolamina como agonista de la octopamina en concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y no reportan efectos negativos sobre la supervivencia de los individuos (Ormslaw y Elliott, 2006; Price y Berry, 2008; De Barros et al., 2012). También el resultado obtenido con octopamina se respalda con una revisión en la que muestran evidencia del efecto positivo de la octopamina sobre el funcionamiento metabólico y homeostasis de los invertebrados (Roeder, 2020). Esta explicación tiene sustento porque: 1) la octopamina se libera ante estímulos estresantes y 2) los efectos son dependientes de la dosis y la concentración administrada de octopamina (Roeder, 2020).

#### 6.1.1 La octopamina se libera ante estímulos estresantes

El estrés es una respuesta adaptativa del organismo antes efectos adversos (Mezheritskiy et al., 2024). En varios estudios en los que se ha sometido a invertebrados a estímulos estresantes (térmicos, parásitos y patógenos, inanición, anoxia, depredación y químicos) se han elevado los niveles de octopamina (Orchard et al., 1993; Davenport y Evans, 1984; Armstrong et al., 2006; Lubawy et al., 2020; Srithiphaphirom y Robertson, 2022; Cinel et al., 2020; Adamo, 2020). Esto sugiere que el sistema octopamiérgico se activa siempre en respuesta a cambios en el entorno que afectan negativamente a la supervivencia de los animales (Mezheritskiy et al., 2024). La octopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina y los invertebrados liberan octopamina en estado de estrés agudo. Esto se presenta cuando los animales alteran su fisiología de manera óptima ante comportamientos como la lucha y la huida en respuesta al peligro (Adamo, 2008). Recientemente se ha estudiado el papel modulador de la octopamina en conductas complejas en insectos estresados como comportamiento agresivo en situaciones de conflicto intraespecífico y el comportamiento de evitación cuando se encuentra con un depredador (Mezheritskiy et al., 2024). La respuesta al estrés tiene efectos inmunosupresores negativos para el organismo, porque las células inmunitarias de los invertebrados tienen receptores de octopamina, lo que sugiere que el papel de la octopamina en la modulación inmunitaria cumple una función adaptativa (Davenport y Evans, 1984; Adamo, 2008). Nuestros resultados del porcentaje de hemocitos vivos 24 horas después de aplicar los tratamientos, muestran que con la concentración utilizada los hemocitos están inactivos lo que puede indicar que no hay vigilancia inmunológica activa. Esto también parece ocurrir con en la actividad de la fenoloxidasa y la actividad lítica.

### 6.1.2 Efectos dependientes de la dosis y concentración de octopamina y fentolamina

Los hemocitos (células del sistema inmunitario de invertebrados que hacen fagocitosis) tienen receptores de octopamina de tipo adrenérgico acoplados a vías de señalización intracelulares (cAMP y Ca<sup>2+</sup>). La activación de estas vías es dependiente de la concentración de octopamina, por lo que existe un efecto dependiente de la concentración sobre la función inmunológica (Adamo, 2012 c), además, el estrés en invertebrados aumenta el nivel de octopamina en la hemolinfa (Davenport y Evans, 1994) y aumenta la proteína receptora de octopamina en los hemocitos, pero, no necesariamente mejora la respuesta inmunitaria (Hsu et al., 2024). La dependencia de la dosis y concentración de octopamina puede explicar nuestros resultados de supervivencia y número de hemocitos al aplicar únicamente los tratamientos experimentales sin parásitos ya que las inyecciones de octopamina con cantidades fisiológicas disminuyen la resistencia a patógenos (Adamo y Parsons, 2006).

Al aplicar solo los tratamientos experimentales (octopamina y fentolamina) no se activó la respuesta inmunitaria. Los resultados podrían deberse a que las larvas no fueron infectadas y no se activó la respuesta inmunitaria. Contrario a la vigilancia inmunitaria activa que esperábamos encontrar en las larvas tratadas con octopamina, encontramos que la respuesta inmunitaria no se activó al recibir el tratamiento. Este resultado es dependiente de la concentración de octopamina y fentolamina utilizadas y las necesarias para activar la respuesta inmunitaria, como se muestra en un trabajo realizado con *Mythimna separata* en el que encontraron que en concentraciones altas de fentolamina (1 µg/mL) la actividad de fenoloxidasa y la actividad de la lisozima disminuyen, mientras que en concentraciones menores (0.01 µg/mL), la actividad de fenoloxidasa y lisozima aumentan porque la fentolamina se reconoce como una sustancia ajena y no cumple su función inhibitoria (Kong et al., 2018).

