

Tesis Doctoral

Modulación del comportamiento alimentario en hormigas: fisiología de la ingestión de néctar

Falibene, Agustina L.

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Falibene, Agustina L.. (2012). Modulación del comportamiento alimentario en hormigas: fisiología de la ingestión de néctar. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Falibene, Agustina L.. "Modulación del comportamiento alimentario en hormigas: fisiología de la ingestión de néctar". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Modulación del comportamiento alimentario en hormigas:
fisiología de la ingestión de néctar**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área Ciencias Biológicas

Agustina L. Falibene

Director de tesis: Dra. Roxana B. Josens

Consejero de estudios: Dr. Walter M. Farina

Grupo de Estudio de Insectos Sociales. IFIBYNE-CONICET.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Buenos Aires, 2012

Modulación del comportamiento alimentario en hormigas: fisiología de la ingestión de néctar

Resumen

La alimentación es un comportamiento complejo cuya regulación involucra la integración de factores externos e internos. En insectos sociales este comportamiento no solo varía de acuerdo a las características del alimento y las condiciones ambientales sino que también de acuerdo a los requerimientos de la colonia. En este trabajo combinamos estudios de comportamiento, electrofisiológicos, farmacológicos e inmunocitoquímicos para estudiar cómo distintos factores afectan la ingestión de soluciones azucaradas en la hormiga *Camponotus mus*. Nuestros estudios mostraron que el ayuno de la colonia determina la motivación recolectora de la hormiga forrajera modificando la concentración umbral de aceptación y su comportamiento de ingestión no solo de soluciones azucaradas sino también de cebos tóxicos. Durante la ingestión, el accionar de la bomba de succión estuvo determinado por el ayuno de la colonia, la temperatura ambiental, la concentración de sacarosa y la presencia de tóxico en la solución. Cambios en estas variables dieron lugar a variaciones en la velocidad y el tiempo de ingestión a través de la modulación de la frecuencia de bombeo, el volumen de solución incorporado por cada bombeo o el número de bombeos totales. Indagamos sobre los mecanismos neuroendócrinos involucrados y encontramos un efecto depresivo de la serotonina sobre la ingestión. También observamos la presencia de neuronas serotoninérgicas en los centros nerviosos involucrados en el control de la alimentación e inervaciones serotoninérgicas a lo largo del tubo digestivo. En conjunto, estos resultados nos permiten una comprensión integral de cómo distintos factores modelan el comportamiento de ingestión en hormigas y cómo esto se integra con estrategias de recolección eficientes en condiciones siempre cambiantes.

Palabras clave: hormigas, ingestión de néctar, bomba de succión, umbral de aceptación de azúcar, tóxicos, temperatura, serotonina, canal alimentario, ganglio frontal, ganglio subesofágico

Feeding behaviour modulation in ants: physiology of nectar ingestion

Abstract

Feeding is a very complex behaviour and its regulation requires the integration of both internal and external factors. Social insects present a special case: not only do the quality of food and the environmental conditions determine their feeding behaviour, but also the colony's requirements. In the present work we combined behavioural, electrophysiological, pharmacological and immunocytochemical studies in order to investigate how different factors affect the nectar ingestion in the ant *Camponotus mus*. Our results showed that colony starvation determines forager motivation by modifying its acceptance threshold and its feeding behaviour not only of sucrose solutions but also of toxic baits. During ingestion, sucking pump activity was determined by colony starvation level, ambient temperature, sucrose concentration and presence or not of toxic in the ingested solution. Changes in these variables prompted variations in the intake rate and the feeding time by modulating the pumping frequency, the volume uptake per pump contraction or the total number of pump contractions. We explored the neuroendocrine mechanisms involved in this regulation and we found a depressant effect of serotonin on food intake. We also observed the presence of serotonin immunoreactive cell bodies on the main nervous centres involved in feeding control and serotonergic innervation along the digestive tube. Altogether, these results allow for an integral understanding of how different factors model feeding behaviour in ants and how this articulates with efficient foraging strategies in ever-changing conditions.

Key words: ants, nectar ingestion, sucking pump, sucrose acceptance threshold, toxics, temperature, serotonin, alimentary canal, frontal ganglion, suboesophageal ganglion

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, Roxy, por guiar mi trabajo y darme siempre la libertad de explorar en mis inquietudes. Gracias por confiar en mi.

Gracias a Walter por sus enseñanzas y por estar siempre disponible para nosotros.

A todos los que comparten o compartieron el día a día en el labo durante los últimos 8 años en los cuales supimos ser excelentes compañeros y amigos: Vane, Andre, Pau, Gaby, Sol, Gonza, Fran, Agus Junior, Caro, Yiyita, Cin, Fer, Ana, JuanP, Nel, Yai, Sofi y Tito. Gracias por cada momento, mate, charla, discusión, risa. Todos han marcado mi vida de alguna forma; me los llevo conmigo!

Agradezco al Dr. Wolfgang Rössler por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. A todo su grupo, especialmente a Claudia Groh y a Thomas Münz, por tratarme como un miembro más del grupo y ayudarme con los experimentos. Gracias al Dr. Flavio Roces por la ayuda brindada antes y durante mi estadía. Y mil gracias a Martín Bollazzi por su entrañable compañía. Todos hicieron de mi estadía en Alemania una hermosa experiencia.

Gracias a mi familia, mamá Nora, mis hermanas y hermanos Pau, Pablín, Fran y Jor, el Tío Tato y Flor por apoyarme siempre y creer en mí. Gracias a Rosangela, Robert y la Nona por su constante apoyo y ayuda.

A mis hermanos del alma Marie y Javi que siempre están incondicionalmente a mi lado; a Loli y Nahui por llenarme de amor.

A Andre, por ser mi compañero y sostén.

ÍNDICE

1. Introducción general.....	8
1.1. Insectos sociales.....	8
1.1.1. Organización de la colonia	8
1.1.2. Recolección de alimento en insectos sociales.....	9
1.1.3. Flujo de información y motivación de las obreras forrajeras.....	10
1.2. Alimentación en hormigas	12
1.2.1. Hormigas carpinteras (género <i>Camponotus</i>)	13
1.2.2. Mecanismos de ingestión de soluciones azucaradas.....	13
1.3. La bomba de succión	15
1.4. El canal alimentario	16
1.4.1. Morfología del tubo digestivo	16
1.4.2. Músculos del tubo digestivo	18
1.5. Actividad muscular en insectos	20
1.5.1. Inervación y contracción muscular	20
1.5.2. Neuromodulación	21
1.6. Control nervioso del tubo digestivo.....	22
1.7. Objetivos.....	23
1.7.1. Objetivos generales	23
1.7.2. Objetivos particulares	24
2. Materiales y métodos generales	26
2.1. Animales	26
2.2. Registro de la actividad eléctrica de la bomba de succión.....	27
2.2.1. Procedimiento experimental	27
2.2.2. Dispositivo de registro.....	28
2.2.3. Análisis de las señales eléctricas	30
3. Bomba de succión y regulación del comportamiento alimentario	32
3.1. Introducción.....	32
3.1.1. Objetivos	33
3.2. Materiales y Métodos.....	33
3.2.1. Series experimentales	33
3.2.2. Variables y parámetros	34
3.2.3. Análisis estadístico	35
3.3. Resultados.....	36
3.3.1. Efecto del ayuno de la colonia.....	36
3.3.2. Efecto de la concentración.....	40
3.4. Discusión	43

3.4.1. Modulación de la actividad de la bomba de succión	43
3.4.2. Modelos de control de la bomba de succión.....	45
3.4.3. Estrategias de recolección y modulación del comportamiento alimentario	45
3.4.4. Reglas de decisión durante la recolección	46
4. Ingestión de cebos tóxicos	48
4.1. Introducción	48
4.1.1. Objetivos particulares	50
4.2. Materiales y métodos	50
4.2.1. Borato de Sodio	50
4.2.2. Comparación entre tóxicos	51
4.2.3. Análisis estadístico	52
4.3. Resultados	52
4.3.1. Borato de Sodio	52
4.3.2. Comparación entre tóxicos	54
4.4. Discusión	59
5. Umbrales de aceptación de sacarosa	61
5.1. Introducción	61
5.1.1. Objetivos	63
5.2. Materiales y Metodos.....	64
5.2.1. Respuesta a la estimulación en palpos y antenas	64
5.2.2. Umbral de aceptación de sacarosa (UAS): efecto de la reserva de azúcares	66
5.2.3. Análisis estadístico	67
5.3. Resultados	68
5.3.1. Respuesta a la estimulación en palpos y antenas	68
5.3.2. UAS. Efecto del nivel de reserva de azúcar.....	69
5.4. Discusión	70
6. Efecto de la temperatura sobre el comportamiento alimentario	73
6.1. Introducción	73
6.1.1. Objetivos	74
6.2. Materiales y Métodos.....	74
6.2.1. Comportamiento alimentario de hormigas en condiciones naturales	74
6.2.2. Efecto de la temperatura bajo condiciones controladas de laboratorio	76
6.3. Resultados	78
6.3.1. Comportamiento alimentario de hormigas en condiciones naturales	78
6.3.2. Efecto de la temperatura bajo condiciones controladas de laboratorio	82
6.4. Discusión	85

7. Aminas biogénicas y la modulación del comportamiento alimentario: efecto farmacológico de la serotonina	88
7.1. Introducción	88
7.1.1. Objetivo	89
7.2. Materiales y métodos	90
7.2.1. Administración de la droga.....	90
7.2.2. Series experimentales	90
7.3. Resultados.....	92
7.3.1. Determinación de la ventana temporal y el efecto de la 5-HT.....	92
7.3.2. Evaluación de la dosis-dependencia	96
7.3.3. Control 1: Actividad locomotora	98
7.3.4. Control 2: UAS	98
7.4. Discusión	99
8. Serotonina en tejidos y sistema nervioso asociados a la alimentación.....	102
8.1. Introducción	102
8.1.1. Objetivos	103
8.2. Materiales y métodos	104
8.2.1. Animales.....	104
8.2.2. Doble tinción en sistema nervioso: núcleos celulares y serotonina	104
8.2.3. Inmunomarcación de serotonina en el canal alimentario.....	105
8.2.4. Montaje de los preparados	106
8.2.5. Visualización de los preparados y procesamiento de las imágenes	106
8.3. Resultados.....	107
8.3.1. Ganglio subesofágico	107
8.3.2. Ganglio frontal.....	108
8.3.3. Canal alimentario.....	110
8.4. Discusión	112
8.4.1. Asociación de la serotonina con el canal alimentario	112
8.4.2. Serotonina en el sistema nervioso.....	113
8.4.3. Posibles mecanismos de regulación.....	114
9. Conclusiones y discusión general.....	116
9.1. Conclusiones.....	116
9.2. Discusión general.....	117
9.2.1. Modulación del comportamiento alimentario	117
9.2.2. Regulación del comportamiento alimentario	122
9.3. Implicancias	124
Anexo A.....	127

Anexo B	132
Bibliografia	134

1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los insectos representan el grupo de animales más diverso y numeroso de la Tierra, comprendiendo más del 70% de las especies conocidas de animales en el mundo (Chapman, 2009). Con aproximadamente 1 millón de especies distintas, presentan gran diversidad de estrategias de vida. La eusocialidad es una de las estrategias más exitosas, y esto se debe en gran medida a que estos insectos han desarrollado comportamientos altamente complejos y división del trabajo (Hölldobler y Wilson, 1990).

1.1. INSECTOS SOCIALES

1.1.1. Organización de la colonia

Los insectos sociales comprenden las hormigas, termitas y muchas especies de abejas y de avispas. Una de las principales características de este grupo es la organización de la colonia mediante la división del trabajo, en donde distintos individuos se especializan en diferentes tareas. En primer lugar, los adultos de la colonia pueden ser divididos en dos grupos principales: la casta reproductiva por un lado, un grupo minoritario compuesto por reinas y machos y, por otro lado, una casta parcial o totalmente estéril (no-reproductiva), las obreras. Esta última casta se ocupa de realizar tareas dentro y fuera del nido; pero no todos los individuos se encargan de todas las tareas sino que existe una división temporal del trabajo: las obreras más jóvenes se ocupan de atender a las reinas, huevos y pupas, luego permanecen cerca de las larvas y por último, las de mayor edad, se encargan de las tareas en la periferia y exterior del nido como ser su construcción, defensa y la recolección de recursos (Hölldobler y Wilson, 1990). La realización de estas tareas responde a los requerimientos de toda la colonia como una unidad funcional, y su organización y

coordinación se basan en las decisiones individuales junto con un eficiente sistema de comunicación entre los individuos (Seeley, 1989; Hölldobler y Wilson, 2008; O'Donnell y Bulova, 2007). Así, en tareas colectivas como la recolección de alimento, las obreras se organizan sin una dominancia jerarquizada, de forma descentralizada o de auto-organización, en donde las respuestas colectivas emergen de las decisiones que cada individuo toma a partir de las interacciones con otros individuos o con el medioambiente.

1.1.2. Recolección de alimento en insectos sociales

La obtención de alimento recae sobre un pequeño porcentaje de individuos de la colonia, las obreras forrajeras. Cuando una hormiga encuentra un recurso, carga parte del alimento encontrado y lo traslada a un lugar determinado -el nido. Este comportamiento se denomina “**recolección de lugar central**” (Orians y Pearson, 1979). En el nido, la forrajera descarga el alimento, que será distribuido entre diversos miembros de la colonia, y vuelve a la fuente del recurso por más. Así, cada obrera forrajera realiza sucesivos ciclos recolectores.

En el nido, la obrera generalmente realiza contactos y diferentes interacciones con sus compañeras (Hölldobler y Wilson, 1990). En aquellos insectos sociales que realizan la recolección en forma grupal, las forrajeras exitosas reclutan a otras recolectoras mediante distintas interacciones que le permiten a estas últimas acceder a cierta información sobre la ubicación y la calidad del recurso (Wilson, 1971). Por ejemplo, las abejas *Apis mellifera* utilizan la danza de contoneo (von Frisch, 1923); en hormigas, al igual que en termitas, la forma más prevalente de reclutamiento es la comunicación por rastros químicos, aunque, dependiendo de la especie, también pueden utilizar señales vibratorias, estimulación táctil, patrones de movimiento estereotipados o la combinación de ellos (Hölldobler y Wilson, 1990). En el caso de la comunicación química, las hormigas regresan al nido desde la fuente de alimento presionando el abdomen (o incluso hasta todo su cuerpo) contra el suelo y dejando, a intervalos frecuentes, sustancias químicas sobre el sustrato. Estas sustancias, llamadas feromonas de camino, guían a otras obreras desde el nido hasta la fuente. Las obreras reclutadas, a su vez, refuerzan el rastro químico al regresar al nido con la carga, atrayendo a nuevas compañeras (Morgan, 2009). Así, la utilización de rastros químicos permite un reclutamiento en masa y generalmente ocurre en colonias

numerosas que requieren de mecanismos elaborados y eficientes de transmisión de información (Andreson y McShea, 2001; Mailleux et al., 2003).

Cuando el alimento recolectado es líquido, a excepción de algunos casos, la obrera recolectora lo transporta en el buche y lo entrega directamente a otro miembro de la colonia. Para ello, regurgita el alimento exponiéndolo entre sus mandíbulas como una gota y realiza una transferencia del alimento boca a boca (trofalaxia) con sus compañeras.

1.1.3. Flujo de información y motivación de las obreras forrajeras

El néctar no solo es el sustento nutricional de los individuos sino que también es un elemento clave en la conexión entre la mayoría de los miembros de la colonia (Cassill y Tschinkel, 1999a). Colectado por las forrajeras en volúmenes que superan ampliamente su consumo individual, dentro del nido es entregado directamente a otras obreras que, a su vez, lo entregan a otras, lo almacenan o alimentan a la reina y a las larvas, formando una gran red de distribución (Seeley, 1995). Esta distribución del néctar y la información que este conlleva, puede darse rápidamente, en pocas horas, llegando a los individuos encargados de todas las tareas dentro de la colonia (Howard y Tschinkel, 1980; DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000; Grüter et al., 2006).

Las interacciones que se establecen entre los individuos de una colonia, y particularmente aquellas que involucran transferencia de alimento, pueden modificar o ajustar el comportamiento de las obreras forrajeras. Así, tomar las decisiones individuales en la fuente de alimento en base a la información recibida durante estas interacciones permite una recolección óptima según las necesidades de la colonia (Detrain y Deneubourg, 2002; Hölldobler y Wilson, 2008). Por ejemplo, en las hormigas de fuego (*Solenopsis invicta*), la alimentación social es regulada por dos agentes principales: el hambre de las larvas y el de las obreras (Cassill y Tschinkel, 1999a). Las larvas solicitan activamente alimento a las obreras dependiendo de su nivel de ayuno, pudiendo regular el volumen y calidad de alimento que reciben (Cassill y Tschinkel, 1995; Cassill et al., 1998). Por otro lado, las obreras encargadas de las larvas las alimentan en función a sus demandas, pero también en relación directa a la disponibilidad de alimento contenido en sus buches (Cassill y Tschinkel, 1999a). Cuando las obreras entregaron o consumieron todas sus reservas y están hambrientas, solicitan activamente alimento a las que lo almacenan y estas, a su vez,

lo solicitan a las forrajeras. De esta forma se establece una cadena de demandas entre los miembros de la colonia que finaliza en un incremento en la motivación de las forrajeras por salir del nido, buscar y recolectar alimento (Cassill y Tschinkel, 1999b). En el mismo sentido, se ha reportado que las condiciones del nido, como ser la presencia de cría o el tamaño de la colonia afectan las respuestas individuales ante un estímulo alimentario, denotando cambios en el estado motivacional de las recolectoras (Howard y Tschinkel, 1980; Dussutour y Simpson, 2008). Incluso la información recibida durante el reclutamiento también modula el estado motivacional de las forrajeras, modificando la evaluación de la calidad del recurso (Roces, 1993).

Considerando lo expuesto previamente, en términos generales, la toma de decisiones de una obrera en la fuente de alimento dependerá fundamentalmente del valor que ese recurso represente, lo cual no solo está determinado por la riqueza en términos absolutos, sino que está directamente ligado a la necesidad que se tiene del mismo y a la experiencia previa del animal, lo que en conjunto determinará su motivación recolectora. En hormigas nectívoras del género *Camponotus* el comportamiento de recolección varía dependiendo de la concentración de la solución (Josens, et al. 1998), del flujo (Schilman y Rocés, 2003) y del ayuno de azúcares de la colonia (Josens y Rocés, 2000). En respuesta a estos factores, son muchas las variables comportamentales que se modulan: la probabilidad de aceptar o no el alimento encontrado, el tiempo invertido en ingerirlo, la carga final alcanzada al finalizar la visita a una fuente de néctar, la realización o no de interrupciones durante la ingesta y la velocidad de ingestión (Josens, et al. 1998, Josens y Rocés, 2000; Falibene y Josens, 2008).

Dentro del marco de la ecología del comportamiento se considera que los animales son capaces de encontrar una solución óptima para los problemas que se presentan durante el forrajeo. Se asume que los animales, empleando una serie de reglas de decisión simples, tienden a maximizar los beneficios obtenidos durante la recolección de alimento; por ejemplo, en términos de ganancia energética neta por unidad de energía gastada o por unidad de tiempo invertido (Schoener, 1971; Charnov, 1976). En insectos sociales, además de las consideraciones a nivel individual, son tenidos en cuenta aspectos que, en detrimento de la eficiencia individual, promueven un aumento en la eficiencia a nivel global de la colonia

(Núñez 1982; Roces y Núñez, 1993). Tanto en abejas como en hormigas se ha observado que las obreras regresan al nido con una carga parcial, por debajo del máximo que pueden transportar, aun cuando las fuentes ofrecían un recurso ad libitum (Núñez 1982; Roces y Núñez, 1993; Josens et al., 1998; Josens y Roces, 2000; Mailleux et al., 2000). Se ha propuesto que las recolectoras disminuyen el tiempo en la fuente de alimento y, consecuentemente, disminuyen la carga transportada, para así aumentar la frecuencia de visitas al nido y, con ello, aumentar el flujo de información entre los miembros de la colonia (Núñez 1982; Roces y Núñez, 1993). En este sentido, una vez más, el comportamiento de recolección en insectos sociales no puede interpretarse en términos individuales sino más bien para maximizar la eficiencia a nivel colonial.

1.2. ALIMENTACIÓN EN HORMIGAS

Dentro de los insectos sociales, las hormigas representan el grupo numéricamente más abundante y más ampliamente distribuido. Hay descriptos más géneros y especies de hormigas que de todos los demás insectos sociales juntos (Wilson, 1971).

Cuando consideramos la nutrición en hormigas debemos tener en cuenta que son insectos holometábolos (con metamorfosis completa) con distintos requerimientos alimentarios entre los estadios larvales y adulto. Las obreras forrajean buscando alimento para cubrir sus necesidades nutricionales, pero también las de las larvas (Blüthgen y Feldhaar, 2010). Existe una gran diversidad de hábitos alimentarios en hormigas: pueden ser nectívoras (colectando soluciones azucaradas directamente de la planta o indirectamente a través de exudados de homópteros), granívoras, fungívoras, predadoras, carroñeras de animales muertos y excrementos u omnívoras (Hölldobler y Wilson, 1990; Blüthgen y Feldhaar, 2010). Sin embargo, la dieta y el balance nutricional también pueden variar dentro de una especie de acuerdo al entorno ecológico (Davidson, 1997; Dussutour y Simpson 2008; Kay 2002, 2004; Blüthgen y Feldhaar, 2010).

Muchas especies están altamente especializadas en la recolección de soluciones azucaradas (las llamadas hormigas nectívoras, dentro de las cuales

Camponotus es un típico ejemplo) mientras que otras raramente se alimentan de este recurso (Hölldobler y Wilson, 1990; Blüthgen y Feldhaar, 2010). Sin embargo, más allá de sus hábitos particulares, este último grupo también puede ingerir de fuentes azucaradas de forma oportunista, si la encuentra casualmente durante el forrajeo.

1.2.1. Hormigas carpinteras (género *Camponotus*)

Las hormigas adultas del género *Camponotus* son llamadas vulgarmente hormigas carpinteras. Se alimentan principalmente de carbohidratos que obtienen de nectarios extraflorales y de exudados de homópteros. Ambas fuentes contienen glucosa, fructosa y sacarosa en cantidades variables (aunque los exudados de homópteros poseen un espectro más amplio de azúcares), y algunas sustancias adicionales como aminoácidos (Baker et al., 1978; Lawton y Heads, 1984; Blüthgen et al., 2004). Para satisfacer las demandas proteicas de la colonia (especialmente de las larvas), las forrajeras pueden ser predadoras, principalmente de otros insectos, o carroñeras (Hölldobler y Wilson, 1990). Además, pueden ser oportunistas, lo que en áreas urbanas las convierte en verdaderas molestias domiciliarias (Hansen y Klotz, 2005).

1.2.2. Mecanismos de ingestión de soluciones azucaradas

La ingestión de soluciones azucaradas en hormigas puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos: **lengüeteo** o **succión**. La utilización de uno u otro depende de la especie y sus hábitos alimentarios (Paul y Roces, 2003) y, en una misma especie, depende de la cantidad de solución o la forma en que esta se encuentra disponible (Josens y Roces, 2000). Cuando un fluido se presenta en volúmenes muy pequeños o como una fina película extendida sobre una superficie sólida, la obrera lo ingiere mediante lengüeteo. Para ello contacta la superficie extendiendo la glosa (Fig. 1.1A, Fig. 1.2), la cual, gracias a su superficie densamente cubierta de vellosidades, adhiere el líquido al ser arrastrada sobre el mismo. Luego, la glosa se retrae (Fig. 1.1B, Fig. 1.2) y las dos galeas (en el extremo distal de las maxilas) se mueven ventralmente sin tocarla. Durante la siguiente extensión de la glosa, las galeas barren el líquido hacia arriba mientras que la glosa desciende y el fluido es llevado hacia la boca (Paul y Roces, 2003). Durante este comportamiento es posible observar movimientos muy conspicuos de la cabeza y piezas bucales. En

cambio, algunas especies de hormigas (por ejemplo las del género *Camponotus*) son capaces de utilizar la succión como mecanismo de ingestión al encontrar una fuente que ofrece un gran volumen de líquido. En estos casos, la hormiga simplemente introduce su glosa y algunas partes adyacentes del complejo labio-maxilar en la gota y succiona el líquido utilizando la **bomba de succión**. Durante el proceso, la cabeza se mantiene inmóvil al igual que la glosa, la que trabaja formando parte de un conducto abierto por el que circula la solución (Josens y Roces, 2000; Paul y Roces, 2003).

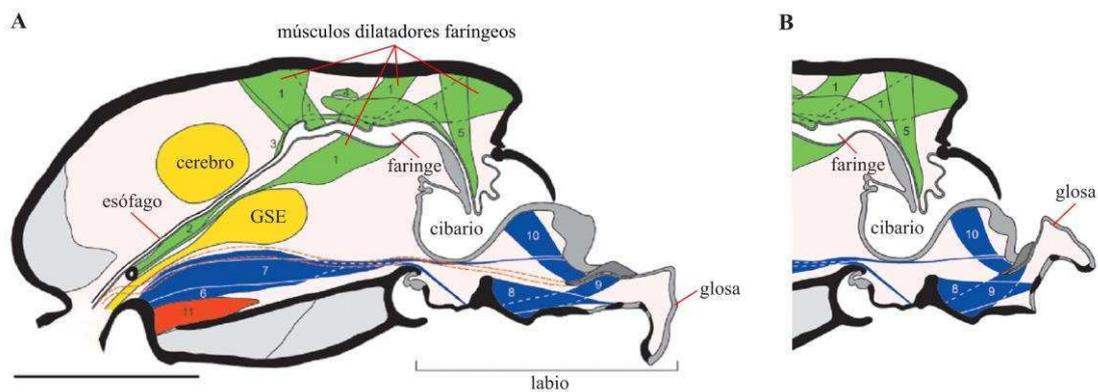


Figura 1.1. Esquema de la morfología interna de la cabeza de una hormiga, vista lateral. Durante el lengüeteo, el labio es extendido (A), exponiendo la glosa, y retraído (B) repetidamente. En cambio, durante la succión el labio permanece extendido junto a partes adyacentes del complejo labio-maxilar (no mostradas) y el líquido es ingerido gracias a la acción de los músculos de la bomba de succión, mostrados en verde: (1) dilatadores faríngeos, (2) retractor faríngeo, (3) músculo longitudinal faríngeo, (4) aductor transversal faríngeo, (5) retractor del tubo bucal. GSE: ganglio subesofágico. Barra de escala = 1 mm. Basado en Paul et al. (2002).

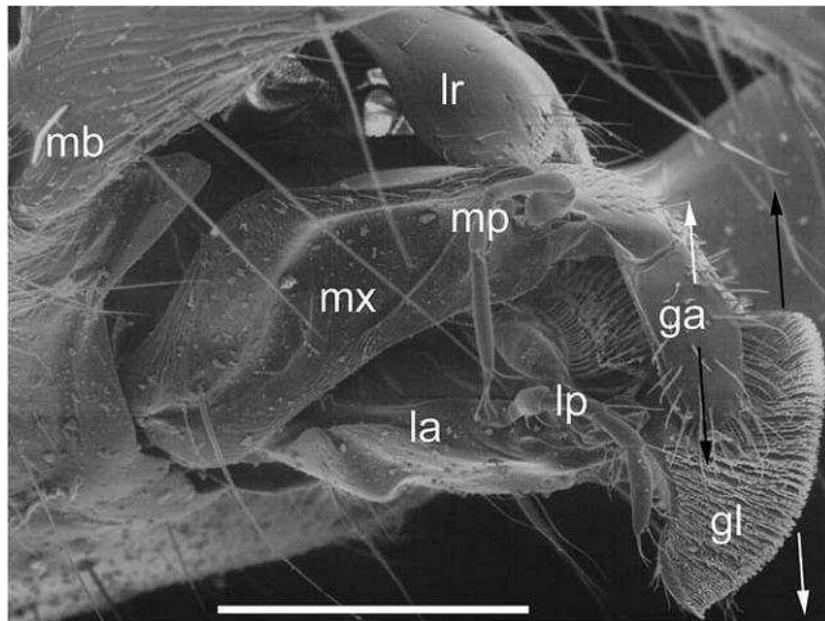


Figura 1.2. Complejo labio-maxilar en hormigas, vista lateral, y movimientos realizados durante el lengüeteo. La glosa y las galeas realizan movimientos opuestos (indicadas por las flechas del mismo color): cuando la glosa es retraída (cargada de fluido) las galeas derecha e izquierda son llevadas hacia abajo sin contactarla (flechas negras). Cuando la glosa descende, las galeas se mueven hacia arriba arrastrando el fluido adherido a las vellosidades de la glosa (flechas blancas). Barra de escala= 500 μ m; (ga) galea, (gl) glosa, (lp) palpos labiales, (la) labio, (lr) labro, (mb) base de la mandíbula, (mx) maxila, (mp) palpos maxilares. Extraído de Paul y Roces (2003).

1.3. LA BOMBA DE SUCCIÓN

En los insectos, la parte anterior del canal alimentario ubicado en la cabeza está modificada en una bomba de succión (Chapman, 1998). En aquellos especializados en la ingestión de fluidos, esta bomba está particularmente desarrollada. En hormigas, su anatomía fue descrita para dos especies: *Lasius niger* (Janet, 1905) y *Pachycondila villosa* (Paul et al., 2002). Está compuesta de distintos paquetes de músculos anclados, por un extremo, a la pared cuticular interna de la cabeza y, por el otro, a la pared del canal (Fig. 1.1A). Estos músculos actúan dilatando, retrayendo y aduciendo la faringe y el tubo bucal (Paul et al., 2002); las contracciones rítmicas de los músculos dilatadores son las responsables de expandir

la cavidad generando una disminución de la presión dentro de la faringe que fuerza al líquido a ingresar dentro del canal.

La **actividad de la bomba de succión** fue descrita para la hormiga neotrófica *Camponotus mus* (Josens, 2002; Josens et al., 2006; Falibene y Josens, 2008). En el laboratorio hemos desarrollado una técnica no-invasiva que permite registrar las señales eléctricas generadas por las hormigas durante la ingestión de soluciones azucaradas. Mediante estos registros hemos demostrado por primera vez en insectos que *C. mus* es capaz de modular la tasa de ingestión variando la frecuencia de contracción de los músculos de la bomba de succión. De esta forma, cuando la colonia está ayunada y tiene altos requerimientos de hidratos de carbono, las obreras forrajeras que encuentran una fuente ad libitum de solución azucarada la ingieren bombeando a frecuencias mayores que hormigas provenientes de colonias no ayunadas (Falibene y Josens, 2008).

1.4. EL CANAL ALIMENTARIO

Las hormigas de la subfamilia Formicinae (a la que pertenece el género *Camponotus*) se especializa particularmente en la recolección, transporte y regurgitación de soluciones azucaradas. Morfológicamente, esto se refleja en su tracto digestivo, el cual ha desarrollado características particulares que le permiten llevar a cabo estas actividades (Eisner y Wilson, 1952).

1.4.1. Morfología del tubo digestivo

El tubo digestivo de los insectos está dividido en tres regiones principales: el estomodeo, el mesenterón y el proctodeo. El primer y último segmento son de origen ectodérmico, con lo que contienen células que secretan una cutícula que es continua con el exterior del cuerpo y puede estar esclerotizada en algunas porciones; el mesenterón, por otro lado, es de origen endodérmico y, consecuentemente, no está recubierto de cutícula.

El alimento ingresa al estomodeo por la boca funcional luego de atravesar el **cibario**, una cámara pre-oral de estructura cuticular (Fig. 1.3). En el cibario se colectan partículas sólidas y basura que quedan retenidas luego de que el líquido es

filtrado al circular por una superficie con crestas y proyecciones. Una vez que atraviesa la boca ingresa a la **faringe**, la porción del canal que compone la bomba de succión en hormigas, para luego desembocar en el **esófago**. Esta última estructura tubular pasa por encima del ganglio subesofágico y, atravesando todo el tórax del animal, llega hasta el abdomen. Allí, el canal se ensancha formando un **buche**, un saco de paredes delgadas, que finalizan en una estructura denominada **proventrículo** (Fig. 1.4). Estas dos últimas estructuras juegan un rol crucial en el almacenamiento de alimento, trofalaxia e integración social de la colonia en insectos sociales (Eisner y Wilson 1952; Hölldobler y Wilson, 1990). En hormigas nectívoras, el buche tiene gran capacidad de distensión, pudiendo contener y almacenar grandes volúmenes de alimento líquido. El proventrículo, por su parte, también se encuentra altamente especializado en hormigas, mostrando una de las formas más avanzadas en el género *Camponotus* (Fig. 1.4B). Esta estructura combina regiones altamente esclerotizadas con músculos bien desarrollados que regulan el flujo unidireccional desde el buche hacia el mesenterón (ventrículo o estómago propiamente dicho), en donde el alimento comienza a ser digerido y absorbido (Eisner y Wilson, 1952). De esta forma, en las hormigas especializadas en la recolección de néctar, el buche cumple la función de “estómago social” ya que es la estructura que permite el transporte y almacenamiento de alimento para luego ser regurgitado y entregado boca a boca a las compañeras de la colonia. Así, el pasaje de solución a través del proventrículo es el punto limitante en el uso de alimento como suministro energético social o individual, ya que esta estructura regula la entrada hacia las porciones del canal encargadas de la digestión propiamente dicha.

Al final del tubo digestivo encontramos el proctodeo, compuesto por el píloro, los túbulos de Malpighi, el intestino (o íleon), y el recto que abre posteriormente al ano (Fig. 1.4A). Esta región es la encargada de los procesos de reabsorción y excreción.

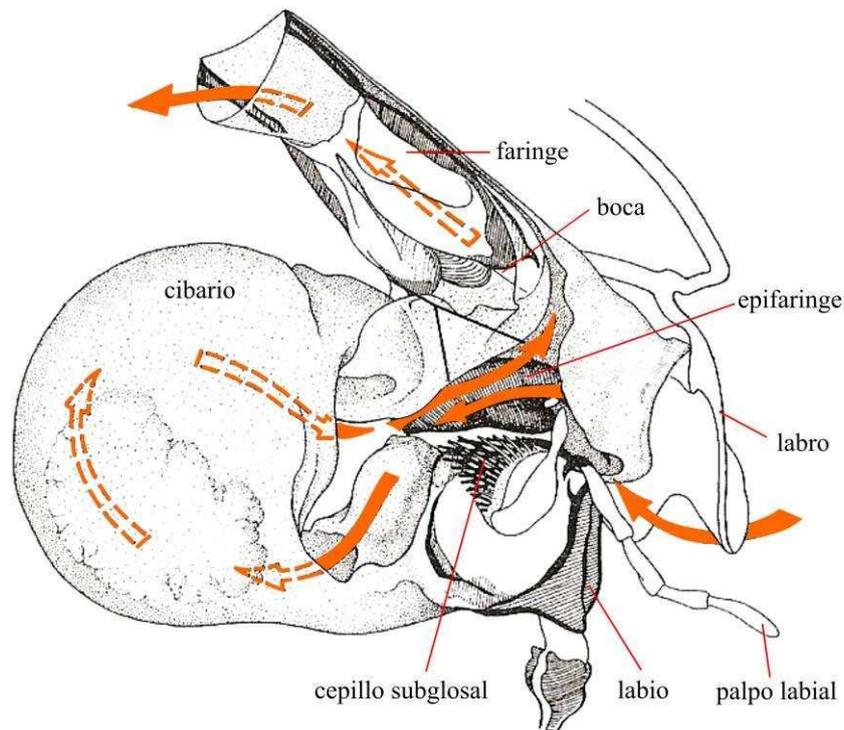


Figura 1.3. Esquema del aparato alimentario de una obrera de *Camponotus*. La hipo y la epifaringe forman una cámara pre-oral, el cibario. Las flechas naranjas muestran el recorrido que realiza al alimento al ser ingerido. Pasa entre la epifaringe y el labio, donde es filtrado, e ingresa al cibario, que retiene las partículas sólidas. Luego pasa nuevamente por el cepillo subglosal, atraviesa la boca e ingresa a la faringe. Tomado de Hansen y Klotz (2005).

1.4.2. Músculos del tubo digestivo

En insectos, todos los músculos son estriados y se dividen en dos clases: músculos esqueléticos y viscerales (Chapman, 1998; Klowden, 2002). Los músculos esqueléticos están anclados a la cutícula por sus dos extremos y permiten el movimiento de una parte del esqueleto en relación a otra. Los músculos del tubo digestivo son los viscerales, que tienen solo uno de sus extremos anclado a la cutícula (**músculos viscerales extrínsecos**) o ninguno (**músculos viscerales intrínsecos**). Los músculos viscerales extrínsecos están asociados con el estomodeo y el mesenterón y generalmente funcionan como dilatadores del canal. Son, por ejemplo, los músculos que componen la bomba de succión, que se encuentran bien desarrollados en los insectos succionadores. Por su parte, los músculos viscerales

intrínsecos son circulares y rodean el tubo digestivo. Como los músculos solo pueden contraerse, su estiramiento se produce por la contracción de un músculo antagonista o por elasticidad cuticular. Los músculos de bombeo asociados a la faringe en muchos insectos se estiran por la acción de músculos circulares intrínsecos (Chapman, 1998), por ejemplo, en los lepidópteros (Eastham y Eassa, 1955; Miles y Booker, 1998; Davis y Hildebrand, 2006). En hormigas parece darse por el músculo aductor transversal de la faringe (Fig. 1.1A) (Janet, 1905).

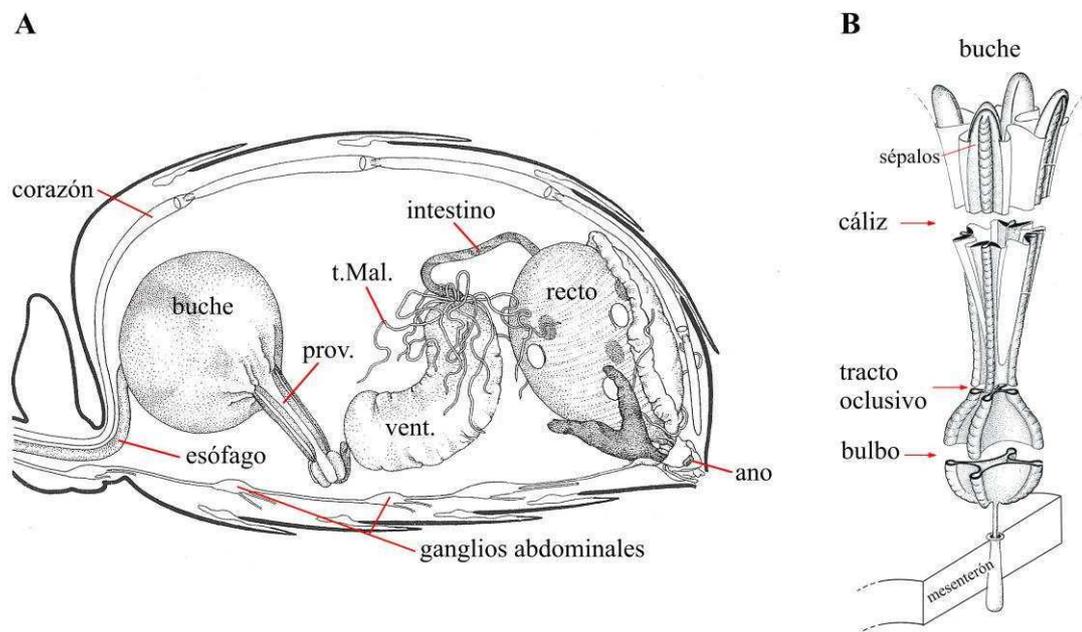


Figura 1.4. (A) Sistema digestivo en el abdomen de hormigas. Están indicados el esófago, el buche, el proventrículo (prov.), el ventrículo (vent.), los túbulos de Malpighi (t.Mal.), el intestino, el recto y el ano. Basado en Hansen y Klotz (2005). (B) Proventrículo de *Camponotus*. El cáliz está formado por 4 sépalos quitinosos que llegan hasta la base del buche. Actúa como un embudo que colapsa por la acción combinada de músculos intrínsecos y músculos del anillo posterior del buche. El tracto oclusivo, rodeado de músculos, actúa como una válvula que puede cortar completamente el flujo de alimento desde el buche hacia el bulbo. El bulbo actúa como una bomba unidireccional con válvulas en ambos extremos. La acción de músculos transversales colapsa las paredes de forma peristáltica forzando al contenido de la cavidad a ir hacia el mesenterón. La relajación muscular permite, por elasticidad cuticular, la nueva expansión y llenado del bulbo. Basado en Eisner y Wilson (1952).

1.5. ACTIVIDAD MUSCULAR EN INSECTOS

1.5.1. Inervación y contracción muscular

A diferencia de los vertebrados, en insectos la **contracción** de las fibras musculares es **gradual** (Klowden, 2002). Esto es posible gracias a dos características: por un lado, una fibra muscular puede recibir inervaciones múltiples de distintas motoneuronas (que pueden ser rápidas y/o lentas; las primeras causan una contracción rápida del músculo mientras que las segundas causan pequeñas despolarizaciones y contracciones ligeras) (Chapman, 1998; Klowden, 2002). Por otro lado, el axón de una motoneurona que corre a lo largo del músculo tiene terminales múltiples y hace sinapsis repetidamente en distintos puntos (Fig. 1.5A), lo que se ha observado tanto en músculos esqueléticos como en viscerales (Chapman, 1998). Las finas ramificaciones nerviosas de las ramas axonales terminales se encuentran generalmente expandidas en una serie de botones sinápticos en donde se encuentran las vesículas sinápticas, comparables con aquellas que se encuentran en las terminales del sistema nervioso central. Es decir, cuánto se contrae el músculo depende de sus características anatómicas y si la estimulación ocurre vía axones rápidos o lentos (Chapman, 1998). La diferencia probablemente radica en la cantidad de neurotransmisor liberado en la unión entre el nervio y el músculo a la llegada del potencial de acción (ver más adelante). Además, una única neurona a veces inerva más de un músculo, lo que es común en los casos en los que distintos músculos actúan al unísono (por ejemplo, durante la caminata: Pearson y Iles, 1971).

La **contracción muscular** se inicia con la llegada del potencial de acción a la unión entre la motoneurona y el músculo, lo que produce, primero, la excitación del músculo y luego su activación. Con la llegada del potencial de acción, las vesículas sinápticas al final del nervio descargan su sustancia de transmisión (neurotransmisor; por lo general L-glutamato en las sinapsis excitatorias) en la membrana postsináptica en la superficie del músculo, provocando su excitación mediante un cambio en la permeabilidad a iones que lleva a un cambio en el potencial de membrana de la fibra, despolarizándola cuando se trata de una sinapsis excitatoria. La distribución de los iones a través de la membrana de la fibra muscular (sarcolema) es semejante a la que ocurre en las células nerviosas. Esta despolarización produce la activación del músculo mediante la liberación de calcio intracelular, que pone en marcha los

mecanismos contráctiles de las fibras musculares. Cada contracción y relajación del músculo se da por liberación y reabsorción de calcio intracelular.

El potencial de acción se transmite a través de la unión neuromuscular a todas las fibras musculares inervadas por una unidad motora. La suma de toda esta **actividad eléctrica** se conoce como un potencial de acción motor de la unidad. La actividad electrofisiológica de las múltiples unidades motoras es la señal que normalmente se registra durante un **electromiograma**.

1.5.2. Neuromodulación

Muchos músculos, además de recibir inervaciones excitatorias, y quizás inhibitorias, reciben señales desde neuronas que liberan compuestos que modifican la respuesta normal del músculo a la excitación. Estos compuestos son definidos como **neuromoduladores**, siendo tres los comúnmente identificados en insectos: la serotonina, la octopamina, y la prolactina. Dichos neuromoduladores pueden tener efectos pre- o post-sinápticos (Fig. 1.5B; Evans, 1985), modificando la fuerza de la contracción y/o la tasa de contracción/relajación del músculo (Whim y Evans, 1989).

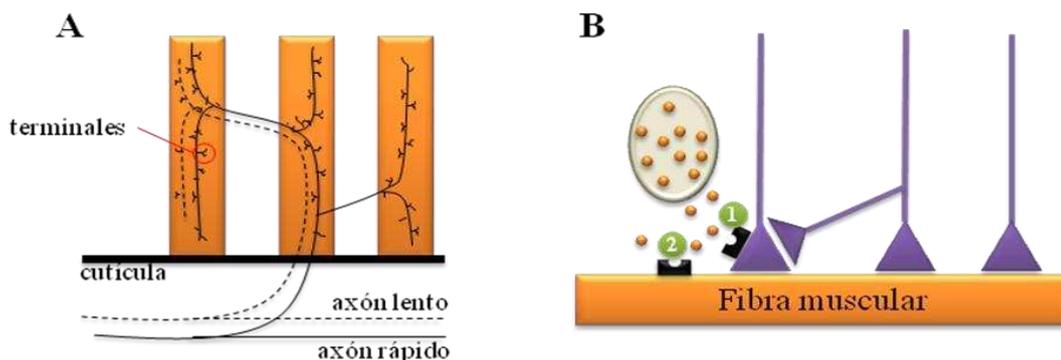


Figura 1.5. (A) Inervación muscular en insectos. Las inervaciones pueden ser multiterminales (un axón posee varias terminales), polineuronales (una fibra inervada por más de un axón motor), o bien involucrar a un solo axón (B) Neuromodulación muscular. Los neuromoduladores pueden actuar en la pre-sinapsis (1) o tener efectos post-sinápticos (2). Basado en Chapman (1998).

1.6. CONTROL NERVIOSO DEL TUBO DIGESTIVO

Los músculos del estomodeo y del mesenterón anterior están inervados por el **sistema nervioso estomatogástrico**. Uno de los ganglios principales de este sistema es el **ganglio frontal**, que yace en la pared dorsal de la faringe, anterior al cerebro (Fig. 1.6). Este ganglio está conectado al tritocerebro a través de los conectivos frontales. Los cuerpos celulares de la mayoría de las motoneuronas que controlan los músculos de la primera porción del tubo están en los ganglios del sistema estomatogástrico, y solo algunos están en el tritocerebro. Por su parte, los músculos del proctodeo están inervados desde los ganglios abdominales terminales.

Los patrones motores rítmicos (movimientos cíclicos, repetitivos), como los observados durante la locomoción o alimentación, son comportamientos generados por circuitos neurales complejos llamados generador de patrón central (GPC), presentes tanto en vertebrados como en invertebrados (Delcomyn, 1980; Pearson, 1993; Marder, 2000). Los GPC son intrínsecamente capaces de generar actividad muscular rítmica sin recibir información aferente (Delcomyn, 1980). Sin embargo, se sabe que el sistema nervioso puede alterar las propiedades de los GPC mediante la entrada de vías descendentes y sensoriales para generar distintos patrones motores, regular su frecuencia de ciclos o activarlos (Pearson, 1993; Ayali y Harris-Warrick, 1999; Mardel y Bucher, 2001). Esto puede ser generado, entre otros mecanismos, mediante neuromodulación. Una serie de experimentos han demostrado la presencia de un GPC en el ganglio frontal de la langosta *Schistocerca gregaria*, el que controla la activación de los músculos del estomodeo de acuerdo al estado nutricional del animal (Ayali et al., 2002; Zilberstein y Ayali, 2002). De esta forma, componentes presentes en la hemolinfa de insectos bien alimentados modulan la acción del GPC del ganglio frontal, inhibiendo la contracción muscular en el estomodeo. Más aún, el ganglio subesofágico, que es parte del sistema nervioso central y controla los movimientos de las piezas bucales, también posee un GPC que se activa en presencia de ciertas sustancias (Rast y Bräunig, 1997; Rast y Bräunig, 2001a). Se ha demostrado una intrincada interacción mediada por neuronas neuromoduladoras entre los GPC del ganglio frontal y del ganglio subesofágico, sugiriendo que ambos ganglios interactúan para generar los complejos patrones rítmicos que se dan durante la alimentación (Rand et al., 2008).

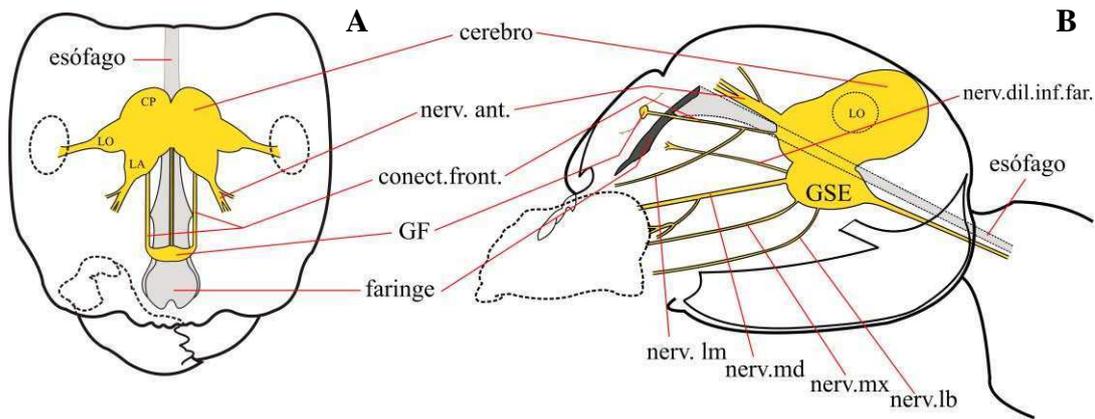


Figura 1.6. Sistema nervioso en la cabeza de una hormiga. **(A)** Vista anterior. **(B)** Vista lateral. El cerebro (o ganglio supraesofágico) consta de tres partes: el protocerebro, que contiene los lóbulos ópticos (LO) y los cuerpos pedunculados (CP); el deutocerebro, que contiene los lóbulos antenales (LA) y sus nervios (nerv. ant.); y el tritocerebro, del que salen los nervios labiales (nerv. lm) que ramifican en los conectivos frontales (conect. front.). Estos últimos se unen en el ganglio frontal (GF), que yace sobre la faringe. Por debajo del esófago se encuentra el ganglio subesofágico (GSE) -el primer ganglio de la cadena ventral, fusionado al cerebro en hormigas-. Este ganglio proyecta nervios que inervan las piezas bucales: nervios mandibulares (nerv. md), maxilares (nerv. mx) y labiales (nerv. lb); y el músculo dilator inferior faríngeo (nerv. dil. inf. far.). Basado en Janet (1905) y Hansen y Klotz (2005).

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivos generales

Existen diversos factores que regulan el comportamiento alimentario de los animales. Las señales recibidas por un individuo desde el medioambiente (factores externos) y las basadas en su estado fisiológico o motivación (factores internos), producto de su experiencia y su umbral de percepción, determinan de manera conjunta su salida comportamental, modelando la toma de decisiones durante la búsqueda y recolección de alimento. En insectos, la capacidad de modular la actividad de la bomba de succión ha sido descrita claramente por primera vez en la hormiga *C. mus*; esto y su condición de insecto social (con complejos repertorios comportamentales) la proponen como un buen modelo para estudiar los mecanismos que subyacen dicha modulación.

En esta tesis se propone combinar estudios de comportamiento, electrofisiológicos, farmacológicos e inmunocitoquímicos para indagar sobre los mecanismos fisiológicos involucrados en la ingestión de néctar en hormigas *C. mus* y su regulación. Analizaremos cómo distintos factores (externos e internos) afectan los umbrales de respuesta que determinan el comportamiento alimentario y la dinámica de la ingestión en estos insectos.

1.7.2. Objetivos particulares

I. Recientemente hemos documentado que la frecuencia predominante de bombeo varía con el ayuno (Josens et al., 2006; Falibene y Josens, 2008). Como inicio de esta tesis, en el capítulo 3 se propone describir en detalle las señales eléctricas generadas, definiendo otros parámetros que permitan caracterizar la actividad de la bomba de succión durante la ingestión de soluciones azucaradas de distinta concentración y diferentes niveles de ayuno de la colonia.

II. Muchas especies de hormigas nectívoras son consideradas plagas estructurales o molestias domiciliarias, tal es el caso de las hormigas carpinteras. El método de control químico más recomendado para hormigas nectívoras es la administración de tóxicos a través de cebos líquidos azucarados. En el capítulo 4 planteamos estudiar la respuesta de *C. mus* ante la presencia de tóxicos en la solución azucarada considerando distintos niveles motivacionales de la hormiga forrajera.

III. La recolección de alimento es un programa comportamental complejo en el que se ejecutan un gran número de comportamientos de manera secuencial. En él existen algunas respuestas simples, reflejas, que suelen ser las salidas evaluadas para estudios más controlados. Ejemplo de esto es la respuesta refleja de extensión de la proboscis en abejas que permite una aproximación en forma muy controlada al estudio de la sensibilidad perceptual a la sacarosa y los niveles de respuesta. En el capítulo 5 estudiaremos de manera controlada cómo el ayuno de carbohidratos afecta los umbrales de aceptación de azúcar en la hormiga *C. mus*. Para ello, es

necesario, en primer lugar, desarrollar y poner a punto un protocolo capaz de medir dichos umbrales en el laboratorio.

IV. Las fluctuaciones diarias y estacionales de las condiciones ambientales tienen una gran influencia sobre la actividad de forrajeo en hormigas. La temperatura es un factor abiótico de fundamental importancia en insectos ya que determina su temperatura corporal y, en consecuencia, su actividad muscular. Considerando que el mecanismo que subyace a la succión de néctar en hormigas radica en el accionar de los músculos de la bomba de succión, es probable que dicha actividad se vea afectada por la temperatura. En el capítulo 6 analizaremos el comportamiento alimentario y la dinámica de ingestión de *C. mus* en condiciones naturales y en el laboratorio, enfocándonos particularmente en los efectos de la temperatura sobre la actividad de la bomba de succión.

V. Los neuromoduladores y las hormonas son sustancias que promueven y modifican comportamientos bien definidos en animales, confiriendo flexibilidad a los circuitos neuronales. Particularmente, la serotonina regula procesos comportamentales y fisiológicos relacionados con la ingestión de alimentos. En el capítulo 7 planteamos evaluar los efectos de la serotonina sobre el comportamiento alimentario, los umbrales de respuesta y la actividad de la bomba de succión en la hormiga *C. mus*.

VI. Considerando los resultados obtenidos en el objetivo anterior y a fin de comprender las vías neuronales que vinculan a la serotonina con las estructuras relacionadas con la ingestión y su modulación, en el capítulo 8 proponemos analizar por métodos inmunohistoquímicos la presencia de serotonina en los principales centros neuronales involucrados en la regulación de este comportamiento, el canal alimentario y los músculos de la bomba de succión.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Grupo de Estudio de Insectos Sociales, ubicado en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Por su parte, los estudios inmunohistológicos presentados en el capítulo 8 se realizaron en la Universidad de Würzburg, Alemania.

2.1. ANIMALES

En los distintos experimentos se utilizaron distintas colonias de hormigas de la especie *C. mus* recolectadas en Capital Federal (34° 32' S, 58° 26' O) y General Rodríguez (34° 41' S, 58° 57' O) de la provincia de Buenos Aires, y en la provincia de Santiago del Estero (27° 49' S, 64° 03' O). Cada colonia, compuestas por 1000 a 2000 obreras y varias reinas, fue trasladada al laboratorio y mantenida en un nido artificial o contenedor que consistió de una caja de plástico (30 x 50 x 30 cm) con la base cubierta de yeso y las paredes pintadas con fluon para evitar el escape de los animales. Dentro de los contenedores se colocó una pila de placas de acrílico separadas entre sí mediante espaciadores de madera que las hormigas tomaban rápidamente como nido. Las colonias fueron mantenidas durante 1 año en condiciones aproximadamente constantes de temperatura (23 ± 3 °C) y bajo un ciclo natural de luz/oscuridad. Las hormigas podían desplazarse libremente dentro del contenedor, teniendo libre acceso a agua. Entre experimentos, las hormigas fueron alimentadas con solución de miel diluida como fuente de hidratos de carbono e insectos frescos cortados, atún o pollo como fuente proteica.

Durante los experimentos, en donde las hormigas debían tener cierto nivel de ayuno de carbohidratos, las colonias solo fueron provistas de agua y proteínas. El

período de privación de azúcares para alcanzar situaciones de ayuno varió según el experimento y para cada colonia. Esto es debido a que existen otros factores, más allá del tiempo desde la última ingesta, que afectan el comportamiento alimentario en hormigas, por ejemplo, la presencia de cría o el tamaño de la colonia (Howard y Tschinkel, 1980; Dussutour y Simpson, 2008).

2.2. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA BOMBA DE SUCCIÓN

2.2.1. Procedimiento experimental

Los individuos utilizados en todos los experimentos fueron obreras recolectoras. En los experimentos realizados en el laboratorio, antes de comenzar cada ensayo, unas 10 hormigas fueron tomadas del nido y colocadas sobre una serie de puentes que conducían hacia la arena de registro y al alimento que allí se ofrecía (Fig. 2.1A). Se permitió que estas hormigas se desplazaran libremente por la arena hasta encontrar la solución de sacarosa. Una vez ingerido el alimento, las hormigas regresaban al nido a través de los puentes, de donde se las retiraba y transportaba mediante un palillo hasta una varilla vertical (1 x 1 x 20 cm) ubicada dentro del nido. En el trayecto de regreso, las hormigas que habían encontrado e ingerido el alimento dejaban un rastro de feromona de camino (sobre la plataforma de la arena de registro, puentes y varilla vertical) que guiaría a sus compañeras hacia la fuente de alimento. Las obreras reclutadas se dirigían hacia la varilla vertical y un buen número de individuos se acumulaba en el extremo, donde el rastro quedaba interrumpido. De allí se tomaron a los individuos experimentales para así asegurarnos que fueran obreras reclutadas. Esto, a su vez, implica que sean individuos de edades avanzadas, ya que la tarea de recolección recae en los adultos de mayor edad. También tuvimos en cuenta que el tamaño de la recolectora afecta muchas variables relacionadas con el comportamiento de ingestión (Josens, 2002); por ello, dentro de cada experimento se tomaron hormigas de tamaño similar.

Para los experimentos de los capítulos 3, 4 y 7, cada hormiga experimental fue colocada individualmente sobre un puente de madera (9 cm de largo, 0.2 cm de ancho) situado sobre una balanza (Metler Toledo, resolución de 0.01 mg) para

obtener el peso (inicial) de la hormiga (Fig 2.1A). Una vez registrado el peso del individuo, este primer puente se conectaba a otro (puente de transferencia) que llevaba directamente a la plataforma de la arena de registro. Una vez allí, las hormigas encontraban e ingerían la solución por ellas mismas. El volumen de solución ofrecido en cada caso superó ampliamente el volumen que una hormiga puede tomar en una ingesta, por lo tanto, la solución ofrecida representó una fuente ad libitum. Una vez finalizada la ingesta, el individuo dejaba la arena experimental dirigiéndose hacia el puente en la balanza, donde se obtenía el peso de la hormiga luego de la ingestión (peso final, masa de la hormiga más carga de buche). Con el fin de evitar la pseudorréplica, los individuos utilizados fueron mantenidos apartados del resto de la colonia, en un nido auxiliar, hasta finalizar el experimento.

2.2.2. Dispositivo de registro

Se empleó un dispositivo no invasivo que permite estudiar la actividad de la bomba de succión mediante el registro de las señales eléctricas generadas por una hormiga al ingerir una solución de sacarosa (Fig. 2.1B; Josens et al, 2006; Falibene y Josens, 2008). La arena de registro constaba de una plataforma de madera (2 x 9 cm) cuyo extremo (una superficie de 2 x 2cm) estaba cubierto primero por papel de filtro y luego por una fina malla metálica. En el centro de esta área se ubicó un tubo tipo Eppendorf (0.5 ml) a través de un orificio de manera tal que la boca del tubo quedara al mismo nivel que la malla metálica. El tubo se llenó completamente con solución de sacarosa hasta que una pequeña gota quedara expuesta, cuidando que esta nunca tocara la malla. Un electrodo que atravesaba la pared lateral del tubo estaba inmerso en la solución de sacarosa (electrodo de registro) mientras que un segundo electrodo estaba en contacto con la malla metálica (electrodo de referencia). De este modo, cuando la hormiga se posaba sobre la malla y contactaba la solución con sus piezas bucales, el circuito se cerraba y podían registrarse las señales eléctricas generadas por la hormiga durante la ingesta. Estas señales reflejan la actividad de los músculos de la bomba de succión de manera análoga a la observada en un electromiograma (Smith, 1979; Guarneri et al., 2000, 2003; Sant' Anna et al., 2001; Falibene y Josens, 2008). En todos los casos, a excepción de los experimentos del capítulo 6, la temperatura durante los registros se mantuvo aproximadamente constante (23 ± 3 °C). Para facilitar la conducción de la corriente, el papel de filtro se humedeció con

agua y la malla metálica se cubrió con una fina capa de gel conductor. Las señales fueron amplificadas 210 veces, filtradas (filtro pasa-banda 0.4Hz a 17Hz, -3dB) y los datos almacenados en una PC a través de un conversor analógico-digital (ADC-212, Pico Technology Limited, UK). Todos los datos fueron obtenidos utilizando una tasa de muestreo de 200 Hz.

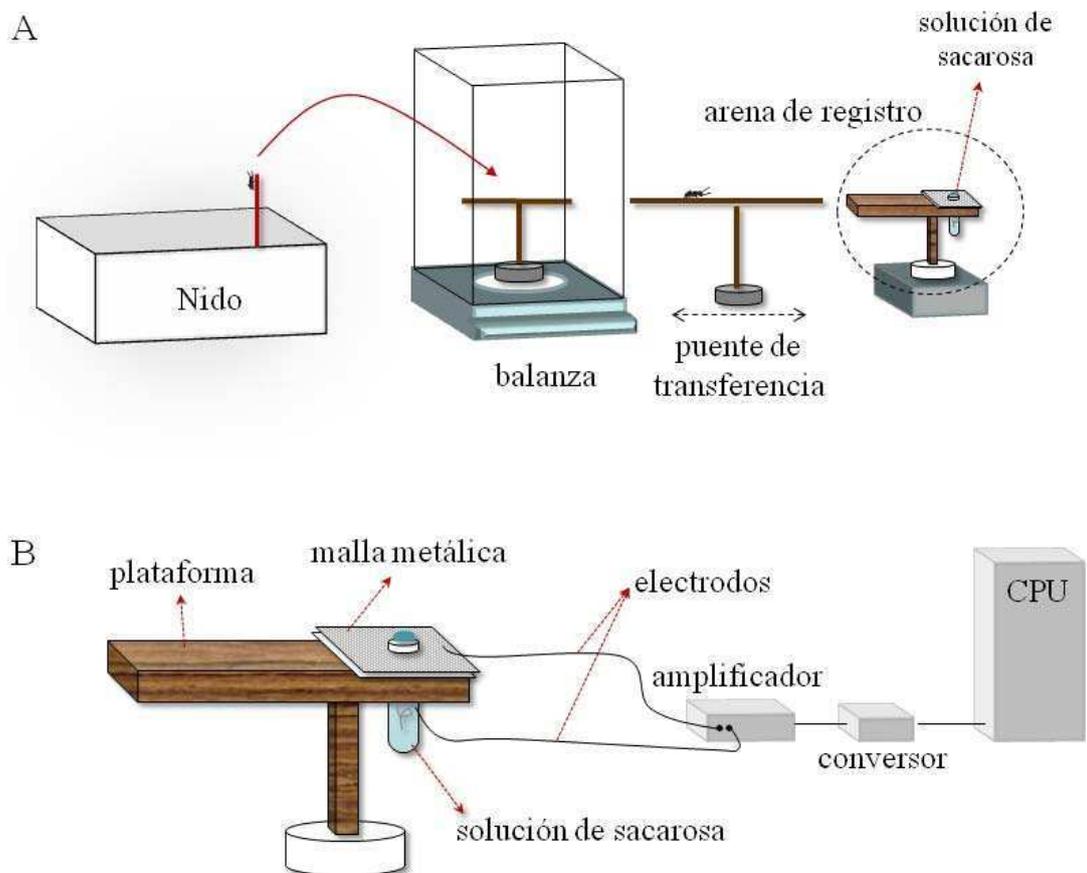


Figura 2.1. Registro de las señales eléctricas generadas por las hormigas durante la ingestión de soluciones de sacarosa. **(A)** Se toman hormigas que se encuentran en el extremo de la varilla vertical y son colocadas individualmente sobre el puente dentro de la balanza. Una vez obtenido el peso de la hormiga, se conecta el puente de transferencia a través del cual tienen acceso a la arena de registro. Luego de la ingesta, regresan por el mismo camino hasta la balanza y se registra el peso de la hormiga con la carga de buche. **(B)** Esquema del dispositivo de registro empleado. Las hormigas arriban por la plataforma y tienen libre acceso a la gota de solución de sacarosa. Al posarse sobre la malla metálica, el circuito entre los dos electrodos se cierra y es posible registrar las señales eléctricas generadas durante la ingesta.

2.2.3. Análisis de las señales eléctricas

Los registros de las señales eléctricas fueron analizados utilizando el programa MatLab 6.5. A través del mismo se realizaron gráficos que muestran la señal obtenida (Fig. 2.2A) y su correspondiente espectrograma (Fig. 2.2B). Un espectrograma es una representación visual tridimensional de las variaciones de la frecuencia (eje de ordenadas) y de la intensidad de las mismas (mediante un código de colores) a lo largo del tiempo (eje de abscisas). Para su construcción el programa aplica una transformación de Fourier a pequeños rangos temporales sucesivos a lo largo de la señal (en este trabajo utilizamos rangos de 0.64 segundos). De esta forma, se obtuvieron los valores de la frecuencia de la señal en intervalos de 0.64 segundos a lo largo de toda la ingesta. Además, se obtuvo información sobre la frecuencia predominante en la ingesta total a través de un periodograma (Fig. 2.2C), que muestra la estimación espectral de potencia o energía (en unidades arbitrarias) con la que se encuentra representada cada frecuencia en dicha señal.

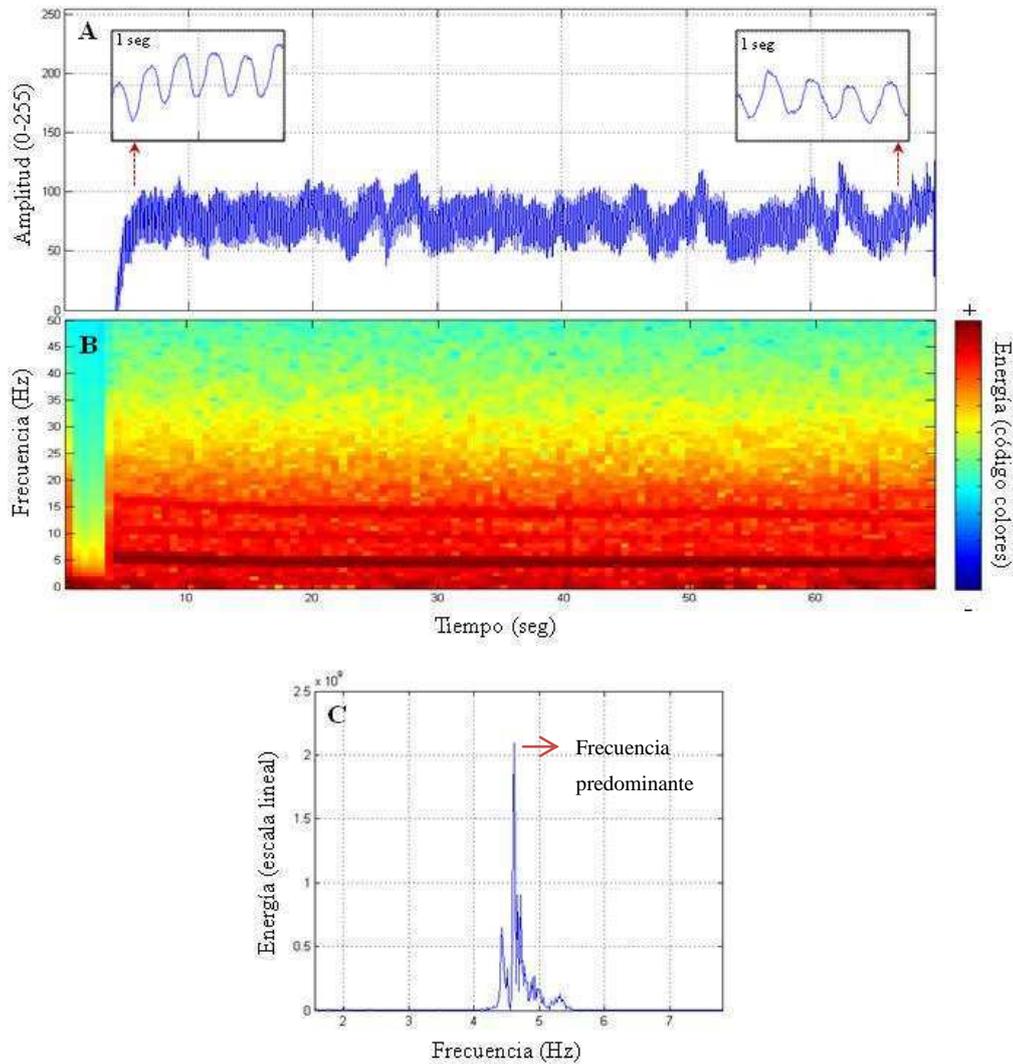


Figura 2.2. Ejemplo de análisis de una señal eléctrica registrada durante la ingestión de soluciones de sacarosa. **(A)** Señal registrada. La amplitud de la señal está expresada en unidades arbitrarias (0-255). Los gráficos insertos muestran un detalle de la señal (1 seg) al inicio y al final de la ingesta. **(B)** Espectrograma (frecuencias a lo largo del tiempo). La energía de cada frecuencia es representada mediante un código de colores (barra a la derecha): azul indica baja energía y marrón alta energía. **(C)** Periodograma (estimación espectral de potencia o energía de cada frecuencia en unidades arbitrarias). El pico de mayor energía indica la frecuencia predominante de bombeo.

BOMBA DE SUCCIÓN Y REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO

3.1. INTRODUCCIÓN

La alimentación es un comportamiento complejo cuya regulación involucra la integración de diversos factores tanto externos como internos (Chapman, 1998). Es así como un estímulo determinado puede afectar el comportamiento alimentario de un animal de diferentes maneras. Las hormigas neotrópicas modulan muchas variables comportamentales (aceptación de néctar, tiempo de ingestión, número y duración de las interrupciones y carga de buche, entre otros) dependiendo de las propiedades de la fuente de alimento (flujo, concentración de azúcar y viscosidad) (Josens et al., 1998; Paul y Roces, 2003; Schilman y Roces, 2003; Medan y Josens, 2005) y el ayuno de la colonia (Howard y Tschinkel, 1980; Cosens y Toussaint, 1986; Josens y Roces, 2000; Falibene y Josens, 2008).

Estudios previos han descrito variaciones en la tasa de ingestión como consecuencia de la morfometría del insecto o de las propiedades físicas del fluido ingerido (moscas: Thomson y Holling, 1974; vichucas: Smith, 1979; Guarneri et al., 2000; Sant' Anna et al., 2001; Guarneri et al., 2003; mariposas: May, 1985; Harder, 1986; polillas: Josens y Farina, 2001; hormigas: Josens et al., 1998; Josens, 2002; Paul y Roces, 2003; Davidson et al., 2004; Medan y Josens, 2005; abejas: Borrell, 2006, 2007). Sin embargo, cuando todos estos parámetros se mantienen constantes, la hormiga neotrópica *C. mus* es capaz de modular la tasa de ingestión de acuerdo a los requerimientos energéticos de la colonia (Josens y Roces, 2000; Falibene y Josens, 2008) variando la frecuencia de contracción de los músculos de la bomba de succión (Falibene y Josens, 2008). Esta fue la primera descripción de una modulación en la frecuencia de bombeo de acuerdo al estado interno en insectos abriendo muchas preguntas referentes al comportamiento de ingestión y su control.

En este capítulo comenzaremos estudiando la relación existente entre la actividad de la bomba de succión y el comportamiento durante la ingestión de soluciones azucaradas. Con ello, pretendemos aportar nuevos datos que permitan profundizar la comprensión de la regulación del comportamiento alimentario en hormigas nectívoras.

3.1.1. Objetivos

- ❖ Definir parámetros que permitan caracterizar las señales eléctricas generadas por las hormigas durante la ingestión de soluciones azucaradas de distintas concentraciones y bajo distintos niveles de privación de azúcares de la colonia.
- ❖ Relacionar dichos parámetros con el comportamiento de ingestión para evaluar qué componentes podrían estar involucrados en la regulación de la alimentación en hormigas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Series experimentales

3.2.1.1. Efecto del ayuno de la colonia

El primer objetivo fue obtener y comparar las señales eléctricas generadas durante la ingestión de soluciones azucaradas por hormigas bajo distintos niveles de ayuno. Los registros se realizaron durante la ingesta de soluciones de sacarosa de dos concentraciones distintas (10 y 40% p/p) en experimentos independientes. Para cada concentración, una colonia de laboratorio fue sometida a diferentes períodos de privación de carbohidratos. Primero, fueron privadas de azúcares por 2 semanas (± 1) alcanzando el estado que denominamos de ayuno, cuando se realizaron los primeros registros de las señales eléctricas (ver sección 2.2). Finalizados los primeros registros, las colonias fueron alimentadas ad libitum con solución de sacarosa por 3 ó 4 días consecutivos, alcanzando el estado de saciedad o no-ayuno. Bajo este estado se registraron nuevamente las señales eléctricas generadas por las hormigas durante la ingestión.

3.2.1.2. Efecto de la concentración de sacarosa

En este experimento, se estudió el efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad de la bomba de succión y el comportamiento de ingestión. Una colonia fue privada de carbohidratos durante 1 semana y luego, durante 3 días consecutivos, se registraron las señales eléctricas generadas durante la ingestión de soluciones de distintas concentraciones. Para ello, las hormigas -de a una por vez- se colocaron en la arena de registro en donde se les ofreció soluciones de sacarosa 10, 40 ó 60% p/p en forma aleatoria. Todas las concentraciones fueron ofrecidas cada día en igual proporción. Cada individuo fue utilizado una única vez y con solo una solución, dejándolos separados del resto de la colonia hasta el final del experimento. Las hormigas se pesaron antes y después de realizar el registro.

3.2.2. Variables y parámetros

Para cada individuo se calculó la carga de buche (mg) como la diferencia entre el peso final e inicial. El volumen ingerido (μl) se obtuvo dividiendo la carga de buche por la densidad de la solución de sacarosa (obtenida de tablas; Wolf et al., 1984). Por otro lado, de las señales eléctricas se obtuvieron los siguientes parámetros:

El tiempo de ingestión (segundos; s) representa la duración de la señal eléctrica y coincide con el tiempo que el animal está en contacto con la gota. La frecuencia predominante (bombeos por segundo; b/s) fue definida como el componente principal que presenta el pico más alto en el periodograma (energía x frecuencia) que resulta del análisis de toda la señal. A partir del espectrograma (frecuencia en función del tiempo) se obtuvo la frecuencia principal para cada intervalo de 0.64 s durante todo el tiempo de ingestión. Llamamos frecuencia inicial (fi) y final (ff) a los valores obtenidos al inicio y al final de la ingesta, respectivamente (ambos expresados en b/s). La diferencia entre estas frecuencias (fi - ff) fue definida como el intervalo de frecuencias (IF).

Está bien establecido que la frecuencia de la señal cae a medida que avanza la ingesta (Josens et al., 2006; Falibene y Josens, 2008). Esto implica que el valor de la fi es siempre el mayor mientras que el valor de la ff es el más bajo de la señal, siempre y cuando la señal solo presente un patrón regular (ver Josens et al., 2006; Falibene y Josens, 2008). Consecuentemente, la tasa de cambio de frecuencia (tc)

fue definida como la pendiente resultante de la variación de la frecuencia en función del tiempo, valor que fue calculado para cada señal. Para comparar esta tasa de cambio a lo largo de la ingesta, el valor t_c fue calculado cada 10 s. De este modo definimos t_{c10} como la tasa de cambio en los primeros 10 s de la señal, t_{c20} a la correspondiente al periodo comprendido entre los 10 y los 20 s desde iniciada la ingesta, t_{c30} a la correspondientes al periodo entre los 20 y 30 s, y así sucesivamente.

El número total de bombeos realizados durante la totalidad de la ingesta se calculó como la suma del número de bombeos realizados en cada intervalo de 0.64 s. Este valor, a su vez, fue obtenido multiplicando la frecuencia principal de cada intervalo por su duración (0.64 s). Finalmente, el volumen incorporado por bombeo se estimó dividiendo el volumen ingerido por el número total de bombeos.