### 6.1.3 Reconfiguración de vías fisiológicas

Encontramos que la concentración de proteínas de las larvas de *P. polyphylla* disminuye al aplicar octopamina respecto al grupo control. Esto sugiere que sí hay cambios fisiológicos en las larvas cuando les inducimos experimentalmente estrés (al inyectarles octopamina) sin exponerlas a un riesgo como parásitos. Este resultado se puede explicar por la reconfiguración de las vías fisiológicas, que establece que las hormonas del estrés optimizan las vías fisiológicas dependiendo el estado actual del organismo y las demandas competitivas sobre sus recursos porque así mantienen la función inmunitaria durante la reasignación de recursos (Adamo, 2012c). Esto podría deberse a cambios fisiológicos y conductuales por miedo a la infección (que mantienen a los individuos bajo estrés), ya que, son costosos energéticamente (Adamo y Shoemaker, 2000; Zanette y Clinchy, 2019) y porque los individuos podrían destinar sus recursos energéticos de manera diferencial. La asignación de recursos se puede ver en la relación estrés y la respuesta inmunitaria que está directamente relacionada con el tejido graso, porque la reserva energética lipídica está relacionada con la síntesis de inmunoproteínas, que puede ser afectada temporalmente en el estado de estrés agudo o permanentemente en estrés crónico por la asignación diferencial de recursos a rasgos costosos de la historia de vida del hospedero (Contreras et al., 2006). Por ejemplo, *Litopenaeus vannamei* bajo estrés térmico experimenta un aumento en el nivel de octopamina en la hemolinfa y de proteínas receptoras de octopamina, ya que la energía puede asignarse a otras funciones y disminuyen la energía disponible para combatir infecciones, además de volver disfuncionales las vías de señalización neuroendocrina (Hsu et al., 2024). Otro

ejemplo ocurre en grillos, cuando realizan actividades exhaustivas como la lucha y huida la octopamina y la hormona adipocinética inducen la movilización de lípidos, la proteína apolipoproteína III (apoLpIII) participa en la vigilancia inmunológica y el transporte de lípidos. El incremento en la liberación de lípidos induce a la apoLpIII a cambiar su conformación para mejorar transitoriamente su capacidad para transportar lípidos, pero disminuye su capacidad para la vigilancia inmunitaria lo que resulta en la disminución de la resistencia a enfermedades, sin embargo, la pérdida de apoLpIII como molécula de vigilancia inmunitaria se compensa con la inmuoestimulación de la octopamina y la hormona adipocinética (Adamo, 2008).

Con los resultados de la disminución en la concentración de proteínas en la hemolinfa de nuestro experimento de toxicidad es necesario considerar que los resultados observados pueden ser dependientes de la concentración utilizada de octopamina y fentolamina (como ya se había mencionado) y de la especie, además de tomar en cuenta que las hormonas del estrés a veces son inmunosupresoras (Kong et al., 2018; Adamo, 2012c). La interacción entre la octopamina y la hormona AKH interviene en procesos como la síntesis de inmunoproteínas y homeostasis de organismos bajo estrés, nuestros resultados se pueden atribuir al nivel de octopamina y AKH en la hemolinfa que pudieron ser alterados debido al tratamiento farmacológico que aplicamos a las larvas, sin embargo, es necesario medir los niveles de ambas hormonas para confirmar esta posibilidad. También proponemos que posiblemente esté ocurriendo una asignación diferencial de recursos, ya que, la activación del sistema de fenoloxidasa puede ser energéticamente costosa (Contreras-Garduño et al., 2006) y podría existir una disminución específica de proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria como la fenoloxidasa (Adamo, 2004 a). Además, los niveles altos de octopamina no necesariamente dan ventaja a las larvas para responder a la infección (Li- Yong et al., 2024; Enríquez et al., 2015). Es necesario considerar que los resultados observados pueden ser dependientes de la concentración utilizada para la octopamina y fentolamina y de la especie, además de tomar en cuenta que las hormonas del estrés a veces son inmunosupresoras (Kong et al., 2018; Adamo, 2012c).

## **6.2 Infección**

Los resultados del experimento de infección muestran que las larvas del grupo agonista tratadas con octopamina e infectadas con nematodos murieron antes que las larvas del grupo testigo en el que simulamos la infección natural y que las larvas del grupo antagonista, tratadas con fentolamina e infectadas con nematodos. Además, las larvas del grupo de octopamina presentaron menos hemocitos totales y menor porcentaje de hemocitos vivos 24 horas después de la infección. Finalmente, no encontramos diferencias significativas entre grupos en la actividad de la fenoloxidasa, la actividad lítica y la concentración de proteínas totales en la hemolinfa. A continuación, se discuten las posibles explicaciones de los resultados.

### **6.2.1 Capacidad de reconocimiento del sistema inmunitario**

La resistencia a la infección depende de la capacidad del sistema inmunitario para reconocer a los invasores (Adamo, 20004b). Nuestros resultados indican que *P. polyphylla* no muestra resistencia contra las bacterias mutualistas de *R. regina*. La falta de resistencia a la infección

puede explicarse por la estrategia parasitaria de los nematodos, una vez que ellos encuentran a su hospedero entran por las aperturas naturales de este y evaden las primeras barreras no inmunitarias físicas (cutícula y epicutícula) y conductuales de su hospedero. Cuando los nematodos están en el hemocele vomitan a sus bacterias simbiotas quienes infectan al hospedero. Esta estrategia permite a las bacterias no ser reconocidas por el sistema inmunitario previamente a la infección (Coates et al., 2022). Una vez que el nematodo encuentra a su hospedero, comienza la competencia entre las estrategias infectivas del huésped y de defensa a la infección del hospedero.

### **6.2.2 Resistencia a la infección**

No encontramos diferencias significativas entre nuestros grupos experimentales, por lo tanto, los resultados que obtuvimos al aplicar a las larvas los tratamientos experimentales e infectarlas con nematodos son contrarios a nuestras predicciones. No obstante, en estudios de ecoinmunología es importante considerar que uno o algunos de los parámetros de la respuesta inmune pueden no arrojar diferencias biológicamente significativas y esto, no significa que los animales no activan la respuesta inmunitaria contra patógenos y parásitos (Adamo, 2004b). Con los resultados de respuesta inmunitaria podemos establecer correlaciones entre una medida inmunitaria y la resistencia a infecciones, pero, la interpretación es compleja porque los resultados dependen de factores ecológicos como la disponibilidad de recursos y la asignación de energía para la respuesta inmunitaria (Adamo, 2004 a). Los resultados de fenoloxidasa y actividad lítica indican que las larvas no tienen resistencia a la infección por bacterias simbiotas de los nematodos y la causa puede multifactorial como lo discutimos en las secciones arriba y también puede tratarse de la especificidad de la respuesta a un patógeno u otro, ya que, en vida libre, las gallinas ciegas se enfrentan a distintos patógenos. Esto abre posibilidades de nuevos estudios, por ejemplo, 1) probar la especificidad de la respuesta inmunitaria a los principales hongos entomopatógenos que infectan a las gallinas ciegas en campo, 2) retar a las larvas de *Phyllophaga polyphylla* para generar priming y ver la respuesta inmunitaria ante un segundo reto letal para conocer si existe memoria inmunitaria.

### **6.2.3 Manipulación de vías fisiológicas por parásitos**

Para que las estrategias utilizadas por los parásitos para infectar y manipular a sus hospederos se mantengan a través del tiempo y se seleccionen, estas deben favorecerlos incrementando su adecuación, es decir, que se favorezca su reproducción y supervivencia (Poulin, 2010). La manipulación parasitaria puede tener costos fisiológicos para los parásitos que pueden limitar su evolución, tratar de evadir estos costos puede explicar la aparición de estrategias novedosas menos costosas, como utilizar compuestos necesarios para la supervivencia del hospedero. Esta estrategia funciona cuando el parásito manipula conexiones inmunológicas-neuronales de su hospedero. Los parásitos son capaces de manipular vías fisiológicas bidireccionales a través de aminas biogénicas como la octopamina (Adamo, 2012). Es posible que *R. regina* siga esta estrategia que induce a las larvas de *P. polyphylla* a aumentar y/o mantener elevados los niveles de octopamina. De forma similar, la acción de la avispa *Cotesia congregata* que reduce la degradación de la octopamina, incrementando el tiempo que los niveles de octopamina permanecen elevados (Adamo, 2005). Manipular la octopamina puede ser una estrategia muy efectiva por la importancia de esta amina biogénica que actúa como neurotransmisor en el encendido de la linterna de las luciérnagas (Nathanson, 1979) y en los cuerpos cardíacos de las langostas (Carlsen et al., 1979; Orchard y Loughton