3.2.3. Análisis estadístico

Las variables y parámetros de la señal fueron analizados por ANOVA de un factor o por Kruskal-Wallis en los casos que no se cumpliera con los supuestos de normalidad. Como las soluciones de sacarosa de 10 y 40% fueron evaluadas en ensayos independientes, las analizamos separadamente. En el primer experimento (efecto del ayuno de la colonia), para comparar la t_c a lo largo de la señal y entre ayunos se utilizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas (factor 1: nivel de ayuno, 2 niveles; factor 2 -medida repetida-: períodos de 10 s; 3 niveles para 10% p/p y 5 niveles para 40% p/p). Para este análisis, solo utilizamos las señales con una duración igual o mayor a la comprendida en los periodos analizados, es decir, las señales que duraron, al menos, 30 s al ingerir la solución de concentración 10% p/p y 50 s al ingerir la solución 40% p/p.

En el segundo experimento (efecto de la concentración de la solución), cuando el análisis por Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas, se realizaron contrastes a posteriori mediante comparaciones de Dunn. Las correlaciones entre variables se analizaron utilizando Spearman. El nivel de significancia fue 5% en todos los casos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Efecto del ayuno de la colonia

La figura 3.1 muestra la frecuencia de bombeo en función del tiempo de ingestión para hormigas ayunadas y no-ayunadas al ingerir una solución de sacarosa 10% (Fig. 3.1A) y una 40% p/p (Fig. 3.1B). Puede observarse cómo los individuos pertenecientes a una misma colonia y bajo un mismo ayuno se comportaron de manera similar, mostrando perfiles de señales con escasa variación interindividual. Esto puede verse reflejado en el pequeño error estándar de los datos, sobre todo al inicio de la ingesta.

Se definieron distintos parámetros (indicados en la Fig. 3.1) que permitan caracterizar a las señales y se compararon entre ayunos para una misma concentración de sacarosa. La *fi* y *ff* resultaron significativamente mayores para las hormigas ayunadas que para las no ayunadas, independientemente de la solución ingerida. Lo mismo ocurrió con el IF de la señal (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Comparación entre niveles de ayuno de los parámetros de la señal eléctrica generada durante la ingesta de solución de sacarosa 10% y 40% p/p. Los valores mostrados corresponden a los estadísticos de prueba y los valores de *p* del análisis por Kruskal–Wallis.

Concentración (% p/p)	Parámetro de la señal (b/s)	Ayuno	No ayuno	estadístico	<i>p</i>
10	<i>fi</i>	5.86 ± 0.12	4.64 ± 0.13	H _{1, N=30} = 17.86	< 0.0001
	<i>ff</i>	4.30 ± 0.15	3.52 ± 0.13	H _{1, N=30} = 10.28	0.0013
	IF	1.56 ± 0.16	1.13 ± 0.17	H _{1, N=30} = 4.20	0.0405
40	<i>fi</i>	7.1 ± 0.14	4.65 ± 0.13	H _{1, N=41} = 30.56	< 0.0001
	<i>ff</i>	4.26 ± 0.17	3.08 ± 0.04	H _{1, N=41} = 21.76	< 0.0001
	IF	2.84 ± 0.23	1.56 ± 0.13	H _{1, N=41} = 16.18	0.0001

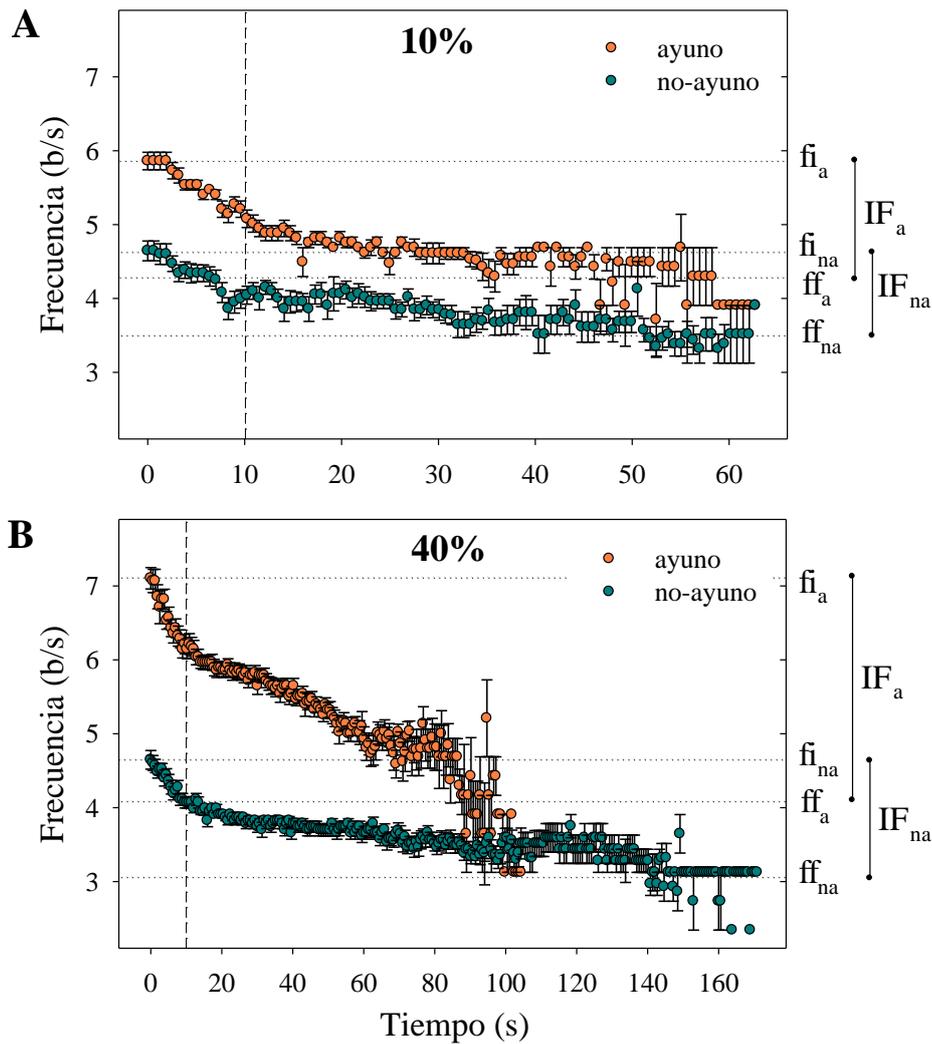


Figura 3.1. Frecuencia de bombeo (en bombeos por segundo; media \pm E.S.) en función del tiempo transcurrido durante la ingesta de solución de sacarosa en hormigas de una misma colonia bajo dos niveles de privación de carbohidratos (ayuno y no-ayuno). Las señales fueron obtenidas durante la ingestión de solución de sacarosa **(A)** 10% ó **(B)** 40% p/p. Se definieron distintos parámetros: f_{i_a} y $f_{i_{na}}$ son las frecuencias iniciales para las hormigas de nidos ayunados (a) y no-ayunados (na), respectivamente. De igual modo, f_{f_a} y $f_{f_{na}}$ son las frecuencias finales para ambos estados de ayuno. Ya que la frecuencia de bombeo disminuye a lo largo de una ingesta, el rango entre la f_f y la f_i fue definido como intervalo de frecuencias (IF_a y IF_{na}). La línea punteada vertical indica los 10 s transcurridos luego de iniciada la ingesta y separa las distintas tasas de cambio de frecuencia (tc) de la señal (ver texto para más detalles). 10%: $N_a = 12$, $N_{na} = 18$; 40%: $N_a = 22$; $N_{na} = 19$.

Todas las señales registradas mostraron un perfil similar: la velocidad con que cae la frecuencia varió a lo largo de la ingesta. Para analizar estadísticamente estos cambios comparamos la tasa de cambio de frecuencia (tc) a lo largo de la señal. Los resultados mostraron que durante los primeros 10 s de ingesta la frecuencia cayó más rápido que en el resto de la señal. Esto ocurrió independientemente del ayuno tanto para soluciones 10% p/p (ayuno*periodo: $F_{2,46} = 2.54$, $p = 0.09$; periodo: $F_{2,46} = 19.20$, $p < 0.0001$; ANOVA de medidas repetidas. Efecto principal del periodo - tc_{10} vs. tc_{20} : $p = 0.0001$; tc_{10} vs. tc_{30} : $p = 0.0002$; tc_{20} vs. tc_{30} : $p = 0.61$; Tukey) como para 40% p/p (ayuno*periodo: $F_{4,156} = 2.88$, $p = 0.024$. Efecto simple del periodo: ayuno, $F_{4,156} = 38.23$, $p < 0.001$; no-ayuno, $F_{4,156} = 9.48$, $p < 0.001$; ANOVA de medidas repetidas. Comparaciones a posteriori: tc_{10} vs. $tc_{(20, 30, 40 \text{ ó } 50)}$, $p < 0.05$ para ambos estados de ayuno; para todas las comparaciones restantes: $p > 0.05$). En base a estos resultados distinguimos dos partes de la señal: los primeros 10 s desde el inicio de la ingesta, en donde la tasa de cambio (tc_{10}) es mayor (es decir, la frecuencia decae con mayor velocidad), y el resto de la señal, en donde la tasa de cambio (tc_r) permanece constante y la frecuencia decae más suavemente.

Además, observamos que tanto tc_{10} como el IF correlacionan con la fi (tc_{10} : $r_s = -0.52$, $p < 0.0001$; IF: $r_s = 0.77$, $p < 0.0001$; $N = 71$, correlación de Spearman para los datos de 10% y 40% p/p): la tc_{10} correlacionó negativamente, a mayor fi, más negativo fue el valor de tc, es decir, la frecuencia decreció con mayor velocidad. Por su parte, el IF lo hizo de forma positiva; cuanto mayor fue la frecuencia con la que comenzaron a bombear, mayor fue el intervalo de frecuencias recorrido.

El efecto del ayuno sobre tc también fue analizado para las distintas concentraciones. Mientras que las hormigas que ingirieron una solución 10% p/p no mostraron diferencias significativas entre ayunos para esta variable (efecto principal del ayuno: $F_{1,23} = 0.017$, $p = 0.9$), los individuos ayunados que ingirieron la solución de sacarosa 40% p/p presentaron mayores tc que los no-ayunados (efectos simples del ayuno para cada periodo de 10s. Periodo: tc_{10} , $F_{1,195} = 18.49$, $p < 0.0001$; tc_{20} , $F_{1,195} = 2.05$, $p = 0.15$; tc_{30} , $F_{1,195} = 0.04$, $p = 0.85$; tc_{40} , $F_{1,195} = 1.94$, $p = 0.17$; tc_{50} , $F_{1,195} = 13.83$, $p = 0.0003$).

Todos estos cambios observados en la actividad de la bomba de succión fueron reflejados en el comportamiento alimentario de las hormigas. Por un lado, cuando la solución ofrecida fue de concentración 10% p/p, no se encontraron

diferencias significativas en el tiempo de ingestión entre hormigas ayunadas y no ayunadas ($F_{1,28} = 0.02$, $p = 0.87$; ANOVA. Fig. 3.2A); pero si en el volumen de solución ingerido, que fue mayor para el estado de ayuno ($F_{1,28} = 7.10$, $p = 0.013$; ANOVA. Fig.3.2B). Por el contrario, el volumen de solución ingerido no varió entre ayunos para la concentración 40% p/p ($F_{1,39} = 0.66$, $p = 0.42$; ANOVA. Fig. 3.2B), mientras que el tiempo de ingestión fue significativamente más corto para el estado de ayuno ($F_{1,39} = 22.49$, $p < 0.0001$; ANOVA. Fig. 3.2A).

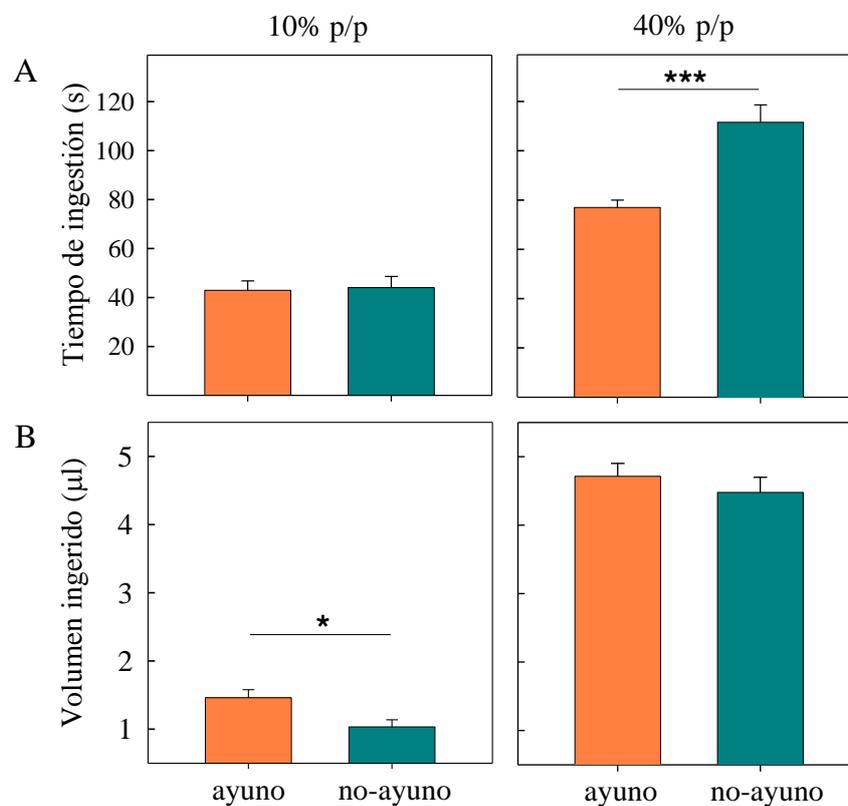


Figura 3.2. Efecto del ayuno de carbohidratos en el comportamiento durante la ingestión de solución de sacarosa. Columna izquierda: hormigas que en la arena de registro encontraron solución de sacarosa 10% p/p. Columna derecha: La solución ofrecida en la arena fue de 40%. Las variaciones con el ayuno en (A) el tiempo de ingestión (media + E.S.) y (B) el volumen de solución ingerido (media + E.S.) dependieron de la solución encontrada. 10%: $N_a = 12$, $N_{na} = 18$; 40%: $N_a = 22$; $N_{na} = 19$.

En todas las situaciones analizadas hemos encontrado que las variables comportamentales y los parámetros de la señal variaron con el estado de la colonia; la *f_i*, la *f_f*, el IF (para 10 y 40%), la *t_c*, el tiempo de ingestión (para 40%) y el volumen ingerido (para 10%) dependieron del periodo de privación de azúcares. Sin embargo, el número total de bombeos realizados durante la ingesta se mantuvo constante entre ayunos, tanto para soluciones de 10% ($F_{1,28} = 4.09$, $p = 0.053$; ANOVA) como para 40% p/p ($F_{1,39} = 0.09$, $p = 0.76$; ANOVA) (Fig. 3.3A). Finalmente, el volumen ingerido por bombeo tampoco varió entre ayunos ni para 10% ($F_{1,28} = 0.41$, $p = 0.53$; ANOVA) ni para 40% ($F_{1,39} = 0.005$, $p = 0.94$; ANOVA) (Fig. 3.3B). Además, como era de esperar, el volumen ingerido por bombeo correlacionó positivamente con el peso de la hormiga ($r_s = 0.51$, $p = 0.0006$, $N = 41$; correlación de Spearman). Por ejemplo, para una solución de sacarosa 40% p/p, el volumen por contracción de la bomba varió desde aproximadamente 4.5 nl en hormigas pequeñas (aprox. 3.6 mg, no incluidas en los datos) hasta 16 nl para las de mayor tamaño (aprox. 14.2 mg).

3.3.2. Efecto de la concentración

El comportamiento de ingestión y la actividad de la bomba de succión variaron dependiendo de la concentración de la solución. Hormigas del mismo tamaño ($F_{2,41} = 1.31$, $p = 0.28$; ANOVA) invirtieron más tiempo en la ingestión de soluciones más concentradas ($H_{2, N=44} = 19.63$, $p = 0.0001$; Kruskal–Wallis. 10% vs. 40%: $Q = 2.55$, $p < 0.05$; 10% vs. 60%: $Q = 4.85$, $p < 0.001$; 40% vs. 60%: $Q = 2.76$, $p < 0.02$; contrastes de Dunn). También se observaron cambios en la tasa de ingestión ($H_{2, N=44} = 22.46$, $p < 0.0001$; Kruskal–Wallis); las hormigas que ingirieron las soluciones de 10% y 40% p/p alcanzaron valores similares ($Q = 0.21$, $p > 0.5$; comparaciones de Dunn) mientras que las hormigas que ingirieron la solución 60% p/p redujeron la tasa de ingestión significativamente (10% vs. 60%: $Q = 4.10$, $p < 0.001$; 40% vs. 60%: $Q = 3.95$, $p < 0.001$; comparaciones de Dunn).

El decremento en la velocidad de ingestión con el aumento de la concentración de sacarosa a priori podría deberse a una disminución en el volumen ingerido por bombeo como consecuencia de un aumento en la viscosidad o bien por una disminución en la frecuencia de bombeo. Para evaluar estas posibilidades, ambas

variables fueron analizadas. La frecuencia de bombeo predominante no se vio afectada por la concentración de la solución ($F_{2,41} = 0.72$, $p = 0.49$; ANOVA. Fig. 3.4A); tampoco la f_i ($H_{2, N = 44} = 0.11$, $p = 0.94$; Kruskal–Wallis), el IF ($H_{2, N = 44} = 1.00$, $p = 0.61$; Kruskal–Wallis) o la t_c (t_{c10} : $H_{2, N = 44} = 4.10$, $p = 0.13$; t_{c1} : $H_{2, N = 44} = 2.00$, $p = 0.37$; Kruskal–Wallis). Sin embargo, el volumen ingerido por cada bombeo se redujo significativamente con la concentración más alta ($H_{2, N = 44} = 24.72$, $p = 0.0001$; Kruskal–Wallis. 10% vs 40%: $Q = 0.4$, $p > 0.5$; 10% vs. 60%: $Q = 4.26$, $p < 0.001$; 40% vs. 60%: $Q = 3.97$, $p < 0.001$; comparaciones de Dunn. Fig. 3.4B), lo cual es esperable por efecto del incremento de la viscosidad al aumentar la concentración de la solución.

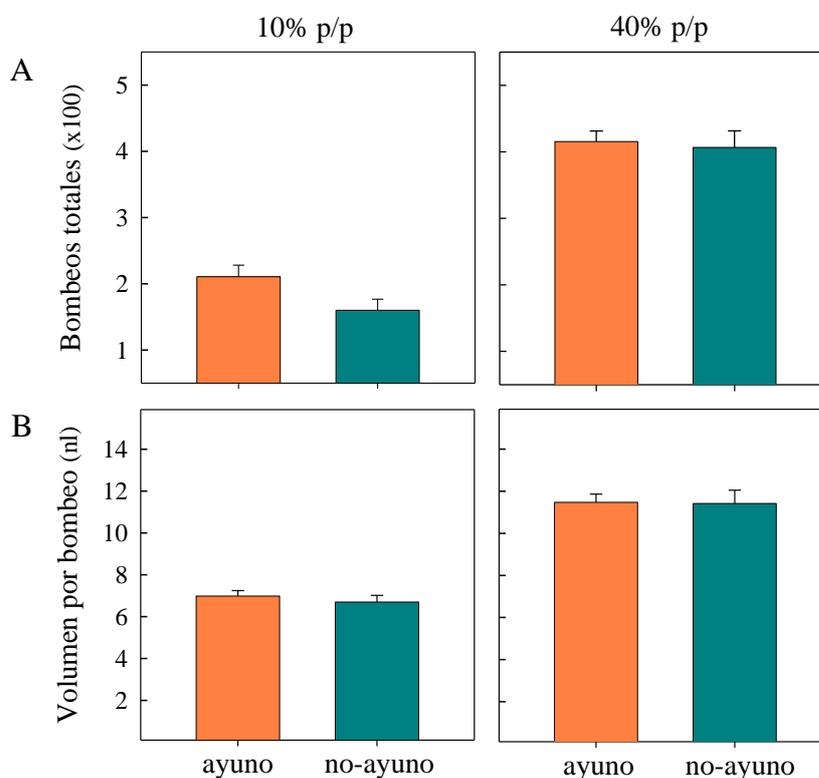


Figura 3.3. Variables obtenidas de las señales eléctricas generadas durante la ingestión por hormigas provenientes de colonias ayunadas y no ayunadas en carbohidratos. Columna izquierda: hormigas ingiriendo solución de sacarosa 10% p/p. Columna derecha: La solución ofrecida en la arena fue de 40%. **(A)** El número total de contracciones de la bomba de succión realizados durante una ingesta (media + E.S.) no varió entre ayunos ni al ingerir soluciones 10% ni para 40% p/p. **(B)** El volumen de solución incorporado por cada contracción (media + E.S.) no se vio afectado por el ayuno de los individuos. 10%: $N_a = 12$, $N_{na} = 18$; 40%: $N_a = 22$; $N_{na} = 19$.

Por último, un aumento en la concentración también provocó un incremento en el número total de bombeos realizados durante la ingesta ($H_{2, N = 44} = 23.04$, $p < 0.0001$; Kruskal–Wallis. Fig. 3.4C). Esta tendencia se volvió significativa a partir de 40% p/p (10% vs. 40%: $Q = 2.30$, $p > 0.05$; 10% vs. 60%: $Q = 5.26$, $p < 0.001$; 40% vs. 60%: $Q = 3.54$, $p < 0.002$; comparaciones de Dunn). Debido a que la frecuencia de bombeo se mantuvo constante entre las concentraciones, una relación directa resultó entre el número de bombeos totales y el tiempo de ingestión ($r_s = 0.95$, $N = 44$, $p < 0.0001$; correlación de Spearman del pool de datos).

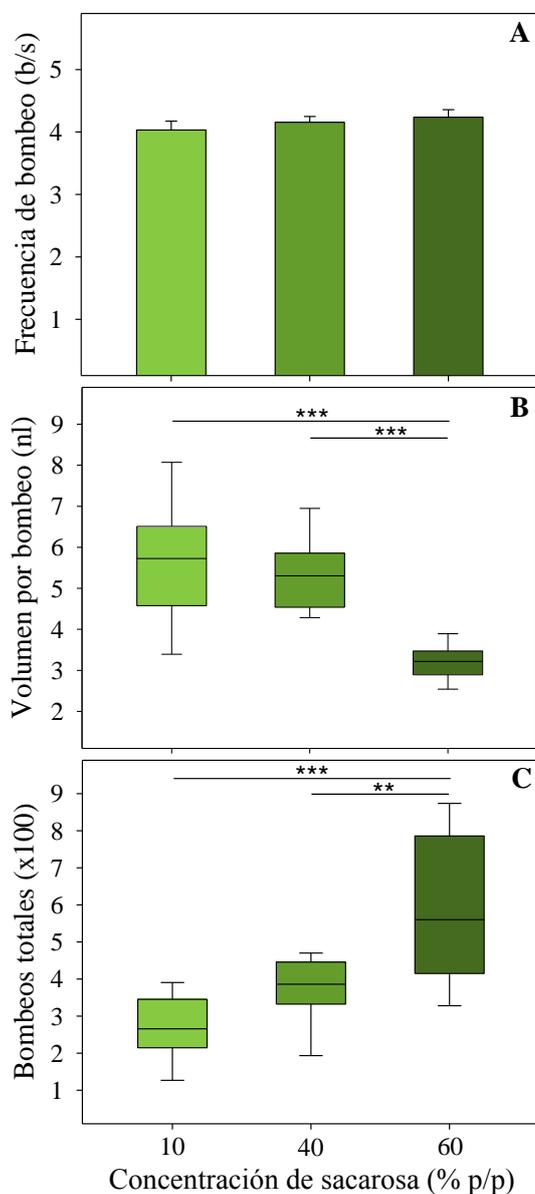


Figura 3.4. Efecto de la concentración de la solución en la actividad de la bomba de succión. **(A)** Frecuencia de bombeo predominante (media + E.S.). **(B)** Volumen de solución incorporado por cada contracción de la bomba de succión y **(C)** número de contracciones totales de la bomba de succión en función de la concentración de sacarosa ofrecida en la arena de registro. Las cajas muestran los cuartiles, las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana y los bigotes muestran los valores extremos. $N_{10\%} = 14$; $N_{40\%} = 16$; $N_{60\%} = 14$. ** $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. Modulación de la actividad de la bomba de succión

En este capítulo hemos caracterizado las señales eléctricas generadas por la hormiga nectívora *C. mus* bajo distintos estados de ayuno, durante la ingestión de soluciones de sacarosa de distintas concentraciones. A través del análisis de la actividad de la bomba de succión pudimos evaluar algunos aspectos del control de la alimentación en estos insectos, observando de qué manera factores internos (el ayuno de la colonia) y externos (concentración de sacarosa en la solución) afectan la ingestión.

En concordancia con estudios anteriores (Falibene y Josens, 2008), la modulación de la tasa con el ayuno se debió a variaciones en la frecuencia predominante, sin variar esta con la concentración. Aunque este tipo de modulación en insectos fue descrito por primera vez en *C. mus*, esta hormiga no debe ser una excepción dentro de esta clase. En otros grupos, como los nematodos, la frecuencia de bombeo también depende del ayuno (Avery y Horvitz, 1990). En insectos, pese a que muchos trabajos se han focalizado en la dinámica de ingestión de fluidos y su modelización (Kingsolver y Daniel, 1979; Heyneman, 1983; May, 1985; Daniel et al., 1989; Borrell, 2006), hasta el momento las variaciones en la frecuencia de bombeo dependientes del estado motivacional nunca han sido consideradas. Más aun, no solo la frecuencia de bombeo varió con el ayuno, sino que también lo hizo la tasa con la que cae la frecuencia a lo largo de la ingesta. Esto guarda una relación directa con el IF: cuanto menos negativo es el valor de t_c , es decir, cuanto más lento cae la frecuencia, más pequeño es el IF. En otras palabras, si la t_c tiende a cero, la variación de la frecuencia a lo largo de la señal va a ser mínima y la frecuencia predominante representa a las frecuencias de la señal con mayor precisión (el pico en el periodograma será mayor). Cuando la t_c tiende a valores más negativos (es decir, la frecuencia cae con mayor pendiente) o el tiempo de ingestión es muy largo (ver Fig. 3.1B) resultaría importante que otros parámetros de la señal, como ser la f_i o el IF, sean considerados para caracterizarla o tenidos en cuenta cuando la dinámica de ingestión quiere ser modelada.

La frecuencia de bombeo en *C. mus* no varió con la concentración bajo un mismo ayuno, coincidiendo con lo observado en trabajos previos (Josens et al.,

2006). En contraposición, la frecuencia de bombeo en vinchucas disminuye al aumentar la viscosidad del fluido (Smith, 1979). Aquí mostramos que la caída de la frecuencia a lo largo de la ingesta (tc_{10} y tc_r) tampoco varió con la concentración. Además, en concordancia con trabajos anteriores en hormigas (Josens et al., 1998; Paul y Roces, 2003; Medan y Josens, 2005) y otros insectos (Smith, 1979; Josens y Farina, 2001; Borrell, 2006), una mayor concentración (por lo tanto, mayor viscosidad) promovió un aumento en el tiempo de ingestión y una disminución en la tasa de ingestión. De hecho, la ley de Pouiseulle sobre dinámica de fluidos describe una relación inversa entre la velocidad de circulación de un fluido y su viscosidad. Así, mientras la frecuencia es constante, nuestros resultados pueden ser explicados en términos de dicha ley: bajas tasas de ingestión con soluciones de altas concentraciones se deben a un decremento en el volumen de solución incorporado en cada bombeo como consecuencia de la viscosidad del fluido. Además, una relación positiva entre el volumen por bombeo y el tamaño era esperada ya que la tasa de ingestión aumenta con el tamaño de la hormiga (Josens, 2002) y no hay variación de la frecuencia entre hormigas de distintos tamaños (Josens, 2002; Falibene y Josens, 2008).

En el mismo sentido, el volumen por bombeo para una solución determinada permanece constante entre ayunos. Esto sugiere que la presión negativa generada por la bomba de succión durante la ingestión es independiente del ayuno. Estos resultados refuerzan la idea que las variaciones en la frecuencia de bombeo es el mecanismo principal de modulación de la tasa de ingestión en hormigas *C. mus* (Falibene y Josens, 2008), dejando al volumen de solución incorporado por cada bombeo como consecuencia de la interacción entre la morfometría del insecto y las propiedades de la solución ingerida. Otra posibilidad considerando la ley de Hill, sería que una mayor velocidad de contracción de los músculos cause una disminución de la tensión muscular, la que debería ser compensada por el animal generando una mayor presión para que ingrese el mismo volumen por cada bombeo. Sin embargo, nuestra metodología de registro no permite discriminar entre estas dos opciones.

3.4.2. Modelos de control de la bomba de succión

Algunas décadas atrás se propusieron diferentes modelos de control de la bomba de succión en insectos. El modelo de retroalimentación periférica se basa en receptores de estiramiento localizados en la faringe (Rice, 1970). Este modelo no involucra un centro de procesamiento superior y la frecuencia de bombeo depende solo de la viscosidad del fluido: mayor viscosidad, menor velocidad de llenado de la cámara, menor velocidad de estiramiento; resultando en una menor frecuencia de bombeo. Un modelo alternativo involucra un oscilador central y plantea que la frecuencia de bombeo es independiente del fluido ingerido. Smith (1979) integró ambos modelos proponiendo que la actividad de las motoneuronas que accionan los músculos de la bomba es el resultado de la suma de, por un lado, la excitación (constante) proveniente desde el sistema nervioso central y, por otro, la inhibición con cierto retardo por parte de los receptores de estiramiento en la faringe (activados al alcanzar un volumen máximo por cada bombeo). Este modelo explica el comportamiento observado en vichucas las que varían la frecuencia de bombeo mientras mantienen un volumen por bombeo constante al variar la viscosidad del fluido. El hecho que, en contraposición, las hormigas varían el volumen por bombeo mientras la frecuencia se mantiene constante al variar la concentración de la solución muestra que este modelo de Smith no explica el accionar de la bomba de succión en este insecto. Creemos que un tipo de procesamiento superior está involucrado en este control. Más recientemente, los patrones motores de la bomba de succión en otros insectos sugieren un control por parte del ganglio frontal (Miles and Booker, 1998).

3.4.3. Estrategias de recolección y modulación del comportamiento alimentario

En términos generales, la variación en la tasa de ingestión permitiría a las hormigas responder de distintas formas a las variaciones ambientales y a los requerimientos de carbohidratos de la colonia, los cuales varían estacionalmente. A partir de nuestros resultados podemos distinguir dos estrategias diferentes de recolección, las cuales dependen de la riqueza de la fuente de alimento y del ayuno de la colonia. Ambas pueden ser explicadas bajo la hipótesis informacional propuesta por Núñez (Núñez, 1982; Roces y Nuñez, 1993). Por un lado, cuando la fuente de alimento encontrada es relativamente pobre (10% p/p), las hormigas invierten un tiempo corto en la ingestión, que no difiere entre ayunos. Pero, al

bombear a mayores frecuencias, las hormigas ayunadas incorporan un volumen mayor de alimento. Por otro lado, cuando encuentran una fuente más rica (40% p/p), las hormigas ayunadas cargan la misma cantidad de alimento que las hormigas no ayunadas, pero en un tiempo menor. A nivel de la colonia, esto implica que cuando la fuente es relativamente pobre y no representa una información valiosa para el resto de la colonia, las recolectoras con altos requerimientos de carbohidratos aumentan la cantidad de alimento sin sacrificar el intercambio de información; por otro lado, cuando la fuente es más rica, la información sobre la misma se vuelve relativamente más valiosa y las hormigas regresan al nido con mayor rapidez, incrementando el intercambio de información en la colonia y sin pagar este aumento con una disminución en la carga de alimento transportado.

3.4.4. Reglas de decisión durante la recolección

Distintos estudios han considerado las reglas que sigue una hormiga recolectora para decidir cuándo abandonar una fuente de alimento y regresar a la colonia. Se ha propuesto que la decisión podría llevarse a cabo de acuerdo a un criterio de carga del buche o de tiempo en la fuente de alimento. Según el primer criterio, las hormigas ingieren hasta alcanzar una carga determinada. Tal parece ser el caso de las hormigas exploradoras de *Lasius niger* que, al presentarles flujos de entrega de solución más lentos, permanecen en la fuente hasta alcanzar un volumen crítico de néctar antes de tomar la decisión de regresar al nido (Mailleux et al., 2000). Por otro lado, las hormigas podrían decidir cuándo abandonar la fuente utilizando como criterio el tiempo de ingestión. Se ha demostrado que las hormigas de la especie *Camponotus rufipes* son capaces de medir intervalos de tiempo durante la recolección de alimentos y usarlo como regla de decisión de abandono de la fuente (Schilman y Roces, 2003). Sin embargo, en el mismo trabajo se demostró que la decisión de finalizar la ingesta no está basada ni en un periodo fijo de tiempo ni en una carga fija de buche. Cuando a estas hormigas se les ofrece solución azucarada a distintos flujos se puede observar que cuanto menor es este, mayor es el tiempo de permanencia en la fuente y menor la carga de buche (Schilman y Roces, 2003).

Sin embargo, los resultados aquí presentados muestran que un criterio diferente podría ser utilizado por *C. mus* y por los insectos para finalizar la ingesta en fuentes ad libitum visitadas por primeras vez. Cuando comparamos el

comportamiento bajo distintos ayunos en las fuentes de 10% p/p, las hormigas parecieran seguir el criterio del tiempo, mientras que en las fuentes de 40% parecen basarse en el criterio de carga de buche. Pero al considerar el análisis de las señales eléctricas, resulta que la cantidad de bombeos totales generados permanece constante entre ayunos y varía con la concentración. Con esto, una hipótesis posible es que el criterio utilizado para abandonar la fuente podría basarse en la asignación de una cantidad de bombeos totales a realizarse durante una ingesta, los cuales estarán determinados por la riqueza (contenido de azúcares; concentración) de la fuente de alimento. De acuerdo con esto, se ha visto en esta hormiga que el tiempo de ingestión varía con la concentración de la solución pero no con soluciones de igual concentración y distinta viscosidad (Medán y Josens, 2005). Una asignación de cantidad de bombeos en función de la concentración de la fuente de alimento, también puede reflejar un gasto energético asignado acorde a la tasa de energía entregada por la fuente, la cual depende esencialmente de la concentración de néctar cuando el flujo es ilimitado. En *C. rufipes* el gasto energético durante la recolección está relacionado con el flujo de la fuente pero no con la concentración cuando los flujos son regulados (Schilman y Roces, 2006). Esto último podría deberse precisamente a que los flujos son considerablemente menores a las tasas de ingestión que los individuos alcanzan en una fuente ad libitum de igual concentración (Paul y Roces, 2003). Hasta el momento no se han publicado trabajos que analicen el gasto energético durante la ingestión de soluciones de distintas concentraciones presentadas ad libitum. Más allá de los insectos sociales, en vinchucas, al ingerir de fuentes artificiales aumentan el tiempo de ingestión y disminuyen el volumen ingerido conforme aumenta la viscosidad del fluido pero, coincidentemente, mantiene constante el número total de contracciones de la bomba de succión (Smith, 1979).

INGESTIÓN DE CEBOS TÓXICOS

4.1. INTRODUCCIÓN

Las hormigas del género *Camponotus* se conocen vulgarmente bajo el nombre de “hormigas carpinteras” debido a que generalmente se establecen y construyen sus nidos en madera. Aunque prefieren la madera húmeda y en proceso de descomposición, estas hormigas también anidan en madera seca, cañas y debajo de la corteza de los árboles, en grietas y bajo piedras (Kusnezov, 1951; Hansen y Klotz, 2005). En zonas urbanas es común que aniden bajo los techos de tejas o chapa, en maderas estructurales, en grietas en los cimientos de las construcciones e incluso en equipos electrónicos, causando grandes daños. Por estos motivos en innumerables zonas se considera a las hormigas carpinteras como plaga (Kusnezov, 1951; Hansen y Klotz, 2005).

El control químico de hormigas plaga incluye tratamientos “barrera” con insecticidas residuales de contacto y cebos alimentarios. Los insecticidas de contacto (aplicados mediante un spray) son frecuentemente utilizados, sin embargo, su uso no es recomendado y es difícil alcanzar un tratamiento efectivo por varias razones: i) muchos formulados resultan nocivos para el medioambiente, matando insectos benéficos y dando lugar a plagas secundarias (Smith et al., 1996), ii) sus efectos no son duraderos ya que se degradan fácilmente con el calor y la lluvia (Rust et al. 1996); además, es común que queden zonas sin tratar permitiendo el paso de los insectos a través de la barrera química y vi) lo más sobresaliente es que la mayoría de estos insecticidas solo repelen o matan a las hormigas forrajeras que salen del nido y tienen escaso o nulo impacto sobre las reinas (Knight y Rust, 1990; Rust et al., 1996). Como las forrajeras solo constituyen una pequeña fracción de la colonia, son rápidamente reemplazadas por otras obreras. En contraposición, la incorporación de tóxicos a líquidos o geles azucarados como cebo alimentario parece ser el método

ideal contra colonias de insectos sociales ya que las forrajeras colectan dicho cebo y lo transportan hasta el nido en donde lo distribuyen entre los miembros de la colonia. A diferencia de lo que ocurre con los insecticidas de contacto, los cebos alimentarios requieren de bajas concentraciones de tóxico, no se necesita localizar y acceder al nido y elimina a toda la colonia.

Los compuestos que contienen boro como el borato de sodio (bórax o tetraborato de sodio decahidratado) y el ácido bórico han sido utilizados como insecticida en cebos alimentarios para hormigas desde el 1900 (Rust, 1986), siendo efectivos también para otros insectos como moscas, mosquitos y cucucarachas (Cochran, 1995; Xue y Barnard, 2003; Duyck et al., 2004; Habes et al., 2006). Estas sustancias poseen ciertas ventajas sobre otros tóxicos: tienen baja toxicidad para mamíferos (Fail et al., 1998), solubilidad en agua y toxicidad retardada (Rust et al., 2004). Esto último es una condición fundamental para insectos sociales ya que las hormigas forrajeras deben sobrevivir lo suficiente (y no notar los efectos nocivos del tóxico) para realizar sucesivos ciclos recolectores y reclutar a otras forrajeras. De esta forma, el cebo es colectado en grandes cantidades y el tóxico llega, a través de transferencias trofalácticas, a todos los miembros de la colonia.

El ácido bórico es una de las sustancias administradas en forma oral más estudiadas para el control de hormigas neotrópicas en laboratorio y a campo (por ejemplo, Klotz et al., 1997; 1998; 2000; Hooper-Bui y Rust, 2000; Ulloa-Chacón y Jaramillo, 2003; O'Brien y Hooper-Bui, 2005; Daane et al., 2006, 2008). Particularmente, este tóxico ha probado generar gran mortandad en las hormigas neotrópicas de la especie *C. mus*, lo que lo convierte en un buen candidato para ser utilizado en cebos alimentarios (Fernandez y Josens, 2001). Sin embargo, la presencia de un tóxico disuelto en una solución azucarada puede actuar como disuasor de la ingestión, esto es, un aumento en la concentración del tóxico ocasionaría una disminución en la cantidad de cebo consumido (Klotz et al., 1997). Efectivamente, ensayos preliminares con *C. mus* han mostrado que altas concentraciones de ácido bórico en el cebo reducen la aceptación del mismo provocando rechazos y una reducción en la cantidad ingerida, el tiempo y la tasa de ingestión (Fernandez y Josens, 2001). El comportamiento observado podría deberse a que el agregado de ácido a la solución de sacarosa produce una disminución del pH, siendo la acidez lo que podría afectar la respuesta del insecto ante el alimento (Duyck et al., 2004). Por otro lado, se ha registrado una variación estacional en el

consumo de soluciones azucaradas (Sudd y Sudd, 1985; Howard y Tschinkel, 1980, Dussutour y Simpson, 2008; Kay, 2002) y de cebos tóxicos (Tripp et al., 2000), debido a las condiciones de la colonia y/o a la disponibilidad de recursos alternativos. Por lo tanto, es posible que la respuesta ante un cebo tóxico varíe por diversas razones.

En general, la mayoría de los estudios con cebos tóxicos se realizan a nivel colonial o en grupos de hormigas, pero muy pocos a nivel individual (O'Brien y Hooper-Bui, 2005). En este capítulo proponemos estudiar el comportamiento y la dinámica de ingestión a nivel individual de cebos azucarados con compuestos borados. Utilizaremos ácido bórico y borato de sodio, que contiene el mismo principio activo que el ácido pero sin provocar una disminución del pH al ser incorporado al cebo.

4.1.1. Objetivos particulares

- ❖ Evaluar la respuesta de *C. mus* ante distintas concentraciones de borato de sodio y su efectividad como tóxico cuando es incorporado en soluciones azucaradas.
- ❖ Realizar un estudio comparativo entre el borato de sodio y el ácido bórico analizando la respuesta de las hormigas y efectividad del tóxico en distintas situaciones motivacionales.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Borato de Sodio

Hormigas recolectoras pertenecientes a una misma colonia fueron pesadas y colocadas en el puente que conducía a la arena de registro en donde se les ofreció solución de sacarosa 30% p/p conteniendo distintas concentraciones de borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$): 0% (control), 1, 3 ó 5% p/v. Se registró el comportamiento de ingestión y las señales eléctricas generadas por la bomba de succión durante la ingesta de dichas soluciones. Luego, las hormigas fueron pesadas nuevamente y colocadas en frascos (7 cm de diámetro) en grupos de 5 individuos, según el tratamiento recibido. Durante 14 días, se registró la cantidad de hormigas muertas en cada grupo, manteniendo siempre agua y solución de miel ad libitum para evitar

diferencias nutricionales entre grupos que puedan afectar a la supervivencia de los individuos.

4.2.2. Comparación entre tóxicos

Para distintas situaciones motivacionales, se comparó el comportamiento de ingestión de hormigas al ingerir soluciones azucaradas conteniendo distintos tóxicos. Se utilizaron 2 colonias durante 8 días de registro; en cada día de registro se utilizaba solo una colonia y se evaluaban todos los tratamientos a comparar: solución control, solución con borato de sodio y solución con ácido bórico. Las distintas situaciones motivacionales fueron definidas de acuerdo a la proporción de hormigas que aceptaron la solución control, ya que esta variable refleja en buena medida la motivación por recolectar que tiene la colonia (Josens y Roces, 2000). Se considera rechazada una solución cuando la hormiga la encuentra, la contacta con las antenas o la toca con las piezas bucales y se retira sin haberla ingerido. El grupo de aceptación total incluyó aquellos días de registro en los que todas las hormigas evaluadas para la solución control (sacarosa 30% p/p) la aceptaron e ingirieron, mientras que el grupo de aceptación parcial quedó compuesto por aquellos días de registro en donde la aceptación de la solución control no fue total, es decir, al menos una hormiga la rechazó. Cada forrajera era pesada y colocada en el puente que conducía a la arena de registro en donde encontraba solución de sacarosa 30% p/p (control) o una solución de sacarosa de igual concentración conteniendo ácido bórico (5% p/v) o borato de sodio (5% p/v). Luego de medir las distintas variables comportamentales durante la ingestión (del mismo modo que en 4.2.1), la hormiga era pesada nuevamente. Finalmente, se cuantificó la cantidad de hormigas muertas en cada uno de los 14 días siguientes para cada tratamiento.

Para el cálculo del volumen de solución ingerido se procedió tal como fue descrito en la sección 3.2.2 pero la densidad de cada una de las soluciones utilizadas se estimó pesando un volumen conocido de esa solución. El valor utilizado fue el promedio resultante de 5 mediciones.

4.2.3. Análisis estadístico

Las variables y parámetros de la señal fueron analizados por ANOVA de un factor o por Kruskal-Wallis en los casos que no se cumpliera con los supuestos de normalidad y/u homogeneidad de varianza. En el segundo experimento (comparación entre tóxicos), cuando el análisis de ANOVA mostró diferencias significativas, se realizaron contrastes a posteriori mediante comparaciones de Tukey. El nivel de significancia fue 5% en todos los casos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Borato de Sodio

Las hormigas no mostraron diferencias en la aceptación de los cebos ofrecidos en la arena de registro: tanto la solución control como las que contenían distintas concentraciones de borato de sodio fueron aceptadas al 100%. El comportamiento de ingestión y la actividad de la bomba de succión tampoco variaron entre hormigas que ingirieron la solución control o el borato de sodio en distintas concentraciones. Hormigas del mismo tamaño ($H_{3, N = 59} = 2.19, p = 0.53$; Kruskal-Wallis) invirtieron el mismo tiempo ($H_{3, N = 59} = 1.06, p = 0.79$, Kruskal-Wallis) e ingirieron la misma cantidad de solución ($F_{3,55} = 0.69, p = 0.56$; ANOVA) independientemente de la presencia y la concentración de borato de sodio en dicha solución. La tasa de ingestión ($F_{3,55} = 0.63, p = 0.60$; ANOVA. Fig. 4.1A), la frecuencia de bombeo ($F_{3,55} = 1.03, p = 0.39$; ANOVA. Fig. 4.1B), el volumen de solución incorporado por cada bombeo ($F_{3,55} = 0.60, p = 0.62$; ANOVA. Fig. 4.1C) y la cantidad de bombeos totales ($H_{3, N = 59} = 1.33, p = 0.72$; ANOVA) tampoco se vieron afectados por la presencia de borato de sodio en la solución.

Las curvas de mortalidad mostraron un efecto letal dosis-dependiente de borato de sodio (Fig. 4.2). Las hormigas control y las que ingirieron solución con 1% p/v de borato de sodio mostraron una mortalidad del 5 y 20%, respectivamente, a los 14 días luego de ingerir la solución mientras que las hormigas que ingirieron el tóxico en una concentración de 3 y 5% alcanzaron el 50% de mortalidad 8 y 4 días, respectivamente, después de haber ingerido el tóxico.

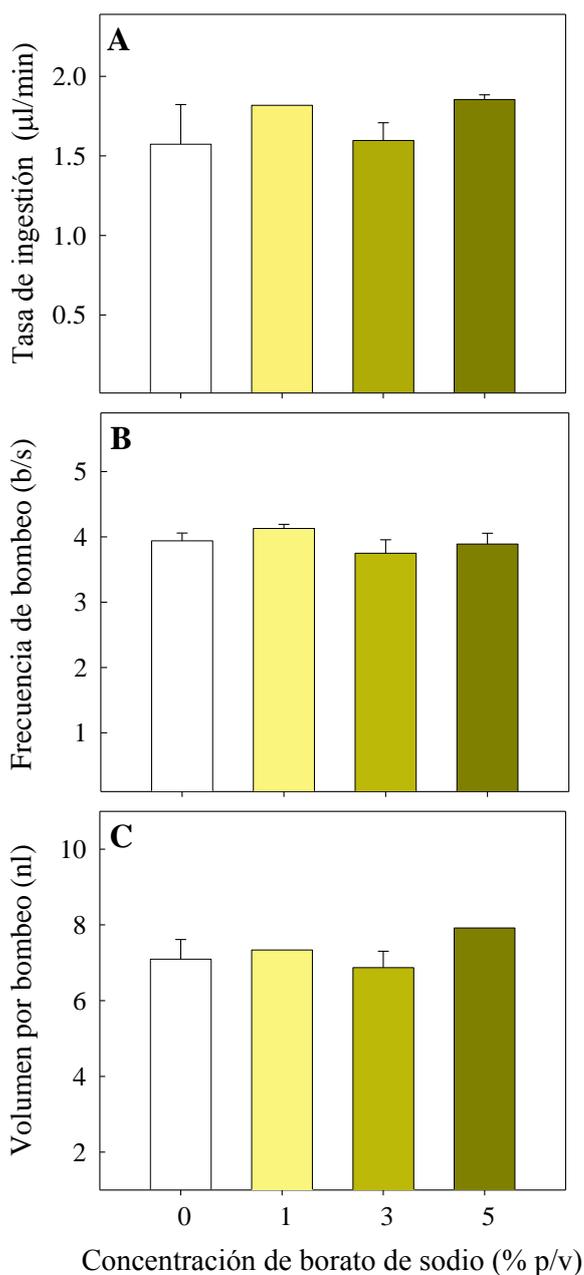


Figura 4.1. Comportamiento de hormigas forrajeras *C. mus* durante la ingestión de solución de sacarosa con distintas concentraciones de borato de sodio. **(A)** Tasa de ingestión. **(B)** Frecuencia de bombeo. **(C)** Volumen de solución incorporado por cada bombeo (media + error estándar). $N_0 = 14$; $N_1 = 15$; $N_3 = 15$; $N_5 = 15$.

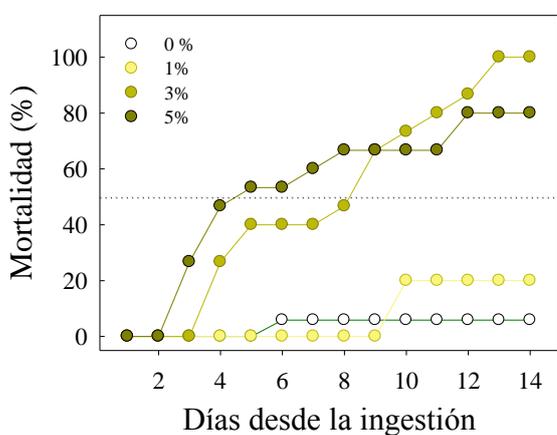


Figura 4.2. Curva de mortalidad de grupos de hormigas que ingirieron solución de sacarosa control o con distintas concentraciones de borato de sodio. Porcentaje de hormigas muertas en función de los días transcurridos desde la ingestión del cebo. La línea punteada cruza cada curva indicando en tiempo transcurrido hasta alcanzar una mortalidad del 50%. $N_{0\%} = 15$; $N_{1\%} = 15$; $N_{3\%} = 15$; $N_{5\%} = 15$.

Estos resultados difieren sustancialmente a los obtenidos con ácido bórico en ensayos preliminares realizados previamente en el laboratorio (Fernandez y Josens, 2001). Dichos experimentos daban cuenta de una disminución en la aceptación, el volumen ingerido y el tiempo de ingestión con concentraciones de ácido bórico mayores a 3% p/v de ácido bórico. En referencia al efecto tóxico, también se encontraron diferencias con lo ensayado previamente: concentraciones de 3, 4 y 5% p/v tuvieron una mortalidad alta y similar, alcanzándose el 50% de hormigas muertas dos días después de ingerido el cebo. Por esta razón se propuso la realización del experimento siguiente, comparando altas concentraciones (5% p/v) de los dos compuestos borados.

4.3.2. Comparación entre tóxicos

Los días de registro fueron separados de acuerdo al criterio de aceptación de la solución control: aceptación total para aquellos días en donde todas las hormigas del grupo control ingirieron la solución de sacarosa 30% p/p (Fig. 4.3A) y aceptación parcial para aquellos días de registro en donde la aceptación de la solución control no fue total (Fig. 4.3E). Este último grupo presentó una aceptación de la solución control promedio del 80%. Esta separación nos permitió observar diferencias entre distintos niveles de motivación recolectora de las forrajeras. Así, al comprar la respuesta ante los distintos tipos de tóxicos se encontró que la respuesta dependió del estado de la colonia.

En los días en donde las hormigas mostraban una aceptación total de la solución control no se observaron diferencias en el comportamiento de ingestión. En primer lugar, la aceptación de los cebos conteniendo tóxico no difirió de la solución control ($p = 0.33$; test de G. Fig. 4.3A). Tampoco se encontraron diferencias en ninguno de los parámetros evaluados: volumen de solución ingerida ($F_{2,88} = 0.57$, $p = 0.57$; ANOVA. Tabla 4.1), tiempo de ingestión ($F_{2,88} = 0.60$, $p = 0.55$; ANOVA. Tabla 4.1), tasa de ingestión ($F_{2,88} = 0.35$, $p = 0.71$; ANOVA. Fig. 4.3B), frecuencia de bombeo ($H_{2, N = 89} = 0.72$, $p = 0.70$; Kruskal-Wallis. Fig. 4.3C), volumen por bombeo ($F_{2,86} = 0.17$, $p = 0.85$; ANOVA. Fig. 4.3D) y número de bombeos totales ($F_{2,87} = 0.39$, $p = 0.68$; ANOVA).

Por otro lado, cuando las hormigas presentaron una menor motivación recolectora, aquellas que encontraron solución de sacarosa conteniendo 5% p/v de

ácido bórico en la arena de registro la aceptaron en una proporción significativamente menor respecto a la solución control ($p = 0.001$; ctr vs. ác.: $p = 0.001$; test de G. Fig. 4.3E). Por el contrario, no se encontraron diferencias entre el control y la solución de borato de sodio al 5% p/v (ctr vs. bor: $p = 0.68$; test de G. Fig. 4.3E). Las otras variables también disminuyeron significativamente para el ácido bórico respecto al borato de sodio o la solución control: el volumen ingerido ($F_{2,72} = 13.62$, $p < 0.0001$; ANOVA. ctr vs. bor: $p = 0.71$; ctr vs. ác: $p = 0.0001$; bor vs ác: $p = 0.0002$; contrastes de Tukey. Tabla 4.1), el tiempo de ingestión ($F_{2,72} = 4.59$, $p = 0.013$; ANOVA. ctr vs. bor: $p = 0.98$; ctr vs. ác: $p = 0.03$; bor vs ác: $p = 0.02$; Tukey. Tabla 4.1) y la tasa de ingestión ($F_{2,72} = 7.31$, $p = 0.001$; ANOVA. ctr vs. bor: $p = 0.23$; ctr vs. ác: $p = 0.0009$; bor vs ác: $p = 0.08$; Tukey. Fig. 4.3F). Las variaciones en la tasa no se debieron a una disminución en la frecuencia de bombeo (H_2 , $N = 57 = 3.67$, $p = 0.16$; Kruskal-Wallis. Fig. 4.3G) sino a un decremento en el volumen de solución incorporado por cada bombeo ($F_{2,54} = 9.47$, $p = 0.0003$; ANOVA. ctr vs. bor: $p = 0.11$; ctr vs. ác: $p < 0.0001$; bor vs ác: $p = 0.004$; Tukey. Fig.4.3H). La cantidad de bombeos totales no se vio afectada por la presencia de tóxico ($F_{2,54} = 0.70$, $p = 0.50$; ANOVA). Bajo esta condición, los registros obtenidos durante la ingesta de solución con ácido bórico mostraron señales menos regulares (Fig. 4.4). En concordancia con el volumen por bombeo, se aprecia que la calidad de cada pico en la señal es menor, observándose picos más achatados.

Tabla 4.1. Volumen de solución ingerida y tiempo de ingestión (media \pm error estándar) en condiciones de alta (aceptación total) y baja (aceptación parcial) motivación recolectora. Se indica el N de cada grupo entre paréntesis.

Parámetro	Solución ingerida	Aceptación total	Aceptación parcial
Volumen ingerido (μl)	Control	2.25 \pm 0.12 (32)	1.41 \pm 0.13 (28)
	Borato de sodio	2.1 \pm 0.11 (30)	1.30 \pm 0.17 (25)
	Ácido bórico	2.07 \pm 0.14 (29)	0.43 \pm 0.10 (22)
Tiempo de ingestión (s)	Control	73 \pm 6 (32)	39 \pm 4 (28)
	Borato de sodio	66 \pm 5 (30)	41 \pm 5 (25)
	Ácido bórico	65 \pm 6 (29)	22 \pm 5 (22)

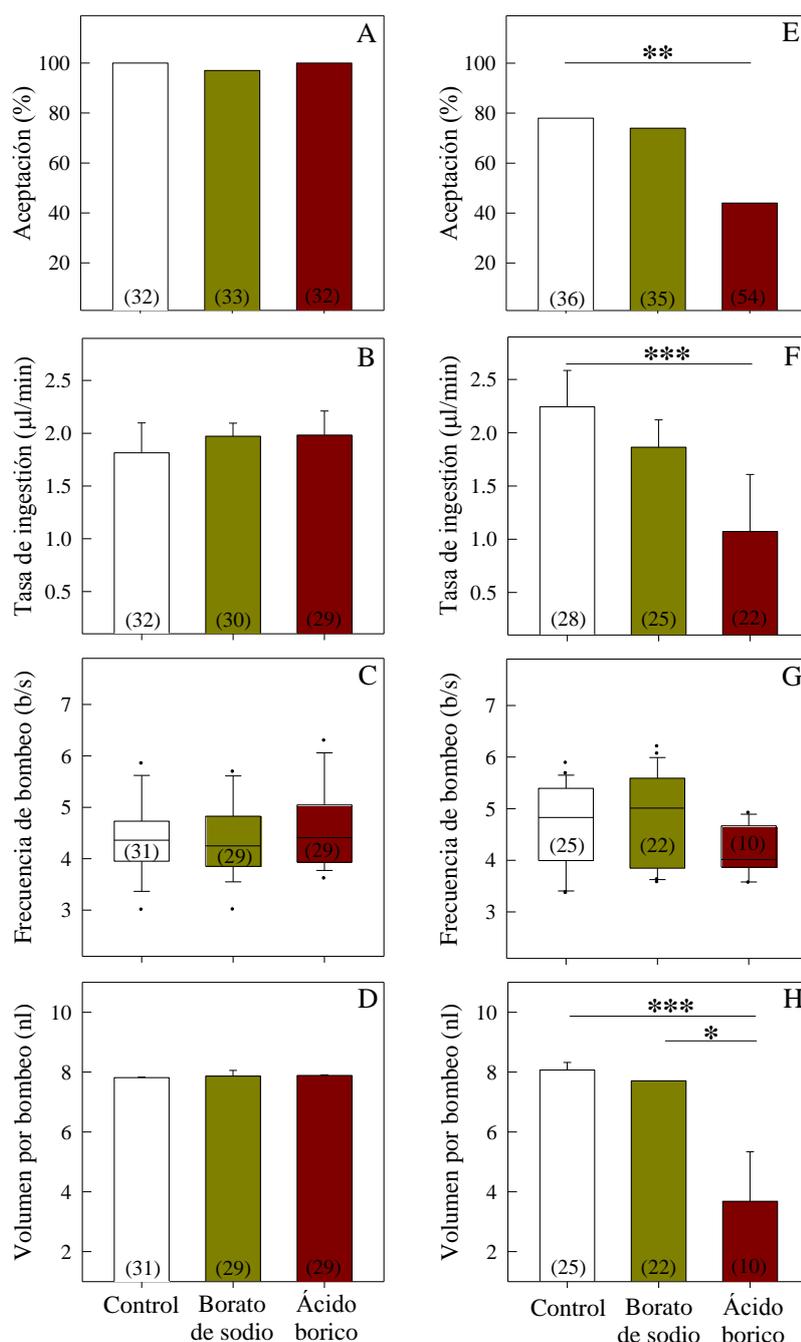


Figura 4.3. Comportamiento durante la ingestión de solución azucarada control, con borato de sodio o ácido bórico 5 % p/v para hormigas con alta (A-D) y baja (E-H) motivación recolectora. (A y E) Aceptación de la solución. Porcentaje de hormigas que ingirieron la solución ofrecida en la arena de registro respecto al total de hormigas ensayadas. (B y F) Tasa de ingestión (media + error estándar). (C y G) Frecuencia de bombeo. Las cajas muestran los cuartiles, las líneas horizontales dentro de las cajas indican la mediana y los bigotes muestran los valores extremos. (D y H) Volumen de solución incorporado por cada bombeo (media + error estándar). La diferencia entre los Ns de cada grupo (indicados entre paréntesis) se debe a que algunas señales registradas fueron poco regulares y no pudieron analizarse por completo para obtener todos los datos * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

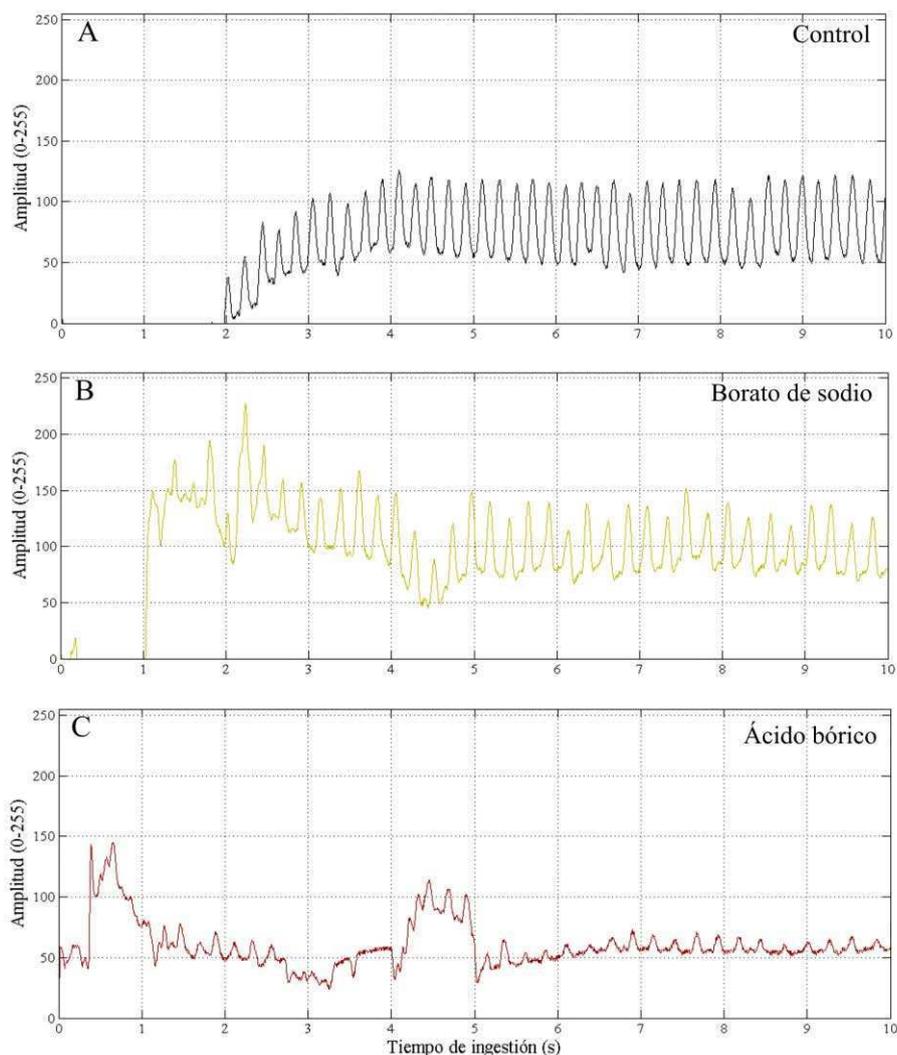


Figura 4.4. Ejemplos de señales eléctricas obtenidas durante la ingestión de (A) solución de sacarosa 30% p/p control, (B) con borato de sodio 5% p/v o (C) con ácido bórico 5% p/v. Se muestran los 10 segundos iniciales de cada ingesta.

Una única ingestión de tóxico resultó suficiente para aumentar la mortalidad respecto al control. En la situación de aceptación total, las hormigas que ingirieron tóxico alcanzaron el 50% de mortalidad 3 días después de la ingestión, independientemente del tóxico ingerido (Fig. 4.5A). En situación de aceptación parcial, el grupo de hormigas que ingirió borato de sodio alcanzó el 50% de mortalidad 2 días después de la ingesta mientras que el que ingirió ácido bórico lo hizo a los 5 días (Fig. 4.5B). Estos resultados responden, seguramente, a la mayor

cantidad de tóxico incorporado (Aceptación total: $H_2, N = 76 = 61, p < 0.0001$; Kruskal-Wallis. ctr vs bor: $Q = 5.63, \text{sign.}$; ctr vs ac: $Q = 7.20, \text{sign.}$; bor vs ac: $Q = 2.15, \text{n.s.}$; VC = 2.39; contrastes de Dunn. Aceptación parcial: $H_2, N = 76 = 61.02, p < 0.0001$; Kruskal-Wallis. ctr vs bor: $Q = 7.00, \text{sign.}$; ctr vs ac: $Q = 4.51, \text{sign.}$; bor vs ac: $Q = 3.46, \text{sign.}$; VC = 2.39; contrastes de Dunn. Tabla 4.2). En ambos grupos, las hormigas control alcanzaron el 50% de mortalidad entre los 11 y 14 días luego del registro (Fig. 4.5).

Tabla 4.2. Cantidad de tóxico ingerido (μg , media \pm error estándar) en condiciones de alta y baja motivación recolectora. Los valores se calcularon para cada hormiga en base a la concentración conocida del tóxico en la solución y el volumen de solución ingerida (μg de tóxico ingerido = volumen de solución ingerida (μl) * concentración del tóxico en la solución ($\text{mg}/\mu\text{l}$) * 10^{-3})

Solución ingerida	Aceptación total	Aceptación parcial
Control	0 ± 0 (32)	0 ± 0 (28)
Borato de sodio	105.6 ± 5.4 (30)	65.1 ± 8.5 (25)
Ácido bórico	103.7 ± 6.9 (29)	22.0 ± 4.9 (22)

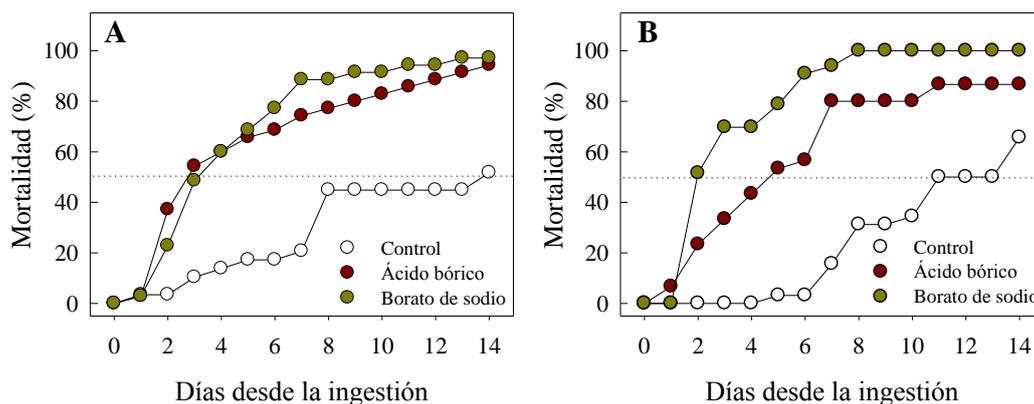


Figura 4.5. Curva de mortalidad de hormigas que ingirieron solución de sacarosa control, con borato de sodio o ácido bórico 5% p/v. Porcentaje de hormigas muertas en función de los días transcurridos desde la ingestión del cebo para hormigas del grupo (A) aceptación total y (B) aceptación parcial de una solución control. La línea punteada cruza cada curva indicando el tiempo transcurrido hasta alcanzar una mortalidad del 50%.

4.4. DISCUSIÓN

En este capítulo hemos visto que la aceptación e ingestión de soluciones azucaradas con el agregado de compuestos borados en hormigas *C. mus* depende del estado motivacional de las obreras forrajeras y de la naturaleza de la sustancia utilizada. El borato de sodio, de igual efectividad tóxica que el ácido bórico, es aceptado ampliamente aun cuando está presente en altas concentraciones en la solución. Sin embargo, el ácido bórico sólo es aceptado y consumido en igual medida que una solución sin tóxico cuando la colonia tiene una alta motivación recolectora, o sea, requerimientos de azúcares relativamente altos.

Estudios realizados en la hormiga *Solenopsis invicta* mostraron una reducción del consumo cuando la concentración de ácido bórico alcanzó el 5% p/v (Klotz et al., 1997). En la hormiga argentina (*Linepithema humile*) no se observaron diferencias en la preferencia entre el ácido y el borato hasta concentraciones del 1%, ni aun equiparando el pH o cantidad de Na presente en ambas soluciones, mostrando que ambos compuestos son igualmente tóxicos y palatables (Klotz et al., 2000). En ese mismo estudio se ha demostrado que el ácido bórico resulta fago-repelente en concentraciones de 2 y 4 % p/v para esa especie (Klotz et al., 2000). Sin embargo, trabajos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la hormiga argentina en situaciones de baja motivación recolectora (utilizando bajas concentraciones de sacarosa en la solución cebo), al contrario de *C. mus*, rechaza la solución conteniendo borato de sodio 5% p/v y acepta en igual medida que la control a la solución con ácido bórico 5% p/v (Sola et al., en preparación). Para *Solenopsis* y *Linepithema* se propuso que el formulado del cebo debe contener hasta 1% del compuesto borado para no generar fago-repelencia (Klotz et al., 2000), la que se incrementa aún más con la saciedad de las colonias (O'Brien y Hooper-Bui, 2005). En *C. mus* soluciones con concentraciones del 5% de borato de sodio no son rechazadas, aun en condiciones de baja motivación recolectora. Esto evidencia que al momento de desarrollar un protocolo de administración de cebos debe considerarse la biología única de cada especie (Field et al 2007).

Durante nuestros experimentos, el agregado de ácido bórico a la solución azucarada modificó drásticamente su pH. Al adicionar 5% p/v de ácido bórico a la solución de sacarosa, el pH disminuyó de 7 (solución control) a 4, mientras que el agregado de 5% p/v de borato de sodio llevó ese valor a 9. Esto podría ser un factor

que modifique el comportamiento alimentario del insecto frente al cebo (Duyck et al., 2004). Hemos observado que cuando las hormigas tienen baja motivación recolectora, la presencia de ácido bórico en la solución pareciera generar cierta disfunción en el accionar de la bomba de succión. Esto se evidenció tanto en las señales eléctricas como en una disminución en la carga de solución por cada contracción de la bomba.

El mecanismo de acción de los compuestos borados en hormigas no se ha descrito hasta el momento. Sin embargo, estudios realizados en cucarachas mostraron que la ingestión de ácido bórico produce la destrucción del epitelio del estomodeo y el mesenterón. Por esta vía, la causa última más probable de muerte de los insectos sería por ayuno (Cochran, 1995; Habes et al., 2006)

Para maximizar la eficiencia de los mecanismos de control de hormigas carpinteras por administración de cebos alimentarios, resulta fundamental el estudio del comportamiento de recolección de soluciones azucaradas ya que son consideradas como un cebo apropiado para estos insectos sociales. En resumen, aquí encontramos que el uso de la sal en vez del ácido permitiría agregar tóxico al cebo alimentario en cantidades suficientes para obtener una toxicidad máxima, sin minimizar la aceptación y recolección del mismo en cualquier situación.

UMBRALES DE ACEPTACIÓN DE SACAROSA

5.1. INTRODUCCIÓN

El sentido del gusto se ha desarrollado como un regulador dominante y conductor del comportamiento alimentario en animales (Yarmolinsky et al., 2009). Cuando un insecto encuentra un potencial alimento, primero lo evalúa en busca de compuestos nutricionalmente relevantes y/o nocivos. Luego, y de acuerdo a las sustancias detectadas, se disparan comportamientos innatos llevando a la aceptación o rechazo del alimento hallado (Chapman, 1998; Yarmolinsky et al., 2009). Sin embargo, la **percepción** de diferentes sustancias químicas puede variar en función de distintos factores, un fenómeno bien conocido tanto en invertebrados como en vertebrados. Esto lleva a que la aceptación o rechazo de un alimento, al igual que lo que ocurre con el comportamiento durante la ingestión, no solo dependa de las características intrínsecas del alimento sino que también sea modulado por el estado fisiológico del animal (Capítulo 4).

Dependiendo del modelo animal, se han establecido distintas formas de medir la respuesta a estímulos gustativos de manera controlada en el laboratorio. Los azúcares son fago-estimulantes en la mayoría de los insectos fitófagos. Existen protocolos estandarizados para medir el umbral de respuesta al azúcar (URA) en moscas (Sudlow et al., 1987; Edgecomb et al., 1987; Scheiner et al., 2004) y abejas (Page et al., 1998). En hormigas, aunque muchos trabajos han analizado la modulación de comportamientos complejos en respuesta a la estimulación con soluciones de distintas concentraciones de azúcar, solo unos pocos abordan el estudio del umbral de percepción a nivel individual (Wada et al., 2001).

El paradigma experimental ampliamente aceptado para medir el URA en abejas se basa en la respuesta refleja de extensión de la probóscide frente a la estimulación con solución azucarada en las antenas (Page et al., 1998). Este

procedimiento se realiza con las abejas encepadas; esto es, las abejas amarradas donde solo pueden mover libremente las antenas y las piezas bucales. En moscas, a su vez, los umbrales se miden mediante la extensión de la probóscide tras la estimulación en patas o piezas bucales (Sudlow et al., 1987; Edgecomb et al., 1987; Scheiner et al., 2004). Ya que las hormigas no poseen las piezas bucales diferenciadas en una probóscide, la respuesta al azúcar en condiciones de movimiento restringido (encepadas) puede evidenciarse mediante la extensión del complejo labio-maxilar. Sin embargo, y aunque han sido escasos los trabajos publicados en este tópico, lejos de consensuar un protocolo único para el estudio de esta respuesta en distintas hormigas, distintos paradigmas han sido utilizados aun para un mismo género. Por un lado, un trabajo desarrollado en hormigas *Camponotus japonicus* encepadas estudió los umbrales de respuesta ante distintas sustancias cuantificando movimientos del complejo labio-maxilar ante la estimulación en palpos (Wada et al., 2001). Por otro lado, se ha demostrado como hormigas de la especie *Camponotus aethiops* pueden ser sometidas exitosamente a un protocolo de condicionamiento olfativo aplicando, al igual que en abejas, la estimulación con solución azucarada en antenas y registrando la respuesta de extensión del complejo labio-maxilar (MaLER, Guerrieri y d'Ettoire, 2010). Sin embargo, esta respuesta en hormigas no siempre es provocada por simple estimulación en antenas y muchas veces ocurre después de tocar las piezas bucales con solución azucarada (Falibene, obs. pers.; Guerrieri, com. pers.). Además, hemos observado en pruebas preliminares que algunas veces las hormigas encepadas de la especie *C. mus* presentan el complejo labio-maxilar extendido, con la glosa expuesta de manera inmóvil aun antes de ser estimuladas y otras veces solo extienden el complejo parcialmente luego de la estimulación. Esto lleva a que la cuantificación de esta respuesta sea ambigua y plantea la necesidad de considerar un tipo de respuesta que no genere dudas al ser cuantificada durante el desarrollo de un protocolo de medición de umbrales para esta y otras especies.

Como ya hemos visto, las hormigas ingieren líquidos por succión o lamiendo (Paul y Roces, 2003). Algunas especies siempre lamen mientras que otras, como *C. mus*, lamen o succionan dependiendo de la cantidad de solución disponible (Josens y Roces, 2000; Paul y Roces, 2003). El “lengüeteo” es causado por la estimulación con azúcar e implica un movimiento en el cual la glosa (la parte distal del labio), es extendida y retraída repetidamente para llevar el líquido hacia la boca (Josens y Roces, 2000; Paul y Roces, 2003); se han cuantificado de cuatro a cinco de estos

ciclos por segundo (Paul y Roces, 2003). Este comportamiento es muy conspicuo observado bajo lupa y, por lo tanto, podría ser cuantificado sin ambigüedad como una respuesta en individuos encephados.

En hormigas, pese a que los efectos del estado fisiológico o nivel motivacional sobre la ingestión de néctar han sido bien estudiados, solo unos pocos trabajos han examinado cómo el estado motivacional de la forrajera influye sobre la aceptación de alimento (Josens y Roces, 2000; Silverman y Roulston, 2001; Kay, 2002). Dichos estudios resultan incompletos desde el punto de vista del análisis del umbral de detección de sustancias ya que fueron realizados ofreciendo una solución de una única concentración o fueron realizados bajo condiciones de libre caminata. En el mismo sentido, de los dos capítulos previos se desprende la necesidad de desarrollar un protocolo estandarizado capaz de evaluar la percepción de sustancias azucaradas bajo condiciones controladas. Aquí nos proponemos estudiar cómo el ayuno afecta el umbral de aceptación de azúcares a nivel individual en *C. mus*. Considerando la falta de consenso en el paradigma a utilizar, en primer lugar nos preguntamos cuál es el tipo de estimulación adecuada para este insecto, y cuál la respuesta óptima a cuantificar. En segundo lugar, se puso a punto un protocolo capaz de medir los umbrales de respuesta al azúcar en hormigas y, por último, se compararon las respuestas de hormigas *C. mus* bajo distintos niveles de privación de azúcares. Los procedimientos utilizados en *C. mus* fueron probados en otras especies de hormigas con distintos hábitos alimentarios, resultados que aparecen detallados en el Anexo A.