1981). Su función como neurohormona está descrita en cucarachas y langostas en las que controla la liberación de trehalosa (Downer, 1979) y lípidos del cuerpo graso (David y Lafon-Cazal, 1979; Downer, 1979; Orchard et al., 1981; Goosey y Candy 1980). Además, actúa como neuromodulador en el sistema locomotor de insectos al ser detectada por receptores en neuronas octopaminérgicas que inhiben el ritmo miogénico de contracción y relajación de las fibras musculares (Pfluger y Stevenson, 2005). Además, la octopamina está relacionada con conductas de lucha y huida (Adamo, 1995) y es importante en respuestas generales de excitación (Orchard, 1981). Otro ejemplo del uso de mecanismos económicos para los parásitos es en gamáridos infectados a los que una variedad filogenética de parásitos conduce a aumentar la producción de serotonina (otra amina biogénica) en el SNC, de esta manera los parásitos no necesitan producir ningún compuesto para alterar la neuroquímica de su hospedero (Lefèvre et al., 2009). Los mecanismos de manipulación de la conducta que son favorecidos por la evolución, no son limitantes en la historia de vida de los parásitos y evitan transferir costos a su descendencia (Poulin, 2010).

### **6.3 Perspectivas a futuro**

Identificamos áreas de investigación para mejorar el diseño experimental de nuestro trabajo. En un artículo con *Gryllus texensis* (Adamo, 2004) primero infectaron a los individuos y después aplicaron el tratamiento con octopamina, además de que usaron diferentes concentraciones de octopamina. Seguir este diseño experimental permitirá conocer la concentración necesaria para inducir la respuesta inmune en *P. polyphylla* y que sea aprovechada como inmunomodulador, para que, de esta manera, esta amina biogénica sea metabolizada. Además, consideramos que podemos conocer el efecto agudo y crónico de los agonistas y antagonistas de la respuesta inmune en invertebrados extrayendo hemolinfa en distintos tiempos después de la infección. Para entender mejor la manipulación neuroinmunológica de las larvas y de los nematodos hacia las larvas es necesario hacer pruebas de el efecto de la octopamina sobre la conducta de *P. polyphylla*. En estudios futuros podría probarse si los hongos patógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* afectan la neuroinmunomodulación, además de medir más parámetros de la respuesta inmune, como los péptidos antimicrobianos y parámetros de la condición de las larvas como el estrés oxidativo.

## 7 Conclusión

Nuestro trabajo muestra neuroinmunomodulación mediante la octopamina que puede ser alterada por los nematodos, ya que, tienen la capacidad de utilizar vías fisiológicas importantes para el desarrollo y supervivencia de las larvas que se activan en respuesta al miedo. Además, sugiere que la inmunomodulación es dependiente de la concentración de la octopamina y fentolamina. Los estudios sobre la respuesta anticipatoria de los animales cuando sienten miedo permiten entender la coevolución de las estrategias de defensa ante parásitos y de infección, además, estudiar los mecanismos fisiológicos de la respuesta al miedo permite explicar por qué algunas estrategias se seleccionan a través del tiempo y cómo los animales buscan mantener su adecuación. En el caso de invertebrados con metamorfosis hemi u holometábola es interesante entender los mecanismos que siguen en cada etapa de desarrollo hasta ser adultos reproductivos. Esta perspectiva abre grandes oportunidades para seguir incursionando en el estudio de la respuesta inmune de los animales según su etapa de desarrollo.

Algo que debemos considerar es que las larvas con las que trabajamos provienen del campo y es posible que los resultados que encontramos dependan de factores ambientales que desconocemos previos a la colecta que pueden afectar los rasgos de la historia de vida.

Finalmente, entender las interacciones bióticas utilizando modelos de estudio con interacciones complejas como el de las gallinas ciegas (*Phyllophaga polyphylla*), el nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* y sus bacterias simbiotas puede ser un reto, sin embargo, brindan conocimiento sobre posibles efectos en las redes tróficas, los flujos de materia y energía en los ecosistemas, la importancia de conservar el nicho ecológico de los organismos porque responden bioquímicamente a estímulos estresores y brinda nuevas perspectivas que pueden aplicarse en áreas como el control biológico.

## 8 Referencias

Adamo, S.A., Linn, C.E., Hoy, R.R., (1995). The role of neurohormonal octopamine during 'fight or flight' behaviour in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Experimental Biology*. 198, 1691–1700.

Adamo, S. A., & Shoemaker, K. L. (2000). Effects of parasitism on the octopamine content of the central nervous system of *Manduca sexta*: a possible mechanism underlying host behavioural change. *Canadian Journal of Zoology*. 78, 1580-1587.

Adamo, S. A. (2004 a). Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insect Physiology*. 50, 209–216.

Adamo, S. A. (2004 b). How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour*. 68, 1443–1449.

Adamo, S. A. (2005). Parasitic suppression of feeding in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: parallels with feeding depression after an immune challenge. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 60, 185-197.

Adamo, S. A., & Parsons, N. M. (2006). The emergency life-history stage and immunity in the cricket, *Gryllus texensis*. *Animal Behaviour*. 72, 235-244.

Adamo, S. A. (2008). Norepinephrine and octopamine: linking stress and immune function across phyla. *Invertebrate Survival Journal*. 5, 12-19.

Adamo, S. A. (2010). Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior, and Immunity*. 24, 194-200.

Adamo, S. A. (2012 a). Parasites: evolution's neurobiologists. *Journal of Experimental Biology*. 216, 3–10.

Adamo, S. A. (2012 b). The strings of the puppet master: how parasites change host behaviour. In *Parasitic Manipulation* (ed. D. Hughes and F. Thomas). 36-51. Oxford: Oxford University Press

Adamo, S. A. (2012 c). The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection. *Hormones and Behavior*. 62, 324–330.

Adamo, S.A. (2020). Animals have a Plan B: How insects deal with the dual challenge of predators and pathogens. *Journal of Comparative Physiology B*. 190, 381–390.

Armstrong, G.A.B. and Robertson, R.M. (2006). A role for octopamine in coordinating thermoprotection of an insect nervous system. *Journal of Thermal Biology*. 31, 149–158.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. 67(1).

Boemare, N. 2002. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: *Entomopathogenic Nematology*. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). 311-326

Cant, M. A. (2010). The role of threats in animal cooperation. *Proceedings of the Royal Society B*. 278, 170–178.

Carlsen, J., W. S. Herman, M. Christensen, and L. Joseffson. (1979). Characterisation of a second peptide with adipokinetic and red pigment concentrating activity from the locust *corpura cardiaca*. *Insect Biochemistry*. 9, 497-501

Castelo, M. K., & Crespo, J. E. (2012). Incidence of non-immunological defenses of soil white grubs on parasitism success of *Mallophora ruficauda* larva (Diptera: Asilidae). *Insects*. 3, 692-708.

Černý, J., Krishnan, N., Hejníková, M., Štěřbová, H., & Kodrík, D. (2024). Modulation of response to braconid wasp venom by adipokinetic hormone in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 285, 110005.

Cinel, S.D., Hahn, D.A., and Kawahara, A.Y. (2020). Predator-induced stress responses in insects: A review, *Journal of Insect Physiology*. 122, 104039.

Coates, C. J., Rowley, A. F., Smith, L. C., & Whitten, M. M. (2022). Host defences of invertebrates to pathogens and parasites. *Invertebrate pathology*, 1.

Contreras-Garduño, J., Canales-Lazcano, J., & Córdoba-Aguilar, A. (2006). Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*. *Journal of Ethology*. 24, 165-173.

Cornet, S., Biard, C., & Moret, Y. (2008). Variation in immune defence among populations of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Oecologia*. 159, 257–269.

Cubillo-Martínez, A. A., Pereyra, M. A., Garfías, Y., Guluarte, C., Zenteno, E., & Sánchez-Salgado, J. L. (2022). Extracellular traps involved in invertebrate immune mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 380-386.

Davenport, A. P., & Evans, P. D. (1984). Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph. *Insect Biochemistry*. 14, 135–143.