5.1.1. Objetivos

- ❖ Estudiar el comportamiento de las hormigas encephadas ante la estimulación con solución azucarada, identificando el tipo apropiado de estimulación y una respuesta capaz de ser evaluada sin ambigüedad.
- ❖ Desarrollar y poner a punto un protocolo que permita medir los umbrales de respuesta al azúcar en hormigas bajo distintas condiciones experimentales o tratamientos.
- ❖ Comparar el umbral de respuesta al azúcar en hormigas con distintos niveles de reserva de carbohidratos.

5.2. MATERIALES Y METODOS

5.2.1. Respuesta a la estimulación en palpos y antenas

Se evaluó la respuesta a la estimulación con sacarosa en antenas y palpos (maxilares y labiales) en hormigas forrajeras de *C. mus*. Para llevar a cabo este procedimiento las hormigas fueron primero anestesiadas. Cada individuo se colocó en un tubo tipo Eppendorf (1.5 ml) que fue sumergido en hielo de 2 a 4 minutos, hasta los primeros signos de inmovilidad. Luego, las hormigas se enceparon utilizando tips de micropipeta (10–100 μ l) cuyo extremo había sido cortado. Solo la cabeza de los individuos fue expuesta a través de este agujero, asegurándolos con cinta adhesiva de manera que solo pudieran mover libremente sus antenas y piezas bucales (Fig. 5.1). Grupos de 20 a 30 hormigas fueron encepados cada vez. El procedimiento de montaje duró alrededor de 40 minutos y la evaluación comenzó 1 hora después de que la última hormiga fue montada en el cepo, periodo durante el cual las hormigas fueron dejadas en oscuridad para su aclimatación. Previo a la medición, se ofreció agua a cada individuo tocando sus piezas bucales con un palillo embebido en agua y se le permitió tomar hasta saciedad.

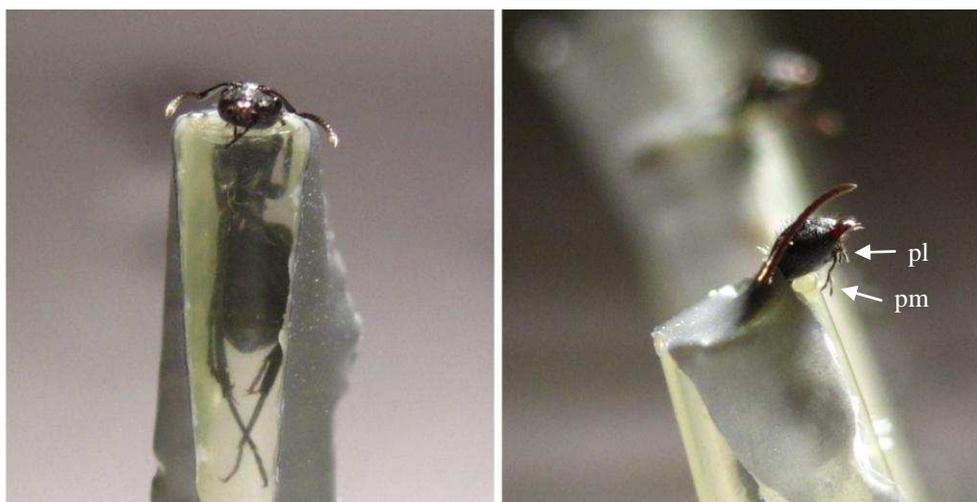


Figura 5.1. Hormigas *C. mus* encepadas. Los individuos son anestesiados en frío y montados de manera tal que la cabeza quede expuesta y las antenas y piezas bucales libres. Las flechas indican los palpos labiales (pl) y maxilares (pm).

Los individuos, luego de encephados, se separaron al azar en dos grupos. La estimulación se llevó a cabo tocando las antenas o los palpos con un palillo de madera embebido con solución de sacarosa 50% p/p. En un grupo, las hormigas fueron estimuladas primero en las antenas y en segundo lugar en los palpos (grupo antena/palpo) mientras que el otro recibió primero la estimulación en los palpos y luego en antenas (grupo palpo/antena). El intervalo inter-estímulo varió entre 4 y 5 minutos. En cada individuo se evaluó la respuesta considerándose positiva si la hormiga lamio al ser estimulada y negativa si este comportamiento estuvo ausente (Fig. 5.2).

Se calculó la proporción de respuestas positivas como la proporción de hormigas que lamieron en respuesta a alguna de las dos estimulaciones (antena o palpo) con respecto al número total de hormigas encephadas. Luego, y considerando solamente las hormigas que mostraron una respuesta durante la evaluación, se calculó la proporción de respuestas a la estimulación en antena como el número de respuestas positivas a la estimulación en antena dividido por el número total de hormigas que respondieron positivamente a uno o los dos estímulos. Del mismo modo, se calculó la proporción de respuestas a la estimulación en palpos. Ambas proporciones fueron obtenidas independientemente para cada grupo (antena/palpo y palpo/antena). Cabe resaltar que si las hormigas lamieron en respuesta a los dos estímulos, la suma de las proporciones de respuesta a antenas y palpos para cada grupo resultaría mayor que 1.

Este procedimiento es novedoso y fue puesto a punto durante la realización de esta tesis, utilizando -además de *C. mus*- hormigas silvestres de 7 especies distintas: *Acromyrmex lundi*, *Cephalotes jheringi*, *Crematogaster* sp., *Solenopsis richteri* (Myrmicinae), *Camponotus punctulatus* (Formicinae), *Linepithema humile* (Dolichoderinae) y *Pseudomyrmex* sp. (Pseudomyrmecinae). Los resultados se muestran en el Anexo A de la presente tesis.

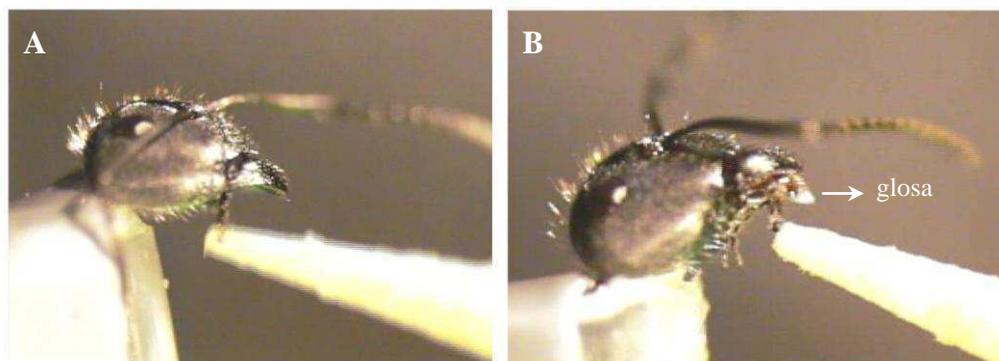


Figura 5.2. Respuesta de *C. mus* a la estimulación en palpos con solución de sacarosa. **(A)** Respuesta negativa. Hormiga con las piezas bucales retraídas al ser estimulada con una solución de sacarosa de una concentración sub-umbral. **(B)** Respuesta positiva. Hormiga lamiendo al ser estimulada con una solución de sacarosa de concentración umbral.

5.2.2. Umbral de aceptación de sacarosa (UAS): efecto de la reserva de azúcares

5.2.2.1. Grupos experimentales.

Hormigas *C. mus* de un mismo nido de laboratorio previamente ayunado fueron separadas en dos grupos de igual tamaño ($N = 40$). Ambos grupos fueron alimentados al mismo tiempo con una solución de sacarosa 20% p/p; uno de los grupos con una cantidad de solución equivalente a $0.1 \mu\text{l}$ por individuo y el otro con una cantidad 10 veces mayor, es decir, $1.0 \mu\text{l}$ por individuo. De esta forma, el tiempo transcurrido desde la última ingesta y la calidad de este alimento fue equivalente para los dos grupos y solo el nivel de reserva de hidratos de carbono varió entre ellos. Las hormigas fueron mantenidas con libre acceso a agua hasta el día siguiente.

5.2.2.2. Protocolo para medir el UAS.

El día de la evaluación, las hormigas fueron anestesiadas y encepadas como fue descrito previamente. Antes de la medición, se ofreció agua a cada individuo y se le permitió tomar hasta saciedad. Considerando los resultados obtenidos para el punto anterior, la estimulación con solución de sacarosa en *C. mus* se llevó a cabo tocando los palpos con un palillo de madera embebido en solución de sacarosa de 0.3, 1, 3, 10, 30 ó 50% (p/p). Estas concentraciones fueron presentadas a cada hormiga en orden ascendente. Antes del primer ensayo con solución azucarada y entre cada ensayo consecutivo, se evaluó la respuesta de las hormigas al agua de la

misma forma pero embebiendo el palillo en agua. El intervalo inter-estímulo varió entre 4 y 5 minutos.

Cuando la estimulación provocó la extensión del complejo, se contactó el mismo con solución azucarada. La respuesta fue considerada positiva cuando las hormigas lamieron después de contactar la solución y negativa cuando no presentaron este comportamiento (Fig. 5.2). Todas las hormigas fueron estimuladas con concentraciones crecientes de azúcar hasta que presentaron la primera respuesta positiva. Luego, fueron apartadas del grupo. La mínima concentración de azúcar que provocó una respuesta positiva en cada hormiga fue considerada como el valor de su UAS, un indicador del nivel de respuesta al azúcar.

Por otro lado, con el fin de corroborar que este protocolo de medición de umbrales es adecuado para hormigas de distintas especies, se midió y comparó el UAS en hormigas silvestres de 4 especies distintas, incluyendo *C. mus*. Los resultados se detallan en el Anexo A.

5.2.3. Análisis estadístico

En el experimento de respuesta a la estimulación de palpos y antenas se comparó la proporción de respuestas positivas al primer estímulo entre los dos grupos (antena en el grupo antena/palpo y palpo en grupo palpo/antena) mediante un análisis de diferencia de proporciones.

Con el objetivo de comparar estadísticamente las respuestas de UAS entre los grupos con distinto nivel de reserva de carbohidratos, se asignó un puntaje a cada hormiga según su respuesta. Aquellas que respondieron positivamente a la primer solución presentada (0.3% p/p) recibieron un puntaje de 1; si la respuesta se mostró por primera vez al presentarles la segunda concentración, el puntaje asignado fue de 2; y así sucesivamente. De esta forma y considerando que fueron evaluadas 6 concentraciones distintas, el puntaje de UAS de cada individuo podía oscilar entre 1 y 6. Los valores de puntaje de los distintos grupos fueron comparados por Kruskal-Wallis ya que este tipo de datos no cumplen con los supuestos de homogeneidad de varianza (Sokal y Rohlf, 2000). Las hormigas que mostraron una respuesta positiva a la presentación de agua inmediatamente antes de la primera respuesta positiva al azúcar y las que no respondieron a ninguna de las concentraciones presentadas fueron eliminadas del análisis.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Respuesta a la estimulación en palpos y antenas

Las hormigas *C. mus* respondieron diferencialmente a la estimulación en antenas y palpos. Los dos grupos de hormigas respondieron a alguna de las dos estimulaciones en porcentajes similares: 93% de las hormigas encephadas de los grupos antena/palpo y 86% del grupo palpo/antena mostraron una respuesta positiva a la estimulación en antenas y/o palpos. Al comparar la proporción de respuesta encontramos que *C. mus* responde preferentemente a la estimulación en palpos, siendo la respuesta en antenas casi nula (Fig. 5.3). Esta diferencia pudo analizarse estadísticamente al comparar la proporción de respuestas positivas al primer estímulo entre los dos grupos (antena en el grupo antena/palpo y palpo en palpo/antena) ($p < 0.001$; análisis de diferencia de proporciones). Las hormigas mostraron además un incremento en la respuesta en antenas al ser previamente estimuladas en sus palpos (Fig. 5.3). Una respuesta inicial de 0.04 (grupo antena/palpo) se incrementó a 0.35 en el grupo palpo/antena.

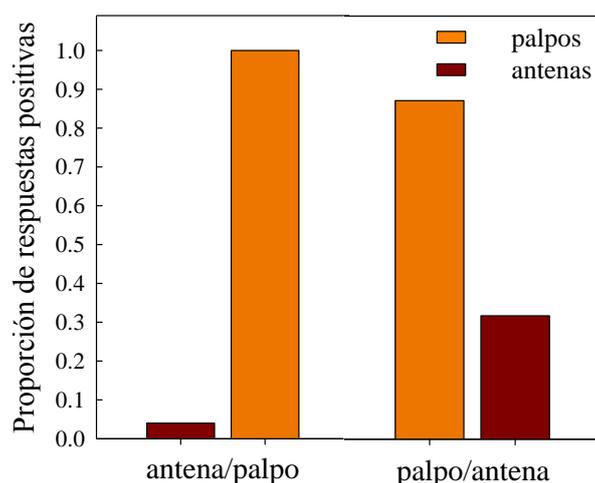


Figura 5.3. Proporción de respuestas positivas de *C. mus* al ser estimulada en palpos y antenas con solución de sacarosa. Cada hormiga recibió los dos tipos de estimulaciones pero en distinto orden: un grupo fue estimulado primero en antenas y en segundo lugar en palpos (antena/palpo) y el otro grupo recibió las estimulaciones en el orden inverso (palpo/antena).

5.3.2. UAS. Efecto del nivel de reserva de azúcar

Se comparó el UAS de hormigas *C. mus* con diferentes niveles de reserva de azúcar. Los individuos que habían ingerido un volumen mayor de solución (1.0 μ l) el día anterior a la evaluación mostraron un puntaje de UAS significativamente mayor que el grupo de hormigas que ingirió un volumen menor (0.1 μ l) ($H_{1, N=96} = 22.38$, $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis. Fig. 5.4). Mientras que el UAS de las hormigas provenientes del grupo alimentado con menor volumen de solución fue de 3% p/p (moda), las hormigas alimentadas con un volumen de solución mayor respondieron en su mayoría a la concentración de 10% p/p.

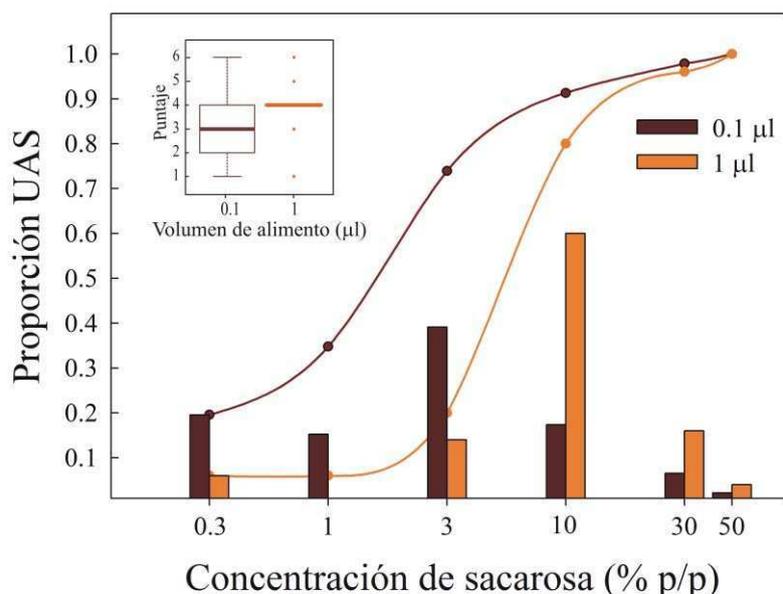


Figura 5.4. Distribución de UAS para hormigas *C. mus* con distinto nivel de reserva de hidratos de carbono. Ambos grupos provenían de una colonia previamente ayunada y fueron alimentados con la misma solución un día antes de la evaluación: uno de ellos recibió una cantidad equivalente a 0.1 μ l por hormiga ($N = 50$) mientras que el otro recibió una equivalente a 1 μ l por individuo ($N = 46$). Las barras indican la proporción de respuestas positivas a las distintas concentraciones (en escala logarítmica); las líneas indican la proporción de respuesta acumulada. Figura inserta: Puntaje de UAS para cada grupo. Las líneas horizontales gruesas representan la mediana, las cajas muestran los percentiles 25 y 50, los bigotes muestran los valores extremos y los círculos los outliers.

5.4. DISCUSIÓN

En este capítulo logramos desarrollar un método capaz de medir y comparar la percepción de azúcar en hormigas bajo condiciones controladas. El UAS pudo medirse con suficiente sensibilidad como para detectar diferencias entre distintos estados de ayuno mediante la cuantificación de la ocurrencia de lengüeteo luego de la estimulación con azúcar. Nuestros resultados mostraron que el nivel de reserva de carbohidratos (que estaría dado por el volumen de solución ingerido en la última ingesta) modifica el umbral de aceptación de azúcar en esta hormiga, siendo menor en individuos que poseen menores reservas, es decir, hormigas más ayunadas responden a concentraciones menores de azúcar. Considerando que el tiempo transcurrido desde la última ingesta y la calidad del alimento no se modificó entre grupos, los cambios observados en el UAS podrían ser consecuencia de un cambio en la sensibilidad al azúcar asociado al nivel de reserva de azúcares. En otros insectos también se ha observado que esta respuesta cambia de acuerdo al tiempo transcurrido desde la última ingesta y a la calidad del alimento ingerido en ese evento (moscas: Edgecomb et al., 1987; Sudlow et al., 1987; abejas: Page et al., 1998; Martínez y Farina, 2008). Esto demuestra que la respuesta al azúcar podría ser un indicador del estado interno o de la motivación en los insectos que se alimentan de néctar.

Los insectos pueden tener receptores gustativos en todo el cuerpo, encontrándose en mayor densidad en las piezas bucales y, en menor número, en antenas (Chapman, 1998). Más allá de la marcada variación dependiente del ayuno, el umbral de respuesta de receptores específicos cambia también dentro del mismo individuo según su localización; por ejemplo, en moscas el umbral de respuesta al azúcar es mayor en los tarsos que en las piezas bucales (Sudlow et al., 1987). En hormigas la respuesta al azúcar varía enormemente entre especies, remarcando la importancia de identificar el sitio apropiado de estimulación para cada una en particular. Aun dentro del mismo género, distintas especies responden distinto al ser estimuladas en antenas y palpos, como es el caso del género *Camponotus*. Nuestros resultados muestran que *C. mus* responde principalmente a la estimulación en palpos mientras que *C. punctulatus* lame indistintamente en respuesta a la estimulación en palpos y antenas (ver Anexo A). Además, *C. aethiops* responde extendiendo el complejo labio-maxilar (MaLER) consistentemente durante un condicionamiento de

aprendizaje asociativo luego de la estimulación en antenas (Guerrieri y d'Ettoire, 2010) y *C. japonicus* extiende y mueve la glosa después de ser estimulada en palpos (Wada et al., 2001). Esta respuesta también varía en especies pertenecientes a otros géneros y que poseen distintos hábitos alimentarios (Anexo A). Estas diferencias podrían estar dadas por una densidad diferencial de quimiosensilias en antenas y palpos o bien por diferencias en el umbral de detección de dichas sensilias.

En hormigas, algunos trabajos han estudiado las preferencias entre distintos azúcares o sustancias así como también la respuesta ante distintas concentraciones de dichos azúcares (Lanza et al. 1993; Völkl et al., 1999; Tinti y Nofre, 2001; Wada et al. 2001; Kay, 2002; Boevé y Wäckers, 2003). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos lo han hecho de manera poco controlada, con animales en libre movimiento e incluso recolectando en forma grupal. Lo mismo ocurre en referencia al estudio de la modulación de esta respuesta según el estado fisiológico de los individuos. Por ejemplo, se han reportado diferencias en la aceptación de soluciones de sacarosa recolectadas en forma grupal en hormigas de la especie *L. humile* y *Dorymyrmex smithi* sometidas a distintos ayunos, contabilizando la aceptación como la cantidad de hormigas presentes en un único alimentador (Silverman y Roulston, 2001) o la aceptación/rechazo individual en alimentadores con distintas concentraciones durante la recolección grupal (Kay, 2002). Este método puede dar idea sobre el comportamiento de la colonia pero no da información precisa sobre los umbrales de aceptación individuales ya que también entran en juego procesos comportamentales complejos y fenómenos de interacción entre individuos. Por ejemplo, se ha reportado que la información que una obrera recolectora recibe durante el proceso de reclutamiento modula la evaluación que realiza del recurso (Roces, 1993). Por otro lado, Josens y Roces (2000) estudiaron la aceptación individual de una solución de sacarosa de concentración determinada (10% p/p) pero, al igual que el otro trabajo, no se tuvo información sobre la concentración de aceptación umbral. Wada y colaboradores (2001), por el contrario, realizaron sus experimentos con hormigas encepadas y bajo condiciones controladas y lograron detectar umbrales de aceptación de azúcares y el efecto de sustancias fago-estimulantes.

El estudio de la percepción del gusto en insectos sociales permite relacionar este tópico no solo con aspectos de la biología individual sino también con aquellos aspectos relacionados con la biología social y la organización de la colonia. Es así

como en abejas, gracias a la existencia de un protocolo bien estandarizado para medir umbrales, se ha podido estudiar la relación entre los umbrales de respuesta con el genotipo, el rol del individuo en la colonia, el estado nutricional, la calidad de alimento circulante en la colonia, etc. (Page et al., 1998; Pankiw y Page, 1999; Pankiw y Page, 2000; Pankiw et al., 2001; Pankiw et al., 2004; Martinez y Farina, 2008). Las hormigas son insectos sociales que además presentan una gran diversidad de historias de vida y comúnmente muestran polimorfismo en la casta obrera. Incluir a las hormigas como un nuevo modelo en estudios de sensibilidad gustativa ayudará a un mejor entendimiento de muchos aspectos relacionados con las funciones individuales, la estructura social, la organización del grupo, patrones de interacción y relaciones entre individuos en insectos sociales.

6

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO

6.1. INTRODUCCIÓN

En un hábitat natural las condiciones ambientales fluctúan regularmente con la hora del día, los días y los ciclos estacionales. Todos los seres vivos ajustan sus sistemas fisiológicos y su comportamiento de acuerdo a estas variaciones. En particular, para los animales ectotermos como los insectos (cuya temperatura corporal es variable y dependiente de la temperatura ambiental), la temperatura es un factor abiótico crucial que tiene gran influencia en su desarrollo, comportamiento y fisiología. De ella dependen la velocidad de todos los procesos bioquímicos que subyacen su actividad, dando como resultado que los sistemas fisiológicos funcionen óptimamente dentro de un rango limitado de temperatura, que dependerá del ambiente natural del insecto (Chapman, 1998).

Para las hormigas existe una dependencia casi completa de la actividad con la temperatura (Hölldobler y Wilson, 1990; Heinrich, 1993). En el interior del nido las condiciones se mantienen relativamente constantes y controladas, pero una vez fuera de él, las hormigas rápidamente adquieren una temperatura corporal que es impuesta por el ambiente (Heinrich, 1993). Por este motivo, la temperatura externa es especialmente decisiva para todas las actividades relacionadas con el forrajeo. Dependiendo del ambiente en donde habita y en donde ha evolucionado, cada especie es tolerante a un rango de temperatura específico, dentro del cual los individuos activan determinados comportamientos (Hölldobler y Wilson, 1990). Como ejemplo, Hölldobler y Wilson (1990) han resumido trabajos de diversos autores en una lista de 43 especies distintas de hormigas cuya actividad recolectora está acotada a un rango de temperatura especie-específico; y decenas más de trabajos han sido publicados en este tópico (por ejemplo, Cerdá et al., 1998; Pol y Lopez de

Casenave, 2004; Bucy y Breed, 2006). En el mismo sentido, la velocidad de locomoción y el reclutamiento también son profundamente modulados por este factor (Hölldobler y Wilson, 1990; Heinrich, 1993; Cassill y Tschinkel, 2000; van Oudenhove et al., 2011; Azcárate et al., 2007; Hurlbert et al., 2008; Bollazzi y Roces, 2011). Pese a la abundante bibliografía sobre este tópico en hormigas, muy pocos han estudiado el efecto de la temperatura sobre variables relacionadas con la dinámica de ingestión de néctar (Bonser et al., 1998). Considerando el efecto de la temperatura corporal y la tasa metabólica sobre la actividad muscular en insectos (Heinrich, 1993) y que el mecanismo que subyace a la succión de néctar en hormigas radica en la actividad muscular (de la bomba de succión), es probable que dicha actividad se vea afectada por la temperatura. En este capítulo proponemos abordar este tema, analizando de qué manera las fluctuaciones de la temperatura afectan el comportamiento alimentario en la hormiga *C. mus*.

6.1.1. Objetivos

- ❖ Estudiar el comportamiento alimentario y la dinámica de ingestión en condiciones naturales de hormigas *C. mus*, a lo largo del día en diferentes épocas del año.
- ❖ Evaluar el efecto de la temperatura sobre el comportamiento alimentario y la actividad de la bomba de succión en condiciones controladas de laboratorio.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Comportamiento alimentario de hormigas en condiciones naturales

Se registró el comportamiento alimentario en condiciones naturales de hormigas *C. mus* de nidos encontrados en áreas urbanas. Se identificó una colonia (localizada en 34° 33' S, 58° 33' O), con la que se realizó un seguimiento de las hormigas recolectoras en distintos momentos del año, registrando el comportamiento alimentario a lo largo del día. Para ello, se utilizó el mismo dispositivo de registro de la actividad de la bomba de succión usado en el laboratorio pero conectado a una computadora portátil. Cada día de registro (distintas fechas a lo largo del año) se

colocó la arena de registro, bajo sombra, en una zona cercana a los sitio de recolección y el camino de forrajeo (Fig. 6.1). Comenzando aproximadamente a las 8 a.m., se observó la presencia/ausencia de hormigas en el camino de forrajeo ya establecido. En el momento que se comenzó a observar actividad, se tomaron hormigas desde el camino colocando un palillo de madera y esperando que los individuos caminaran sobre él. Una vez que una hormiga se posicionaba sobre el palillo, era rápidamente trasladada y colocada en la arena de registro, donde accedía a la solución allí ofrecida (sacarosa 30% p/p) y la señal eléctrica generada durante la ingestión era registrada. En ese instante se registraba además la hora, la temperatura y la humedad relativa en la zona de la arena. Al finalizar la ingestión, se le permitía a la hormiga retirarse sin perturbaciones y regresar al nido. Este procedimiento se repitió hasta que las hormigas comenzaron a llegar por su cuenta a la arena. A partir de ese momento se continuó la toma de datos registrando a los individuos reclutados (sin tomar hormigas desde el camino de forrajeo).



Figura 6.1. Arena de registro durante los experimentos realizados a campo.

6.2.1.1. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante una regresión con variables auxiliares o dummies (Balzarini et al., 2008) utilizando el programa estadístico InfoStat (Di Renzo et al., 2008). La frecuencia de bombeo fue determinada como la variable dependiente y la temperatura como la variable regresora, incorporando el efecto del día de registro (fecha) como variable de clasificación (7 niveles) a través del uso de variables auxiliares. La fecha febrero de 2010 (Feb 10) fue tomada arbitrariamente como valor de referencia. Para llevar a cabo la prueba de homogeneidad de

pendientes y realizar las comparaciones que no son provistas por el análisis de la varianza del modelo completo (el que sólo otorga las comparaciones con el valor de referencia), se realizaron contrastes tal como indica el manual del usuario del InfoStat (Balzarini et al., 2008).

Por último, con el fin de comparar la frecuencia de bombeo de distintas fechas para una misma temperatura, se calcularon los intervalos de confianza para la frecuencia estimada en tres temperaturas distintas: 17, 24 y 30 °C. Para cada temperatura solo se consideraron las fechas en las cuales dichos valores se encontraran dentro del rango registrado, es decir, no se realizaron extrapolaciones de los datos.

6.2.2. Efecto de la temperatura bajo condiciones controladas de laboratorio

En base a los resultados encontrados en los registros a campo, decidimos evaluar el efecto de la temperatura sobre el comportamiento alimentario y la actividad de la bomba de succión bajo condiciones controladas en el laboratorio. Para ello, se realizó una adaptación del dispositivo utilizado previamente (detallado en la sección 2.2.2). El nuevo dispositivo (Fig. 6.2) constó de una arena de registro ubicada dentro de una cámara cuya temperatura era controlada. Las paredes y base de dicha cámara (20 x 12 x 12 cm) eran de poliestireno expandido y su tapa superior de acrílico transparente, con una abertura (5 x 5 cm) para acceder al interior produciendo el menor cambio de temperatura posible. La arena de registro estaba constituida por un contenedor circular (6 cm de diámetro, 3 cm de alto) con sus paredes pintadas con flulon para evitar el escape de los animales. Una superficie de 2.5 cm de diámetro en el centro de la arena estaba cubierta con papel de filtro y una fina malla metálica. Del mismo modo que en el dispositivo descrito anteriormente, un tubo tipo Eppendorf (0.5 ml) se ubicó a través de un orificio y se llenó completamente con solución de sacarosa. Un electrodo estaba inmerso en la solución (electrodo de registro) mientras otro se encontraba en contacto con la malla metálica (electrodo de referencia). Ambos electrodos salían de la cámara a través de un pequeño orificio y conducían la señal hacia el amplificador, el conversor analógico-digital y la PC, de la misma manera que fue descrito previamente. La arena de registro se comunicaba con el exterior mediante un tubo a través del cual ingresaban las hormigas. La temperatura de la cámara se controló utilizando una bomba de flujo

regulado que hacía circular aire por una serpentina de cobre ubicada dentro de un baño térmico. La humedad relativa, no controlada experimentalmente, era la ambiental y fue medida durante todo el tiempo de registro dentro de la cámara.

Se trabajó con colonias de *C. mus* mantenidas en nidos artificiales en el laboratorio (23 ± 3 °C), las cuales fueron privadas de carbohidratos por 10 ± 3 días. Cada día de registro, las hormigas recolectoras de la colonia utilizada ese día fueron tomadas individualmente desde la varilla vertical dentro del nido y colocadas en pequeños frascos para ser pesadas (peso inicial). Luego, el frasco era conectado con el tubo de acceso a la arena de registro dentro de la cámara (Fig. 6.2). Allí, se las dejaba aclimatarse durante, por lo menos, 1.5 minutos y luego se registró la actividad de la bomba de succión durante la ingestión de solución de sacarosa 30% p/p. Al finalizar la ingestión, los individuos fueron pesados nuevamente (peso final). Las mediciones se realizaron a tres temperaturas distintas: 17, 24 y 30 °C aproximadamente, asignando los individuos al azar e intercalando la temperatura de registro a lo largo del día. Cada hormiga registrada se mantuvo separada del resto de la colonia para evitar pseudorréplica. Este procedimiento se llevó a cabo en distintos días con tres colonias diferentes.

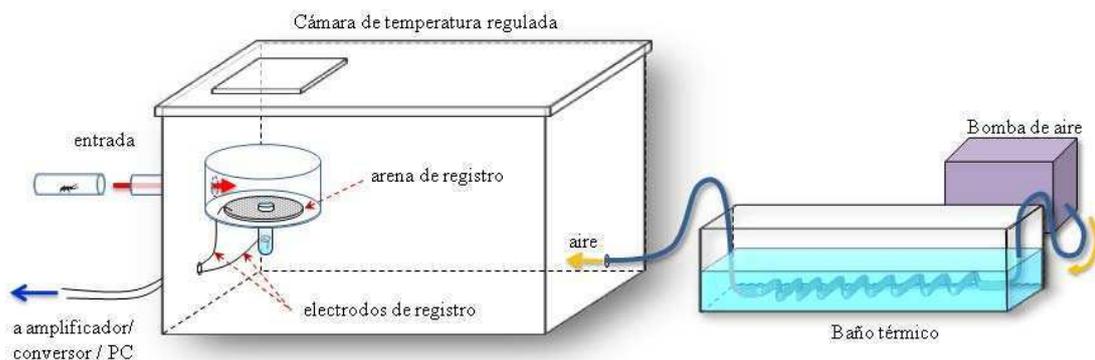


Figura 6.2. Dispositivo utilizado para el registro de la actividad eléctrica de la bomba de succión durante la ingestión de soluciones azucaradas bajo distintas temperaturas (ver texto para una descripción detallada).

6.2.2.1. Análisis estadístico

Debido a que no se encontraron diferencias entre nidos, los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor, realizando contrastes de Fisher cuando era pertinente. En los casos en donde no se cumplieron los supuestos de normalidad y/o de homogeneidad de varianza, se realizó el análisis mediante Kruskal-Wallis, contrastando los datos obtenidos bajo distintas temperaturas por el método de Dunn.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Comportamiento alimentario de hormigas en condiciones naturales

Estos registros se llevaron a cabo a lo largo de un día en 7 fechas diferentes: 29 de septiembre (Sep 09), 22 de octubre (Oct 09) y 26 de noviembre de 2009 (Nov 09), 9 de enero (Ene 10), 18 de febrero (Feb 10), 30 de marzo (Mar 10) y 5 de noviembre de 2010 (Nov 10). En cada día, e independientemente del rango de temperatura experimentado, se observó una fuerte relación entre la variación de la temperatura y el comportamiento de las hormigas (Fig. 6.3). En primer lugar, observamos que la actividad de forrajeo (la presencia/ausencia de individuos en el camino principal) varió con las condiciones ambientales. Por ejemplo, no se observó ningún tipo de actividad durante la mañana y la caída de la tarde de Sep 09, cuando la temperatura registrada fue inferior a 12 °C (área gris en Fig. 6.3A); lo mismo ocurrió en Oct 09, cuando las temperaturas se encontraban por debajo de los 16 °C por la mañana y los 20 °C por la tarde (área gris en Fig. 6.3B). Ambas situaciones, además de bajas temperaturas, presentaron un alto porcentaje de humedad relativa en el ambiente. Por otro lado, al superar los 38 °C en la tarde de Ene 10 también se observó una fuerte depresión en la actividad de forrajeo (área gris en Fig. 6.3D). En todas las fechas de registro, la temperatura ambiental correlacionó negativamente con la humedad relativa ($p < 0.01$ para todas las fechas; correlación de Pearson).

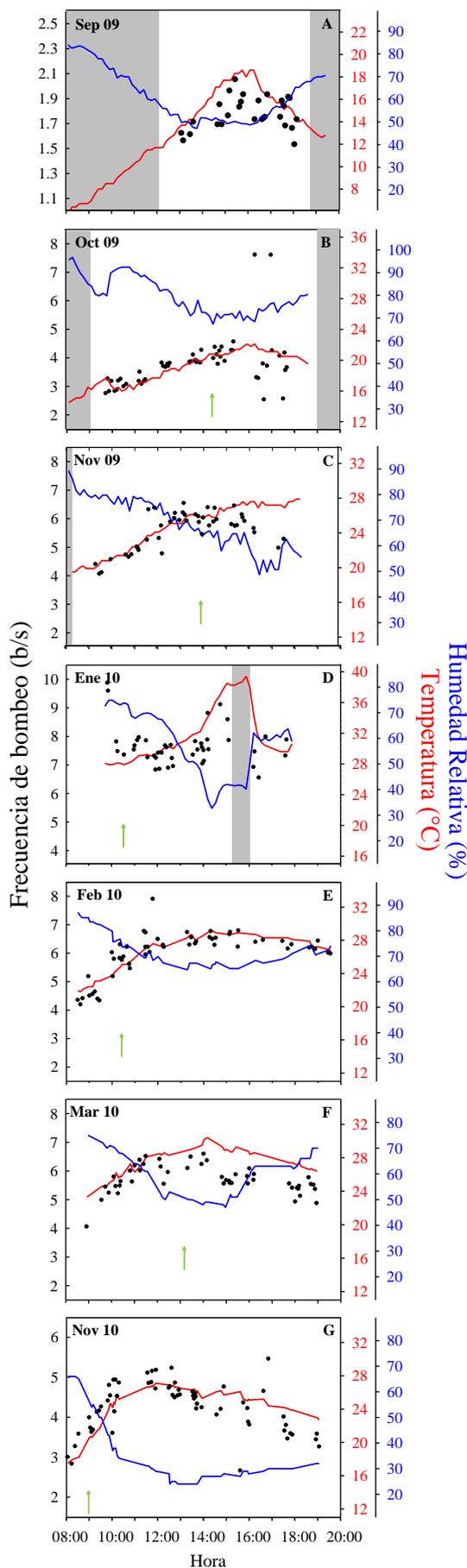


Figura 6.3. Frecuencia de bombeo durante la ingestión de solución de sacarosa en condiciones naturales a lo largo del día para distintas fechas: Septiembre (A), Octubre (B) y Noviembre del 2009 (C), Enero (D), Febrero (E), Marzo (F) y Noviembre (G) del 2010. Cada punto es un registro, la línea roja representa la temperatura y la línea azul la humedad relativa registrada en cada momento. Dentro de cada gráfico, la barra gris muestra el momento del día en que no se registró actividad de forrajeo (no se observaron hormigas en el camino principal). La flecha verde indica el momento en que las hormigas comenzaron a llegar por su cuenta a la arena de registro. En Sep 09, la ausencia de flecha indica que todas las hormigas fueron llevadas a la arena desde el camino principal..

En todos los casos, al comienzo del día la temperatura fue relativamente baja y en general alcanzó su pico máximo entre las 15 y 16 h, para luego descender. La frecuencia de bombeo mostró una fuerte relación positiva con la temperatura siguiendo una dinámica similar: frecuencias relativamente bajas al inicio del día, que incrementaron con el transcurso de las horas hasta promediar la tarde y luego descendieron acompañado los cambios en la temperatura (Fig. 6.3). Esta relación fue analizada estadísticamente encontrándose una fuerte regresión lineal entre ambas variables ($F_{1,323} = 88.7$, $p < 0.0001$, regresión con variables auxiliares; ver Anexo B. Fig. 6.4); a mayor temperatura, mayor fue la frecuencia de bombeo. Sin embargo, observamos que dicha relación no se mantuvo constante entre los distintos días de registro. Un aumento en una unidad de temperatura no produjo siempre el mismo aumento en la frecuencia de bombeo (tabla 6.1). Esto se analizó mediante una prueba de homogeneidad de pendientes (frecuencia en función de la temperatura) encontrándose diferencias significativas para las fechas con temperaturas extremas (tabla 6.2). En este sentido, Sep 09 (para las temperaturas más bajas) y Ene 10 (para las temperaturas más altas) mostraron pendientes que no difieren entre sí pero resultaron significativamente menores que las halladas para los otros días de registro (Fig. 6.4). Mar 10 y Nov 10 no se diferenciaron de Sep 09, pero tampoco de los otros días con temperaturas intermedias.

Tabla 6.1. Relación lineal entre la frecuencia de bombeo y la temperatura para cada fecha registrada. Se muestra además las temperaturas mínimas y máximas en las que se tomaron registros.

Fecha	Ecuación de ajuste	Rango de temperatura (°C)
Sep 09	$F = 1.01 + 0.04 * T$	13.7 - 18.6
Oct 09	$F = -1.29 + 0.26 * T$	16 - 21.4
Nov 09	$F = 0.14 + 0.21 * T$	19.9 - 27.6
Ene 10	$F = 6.7 + 0.03 * T$	27.9 - 38.5
Feb 10	$F = -1.82 + 0.29 * T$ (*)	21.8 - 29.1
Mar 10	$F = 0.23 + 0.19 * T$	23.3 - 30.4
Nov 10	$F = 0.13 + 0.16 * T$	17.5 - 27.1

(*) Esta ecuación no se obtuvo del modelo completo ya que esta fecha fue tomada como valor de referencia. En su lugar, se obtuvo realizando la regresión separadamente. Esto es posible ya que las ecuaciones que se obtienen por ambos métodos son las mismas (Balzarini et al., 2008).

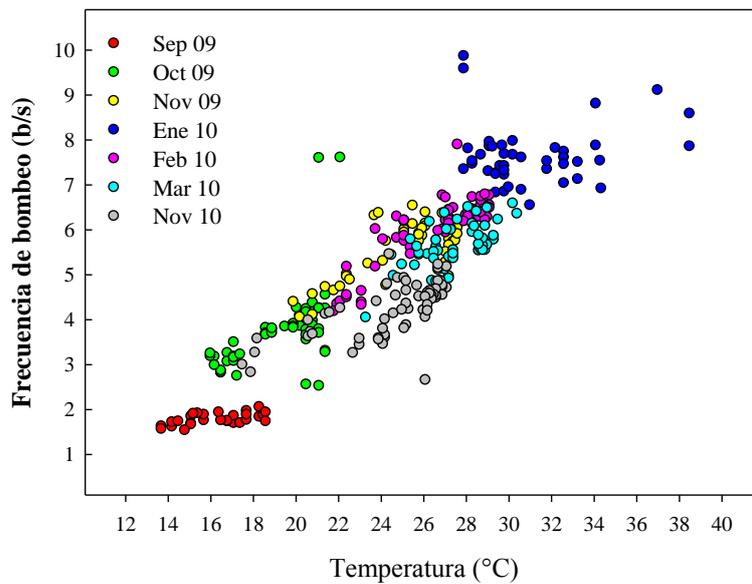


Figura 6.4. Frecuencia de bombeo en función de la temperatura para cada fecha registrada (ver texto para análisis estadístico).

Tabla 6.2. Comparación entre las pendientes (frecuencia de bombeo en función de la temperatura) para los distintos días de registro. Se muestran los valores de p obtenidos mediante una prueba de homogeneidad de varianza.

	Sep 09	Oct 09	Nov 09	Ene 10	Feb10	Mar10	Nov 10
Sep 09		0.005	0.019	0.814	0.034	0.060	0.082
Oct 09	0.005		0.416	0.000	0.641	0.311	0.050
Nov 09	0.019	0.416			0.108	0.734	0.249
Ene 10	0.814	0.000	0.000		0.000	0.004	0.001
Feb 10	0.034	0.641	0.108	0.000		0.193	0.067
Mar 10	0.060	0.311	0.734	0.004	0.193		0.580
Nov 10	0.082	0.050	0.249	0.001	0.067	0.580	

En adición a lo expuesto anteriormente, en varios casos se observó que los registros tomados a una misma temperatura mostraron distintas frecuencias de bombeo en distintos momentos del año. Para analizar esto se calcularon los intervalos de confianza para los valores de frecuencia de cada día para tres

temperaturas distintas (17, 24 y 30 °C), considerándose solo las fechas en que dicha temperatura se encontraba dentro del rango registrado (tabla 6.1; Fig. 6.5). De esta forma se observó que a una temperatura ambiental de 17 °C, la frecuencia de bombeo registrada en Sep 09 fue menor a la registrada en octubre del mismo año (Oct 09); a una temperatura de 24 °C, los registros tomados en Nov 10 presentaron una frecuencia significativamente menor que los obtenidos durante Nov 09, Feb 10 y Mar 10; por último, en los registros realizados a 30 °C, las frecuencias registradas en Ene 10, Feb 10 y Mar 10 también resultaron significativamente diferentes entre sí.

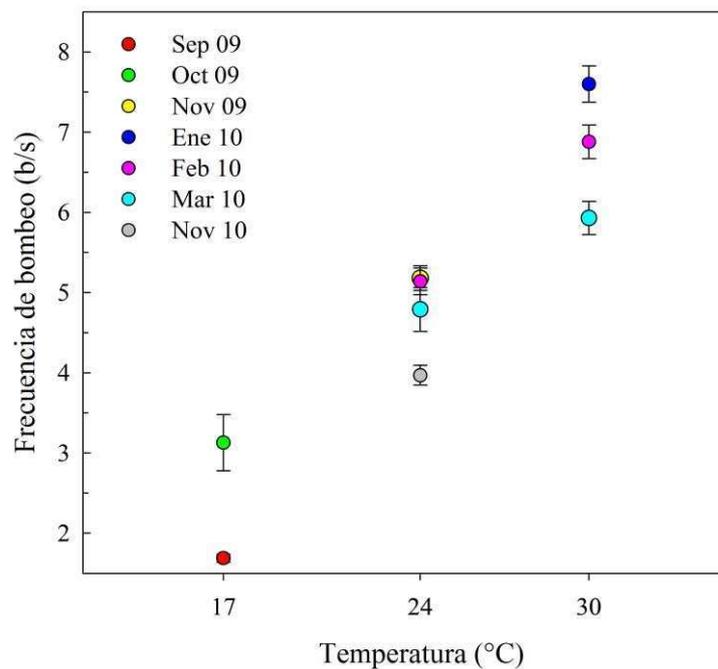


Figura 6.5. Intervalo de confianza para la frecuencia de bombeo (frecuencia estimada \pm límite de confianza del 95%) registrada a 17, 24 y 30 °C. Para cada temperatura, solo se consideraron las fechas en que dicha temperatura se encontraba dentro del rango registrado para ese día.

6.3.2. Efecto de la temperatura bajo condiciones controladas de laboratorio

A fin de evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la bomba de succión en forma controlada, hormigas recolectoras procedentes de colonias mantenidas en laboratorio fueron sometidas a distintas temperaturas durante la

recolección de solución de sacarosa 30% p/p. Se realizaron los registros a 17 °C (16.89 ± 0.06 °C, N = 37), 24 °C (23.61 ± 0.07 °C, N = 37) y 30 °C (29.58 ± 0.07 °C, N = 39). La humedad relativa dentro de la cámara presentó fluctuaciones a lo largo del día que fueron compensadas entre los registros a distintas temperaturas ya que los datos fueron tomados alternadamente. Es así como el análisis de los valores de humedad relativa registrada dentro de la cámara no varió con la temperatura de registro (17 °C: 51.7 ± 1.8 , 24 °C: 50.9 ± 1.7 , 30 °C: 51.0 ± 1.6 ; $F_{2,110} = 0.069$, $p = 0.93$; ANOVA).

Los registros de la actividad de la bomba de succión en estas condiciones confirmaron los datos hallados en condiciones naturales, observándose un fuerte efecto de la temperatura sobre el comportamiento alimentario. La aceptación de la solución en la arena de registro fue de 84% (N = 44), 100% (N = 37) y 97% (N = 38) cuando la cámara se encontraba a 17, 24 y 30 °C, respectivamente. El volumen de solución ingerido aumentó significativamente con la temperatura ($F_{2,110} = 9.62$, $p = 0.0001$; ANOVA. 17 vs 24 °C: $p = 0.06$; 17 vs 30 °C: $p < 0.0001$; 24 vs 30 °C: $p = 0.02$; contrastes de Fisher. Fig. 6.6A). El tiempo de ingestión también se vio afectado ($H_{2, N = 113} = 47.42$, $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis. Fig 6.6B). A bajas temperaturas los individuos invirtieron un tiempo significativamente mayor en la ingesta que a 24 y 30 °C (17 vs 24 °C: $Q = 6.18$, $p < 0.001$; 17 vs 30 °C: $Q = 7.74$, $p < 0.001$; 24 vs 30 °C: $Q = 2.02$, $p > 0.05$; VC = 2.394; contrastes de Dunn). Por el contrario, la cantidad de bombeos totales realizados durante la ingestión incrementó a altas temperaturas ($F_{2,110} = 3,35$, $p = 0.039$; ANOVA. 17 vs 24 °C: $p = 0.81$; 17 vs 30 °C: $p = 0.02$; 24 vs 30 °C: $p = 0.04$; contrastes de Fisher. Fig. 6.6C).

Considerando que el volumen de solución ingerido aumentó con la temperatura mientras que el tiempo de ingestión disminuyó, la tasa de ingestión presentó un significativo incremento con la temperatura ($H_{2, N = 113} = 84.19$, $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis. Fig 6.6D). A mayores temperaturas, mayor fue la velocidad de ingestión (17 vs 24 °C: $Q = 4.66$, $p < 0.001$; 17 vs 30 °C: $Q = 8.56$, $p < 0.001$; 24 vs 30 °C: $Q = 5.41$, $p > 0.001$; VC = 2.394; contrastes de Dunn). Este cambio en la tasa de ingestión se vio provocado exclusivamente por una variación en la frecuencia de bombeo. Al igual que en los experimentos en condiciones naturales, la temperatura a la que los individuos fueron sometidos durante la ingestión modificó enormemente a la frecuencia de bombeo ($H_{2, N = 113} = 99.55$, $p < 0.0001$; Kruskal-Wallis), la que aumentó a medida que la temperatura incrementaba (17 vs 24 °C: $Q =$

4.25, $p < 0.001$; 17 vs 30 °C: $Q = 9.10$, $p < 0.001$; 24 vs 30 °C: $Q = 6.87$, $p > 0.001$; $VC = 2.394$; contrastes de Dunn. Fig. 6.6E) mientras que el volumen de solución incorporado por cada contracción de la bomba no se vio afectado ($F_{2,110} = 0.75$, $p = 0.47$; ANOVA. Fig. 6.6F).

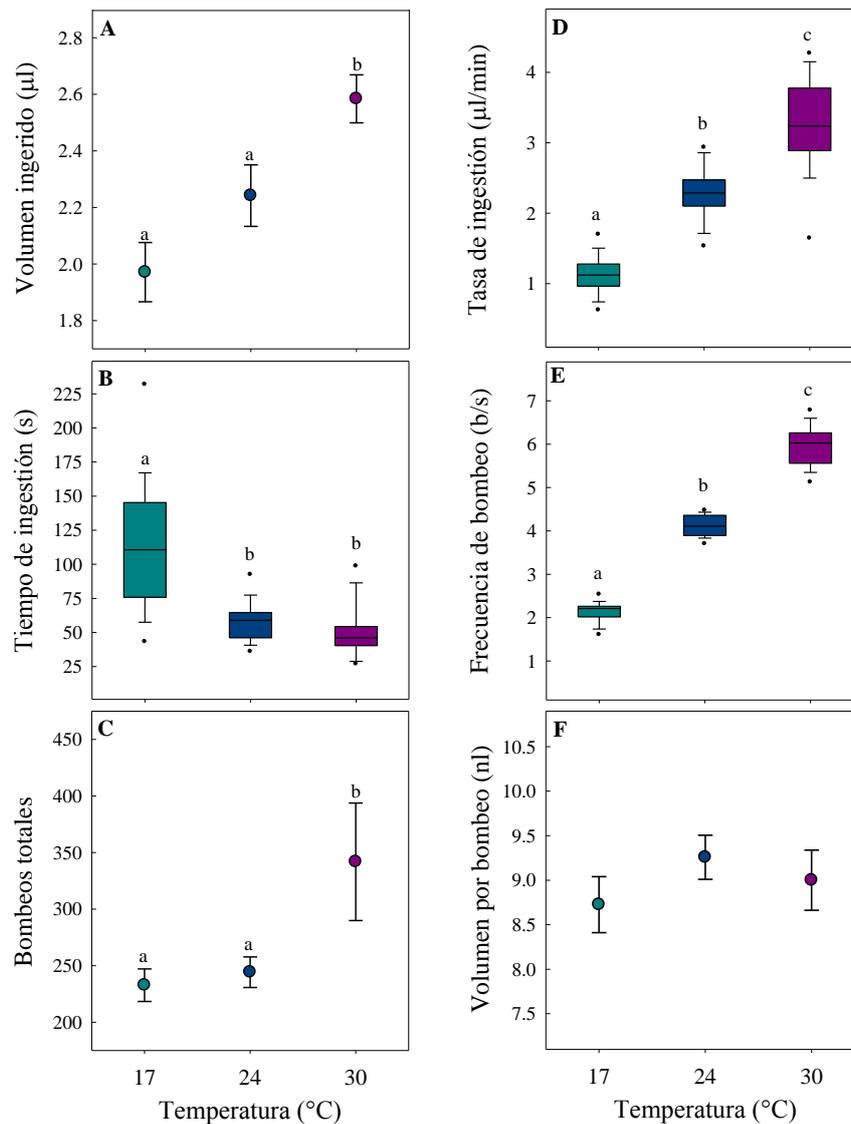


Figura 6.6. Comportamiento de ingestión registrado a 17, 24 o 30 °C en el laboratorio. (A) Volumen ingerido. (B) Tiempo de ingestión. (C) Bombeos totales realizados durante la ingesta. (D) Tasa de ingestión. (E) Frecuencia de bombeo. (F) Volumen de solución incorporado por cada bombeo. (A, C, F) Los puntos muestran las medias \pm error estándar. (B, D, E) Gráfico de caja y bigote: Las líneas horizontales gruesas representan la mediana, las cajas muestran los percentiles 25 y 50 y los bigotes muestran los valores extremos. Para todos los casos, las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas.

6.4. DISCUSIÓN

En este capítulo hemos demostrado que la dinámica de ingestión y la actividad de la bomba de succión en hormigas *C. mus* dependen fuertemente de la temperatura. Tanto en los experimentos a campo como en los realizados en el laboratorio se observó un claro incremento de la frecuencia de bombeo con esta variable.

No son muchos los trabajos realizados en hormigas que analizan los efectos de la temperatura sobre variables relacionadas con la dinámica de ingestión. De manera similar a los resultados que hallamos en el laboratorio, Bonser y colaboradores (1998) observaron en el campo que hormigas del género *Lasius* reducen drásticamente el tiempo de ingestión al aumentar la temperatura ambiental. Estos investigadores plantearon varias alternativas para explicar este fenómeno; entre ellas propusieron que una mayor temperatura podría: i) generar una reducción de la viscosidad de la solución, facilitando el bombeo de la solución y/o ii) incrementar la tasa metabólica del animal, generando un aumento en la velocidad del mecanismo de bombeo. De nuestros datos podemos concluir que la disminución en la viscosidad de la solución por una mayor temperatura no afectó al volumen incorporado por bombeo (Fig. 6.6 y ver más adelante). En cambio, la segunda hipótesis explica el comportamiento observado. La actividad de la bomba de succión se vio fuertemente afectada por la temperatura, la que modificó principalmente la frecuencia de bombeo. Este aumento en la frecuencia llevó, consecuentemente, a un aumento en la tasa de ingestión.

Como la temperatura corporal de los insectos normalmente sigue de cerca a la temperatura ambiental, la tasa metabólica, dentro de ciertos límites, también lo hace. Es así como, a través de su efecto en la tasa metabólica, la temperatura afecta la actividad general de los insectos (Heinrich, 1993). Un gran número de trabajos muestran la estrecha relación entre temperatura, tasa metabólica y actividad muscular (Heinrich, 1993). Los músculos estriados de vertebrados ecto- y endotermos (Bennett, 1985), así como también los de los invertebrados (Neville y Weis-Fogh, 1963; Stevenson y Josephson, 1990), aumentan la tasa de contracción y su potencia máxima al aumentar la temperatura. Aunque la gran mayoría de los trabajos realizados en actividad muscular en insectos (por ejemplo, langostas y polillas) se

concentran en los músculos de vuelo, es posible que los músculos que componen la bomba de succión se vean afectados de forma similar.

Como mencionamos anteriormente, en las hormigas *C. mus* una mayor temperatura produjo un aumento en la frecuencia de contracción de los músculos sin modificar el volumen por bombeo. Este resultado es inesperado, y podría explicarse considerando diversos aspectos. Por un lado, una mayor temperatura genera una disminución en la viscosidad de la solución, lo que debería traducirse -según la ley de dinámica de fluidos (Poiseulle)- en un mayor volumen por bombeo si la diferencia de presión generada en cada contracción fuese la misma. Pero, por otro lado, es probable que la diferencia de presión generada por la bomba de succión no se mantenga constante a distintas temperaturas. Es decir, el aumento en la frecuencia de bombeo al aumentar la temperatura podría implicar una mayor velocidad de acortamiento muscular que, según la Ley de Hill, generaría una menor fuerza durante la contracción, generando así una menor diferencia de presión, aunque se acortaran los músculos en igual medida. Así mismo, el acortamiento podría ser también menor al presentar mayor frecuencia de contracción, lo que también se traduciría en un menor volumen por bombeo. Con nuestro dispositivo no podemos distinguir entre estas (u otras) alternativas.

También a nivel muscular existe un rango de temperatura óptimo de trabajo (Heinrich, 1993). Los resultados de los experimentos de campo aquí presentados muestran que en los días con temperaturas extremas (Sep 09 para las temperaturas bajas y Ene 10 para las altas) las ecuaciones de ajuste de las rectas de frecuencia en función de la temperatura tienen menores pendientes que las de los días con temperaturas intermedias (Fig. 6.6), es decir, a bajas temperaturas en Sep 09, la capacidad de modulación de la frecuencia de bombeo fue menor, mientras que para Ene 10 fue nula ($p = 0.45$, $R^2 = 0.014$, Regresión lineal). Por un lado, existen límites fisiológicos en la actividad de estos músculos: valores máximos de frecuencias de contracción. Aquí encontramos que la bomba de succión puede actuar dentro de un rango limitado de frecuencias. Los trabajos de manipulación de ayuno de carbohidratos habían mostrado un rango de acción de la bomba con frecuencias predominantes que iban desde 4 hasta 7 bombeos por segundo (Falibene y Josens, 2008, Capítulo 3). Aquí encontramos que, al variar la temperatura, la frecuencia de bombeo predominante abarcó el rango comprendido entre 1.5 y 9 bombeos por segundo. Por otro lado, se sabe que la respuesta a la temperatura no es estática, al

contrario, depende de la temperatura experimentada previamente por el insecto (Chapman, 1998). Esta aclimatación del insecto a las condiciones ambientales ocurre también dentro de los rangos normales de temperatura, afectando su fisiología y comportamiento. Esto sugiere que los individuos podrían modular diferencialmente la frecuencia de bombeo según las condiciones ambientales promedio del ciclo estacional que están atravesando. En las figuras 6.4 y 6.5 puede verse que los días con menores frecuencias de bombeo presentan pendientes de frecuencia en función de la temperatura relativamente menores (ver Mar 10 y Nov 10).

No solo la temperatura modificó la frecuencia de bombeo: en consonancia con los experimentos de laboratorio presentados en el capítulo 3 de esta tesis, en condiciones naturales también se registraron distintas frecuencias de bombeo para una misma temperatura en distintos días de registro (Fig. 6.5). Estos cambios podrían deberse a distintos niveles de reserva de carbohidratos de la colonia según la disponibilidad de dichos recursos (Kay, 2002, 2004). Una de las posibles causas de esto puede ser por variaciones estacionales en la disponibilidad de fuentes de alimento, así como en los requerimientos de azúcares de la colonia debidas al tamaño del nido, nivel de actividad, cantidad de cría, etc. Efectivamente, a lo largo de los registros realizados a campo observamos variaciones en el tamaño de la colonia, y en la disponibilidad de fuentes de alimento (obs. pers. A. Falibene).

AMINAS BIOGÉNICAS Y LA MODULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO: EFECTO FARMACOLÓGICO DE LA SEROTONINA

7.1. INTRODUCCIÓN

Fisiológicamente, las aminas biogénicas juegan un rol importante en el control y la modulación de muchas acciones y procesos tanto en vertebrados como en invertebrados. Particularmente, la monoamina serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), que se encuentra en todos los filos que poseen sistemas nerviosos (Weiger, 1997), orquesta diversos procesos comportamentales y fisiológicos relacionados con el balance energético en grupos tan distantes como nematodos y humanos (revisión en Tecott, 2007). Mientras que en vertebrados tiene un efecto inhibitorio en las actividades relacionadas con la ingestión, en algunos invertebrados, como los anélidos, moluscos y nematodos, promueve una activación de estos comportamientos (revisión en: Gillette, 2006; Tecott, 2007).

En insectos, las monoaminas (sustancias neuroactivas) pueden actuar de tres formas distintas: (1) como **neurotransmisores**, al ser liberadas desde neuronas pre-sinápticas y actuar sobre receptores de la membrana post-sináptica, (2) como **neurohormonas**, liberadas al sistema circulatorio o extracelularmente en regiones localizadas del SNC (actuando a distancia) o (3) como **neuromoduladores** (Fig 1.5B), que son casos especiales de neurohormonas que cambian las señales transferidas en las sinapsis o bien alteran la actividad espontánea de neuronas receptoras o células musculares (revisión en Nässel, 1988). Es decir, estas sustancias pueden ejercer sus efectos a nivel central o periférico (Bicker y Menzel, 1989; Roeder, 1999; Blenau y Baumann, 2001, Scheiner et al., 2006; Orchard, 2006). Estudios farmacológicos demostraron que la alteración de los niveles de 5-HT presentes en hemolinfa o a nivel neuronal modifican el comportamiento alimentario

en muchos insectos (Cohen, 2001; Dacks et al., 2003; Kaufmann et al., 2004; Neckameyer et al., 2007; Haselton et al., 2009). En las moscas *Phormia regina* y *Neobellieria bullata* y en las cucarachas de la especie *Rhyarobia maderas*, la administración de 5-HT promueve un decremento en el consumo de azúcares (Long y Murdock, 1983; Cohen, 2001; Dacks et al., 2003). Se ha sugerido que esto puede deberse a una disminución en la sensibilidad al azúcar, lo que incrementaría los umbrales de respuesta y, consecuentemente, disminuiría la tasa de ingestión (Dacks et al., 2003). Sin embargo, el efecto de la 5-HT sobre la dinámica de ingestión y los mecanismos que subyacen dichas variaciones aún no han sido identificados en insectos.

Diversos estudios han revelado un importante sistema serotoninérgico en los principales centros que controlan la alimentación (ganglio subesofágico -GSE- y ganglio frontal -GF), así como también en las glándulas salivales, las piezas bucales y el canal alimentario en diversos insectos (Nässel y Elekes, 1984; Davis, 1985; 1987; Klemm et al., 1986; Nässel, 1988; Orchard et al., 1988; Lange et al., 1988; van Haeften y Schooneveld, 1992; Schachtner y Bräunig, 1993; Ali y Orchard, 1996; Ali, 1997; Miggianni et al., 1999; Dacks et al., 2003; Molaei y Lange, 2003; Orchard, 2006; Tsuji et al., 2007; Siju et al., 2008). Esto sugiere fuertemente que la serotonina cumple un rol importante en la integración de los procesos involucrados en la modulación del comportamiento alimentario.

Si bien diversos aspectos del comportamiento de ingestión y la regulación de la alimentación han sido estudiados en hormigas, no hay información disponible sobre los efectos de la 5-HT en la alimentación en este insecto. Considerando el rol del estado fisiológico en la modulación de la dinámica de ingestión, nos preguntamos cómo la 5-HT afecta el comportamiento alimentario y la dinámica de ingestión en hormigas.

7.1.1. Objetivo

- ❖ Evaluar los efectos de la 5-HT sobre el comportamiento alimentario y la actividad de la bomba de succión en hormigas *C. mus*.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Administración de la droga

Considerando que el comportamiento alimentario en hormigas depende fuertemente del estado motivacional, administramos la droga oralmente para minimizar la manipulación del animal y realizar el tratamiento de la forma menos invasiva.

Se disolvió serotonina hidroclorehídrica (CAS No. 153-98-0, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en solución de sacarosa 30 ó 20% p/p, dependiendo del experimento, conteniendo ácido ascórbico (10 mM), el cual se usa comúnmente para reducir la oxidación de las aminas biogénicas. Las soluciones fueron preparadas, guardadas a -10 °C (por no más de 10 días) y descongeladas 5 min antes de ser usadas. Las hormigas fueron alimentadas individualmente o en grupos con solución control (sacarosa y ácido ascórbico) o con esta solución con el agregado de diferentes cantidades de 5-HT.

7.2.2. Series experimentales

7.2.2.1. Determinación de la ventana temporal y el efecto de la 5-HT

En primer lugar determinamos el tiempo necesario para observar un efecto de la administración de 5-HT en el comportamiento alimentario de las hormigas *C. mus*. Para evaluar esto, obreras de la misma colonia fueron colocadas en frascos individuales (3 cm de diámetro) y alimentadas con 0.25 µl de solución control 30% p/p (grupo control) ó 0.25 µl de la misma solución con 5-HT 7.5×10^{-2} M (grupo 5-HT). Solo las hormigas que ingirieron la totalidad de la solución ofrecida fueron usadas en los experimentos (hora de administración: entre 9 y 10 am, invierno). Luego, a distintos tiempos después de la administración de la droga (desde 40 min hasta 6:30 h), cada hormiga fue colocada en la plataforma de madera de la arena de registro (ver sección 2.2). Se registró la actividad eléctrica de la bomba de succión durante la ingestión de solución de sacarosa 30% p/p. Con el fin de incrementar el número de registros y asegurar una buena resolución en el tiempo, las hormigas no fueron pesadas antes ni después de la ingestión en este ensayo. Con esto, solo el tiempo de ingestión y la frecuencia de bombeo pudieron obtenerse de estos registros.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el primer experimento, realizamos un segundo experimento con otra colonia. Considerando que en otros insectos sociales la administración oral de aminas biogénicas es usualmente llevada a cabo en forma grupal (Schulz y Robinson, 2001; Barron et al., 2002; Barron y Robinson, 2005; Vander Meer et al., 2008), decidimos aplicar este procedimiento. Para ello, obreras de una misma colonia fueron separadas en dos grupos iguales ($N = 40$); uno de ellos fue alimentado con $10 \mu\text{l}$ (una cantidad equivalente a $0.25 \mu\text{l}$ por individuo) de solución control mientras que el otro fue alimentado con $10 \mu\text{l}$ de solución de 5-HT ($7.5 \times 10^{-2} \text{ M}$) (administración: 11 am, verano). En todos los casos, después de haber ofrecido la solución correspondiente a cada grupo, se confirmó la ocurrencia de trofalaxia entre las hormigas del grupo. El comportamiento y la actividad eléctrica de la bomba fueron registrados desde las 3:30 h hasta las 5:30 h luego del tratamiento. Con el objetivo de obtener el volumen ingerido durante el registro y todas sus variables derivadas, los individuos fueron pesados antes y después del registro haciéndolos pasar previa y posteriormente por un puente de madera situado en una balanza (Metler-Toledo, 0.01 mg. Fig. 2.1).

7.2.2.2. Evaluación de la dosis-dependencia

Obreras de una misma colonia fueron colocadas en frascos individuales y alimentadas con $0.25 \mu\text{l}$ de solución control (sacarosa 30% p/p) o con la misma solución con distintas concentraciones de 5-HT: 7.5×10^{-4} , 7.5×10^{-3} y $7.5 \times 10^{-2} \text{ M}$. Los registros fueron realizados aproximadamente 4 h después del tratamiento (administración: 10 am – 12 am; verano). Las hormigas fueron pesadas antes (masa de la hormiga) y después (masa de la hormiga más carga ingerida) de cada registro.

7.2.2.3. Control 1: Actividad locomotora

Se evaluó la locomoción después del tratamiento para analizar si el efecto de la 5-HT en el comportamiento alimentario se debió a cambios en la actividad general de los individuos. Las hormigas fueron tratadas con $0.25 \mu\text{l}$ de solución control o 5-HT ($7.5 \times 10^{-2} \text{ M}$) y evaluadas 1 ó 4 h después de la administración. La evaluación de la locomoción se llevó a cabo colocando a las hormigas individualmente en una arena circular (un frasco de 7 cm de diámetro con las paredes pintadas con flouon para evitar el escape) con una grilla de cuadrados (1.5 cm de lado) en la base (Fig. 7.1) y

filmadas durante el primer minuto. La actividad locomotora fue evaluada cuantificando el número de líneas atravesadas en 1 minuto (índice de locomoción).



Figura 7.1. Arena circular para evaluar la actividad locomotora en hormigas

7.2.2.4. Control 2: Umbral de aceptación de sacarosa (UAS)

El umbral de respuesta al azúcar fue evaluado luego de la administración del tratamiento para analizar si el efecto de la 5-HT sobre el comportamiento observado al momento de realizar los registros se debió a cambios en dicha respuesta. Hormigas de una misma colonia fueron colocadas en frascos individuales y tratadas oralmente con 0.25 μ l de solución control (20% p/p sacarosa) o solución con 5-HT (7.5×10^{-2} M). Aproximadamente 2 h después del tratamiento, las hormigas fueron anestesiadas en hielo y encepadas (duración del procedimiento: 40-50 min). El umbral fue medido 1 h después de que la última hormiga fue montada en el cepo (tal como fue descrito en el capítulo 5). De esta forma, el ensayo de UAS fue realizado aproximadamente 4 h después del tratamiento.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Determinación de la ventana temporal y el efecto de la 5-HT

Se registró la actividad eléctrica generada por la bomba de succión durante la ingestión a distintos tiempos después del tratamiento con 5-HT. Desde los 40

minutos hasta las 3:30 h post-tratamiento la frecuencia de bombeo incrementó con el tiempo en ambos grupos (Fig. 7.2A). Desde ese momento, las hormiga del grupo control mantuvieron la frecuencia constante hasta el final del experimento (6:30 h) mientras que las del grupo 5-HT mostraron una tendencia a bombear a frecuencias menores. Considerando estos resultados y con el objetivo de analizarlos estadísticamente, los datos fueron separados en dos periodos: entre 40 min y 3:30 h y el comprendido entre las 3:30 y las 6:30 h después del tratamiento (Fig. 7.2B). La frecuencia de bombeo varió significativamente entre los periodos (tratamiento*periodo: $F_{1,70} = 3.72$, $p = 0.058$; periodo: $F_{1,70} = 18.39$, $p < 0.0001$; ANOVA de dos factores), pero el tratamiento con 5-HT solo provocó una tendencia a frecuencias de bombeo menores comparado con el control (tratamiento: $F_{1,70} = 2.53$, $p = 0.12$; ANOVA de dos factores. Fig. 7.2A, B).

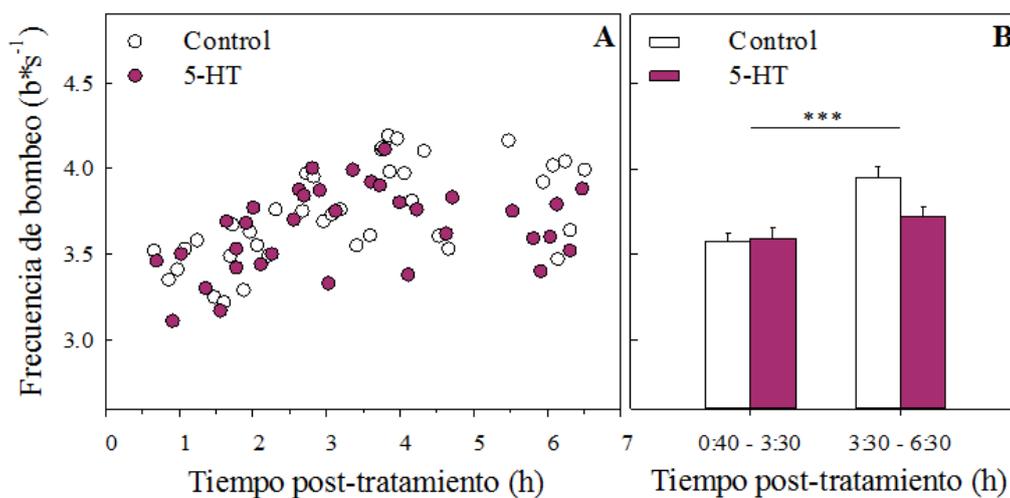


Figura 7.2. Efecto del tiempo transcurrido desde el tratamiento oral con 5-HT. Actividad de la bomba de succión registrada durante la ingestión de solución de sacarosa a distintos tiempos post-tratamiento con solución control o 5-HT (10^{-2} M). (A) Frecuencia de bombeo predominante en función del tiempo desde el tratamiento (administración = 0 h). Cada punto representa una hormiga. (B) Frecuencia de bombeo (media + error std.) considerando dos periodos de tiempo después de la administración: 0:40-3:30 h ($N_{\text{control}} = 21$, $N_{5\text{-HT}} = 20$) y 3:30-6:30 h ($N_{\text{control}} = 18$, $N_{5\text{-HT}} = 15$). *** $p < 0.001$.

Basados en estos resultados, se evaluó el efecto de la 5-HT en el comportamiento alimentario en un nuevo experimento en el cual las hormigas fueron tratadas en forma grupal y los datos registrados luego de las 3:30 h post-tratamiento. Considerando que el tamaño afecta a determinadas variables relacionadas con la ingestión, utilizamos hormigas de tamaños similares (peso inicial de las hormigas: $F_{1,16} = 0.27$, $p = 0.61$, ANOVA). Los registros mostraron que, a pesar de no encontrar variaciones en el tiempo de ingestión entre los dos grupos (control: 56.89 ± 7.43 s; 5-HT: 54.76 ± 4.49 s; $F_{1,16} = 0.06$, $p = 0.81$; ANOVA), el volumen de solución ingerido por las hormigas tratadas con 5-HT fue significativamente menor que el ingerido por las hormigas control (control: 4.77 ± 0.15 μ l; 5-HT: 3.69 ± 0.36 μ l; $H_{1, N = 18} = 5.07$, $p = 0.024$; Kruskal-Wallis). Esto implica que la 5-HT generó una disminución en la tasa de ingestión ($F_{1,16} = 6.13$, $p = 0.025$; ANOVA. Fig. 7.3A). En teoría, un decremento en la tasa de ingestión de una solución determinada puede deberse a una disminución en la frecuencia de bombeo y/o en el volumen de solución incorporado por bombeo. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de bombeo (Frecuencia predominante: $F_{1,16} = 0.06$, $p = 0.80$; ANOVA. Frecuencia inicial: $H_{1, N = 18} = 0.65$, $p = 0.42$; Kruskal-Wallis) (Fig. 7.3B), mostrando que la disminución en la tasa de ingestión se debió principalmente a un decremento en el volumen por bombeo ($F_{1,16} = 9.70$, $p = 0.007$; ANOVA. Fig. 7.3C). La tasa de cambio de frecuencia (tc) no difirió entre tratamientos (Periodo*tratamiento: $F_{1,15} = 0.30$; $p = 0.59$; Tratamiento: $F_{1,15} = 0.64$; $p = 0.44$; Periodo (tc₁₀ vs. tc_r): $F_{1,15} = 22.20$, $p = 0.0003$; ANOVA de dos factores); tampoco el número de bombeos totales realizados durante la ingesta (control: 345.1 ± 30.6 ; 5-HT: 328.5 ± 24.6 ; $F_{1,16} = 0.18$, $p = 0.68$; ANOVA).

Se realizó otro experimento como ensayo preliminar, con la misma metodología pero aplicando un tratamiento crónico (administración diaria durante 6 días consecutivos) con solución control o con 5-HT (0.25 μ l 5-HT 7.5×10^{-2} M por día por hormiga, tratamiento grupal) y tomando los registros 3:30 h luego de la última administración. En este caso, el grupo 5-HT ($N = 10$) mostró una disminución en la frecuencia de bombeo comparado con el grupo control ($N = 7$) ($F_{1,15} = 6.05$, $p = 0.027$; ANOVA), así como también en la tasa de ingestión ($F_{1,15} = 10.33$, $p = 0.0058$) y el volumen por bombeo ($F_{1,15} = 8.39$, $p = 0.011$; ANOVA; $N_{\text{control}} = 7$, $N_{5\text{-HT}} = 10$).

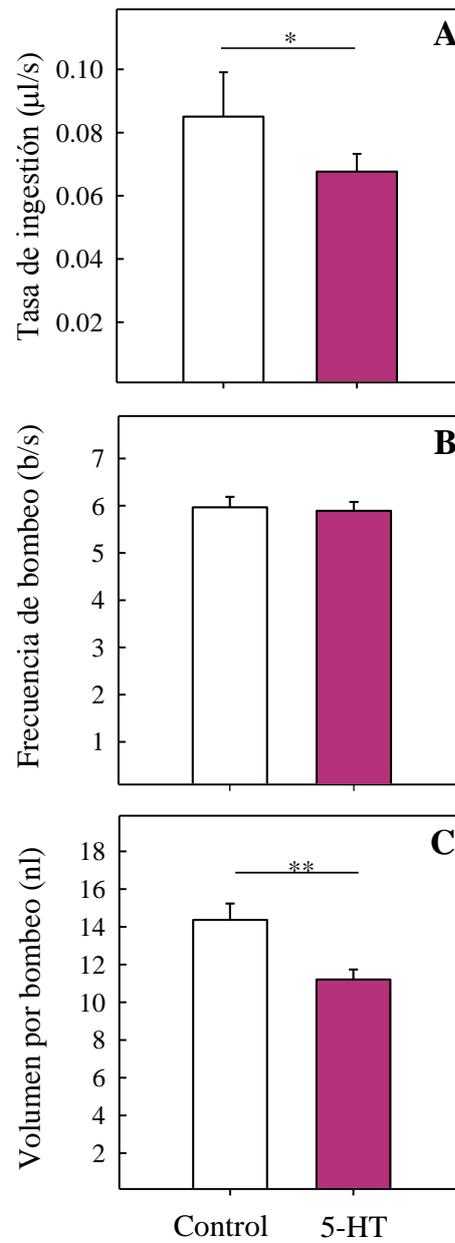


Figura 7.3. Comportamiento alimentario de hormigas que recibieron tratamiento control (N = 9) o con 5-HT (N = 9) 3:30 h previas a los registros y en forma grupal. **(A)** Tasa de ingestión, **(B)** Frecuencia de bombeo y **(C)** Volumen de solución ingerida por cada contracción de la bomba. Todas las variables se muestran como el valor medio + error std. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

7.3.2. Evaluación de la dosis-dependencia

Hormigas tratadas con diferentes dosis de 5-HT (Tabla 7.1) modificaron su comportamiento alimentario de manera dosis-dependiente. A pesar de que los pesos promedio de los distintos grupos no varió significativamente ($F_{3,63} = 1.11$, $p = 0.35$; ANOVA), mostraron cierta tendencia a diferir por lo cual las variables dependientes del tamaño corporal fueron relativizadas al peso de los mismos. La tasa de ingestión relativa ($nl/(s \cdot mg)$) varió con la concentración de 5-HT previamente administrada ($F_{3,63} = 3.32$, $p = 0.025$; ANOVA. Fig. 7.4A). En el mismo sentido que en los experimentos previos, ni la frecuencia de bombeo ($F_{3,62} = 1.38$, $p = 0.26$; ANOVA. Fig. 7.4B) ni el número total de bombeos variaron (control: 187.8 ± 9.4 ; 5-HT 10^{-4} M: 191.9 ± 9.7 ; 5-HT 10^{-3} M: 208.3 ± 16.4 ; 5-HT 10^{-2} M: 184.6 ± 17.6 ; $F_{3,63} = 0.60$, $p = 0.68$; ANOVA), pero el volumen por bombeo disminuyó de manera dosis-dependiente ($F_{3,63} = 3.83$, $p = 0.014$; ANOVA. Fig. 7.4C). Las hormigas tratadas con solución con 5-HT 10^{-3} y 10^{-2} M incorporaron un volumen menor de solución por cada contracción de la bomba comparadas con las hormigas control ($p = 0.03$ y $p = 0.007$ respectivamente; contrastes de Fisher).