Demas, G., & Nelson, R. (Eds.). (2012). *Ecoimmunology*. OUP USA.

Downer, R. G. H. (1979). Induction of hypertrehalosemia by excitation in *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology*. 25, 59-63.

Downer, R. G. H. (1979) Trehalose production in isolated fatbody of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 62C, 3, 1-34.

Eleftherianos, I., Heryanto, C., Bassal, T., Zhang, W., Tettamanti, G., & Mohamed, A. (2021). Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*, 164, 401-432.

Enríquez-Vara, J. N., Contreras-Garduño, J., Guzmán-Franco, A. W., Córdoba-Aguilar, A., Alatorre-Rosas, R., & González-Hernández, H. (2015). Temporal Variation in Immune Components of the White Grub *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae). *Neotropical Entomology*. 44, 466–473.

Farooqui, T. (2007). Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. *Neurochemical Research*. 32, 1511-1529.

Fox, J, Weisberg, S (2019). *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA.

Goosey, M. W., and D. J. Candy. (1980). The D-octopamine content of the haemolymph of the locust, *Schistocerca americana* gregaria and its elevation during flight. *Insect Biochemistry*. 10, 393-397

Huang, J., Wu, S. F., Li, X. H., Adamo, S. A., & Ye, G. Y. (2012). The characterization of a concentration-sensitive  $\alpha$ -adrenergic-like octopamine receptor found on insect immune cells and its possible role in mediating stress hormone effects on immune function. *Brain, Behavior, and Immunity*. 26, 942-950.

Hsu, L. Y., Kuo, H. W., & Cheng, W. (2024). Expression of octopamine/tyramine receptors and immune regulation in *Litopenaeus vannamei* under acute and chronic thermal stress. *Developmental & Comparative Immunology*. 158, 105195.

Jiménez-Cortés, J. G., Canales-Lazcano, J., Lara-Reyes, N., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., & Contreras-Garduño, J. (2016). Microbiota from *Rhabditis regina* may alter nematode entomopathogenicity. *Parasitology Research*. 115, 4153-4165.

Kassambara A (2023). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.0.999.

Kassambara A, Kosinski M, Biecek P (2024). survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.5.0.999.

Kaya, H. K. (1990). Soil ecology. In: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Gaugler R.; Kaya, H. K. (Eds). Boca Raton (USA), CRC Press. 93-115.

Kaya, H. K. y Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*. 38, 181-206.

Kong, H., Dong, C., Tian, Z., Mao, N., Wang, C., Cheng, Y., & Luo, L. (2018). Altered immunity in crowded *Mythimna separata* is mediated by octopamine and dopamine. *Scientific Reports*. 8, 3215.

- Lara-Reyes, N., Jiménez-Cortés, J. G., Canales-Lazcano, J., Franco, B., Krams, I., & Contreras-Garduño, J. (2021). Insect immune evasion by Dauer and Nondauer entomopathogenic nematodes. *The Journal of Parasitology*. 107, 115-124.
- Lefèvre, T., Adamo, S. A., Biron, D. G., Missé, D., Hughes, D. and Thomas, F. (2009). Invasion of the body snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. *Advances in Parasitology*. 68, 45-83.
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198, 10-24.
- Lopes, P. C. (2023). Anticipating infection: How parasitism risk changes animal physiology. *Functional Ecology*. 37, 821–830.
- Lubawy, J., Urbański, A., Colinet, H., Pflüger, H.J., and Marciniak, P. (2020). Role of the insect neuroendocrine system in the response to cold stress. *Frontiers in Physiology*. 11, 376.
- Lüdecke D (2024). sjPlot: Data Visualization for Statistics in Social Science. R package version 2.8.17.
- Marín Jarillo, A., & Bujanos Muñiz, R. (2008). Especies del complejo "gallina ciega" del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura técnica en México*. 34, 349-355.
- Miles, C. I., Chen, W. P., Adamo, S. A., Kester, K. M., & Miller, D. W. (2023). *Manduca sexta* caterpillars parasitized by the wasp *Cotesia congregata* stop chewing despite an intact motor system. *The Journal of Experimental Biology*. 226, jeb245716.
- Mezheritskiy, M. I., Vorontsov, D. D., Dyakonova, V. E., & Zakharov, I. S. (2024). Behavioral functions of octopamine in adult insects under stressful conditions. *Biology Bulletin Reviews*. 14, 535-547.
- Nakhleh, J., El Moussawi, L., & Osta, M. A. (2017). The melanization response in insect immunity. *Advances in insect physiology*, 52, 83-109.
- Nathanson, J. A., and E. J. Hunnicutt. (1979). Neural control of light emission in *Photuris* larvae: identification of octopamine-sensitive adenylate cyclase. *Journal of Experimental Zoology*. 208, 255-262.
- Ogle DH, Doll JC, Wheeler AP, Dinno A (2025). FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods. R package version 0.9.6.
- Orchard, I., B. G. Loughton, and R. A. WEBB. (1981). Octopamine and short-term hyperlipaemia in the locust. *General and Comparative Endocrinology*. 45, 175–180.
- Orchard, I. (1981). Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator. *Canadian Journal of Zoology*. 60, 659–669.
- Orchard, I., Ramirez, J.M., and Lange, A.B. (1993). A multifunctional role for octopamine in locust flight. *Annual Review of Entomology*. 38, 227–249.

- Pflüger, H.-J., & Stevenson, P. A. (2005). Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. *Arthropod Structure & Development*. 34, 379–396.
- Poulin, R. (2000). Manipulation of host behavior by parasites: a weakening paradigm?. *Proceedings of the Royal Society B*. 267, 787–792.
- Poulin, R. (2010). Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. *Advances in The Study of Behavior*. 41, 151–186.
- Roeder, T. (2020). The control of metabolic traits by octopamine and tyramine in invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 223.
- Salgado-Farias, F., Rosete-Enríquez, M., Yanes-Gómez, G., & Romero-López, A. A. (2023). Review of Adult *Phyllophaga* Based on Morphological and Molecular Taxonomy. *Southwestern Entomologist*. 48, 593-604.
- Schulte, F., & Poinar, G. O. (1991). Description of *Rhabditis (Rhabditoides) regina* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae) from the body cavity of beetle larvae in Guatemala. *Revue de Nématologie*. 14, 151-156.
- Schmid-Hempel, P. (2021). *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford University Press.
- Schmid-Hempel, P. (2008). Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends in Ecology & Evolution*. 23, 318-326.
- Stanley, D., & Kim, Y. (2019). Insect prostaglandins and other eicosanoids: From molecular to physiological actions. In *Advances in Insect Physiology*. Academic Press. 56, 283-343.
- Srithiphaphirom, P. and Robertson, R.M. (2022). Rapid cold hardening delays the onset of anoxia-induced coma via an octopaminergic pathway in *Locusta migratoria*, *Journal of Insect Physiology*. 137, 104360.
- Tamayo-Sánchez, F., Tamayo-Mejía, F., Marín-Jarrillo, A., Santillán-Galicia, M. T., Pérez-Valdez, A., & Guzmán-Franco, A. W. (2022). Dynamics of natural infection of white grub larvae by *Beauveria* and *Metarhizium* in maize crops from Mexico. *Biocontrol Science and Technology*. 32, 1177-1193.
- Thermo Scientific. (2015). *SkanIt Software for Microplates Readers, Technical Manual*. Software version 4.1.
- Therneau, T. M. (2020). *A Package for Survival Analysis in R*. R package version 3.2.7.
- Trejo-Meléndez, VJ, Méndez-López, TT & Contreras-Garduño, J. (2023). The Coincidental Evolution of Virulence Partially Explains the Virulence in a Generalist Entomopathogenic. *Acta Parasitológica*. 68, 293–303.

Yu, P., Iwanami, T., Yazaki, H., Tsubuki, M., Saito, K., & Hayashi, F. (2023). Cost of defensive spraying by larval *Osmylus hyalinatus* (Neuroptera: *Osmylidae*) for post-larval development. *Journal of Ethology*. 41, 129–139.

Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (2nd ed.) [PDF]. Springer International Publishing.

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*. 4 (43), 1686. R package version 1.3.0.

Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.1.4.

Zanette, L. Y., & Clinchy, M. (2019). Ecology of fear. *Current Biology*. 29, R309–R313.

Zanette, L. Y., & Clinchy, M. (2020). Ecology and neurobiology of fear in free-living wildlife. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 51, 297–318.