Tabla 7.1. Concentración de 5-HT en 0.25 μ l de solución ingerida por las hormigas en el experimento de dosis-dependencia (entre paréntesis, cantidad de 5-HT μ g) y cantidad de 5-HT ingerida relativo al peso de la hormiga (media \pm error std.).

Dosis de 5-HT	μ g de 5-HT/mg de hormiga
0 M	0 \pm 0
7.5×10^{-4} M (0.04 μ g)	0.011 \pm 0.001
7.5×10^{-3} M (0.4 μ g)	0.099 \pm 0.002
7.5×10^{-2} M (4 μ g)	1.008 \pm 0.028

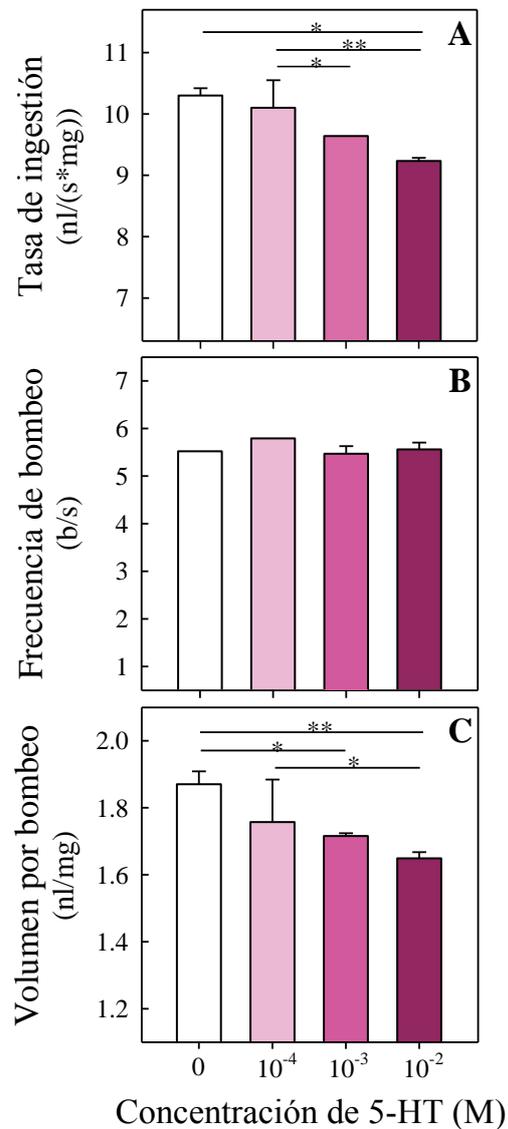


Figura 7.4. Efectos dosis-dependientes del tratamiento oral individual con 5-HT. Comportamiento alimentario registrado 3:30 h luego de la administración en hormigas tratadas con 0.25 μ l de solución de sacarosa con distintas concentraciones de 5-HT: 0 M (N = 17), 7.5×10^{-4} M (N = 17), 7.5×10^{-3} M (N = 17) o 7.5×10^{-2} M (N = 16). **(A)** Tasa de ingestión (relativizada al peso de la hormiga), **(B)** Frecuencia de bombeo y **(C)** Volumen de solución ingerido por cada contracción de la bomba para diferentes concentraciones de 5-HT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

7.3.3. Control 1: Actividad locomotora

La administración oral de 5-HT 7.5×10^{-2} M no afectó la actividad locomotora general de las hormigas registrada 1 ó 4 h después del tratamiento (tratamiento*tiempo: $F_{1,76} = 0.15$, $p = 0.70$; tratamiento: $F_{1,76} = 0.001$, $p = 0.98$; tiempo: $F_{1,76} = 1.09$, $p = 0.30$; ANOVA de dos factores. Fig. 7.5).

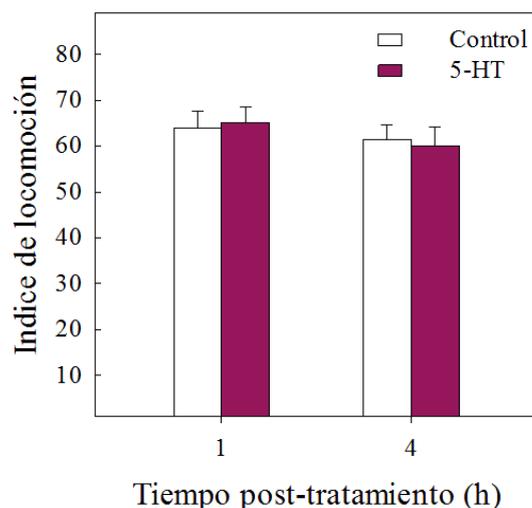


Figura 7.5. Control del efecto de la 5-HT sobre la actividad general en hormigas. La locomoción fue evaluada 1 ó 4 h luego del tratamiento control o con 5-HT 7.5×10^{-2} M. El índice de locomoción se definió como el número de líneas atravesadas en 1 minuto.

7.3.4. Control 2: UAS

La administración oral de 5-HT 7.5×10^{-2} M no modificó el UAS 4 h después del tratamiento ($H_{1, N = 74} = 0.49$, $p = 0.48$; Kruskal-Wallis. Fig. 7.6). Ambos grupos de hormigas respondieron en igual proporción durante la evaluación; 65% de las hormigas control y 67% de las hormigas tratadas con 5-HT mostraron una respuesta positiva a alguna de las concentraciones evaluadas. Ambos grupos presentaron un UAS de 30% p/p (valor de la mediana). Como el peso de los individuos fue de alrededor de 5 mg, la cantidad de droga ingerida resultó aproximadamente $0.85 \mu\text{g}$ por mg de hormiga, cantidad similar a la utilizada en los experimentos anteriores.

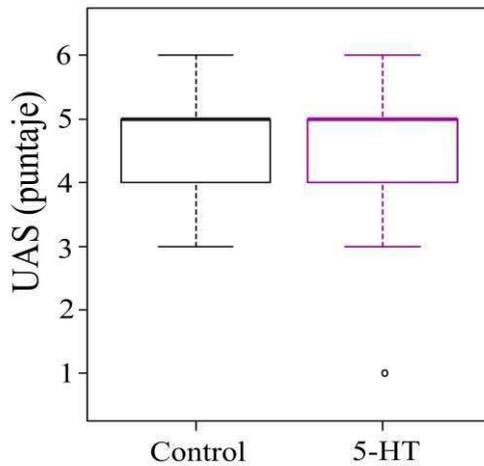


Figura. 7.6. Umbral de aceptación de sacarosa (UAS) en hormigas encephadas que recibieron individualmente el tratamiento control (N = 37) o con 5-HT (7.5×10^{-2} M; N = 37) 4 h antes de la evaluación. Las líneas gruesas horizontales en cada caja representan la mediana, las cajas muestran el primer y tercer cuartil, los bigotes indican los valores extremos y los círculos los outliers.

7.4. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo indican que la 5-HT posee un efecto depresivo en la ingestión de soluciones azucaradas en la hormiga nectívora *C. mus*. La administración oral de 5-HT a hormigas ayunadas redujo el volumen de solución ingerido. Esto ocurrió al administrar la droga en tratamiento individual así como también en tratamiento grupal (compartido por trofalaxia), lo que es importante desde un punto de vista metodológico.

Los efectos depresivos de esta amina biogénica sobre la alimentación han sido demostrados en otros insectos. Los áfidos, que se alimentan de la savia de las plantas, interrumpen el comportamiento de penetración del estilete cuando son tratados con 5-HT exógena (Kauffman et al., 2004). Insectos que basan su dieta en azúcares y proteínas (como las hormigas *C. mus*) muestran respuestas similares. Inyecciones de 5-HT en la cucaracha *R. maderae* cambian su preferencia hacia la ingestión de proteínas y disminuyen la ingesta de azúcares; más aún, las ninfas tratadas con α -metiltryptofano, un antagonista de la 5-HT, incrementan la ingestión de azúcar (Cohen, 2001). En moscas, inyecciones de 5-HT promueven un decremento en la ingesta de carbohidratos (Long y Murdock, 1983; Dacks et al., 2003), como así también de proteínas (Haselton et al., 2009). En adición a estos antecedentes, nosotros mostramos en hormigas que la incorporación de 5-HT exógena también afecta la dinámica de ingestión y la actividad de la bomba de succión de manera dosis-dependiente. Nuestros registros nos permiten discernir por

primera vez en insectos el mecanismo subyacente a este efecto: la 5-HT disminuye la tasa de ingestión principalmente por una reducción del volumen de solución incorporado por cada contracción de la bomba.

La 5-HT actúa sobre la contracción de los músculos viscerales en insectos. Algunos estudios muestran efectos excitatorios sobre la frecuencia y/o la amplitud de la contracción muscular con concentraciones de 5-HT entre 10^{-8} y 10^{-4} M (Cook et al., 1969; Huddart y Oldfield, 1982; Cooper y He, 1994; Kaufmann et al., 2004; Orchard, 2006). Contrariamente, otros trabajos muestran efectos de relajación muscular utilizando las mismas concentraciones (Banner et al., 1987a, b; Osborne et al., 1990; Molaei y Lange, 2003). En nuestros resultados, una disminución del tono muscular de la bomba de succión generada por la administración de 5-HT explicaría la reducción observada en el volumen de solución incorporada por cada contracción. Si ese fuera el caso, los cambios observados en la actividad de la bomba de succión serían específicos (al menos a las dosis utilizadas aquí), ya que no se detectó un efecto depresivo de la 5-HT sobre todo el sistema muscular: no observamos diferencias en la actividad locomotora de hormigas tratadas y no tratadas con dicha amina.

Durante los experimentos pudo observarse un incremento en la frecuencia de bombeo durante las 3 primeras horas post-tratamientos, tanto para el grupo control como para el tratado con 5-HT. Esto podría deberse a sutiles variaciones de la temperatura que puedan ocurrir dentro del laboratorio a lo largo del día (como hemos visto en el capítulo 6) y/o al tiempo transcurrido desde la última ingestión.

A diferencia de otros insectos, en las hormigas *C. mus* la administración oral de 5-HT ejerce sus efectos solo 3:30 h post-tratamiento en las hormigas *C. mus*. En abejas, los ensayos se llevan a cabo generalmente dentro de la primera hora luego de la administración oral de una amina biogénica (Scheiner et al., 2002; Pankiw y Page, 2003; Spivak et al., 2003). La diferencia en el tiempo requerido para observar un efecto podría deberse a diferencias en el metabolismo de estos insectos. La tasa metabólica de una abeja *Apis mellifera* es 125 veces mayor que la de una obrera del género *Camponotus* (Blatt y Roces, 2001; Schilman y Roces, 2008).

No hemos detectado cambios en el UAS promovidos por la administración oral de 5-HT. A pesar que nuestros experimentos muestran que la 5-HT no afecta al umbral de aceptación 4 h post-tratamiento, no podemos descartar la posibilidad de que esta amina tenga un efecto sobre la percepción de azúcares. Estudios previos

realizados en otros insectos han establecido que los umbrales de respuesta al azúcar y la sensibilidad de las neuronas gustativas están relacionados con los niveles de 5-HT presentes (Brookhart et al., 1987; Blenau y Erber, 1998; Dacks et al., 2008). Es posible que los efectos de esta amina sobre el UAS sigan un curso temporal diferente al observado para promover cambios sobre la actividad de la bomba de succión. Más allá de esto, este experimento sólo tuvo como objetivo evaluar si al momento de registrar la actividad de la bomba de succión (4 h post-tratamiento), había un efecto de la 5-HT sobre el UAS en hormigas que habían sido sometidas al mismo tratamiento. Alternativamente, cabe pensar también que la 5-HT podría afectar la respuesta al azúcar, pero el efecto potencial de la sacarosa ingerida durante el tratamiento (como vehículo de la serotonina) podría estar enmascarando los posibles cambios promovidos por la amina. Si este fuese el caso, la administración de 5-HT por inyección nos permitiría detectar los cambios en los umbrales.

Poco se sabe sobre la concentración de 5-HT circulante en hemolinfa de insectos. Se han reportado concentraciones de alrededor de 7 nM en larvas no alimentadas de vinchucas de la especie *Rhodnius Prolixus*, elevándose hasta 115 nM 5 min después de iniciada la ingestión (Lange et al., 1989). En mariposas *Pieris brassicae*, los niveles de 5-HT en hemolinfa varían ampliamente durante los distintos estadios de desarrollo y con el fotoperíodo, encontrándose entre niveles indetectables hasta de 1.6 μ M en larvas y 12 μ M un día después de la pupación (L'Helias et al., 1995; Isabel et al., 2001). Por último, no se ha detectado esta amina en la hemolinfa de larvas de la polilla calavera *Acherontia styx* (con límite de detección de 150 pg/ml; Awad et al., 1997). Por otro lado, estudios llevados a cabo en abejas han demostrado que 1 h después de la administración oral de octopamina (OA) sólo se encuentra alrededor del 1% de la cantidad total de droga ingerida en la hemolinfa abdominal (Barron et al., 2007). No se ha estudiado si la 5-HT actúa de un modo similar a la OA, sin embargo, los efectos de la droga se hicieron visibles con dosis de 0.25 μ l de solución con 5-HT 7.5 mM (e.g. 1.875 nmoles de 5-HT por hormiga).

SEROTONINA EN TEJIDOS Y SISTEMA NERVIOSO ASOCIADOS A LA ALIMENTACIÓN

8.1. INTRODUCCIÓN

En insectos, el sistema neuromotor de las estructuras asociadas a la alimentación y su control a nivel central involucra principalmente dos ganglios, el subesofágico y el frontal. El ganglio subesofágico (GSE) es parte del sistema nervioso central y está involucrado, entre otras cosas, en controlar los movimientos de las piezas bucales en distintos insectos (Miles y Booker, 1998; Rast y Bräunig, 2001b; Davis y Hildebrand, 2006) y se ha reportado que además proyecta nervios al músculo dilatador inferior faríngeo en la hormiga *L. niger* (Janet, 1905). Además, junto con el tritocerebro, recibe proyecciones directas desde sensilias gustativas y mecanosensibles en abejas, moscas y polillas (Rehder, 1989; Edgecomb y Murdock, 1992; Mitchell et al., 1999; Wang et al., 2004; Jørguensen et al., 2006).

Por otro lado, el ganglio frontal (GF) es uno de los componentes principales del sistema estomatogástrico en la mayoría de las taxas de insectos (revisión en Ayali, 2004). En muchos insectos, este ganglio yace sobre el dorso de la faringe y está conectado al tritocerebro por el par de conectivos frontales (Fig. 1.6). El GF es la mayor fuente de inervación de los músculos del estomodeo, incluidos los músculos dilatadores de la bomba de succión (Janet, 1905; Miles y Booker, 1998; Ayali, 2004; Davis y Hildebrand, 2006).

Estudios inmunohistoquímicos han revelado una compleja red serotoninérgica en muchos de estos ganglios y tejidos; tanto el GSE como el GF contienen células serotoninérgicas en varios insectos (Davis, 1985, 1987; Klemm et al., 1986; Nässel, 1988; Radwan et al., 1989; van Haeften y Sehooneveld, 1992; Dacks et al., 2003; Orchard, 2006; Tsuji et al., 2007; Siju et al., 2008). También se han detectado procesos serotoninérgicos en las glándulas salivales, las piezas bucales y el canal

alimentario (Nässel y Elekes, 1984; Davis, 1985, 1987; Klemm et al., 1986; Nässel, 1988; Orchard et al., 1988; Schachtner y Bräunig, 1993; Ali y Orchard, 1996; Ali, 1997; Miggiani et al., 1999; Molaei y Lange, 2003; Orchard, 2006; Siju et al., 2008). Además, la 5-HT modifica la contracción de los músculos viscerales (Cook et al., 1969; Huddart y Oldfield, 1982; Cooper y He, 1994; Kaufmann et al., 2004; Orchard, 2006; Banner et al., 1987a, b; Osborne et al., 1990; Molaei y Lange, 2003). En conjunto, esto sugiere que la 5-HT endógena podría estar involucrada en la regulación de esta actividad y que cumple un rol importante en la integración de los procesos involucrados en la modulación de la alimentación. Sin embargo, la distribución y el modo de acción de esta amina parecen variar enormemente entre taxas.

Considerando que las aminas biogénicas en insectos pueden actuar de distintas formas, el proceso de control de la 5-HT sobre los músculos viscerales podría llevarse a cabo a través de distintos mecanismos: 1) la 5-HT podría actuar como neurotransmisor, siendo la sustancia neuroactiva de las motoneuronas que llegan al músculo o bien de neuronas que actúen en sitios pre-sinápticos de motoneuronas no serotoninérgicas; o 2) la 5-HT podría actuar como neuromodulador o neurohormona, siendo liberada al sistema circulatorio o en regiones localizadas y actuar sobre las sinapsis o alterar la actividad de neuronas receptoras o células musculares (ver sección 7.1).

En el capítulo anterior hemos visto que la administración de 5-HT exógena en hormigas intactas modifica la actividad de la bomba de succión. Por lo cual, nos preguntamos si el canal alimentario y los músculos de la bomba de succión poseen inervaciones del tipo serotoninérgicas y si esta amina está presente en los centros involucrados en el control de dichos tejidos.

8.1.1. Objetivos

- ❖ Analizar la presencia de células serotoninérgicas en los mayores centros neuronales involucrados en la regulación de la alimentación: el GSE y el GF.
- ❖ Estudiar por técnicas inmunohistoquímicas la asociación de la 5-HT con el canal alimentario y los músculos de la bomba de succión.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Animales

Los individuos utilizados para este experimento fueron obreras de *C. mus* correspondientes a las de mayor tamaño, con un ancho de cabeza de alrededor de 2 mm. Se utilizaron dos colonias distintas, ambas mantenidas con acceso libre a agua, miel diluida e insectos cortados como fuente proteica.

8.2.2. Doble tinción en sistema nervioso: núcleos celulares y serotonina

Las hormigas fueron anestesiadas con CO₂ y decapitadas. Las cabezas fueron fijadas en cera y cubiertas con solución fría Ringer de hormiga (solución de composición iónica similar a la hemolinfa de hormigas; 127 mM NaCl, 7 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.8 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4.8 mM TES, 3.2 mM Trehalosa, pH 7.0). Se realizaron incisiones en la cabeza a fin de abrir una ventana en la cutícula entre los ojos, vertex y clipeo (Fig. 8.1). Cuidadosamente se removieron glándulas y tejido graso y se extrajo el cerebro (con el GSE en su parte ventral) y el GF. Durante la disección se tuvo extremo cuidado de mantener unido el GF con el cerebro, los cuales están conectados a través de los conectivos frontales. Los tejidos fueron inmediatamente traspasados a una solución de fijación fría (4% formaldehído en buffer fosfato salino, PBS, pH = 7.2) y fijados durante toda la noche a 4 °C en agitación. Mediante este paso, por un lado, se detienen los procesos biológicos, manteniendo la estructura histológica del tejido y, por otro lado, se fijan los antígenos al tejido para evitar su solubilización y poder identificarlos posteriormente. Al día siguiente los tejidos ya fijados fueron lavados, primero con PBS (3 x 10 min) y luego con PBS conteniendo 0.2% Tritón-X 100 (PBST, 2 x 10 min), un surfactante que permeabiliza la membrana celular. Se realizó una pre-incubación en PBST con 2% suero normal de cabra (SNC, ICN Biomedicals, No. 191356, Orsay, Francia) por 1 h a temperatura ambiente. Se utiliza suero normal ya que contiene una gran mezcla de anticuerpos (no específicos) que bloquean sitios inespecíficos, reduciendo la unión del anticuerpo de interés a los mismos y mejorando la claridad en los preparados (reduce el background). Los preparados fueron incubados luego en anticuerpo anti-serotonina de conejo (1:4000, DiaSorin, agua destilada, MN, Cat. No. 20080, Lot No. 051007) en PBST con 2% SNC

primero 2 h a temperatura ambiente, luego 4 días a 4 °C en agitador. Luego de la incubación los tejidos fueron lavados en PBS (5 x 10 min) e incubados en anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con AlexaFluor 568 (1:250, Molecular Probes, A-11008) en PBS con 1% SNC toda la noche a 4 °C y lavados nuevamente (5 x 10 min). De esta forma, la 5-HT será revelada al excitar los preparados con una longitud de alrededor de 568 nm, fluoresciendo en respuesta a dicha estimulación en color rojo. Para llevar a cabo la tinción de núcleos celulares, los tejidos fueron incubados en una solución de Sytox Green (2.5 mM, Molecular Probes, S-7020) en PBST por 3:30 h a temperatura ambiente. Esta sustancia tiñe diferencialmente ácidos nucleicos y fluoresce en verde al ser excitada con laser de argón de 488 nm. A continuación, los preparados se lavaron con PBS (4 x 10 min).

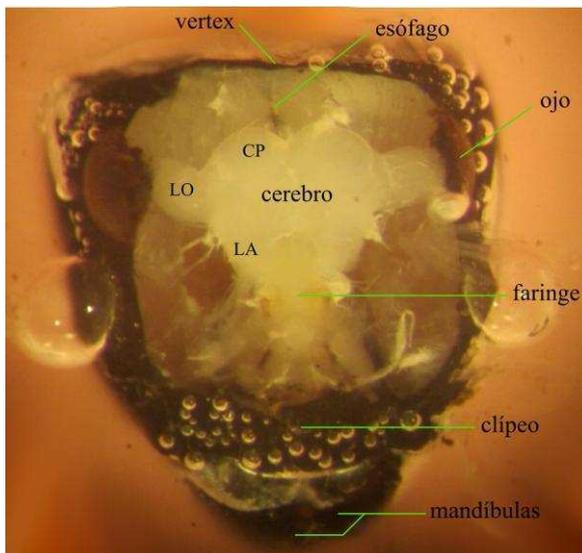


Figura 8.1. Dissección de la cabeza de una hormiga *Camponotus mus*. Para extraer el cerebro o la porción del canal dentro de la cabeza se abre una ventana en cutícula en la parte frontal de cabeza. Se indican distintas estructuras en el cerebro: CP: cuerpos pedunculados; LO: lóbulos ópticos; LA: lóbulos antenales.

8.2.3. Inmunomarcación de serotonina en el canal alimentario

Las hormigas fueron anestesiadas con CO₂ y decapitadas. Las cabezas y los cuerpos fueron fijados en cera y cubiertos con solución de fijación fría. Inmediatamente, se realizó la discción del canal alimentario, incluyendo el estomodeo, el mesenterón y el proctodeo. Abriendo una ventana en la cutícula de la zona frontal de la cabeza hasta el clípeo (Fig. 8.1) y desprendiendo cuidadosamente los músculos insertos en dicha cutícula, se procedió a la extracción de la estructura del aparato alimentario y la porción anterior del esófago que se encuentra dentro de

la cabeza. Por otro lado, se realizó una incisión dorsal en la cutícula a lo largo del tórax y el abdomen y se extrajo cuidadosamente el resto del canal alimentario, desde el esófago hasta el ano. Los tejidos fueron inmediatamente traspasados a un frasco con solución de fijación y fijados toda la noche a 4 °C en agitador. A continuación, se lavaron con PBS 0.1 M (3 x 10 min) y luego con PBS conteniendo 0.2% Triton-X 100 (PBST, 2 x 10 min). Luego, fueron pre-incubados en PBST con 2% de suero normal de cabra (SNC,) por 1 h en agitador a temperatura ambiente. Las preparaciones se incubaron con anticuerpo anti-serotonina de conejo (1:2000, DiaSorin, agua destilada, MN, Cat. No. 20080, Lot No. 051007) en PBST con 2% SNC, primero 2 h a temperatura ambiente y luego 2 días a 4 °C en agitador. A continuación, los tejidos fueron lavados en PBS (5 x 10 min) e incubados con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con AlexaFluor 488 (1:250, Molecular Probes, A-11008) en solución de PBS con 1% SNC toda la noche en agitador a 4 °C y lavados nuevamente con PBS (5 x 10 min). De esta forma, la 5-HT en estos tejidos será visualizada en color verde al excitarlos con un laser de argón de 488 nm.

8.2.4. Montaje de los preparados

Finalmente, los preparados in toto (entero, sin seccionar) de los canales alimentarios y los cerebros fueron deshidratados pasándolos por una serie ascendente de concentraciones de etanol (30, 50, 70, 90, 95, 3 x 100%, 10 min cada paso), clareados y montados en metilsalicilato (M-2047, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) en portaobjetos metálicos especiales con un agujero central cubierto por cubreobjetos de vidrio por ambos lados.

8.2.5. Visualización de los preparados y procesamiento de las imágenes

Los preparados fueron visualizados utilizando un microscopio de barrido confocal (Leica TCS SP2; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con laser argón/kriptón y distintos objetivos: 10 X 0.4 NA inm., 20 X 0.7 NA inm. y 40 X 1.25 aceite. El barrido de los canales alimentarios fue llevado a cabo excitando el preparado con longitudes de onda de 488 nm (visualizado en verde) y con secciones ópticas de 2 µm. La estructura de la bomba de succión fue visualizada utilizando la

autofluorescencia cuticular al excitar con 488 nm. El escaneo del GSE y el GF fue llevado a cabo excitando con una longitud de onda de 568 nm para la visualización del AlexaFluor 568 (rojo) y con 488 nm para revelar el Sytox Green (verde). En este caso, las secciones ópticas se realizaron a una distancia de alrededor de 1 μm .

Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando dos programas: la reconstrucción de la imagen a partir de las secciones ópticas individuales se llevo a cabo con el programa Fiji ImageJ (ImageJ 1.44c; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), mientras que la medición del volumen celular se realizó con el programa AMIRA (Mercury Computer Systems, Berlín, Alemania). Para esto último, se dibujó el contorno de cada célula inmunorreactiva a la 5-HT identificada en cada una de las secciones ópticas obtenidas; luego, el programa integra esa información y calcula el volumen para cada una de dichas células.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. Ganglio subesofágico

El análisis de las imágenes obtenidas reveló que, además de un denso sistema serotoninérgico, el GSE (N = 8) contiene 7 pares de cuerpos celulares inmunorreactivos a serotonina (IR-5-HT) (Fig. 8.2A, B). La tinción del núcleo con Sytox Green (visualizado en color verde) permitió la identificación individual de estos somas sin ambigüedad (Fig. 8.2C). Estos somas se encontraron simétricamente posicionados a cada lado del ganglio, con una distribución similar a la reportada en hormigas *C. japonicus* (Tsuji et al., 2007). Por su localización, se describen como tres grupos distintos de células en la región anterior (2 pares), media (3 pares) y posterior (2 pares) del GSE (Fig. 8.2A). Utilizando el programa AMIRA, se midió el volumen de cada célula, evidenciando diferencias de tamaño entre somas de distintos grupos. Se registraron volúmenes de $576 \pm 64 \mu\text{m}^3$, $1590 \pm 111 \mu\text{m}^3$ y $1155 \pm 130 \mu\text{m}^3$ para los pares anteriores, medios y posteriores, respectivamente.

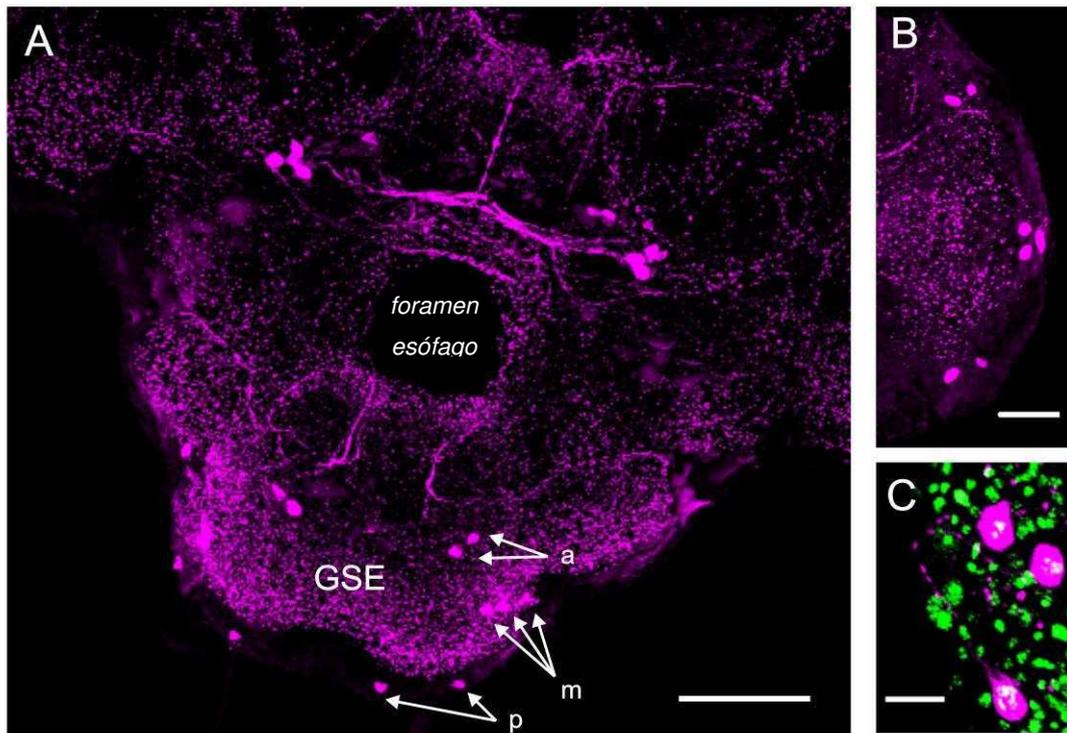


Figura 8.2. Sistema serotoninérgico en el GSE de *C. mus*. Imágenes obtenidas en el microscopio laser de barrido confocal que muestran la inmunorreactividad a 5-HT en magenta (A-C) y los núcleos celulares en verde (C). (A) Vista ventral anterior del cerebro mostrando la compleja red serotoninérgica en todo el cerebro y el GSE. Este último presenta 7 pares de cuerpos celulares IR-5-HT, simétricamente posicionados a cada lado del ganglio. Las flechas indican el grupo anterior (a), medio (m) y posterior (p). Barra = 50 μ m. (B) Vista ventral del lado derecho del GSE donde se distinguen claramente los tres grupos celulares. Barra = 50 μ m. (C) Imagen confocal de la doble tinción en el GSE mostrando los cuerpos celulares del grupo medio izquierdo. Barra = 20 μ m.

8.3.2. Ganglio frontal

El GF está conectado al cerebro a través de los conectivos frontales (Fig. 1.6; 8.3A) y se encuentra ubicado por encima de la cara dorsal de la faringe, rodeado por los músculos dilatadores superiores faríngeos (Fig. 8.3B). Las imágenes obtenidas muestran que el GF presenta cuerpos celulares IR-5-HT (Fig. 8.3C, E), cuyos axones parecen proyectar hacia el tritocerebro a través de los conectivos frontales, los cuales poseen fibras IR-5-HT (Fig. 8.3A, C) perfectamente identificables gracias a la doble tinción de 5-HT y núcleos. El análisis del GF (N = 5) reveló entre 19 y 28 (22 ± 1.58)

cuerpos celulares IR-5-HT. Dentro de cada ganglio, estos somas mostraron diferencias en tamaño e intensidad de tñido (Fig. 8.3D, E). La medición del volumen de cada célula mostró valores entre $\sim 100 \mu\text{m}^3$ en las más pequeñas y $\sim 1900 \mu\text{m}^3$ en las más grandes, con un valor medio de $720 \pm 36 \mu\text{m}^3$ por célula.

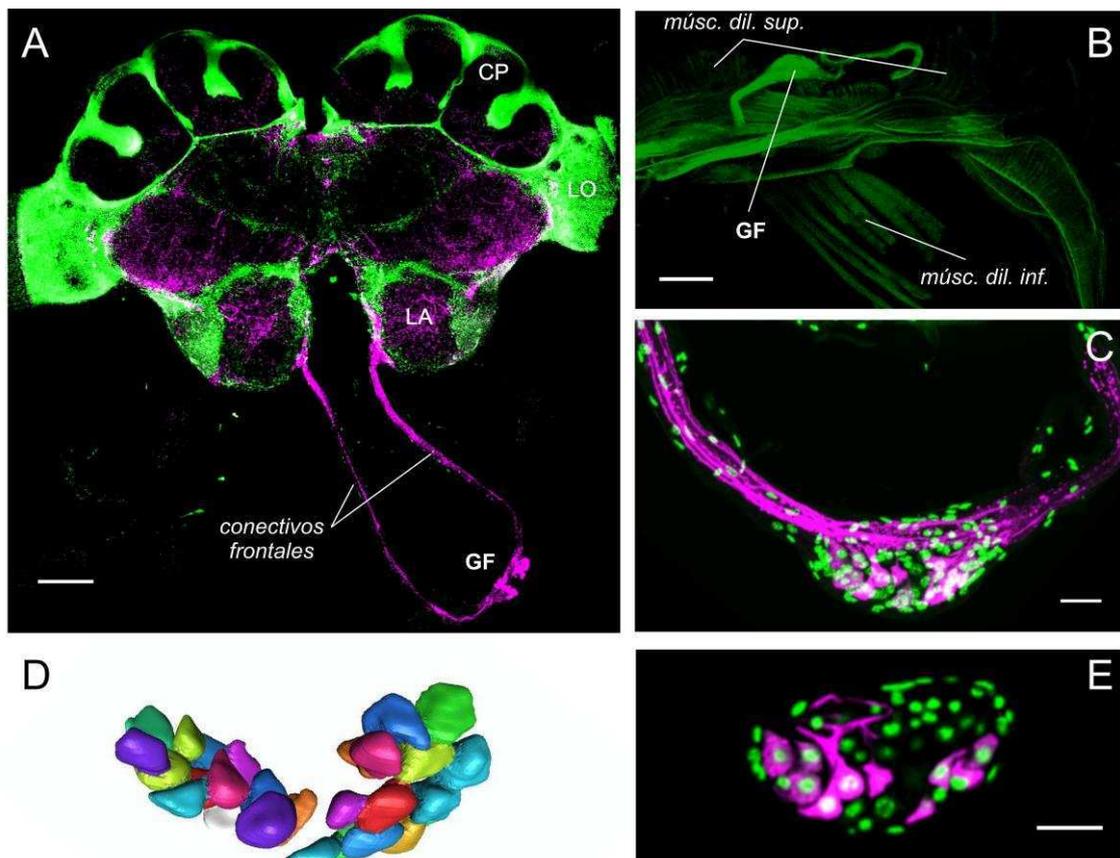


Figura 8.3. 5-HT en el GF de *C. mus*. Imágenes obtenidas en el microscopio laser de barrido confocal que muestran la inmunorreactividad a 5-HT en magenta y los núcleos celulares en verde. **(A)** Vista general del cerebro con el GF unido por los conectivos frontales. En la figura están indicados los cuerpos pedunculados (CP), lóbulos ópticos (LP) y lóbulos antenales (LA). Barra = 100 μm . **(B)** El GF (inmunofluorescencia en color verde) se encuentra ubicado en la cara dorsal de la faringe, rodeado por los músculos dilatadores superiores faríngeos. La estructura de la bomba de succión fue visualizada por autofluorescencia. Barra = 100 μm . **(C y D)** Se encontraron entre 19 y 28 somas celulares IR-5-HT en el GF. **(C)** Proyección tridimensional del GF y los conectivos frontales. Barra = 20 μm . **(D)** Reconstrucción tridimensional de los cuerpos celulares IR-5-HT a partir de la cual se calcularon los volúmenes de cada célula. **(E)** Imagen confocal de cuerpos celulares con distintas intensidades de inmunotinción. Barra = 20 μm .

8.3.3. Canal alimentario

La disección del aparato alimentario mostró la estructura de la bomba de succión en la hormiga *C. mus* (Fig. 8.4). Los músculos dilatadores superiores faríngeos están anclados a la cara dorsal de la faringe (no esclerotizada) por un extremo y al clipeo por el otro. Por su parte, los músculos dilatadores inferiores se encuentran anclados a una estructura altamente esclerotizada en la parte ventral de la faringe.

El análisis inmunohistoquímico de las preparaciones in toto del canal alimentario en hormigas *C. mus* (N = 9) reveló una distribución diferencial de procesos IR-5-HT a lo largo del canal (Fig. 8.5). La Fig. 8.5B muestra una imagen de la estructura de la bomba de succión obtenida por autofluorescencia. No se encontraron procesos IR-5-HT en la porción del canal alimentario que yace dentro de la cabeza, es decir, el cibario, la faringe y la parte anterior del esófago. Tampoco se encontraron dichos procesos en los músculos que componen la bomba de succión (músculos dilatadores superiores e inferiores) ni en los insertos en la última porción de la faringe (probablemente los músculos retractores faríngeos descritos por Janet (1905) y Paul et al. (2002); Fig. 8.5B, C). Sin embargo, las imágenes obtenidas de la porción del esófago que yace en el tórax (Fig. 8.5C, D), el buche y el proventrículo (incluido su bulbo, Fig. 8.5E) mostraron claramente que estas estructuras poseen procesos IR-5-HT. El mesenterón y el proctodeo (túbulos de Malpighi, intestino, recto y ano) no poseen este tipo de inervaciones.

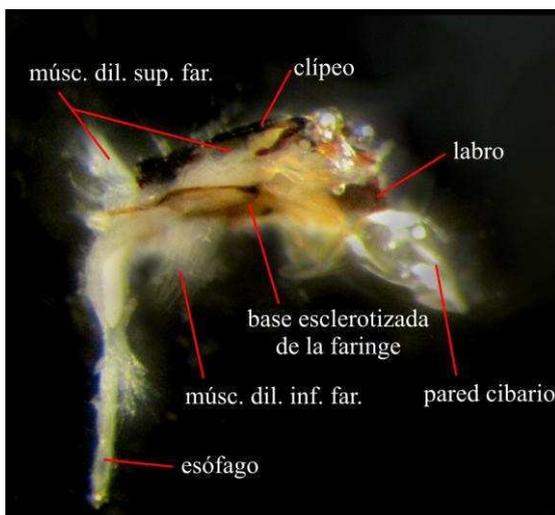


Figura 8.4. Disección del aparato alimentario de *C. mus*. La bomba de succión está compuesta por paquetes musculares anclados a la cara dorsal no esclerotizada de la faringe (músculos dilatadores superiores faríngeos, músc. dil. sup. far.) y a la cara ventral de la faringe (músculos dilatadores inferiores faríngeos, músc. dil. inf. far.), la cual se encuentra esclerotizada.

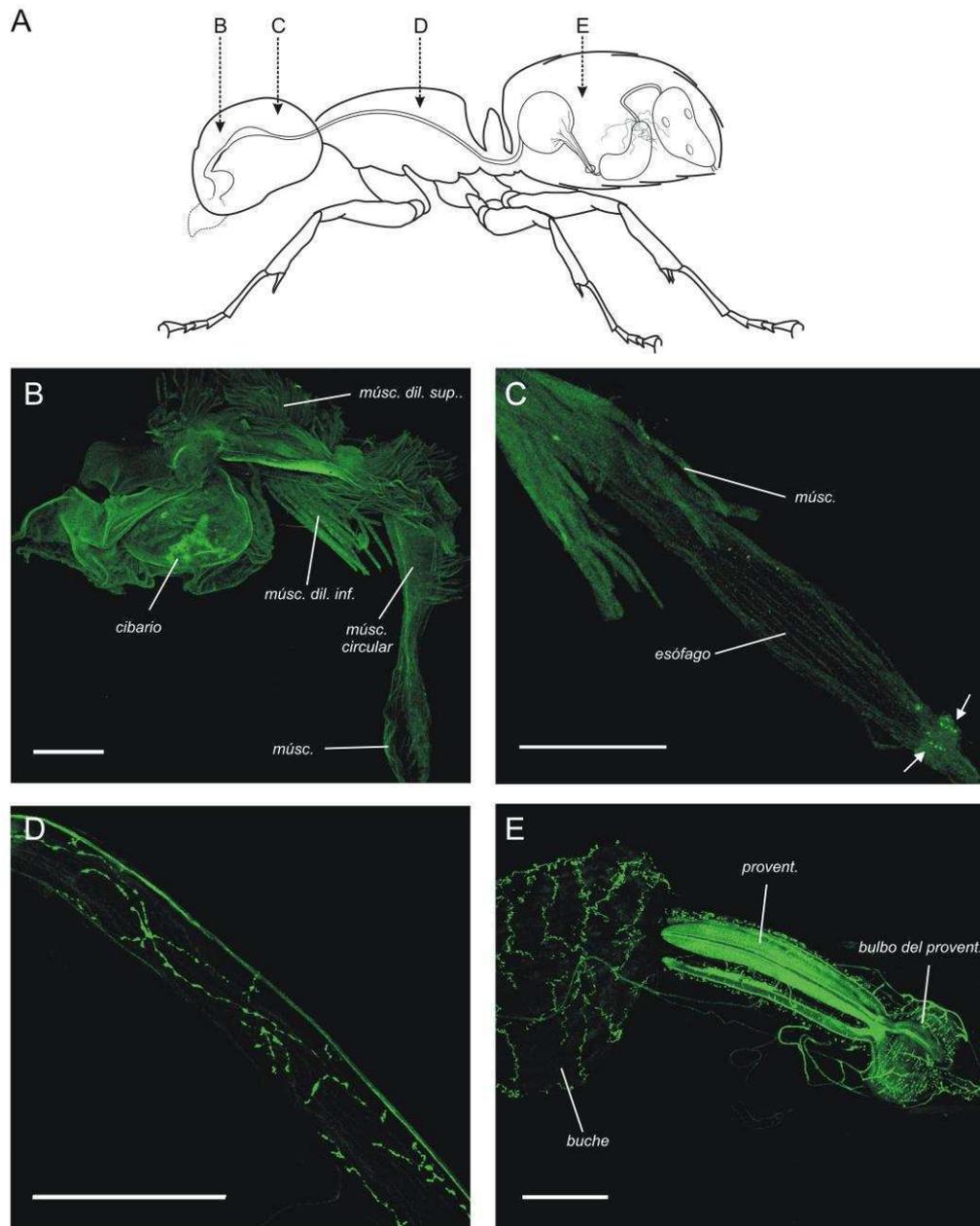


Figura 8.5. Procesos IR-5-HT en el canal alimentario de hormigas *C. mus*. **(A)** Esquema del canal alimentario de una hormiga del género *Camponotus* (basado en Hansen y Klotz, 2005). Las flechas (B - E) indican cada sección del canal mostrada en la figura. **(B)** Imagen confocal de la estructura de la bomba de succión obtenida mediante autofluorescencia cuticular. En la figura están indicados el cibario, los músculos dilatadores superiores (músc. dil. sup.), los músculos dilatadores inferiores (músc. dil. inf.), los músculos circulares en la faringe posterior y los músculos en la faringe posterior (músc., probablemente retractores faríngeos). **(C)** Se encontraron procesos IR-5-HT (indicados por las flechas) en la porción del esófago que corresponde al cuello y **(D)** en la porción del esófago que yace en el tórax. **(E)** Procesos IR-5-HT en el buche, el proventrículo (provent.) y en el bulbo del proventrículo. Para todas las figuras, barra = 200 μ m.

8.4. DISCUSIÓN

8.4.1. Asociación de la serotonina con el canal alimentario

El canal alimentario de los insectos se encuentra modificado en distinta medida según sus hábitos alimentarios (Chapman, 1998). Con ello, puede esperarse que el control de las actividades y procesos relacionados con la alimentación también muestre variaciones entre ellos. En referencia al control motor de los tejidos viscerales y el tipo de inervaciones presente, la presencia de procesos neuronales IR-5-HT en el esófago es una característica común entre insectos de diversas taxas (e.g. langostas: *Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria*, grillos: *Gryllus bicamulatus*, *Acheta domesticus*; vinchucas: *Rhodnius prolixus* y *Oncopeltus fasciatus*; cucarachas: *Periplaneta americana*). Por el contrario, la distribución de estos procesos en el resto del canal alimentario varía ampliamente (Davis, 1985; Klemm et al., 1986; Orchard et al., 1988; Miggiani et al., 1999; Molaei y Lange, 2003). En langostas y grillos, por ejemplo, aunque en distinto grado, el canal alimentario está inervado por procesos serotoninérgicos desde la faringe posterior en el estomodeo hasta el proctodeo, encontrándose ausente en el cibario y la faringe anterior (Klemm et al., 1986; Molaei y Lange, 2003). En contraposición, *P. americana* carece de estos procesos en el proctodeo (Davis, 1985). En *R. prolixus*, las inervaciones serotoninérgicas se encuentran presentes en el esófago y mesenterón pero el buche está totalmente desprovisto de ellas (Orchard et al., 1988). En este trabajo mostramos que en la hormiga *C. mus* el cibario y la región faríngea, incluyendo los músculos de la bomba de succión, no poseen procesos IR-5-HT, los que sí están claramente asociados al esófago, el buche y el proventrículo, volviendo a desaparecer en el mesenterón y el proctodeo. Estas diferencias entre insectos pueden reflejar diferencias en el rol de la 5-HT en el control de determinados componentes o procesos de la alimentación o los requerimientos nutricionales de las distintas especies.

En hormigas eusociales especializadas en recolección de néctar, como *Camponotus*, al igual que en abejas, el control del proventrículo es un elemento clave en el balance entre la distribución de alimento individual y social. El proventrículo está altamente desarrollado en este género y es la estructura que regula el pasaje de líquidos entre el buche (el “estomago social”, ya que su contenido puede ser

compartido por regurgitación entre compañeras), y el mesenterón o intestino medio (en donde los alimentos son digeridos para suministro energético individual) (Hölldobler y Wilson, 1990). Referente a su regulación se sabe que, por un lado, el ayuno de carbohidratos en hormigas afecta fuertemente los niveles de azúcares en hemolinfa (Schilman y Roces, 2008) y, por otro lado, son dichos niveles de carbohidratos en hemolinfa los que controlan el transporte de azúcares a través del proventrículo en abejas (Roces y Blatt, 1999; Blatt y Roces, 2002a; b). Esto establece una fuerte relación, como es de esperarse, entre las necesidades nutricionales del individuo y la distribución de alimento entre los miembros de la colonia. La clara presencia de procesos inmunorreactivos a 5-HT en el buche, proventrículo y bulbo del proventrículo en *C. mus* sugiere que esta amina podría estar involucrada en este control.

8.4.2. Serotonina en el sistema nervioso

El GSE y el GF de varios insectos contienen células serotoninérgicas en distinto número y con proyecciones hacia distintos tejidos (Davis, 1985, 1987; Klemm et al., 1986; Nässel, 1988; Radwan et al., 1989; van Haeften y Schooneveld, 1992; Dacks et al., 2003; Orchard, 2006; Tsuji et al., 2007; Siju et al., 2008). Por ejemplo, el GSE de la cucaracha *P. americana* contiene 5 grupos distintos de cuerpos celulares IR-5-HT (Davis, 1985, 1987), en langostas se han encontrado de 10 a 12 de estos cuerpos celulares mientras que en moscas hay de 18 a 22 (revisión en Nässel, 1988). Algunos de ellos son interneuronas y otros proyectan sus axones al abductor mandibular, glándulas salivales, alcanzan los nervios de las piezas bucales en forma de un extenso sistema neurohemal, o conectan el GSE con el resto del cerebro o el ganglio frontal (Nässel, 1988). Aunque en la abeja se han encontrado 3 pares de células a cada lado del GSE, estas solo conectan los neurómeros entre si y al GSE con el resto del cerebro y el ganglio torácico pero no se han encontrado procesos IR-5-HT en la periferia de las piezas bucales (Nässel, 1988). Nuestros resultados muestran que *C. mus* posee 7 pares de cuerpos celulares IR-5-HT en el GSE con una distribución similar al descrito para *C. japonicus*. Sin embargo, en esta hormiga se han reportado 6 células IR-5-HT impares extra localizadas en la región media del ganglio. Las neuronas del GSE en *C. japonicus* envían sus neuritas hacia el lóbulo dorsal o se extienden bilateralmente atravesando la línea media del ganglio (Tsuji et

al., 2007). Más allá de esto, no se han reportado proyecciones hacia tejidos por fuera del cerebro para esta hormiga.

Tanto la presencia como el número de células serotoninérgicas en el GF varían ampliamente entre insectos (Klemm et al., 1986; Radwan et al., 1989; Davis, 1985; Nässel, 1988). Por primera vez dentro de la familia Formicidae, nuestros resultados muestran que el GF de *C. mus* contiene gran cantidad de células serotoninérgicas cuyo tamaño e intensidad de inmunomarcación varían aun dentro del mismo ganglio.

A pesar de que i) observamos que la 5-HT tiene un marcado efecto sobre la actividad de la bomba de succión (capítulo 7), ii) que existe una relación anatómica cercana entre la bomba de succión y el GF y iii) que este ganglio presenta un buen número de células con gran volumen de material IR-5-HT, no detectamos procesos IR-5-HT en los músculos de la bomba de succión. Considerando estos resultados, descartamos la posibilidad de inervaciones serotoninérgicas directas desde el GF hacia los músculos de la bomba.

8.4.3. Posibles mecanismos de regulación

Es sabido que la 5-HT, junto con OA y DA, es sintetizada y metabolizada en el GF en grandes cantidades y, además, el material neurosecretado desde el GF puede alcanzar todos los músculos a lo largo del canal alimentario (revisión en Ayali, 2004). Las aminas biogénicas pueden causar sus efectos neuromoduladores tanto en los sitios pre- como post-sinápticos de las motoneuronas, alterando las propiedades de respuesta de los músculos a través de cambios en la eficacia sináptica. Aun cuando los músculos no recibieran suministro neural directo de estas sustancias, pueden ser afectados por la presencia de las mismas en la hemolinfa (Chapman, 1998). Las grandes cantidades de 5-HT en el GF de *C. mus* sugieren que la 5-HT podría estar actuando como un neuromodulador sobre la actividad de la bomba de succión.

En langostas, se ha propuesto que la actividad del estomodeo podría estar regulada a través del GF por factores humorales liberados como consecuencia de la alimentación (Ayali et al., 2002). En adición, los movimientos del canal alimentario en grillos están influenciados por la presencia de alimento en dicho canal, mediado tanto por factores humorales como nerviosos (Cooper y He, 1994). Considerando las

evidencias que muestran que en algunos insectos se produce liberación de 5-HT a hemolinfa luego de la ingestión (Lange et al., 1988; 1989; Orchard et al., 1988; Siju et al., 2008; Dacks et al., 2008), esta amina podría ser un componente clave de este factor humoral, el que podría actuar periféricamente sobre el canal alimentario. Alternativamente, algún tipo de retroalimentación desde la parte posterior del estomodeo, la cual está inervada por procesos serotoninérgicos, podría influenciar las contracciones de la bomba. Este tipo de mecanismos de control sobre los músculos del canal alimentario han sido previamente propuestos para grillos, en los que la experimentación utilizando estomodeo aislado demostró un incremento en la actividad espontánea de este tejido cuando permanece conectado al mesenterón y proctodeo (Cooper y He, 1994). Estos resultados apoyan la existencia de este tipo de mecanismo de retroalimentación.

Existe evidencia que sugiere que la 5-HT juega un rol importante en las señales de saciedad tanto en vertebrados como en invertebrados. En vertebrados, la distensión gástrica induce la liberación de 5-HT (Yu et al., 2001, Mazda et al., 2004). Esta amina está involucrada en los procesos que llevan a la saciedad junto con otros factores humorales, entre ellos, la colecitoquinina gástrica (CCK). Ambas sustancias reducen la ingestión de alimento de manera independiente pero se ha demostrado que interactúan de manera sinérgica para inhibir el comportamiento de ingestión (Hayes and Covasa; 2005; Hayes et al., 2006). En insectos, se han reportado cambios asociados con eventos alimentarios en los niveles de 5-HT en hemolinfa o en diferentes aéreas neurales (Lange et al., 1988, 1989; Orchard et al., 1988; Siju et al., 2008; Dacks et al., 2008). Además, las señales de saciedad incluyen a la sulfaquinina, un neuropéptido considerado homólogo a la CCK de los vertebrados. En base a estas evidencias se ha sugerido que los mecanismos que involucran a estos péptidos regulatorios de la alimentación deben estar evolutivamente conservados entre insectos y vertebrados (Wei et al., 2000; Maestro et al., 2001; Downer et al., 2007).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL

9.1. CONCLUSIONES

- Un aumento en el ayuno de la colonia generó un aumento en la tasa de ingestión exclusivamente a través de variaciones en la frecuencia de bombeo. Por otro lado, a mayor concentración de sacarosa en la solución, menor fue el volumen de solución incorporado por cada bombeo y mayor la cantidad de bombeos totales realizados (Capítulo 3).
- La aceptación e ingestión de soluciones azucaradas con compuestos borados dependió del estado motivacional de las forrajeras y de la naturaleza del tóxico: el ácido bórico fue menos aceptado y consumido que la solución control en situaciones de baja motivación recolectora mientras que el borato de sodio (de igual efectividad tóxica que el ácido) fue aceptado y consumido aun en altas concentraciones y en condiciones de baja motivación recolectora (Capítulo 4).
- Hormigas forrajeras de colonias con menores reservas de carbohidratos mostraron umbrales de aceptación de sacarosa menores que las forrajeras de colonias con mayores niveles de reserva (Capítulo 5).
- La dinámica de ingestión y la actividad de la bomba de succión dependieron de la temperatura ambiental: a mayor temperatura, mayor frecuencia de bombeo. Sin embargo, en condiciones naturales, se registraron distintas frecuencias de bombeo en distintas épocas del año para una misma temperatura (Capítulo 6).
- La 5-HT tuvo un efecto inhibitorio sobre la ingestión de soluciones azucaradas. Su administración oral promovió una disminución dosis-dependiente de la cantidad de alimento ingerido y de la tasa de ingestión principalmente mediante una disminución en el volumen por bombeo (Capítulo 7).
- Los principales centros nerviosos que regulan el comportamiento alimentario mostraron poseer células serotoninérgicas en *C. mus*. Además, el esófago, el buche y

el proventrículo presentan procesos serotoninérgicos mientras que el resto del tubo digestivo carece de ellos (Capítulo 8).

9.2. DISCUSIÓN GENERAL

Las condiciones ambientales fluctúan regularmente e impactan profundamente sobre distintos aspectos relacionados con la obtención de alimentos en una sociedad de insectos. En lo referente al entorno, la disponibilidad de recursos varía junto a distintos factores abióticos como la temperatura, humedad, condiciones lumínicas, etc. Estos cambios a su vez afectan las reservas de alimento, la estructura y organización social de la colonia (Sudd y Sudd, 1985; Porter, 1988; Porter y Tschinkel, 1993; Dussutour y Simpson, 2008; Mailleux et al., 2011). Su éxito ecológico depende entonces de la habilidad de ajustar las estrategias de forrajeo a estos cambios. Las forrajeras deben integrar la información relacionada con las condiciones ambientales y las necesidades de la colonia para optimizar las decisiones que toman durante la búsqueda y recolección de alimento (Detrain y Deneubourg, 2002; Hölldobler y Wilson, 2008).

A lo largo de esta tesis estudiamos cómo distintos factores modulan el comportamiento alimentario en las hormigas nectívoras de la especie *C. mus*. Nos focalizamos en los umbrales de respuesta de las obreras forrajeras y en los mecanismos fisiológicos que subyacen a este comportamiento. Si bien nuestras aproximaciones tomaron en cuenta aspectos relacionados con las respuestas a nivel individual, estas son las bases de las cuales emerge la compleja organización de las tareas colectivas en insectos sociales (Seeley, 1989; Hölldobler y Wilson, 2008).

9.2.1. Modulación del comportamiento alimentario

En este trabajo mostramos que tanto el ayuno de la colonia, los niveles de aminas biogénicas (ambos factores internos), como las características de la fuente de alimento (concentración de sacarosa, presencia de compuestos tóxicos) y la temperatura ambiental (factores externos) son moduladores de las respuestas individuales de las hormigas *C. mus* durante la ingestión de soluciones azucaradas. La recolección de néctar es un proceso complejo e integral que se divide en

diferentes fases secuenciales. A lo largo de esta tesis hemos presentado resultados que guardan relación con tres fases en particular: 1) inicio de la recolección, 2) evaluación del néctar y 3) ingestión. La figura 9.1A representa cómo los distintos factores estudiados se integran influyendo en dichas fases de la recolección.

9.2.1.1. Inicio de la recolección

Si bien nuestros estudios no se focalizaron sobre esta fase en particular, reviste de interés considerarla al discutir alguno de los factores que hemos analizado. Por un lado, el ayuno de la colonia es uno de los principales disparadores de las actividades relacionadas con la recolección de alimento (Howard y Tschinkel, 1980; Cassill y Tschinkel, 1999a, b; Mailleux et al., 2006). Por otro lado, las condiciones ambientales también influyen profundamente en esta decisión. Las hormigas acotan su actividad, al menos en parte, a rangos definidos (especie-específicos) de temperatura y humedad (Holldobler y Wilson, 1990, Cerdá et al., 1998; Pol y Lopez de Casenave, 2004; Bucy y Breed, 2006; Azcárate et al., 2007; Cole et al., 2010). De nuestros resultados surge que *C. mus* mostró una ausencia total de actividad de forrajeo con temperaturas inferiores a los 12 °C y superiores a los 38 °C (Capítulo 6). Desde un punto de vista fisiológico, las temperaturas extremas afectan el control muscular y la supervivencia de los individuos (Cerdá et al. 1998; Lighton y Turner 2004). Experimentos preliminares realizados en el laboratorio mostraron que las hormigas *C. mus* quedaban prácticamente inmóviles al exponerse a temperaturas de 12 °C (obs. pers.). Desde un punto de vista ecológico, la temperatura afecta la disponibilidad de alimento: las fuentes de néctar modifican su tasa de secreción (; Núñez, 1977; Robacker et al., 1983; Jakobsen y Kristjánsson, 1994) y su concentración (por evaporación) de acuerdo a la temperatura, pudiendo incluso aumentar su viscosidad hasta alcanzar valores sub-óptimos para la ingestión (Kingsolver y Daniel, 1979; Heyneman, 1983; Harder, 1986; Josens et al., 1998).

La temperatura puede también afectar la estabilidad e intensidad de señales y claves informacionales que guían a las hormigas en la búsqueda de fuentes de alimento. Las forrajeras de *Camponotus* siguen los rastros de feromonas de caminos, del mismo modo que son capaces de usar claves olfativas asociadas a las fuentes para encontrar el alimento (Dupuy et al., 2006; Provecho y Josens, 2009; Josens et al., 2009). Tanto la persistencia de los rastros feromonales (van Oudenhove et al., 2011) como la emanación de olores florales (Robacker et al., 1983) se ven afectados por la

temperatura. Esto podría impactar directamente en la información que una recolectora dispone para guiar su camino hacia la fuente.

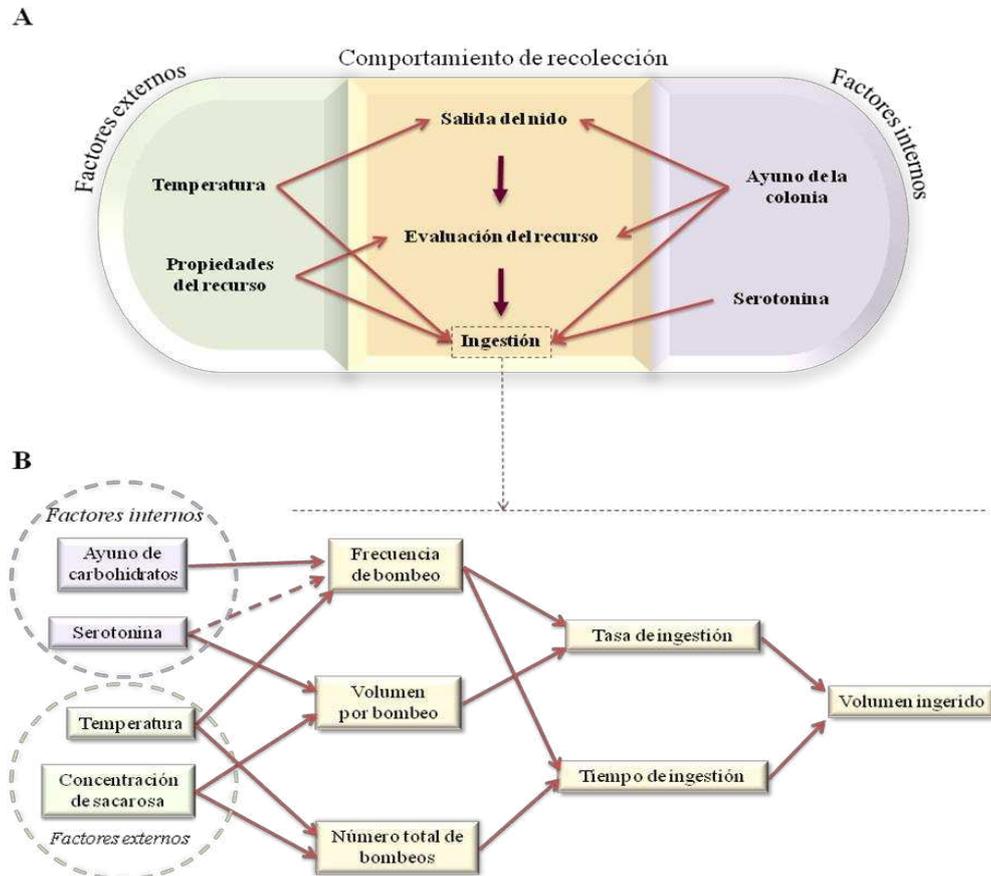


Figura 9.1. Diagrama propuesto para explicar el comportamiento de ingestión en hormigas recolectoras de *C. mus*. Influencia de factores externos e internos sobre (A) el comportamiento recolector desde el inicio del forrajeo hasta la ingestión de la solución azucarada y (B) la actividad de la bomba de succión.

9.2.1.2. Evaluación del recurso

Al encontrar una fuente de alimento, la evaluación que la forrajera realiza sobre el recurso es crucial para aceptarlo o rechazarlo y esta decisión determinará la calidad del alimento que ingresa al nido. La evaluación del recurso no solo depende de sus propiedades intrínsecas (como su concentración) sino también de factores ajenos a la fuente de alimento. Los experimentos que realizamos bajo condiciones ambientales controladas mostraron una tendencia a disminuir la aceptación de

solución de sacarosa a bajas temperaturas (Capítulo 6). Estas observaciones sugieren, tal como se ha observado en moscas (Dethier y Arab, 1958; Napolitano et al., 1986), que la percepción de sustancias azucaradas en hormigas también podría verse afectada por la temperatura. Evaluar el efecto de esta variable sobre la percepción gustativa en hormigas (utilizando el protocolo de UAS) permitiría entender mejor la importancia que reviste este factor durante las tomas de decisiones en la recolección de alimentos.

Al margen de los efectos moduladores que puedan tener las condiciones ambientales, los niveles motivacionales de la recolectora juegan un rol fundamental en la evaluación del recurso. El nivel de reservas de azúcares en la colonia modificó los umbrales de aceptación de sacarosa en *C. mus* (Capítulo 5). Hormigas con mayor ayuno mostraron umbrales más bajos. Se han reportado cambios en esa misma dirección en la sensibilidad gustativa de otros insectos sociales y no sociales con el nivel de ayuno individual (Sudlow et al., 1987; Page et al., 1998). Esto muestra que cuando las necesidades nutricionales de una colonia de hormigas son altas, las obreras aceptan y transportan al nido alimento de calidad relativamente baja, que no sería aceptado bajo otras condiciones (con altos niveles de reservas). Más aun, las demandas de la colonia pueden incluso promover la incorporación de alimentos de baja palatabilidad o incluso hasta nocivos. En este sentido hemos observado que la oferta de una solución azucarada que contiene un tóxico es rechazada bajo condiciones de saciedad pero ampliamente aceptada cuando la colonia está bajo condiciones de ayuno más rigurosas (Capítulo 4).

9.2.1.3. Ingestión de soluciones azucaradas.

El comportamiento de ingestión en *C. mus* podría explicarse como el resultado de la interacción entre estímulos internos y externos que afectan diferencialmente distintas características del accionar de la bomba de succión (Fig. 9.1B). Por un lado, el estado interno o fisiológico del animal, el cual se ve afectado por los requerimientos de azúcares de la colonia, determinaría la frecuencia de bombeo. Por otro lado, la concentración de azúcares no afecta a la frecuencia de bombeo pero determinaría el volumen incorporado por bombeo (producto de la viscosidad) y la cantidad de bombeos totales realizados durante la ingestión. A su vez, la frecuencia de bombeo junto con el número de bombeos totales realizados determinan un rango de tiempo acotado para la ingesta (Capítulo 3). El número de

contracciones incrementaría exponencialmente con la concentración de la solución ingerida, tal como ocurre con el tiempo de ingestión (Josens et al., 1998). Entonces, bajo condiciones constantes de ayuno, la relación entre el tiempo de ingestión y el número de bombeos totales es directa. Por su parte, el volumen total ingerido de una solución determinada será claramente la resultante de la integración de la tasa y el tiempo de ingestión, es decir, de cuán rápido y durante cuánto tiempo se ingiera esa solución. La modulación de estas variables en función del ayuno de la colonia y la riqueza de la fuente permitirían entonces cargar más alimento en igual tiempo o regresar al nido con mayor rapidez sin disminuir la carga. En el marco de la hipótesis informacional propuesta por Núñez y colaboradores (Núñez, 1982; Roces y Núñez, 1993) esto admitiría mantener o incrementar el intercambio de información en la colonia sin pagar este aumento con una disminución en la carga de alimento transportado.

La temperatura ambiental, por su parte, produjo marcados cambios en la actividad de los músculos de la bomba de succión, una característica común en otros músculos de insectos (Bennett, 1985; Neville y Weis-Fogh, 1963; Stevenson y Josephson, 1990; Heinrich, 1993). Tanto en experimentos a campo como en el laboratorio hemos visto que la frecuencia de bombeo aumentó con la temperatura ambiental, acelerando así la velocidad de ingestión (Capítulo 6). Esto acortó el tiempo de permanencia en la fuente de alimento, tal como había sido observado en *Lasius fuliginosus* (Bonser et al., 2008). Sin embargo, hemos observado que, aun a una misma temperatura, hormigas *C. mus* en su ambiente natural ingirieron una solución azucarada con distintas frecuencias de bombeo en distintas épocas del año. Esto evidenció posibles variaciones en las condiciones de la colonia (tamaño, presencia de cría, reservas y disponibilidad de recursos, etc.). Es esperable que estos cambios en la composición de la colonia puedan modular el comportamiento durante la recolección (Howard y Tschinkel, 1980; Dussutour y Simpson, 2008). Por otro lado, ya hemos visto que la disponibilidad de azúcares en una colonia es uno de los principales factores moduladores de la frecuencia de bombeo en hormigas *C. mus* (Falibene y Josens, 2008; Capítulo 3) y del umbral de aceptación de sacarosa (Capítulo 5). Por lo cual, la detección de diferentes frecuencias de bombeo a igual temperatura en condiciones naturales reflejarían distintas condiciones internas o estados motivacionales de las recolectoras en distintos momentos del año. Creemos que tanto este parámetro como el umbral de aceptación de azúcar podrían ser buenos

indicadores de la disponibilidad de los recursos en un ambiente natural (Kay 2002, 2004). Ambos parámetros pueden dar cuenta del complejo balance que determina el nivel de la motivación por recolectar alimentos.

En un ambiente que cambia constantemente, los animales deben poder tomar decisiones rápidas en base a parámetros simples. Detrain y Deneubourg (2002) han desarrollado el concepto de “criterio de decisión inteligente” para explicar cómo los insectos sociales responden adaptativamente a ambientes complejos. Estos autores proponen que durante el forrajeo las obreras utilizan claves que evolutivamente han estado asociadas a determinadas condiciones; claves que en el transcurso del tiempo han permanecido como relevantes, confiables y con contenido informativo funcional. Entonces, en lugar de evaluar todos los parámetros ambientales, las forrajeras dependen de aquellos que automáticamente integran muchas variables (dentro o fuera del nido). En este contexto, incluso factores abióticos pueden contribuir directamente en la toma de decisiones de una colonia de hormigas.

9.2.2. Regulación del comportamiento alimentario

Si consideramos los factores internos como moduladores de diferentes conductas en insectos, el balance de aminas biogénicas promueve distintos estados internos. En este sentido, indagando sobre los mecanismos que gobiernan el comportamiento alimentario, estudiamos los efectos de la serotonina (5-HT) sobre la actividad de la bomba de succión. Esta amina, actuando sobre el volumen de solución incorporado por cada bombeo, promovió una disminución de la tasa de ingestión y la cantidad total de alimento ingerido. Incluso, cuando fue administrada de manera crónica, también influyó sobre la frecuencia de bombeo (Capítulo 7).

El rol de la 5-HT en la alimentación en insectos todavía no ha sido completamente comprendido. Muchos estudios han vinculado a esta amina con umbrales de percepción de azúcar, procesos de ingestión y actividad de los músculos viscerales (ver ejemplos mencionados en capítulos 7 y 8). En la hormiga *C. mus* hemos demostrado que la 5-HT i) juega un papel importante en la modulación de la actividad de la bomba de succión, ii) está claramente presente en distintas áreas del tubo digestivo y muy especialmente en el proventrículo, que es una estructura clave

en la regulación del balance entre el consumo de alimento social e individual y iii) está presente en células de los centros nerviosos que están involucrados en el control de la alimentación (ganglios subesofágico y frontal). La ausencia de procesos inmunorreactivos a 5-HT en los músculos de la bomba de succión sugiere que no existen inervaciones serotoninérgicas directas desde el ganglio frontal hacia esta estructura (Capítulo 7 y 8). Esto lleva a pensar que, tal como se ha propuesto para otros insectos, la 5-HT podría actuar como un neuromodulador liberado a la hemolinfa circulante o en aéreas neurohemales más restringidas (Lange et al., 1988, 1989; Orchard et al., 1988; Ayali, 2004).

Estudios realizados en otros insectos han aportado evidencia en favor de considerar a la 5-HT como un factor relacionado con la saciedad (ver discusión Capítulo 7). Algunos de los resultados presentados en esta tesis sugieren que una relación similar podría tener lugar en hormigas: la administración de 5-HT a hormigas ayunadas disminuyó su tasa de ingestión, proceso que también ocurre cuando hormigas previamente ayunadas son saciadas de carbohidratos (Josens y Roces, 2000; Capítulo 3). Sin embargo, en contraposición a los efectos causados por una única dosis de 5-HT, la modulación del ayuno se manifiesta en variaciones en la frecuencia de bombeo y no en el volumen de solución incorporado por cada contracción de la bomba (Falibene y Josens, 2008; Capítulo 3). Fue necesario someter a los individuos a una ingesta crónica de 5-HT para observar una disminución significativa de la frecuencia de bombeo (Capítulo 7).

A diferencia de los insectos solitarios, que pueden alcanzar la saciedad con una sola ingesta, una colonia de insectos sociales alcanza la saciedad recién cuando todos los individuos de la colonia (larvas, reinas y obreras) han cubierto sus necesidades nutricionales. Luego de un periodo de ayuno, una colonia de hormigas requiere de un tiempo considerable para revertir dicha situación. Por ejemplo, las larvas de *Solenopsis invicta* necesitan 8 horas de alimentación ad libitum para alcanzar la saciedad (Cassill y Tschinkel, 1995). Las obreras forrajeras de *C. mus* demoran entre 2 y 3 días en mostrar signos de saciedad, mediante una reducción en la aceptación de solución de sacarosa (Josens y Roces, 2000) o un decremento en la frecuencia de bombeo durante la ingestión (obs. pers). Esto sugiere que se necesita de varios días de una entrada de alimento a la colonia para que se disparen los procesos fisiológicos que señalizan un estado interno de saciedad. Esto puede

guardar alguna relación con las diferencias que encontramos entre una administración única y crónica de 5-HT.

En insectos sociales, gran parte de la información sobre las necesidades de la colonia se transfiere mediante interacciones entre los miembros de la colonia. Pero, ¿cuáles son los mecanismos fisiológicos que median entre las interacciones sociales y los cambios comportamentales en las recolectoras? En los últimos años varios trabajos han mostrado la relación funcional existente entre feromonas, aminas biogénicas y la modulación del comportamiento. Por ejemplo, la presencia de la reina o de la feromona real modifica los niveles de aminas biogénicas (octopamina y dopamina) en el cerebro de abejas y hormigas (Beggs et al., 2007; Vander Meer et al., 2008); a su vez, las mismas aminas están implicadas en la ocurrencia de trofalaxia e intercambio de hidrocarburos entre obreras, división del trabajo, actividad forrajera y umbrales de respuesta al azúcar (Pankiw et al., 1998; Boulay et al., 2000; Schulz y Robinson 2001; Barron et al., 2002; Scheiner et al., 2002; Beggs et al., 2007). A partir de evidenciar estos cambios en los niveles de octopamina y dopamina en el cerebro es posible pensar que las interacciones producidas entre los miembros de la colonia podrían modificar también los niveles de 5-HT y así afectar el comportamientos de ingestión de las hormigas forrajeras.

9.3. IMPLICANCIAS

Existen diferentes modelos sobre la ingestión de néctar en insectos que se focalizan en la dinámica de ingestión. Dichos modelos consideran variables relacionadas con las propiedades de la fuente de alimento y las características morfológicas del insecto. De esta tesis surge la necesidad de considerar también parámetros que reflejen la motivación del individuo, que en el caso de insectos sociales está íntimamente ligado al estado de la colonia en general.

Por otro lado, tal como ha sido el caso de las abejas melíferas, muchos aspectos relacionados con la organización de la colonia en hormigas podrán ser estudiados a partir del desarrollo del protocolo de medición de umbral de aceptación de sacarosa. A diferencia de las abejas, las hormigas no son un modelo universal y generalmente no se disponen de protocolos unificados. Hemos desarrollado un protocolo para ser utilizado en diferentes especies, lo cual abre un universo de

estudio en hormigas hasta hoy poco explorado desde esta perspectiva. Determinar dicho umbral de percepción de sacarosa en forma controlada a nivel individual y su relación con las características y experiencias previas del individuo así como también el rol del mismo en la estructura social, la organización del grupo, patrones de interacción y relaciones con otros miembros de la colonia permitirá comprender cómo se articula el comportamiento individual con la organización de tareas grupales en una sociedad de insectos.

Profundizar en los mecanismos involucrados en la toma de decisiones nos permitirá una mayor comprensión de las estrategias de recolección de los insectos sociales. Esto resulta indispensable para mejorar el manejo de estos insectos, tanto cuando resultan benéficos como perjudiciales para las actividades humanas. Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis pueden ser utilizados para maximizar la eficacia en la administración de tóxicos en hormigas neotrópicas utilizando a las soluciones azucaradas como vehículo. La motivación recolectora de las obreras forrajeras, y por lo tanto la aceptación y recolección de cebos, es dependiente de diversos factores que fluctúan constantemente. Cuando la oferta de fuentes naturales es alta, la aceptación de cebos tóxicos puede verse disminuida, reduciendo así la eficiencia del tratamiento de control. Entonces, bajo condiciones fluctuantes es necesario distinguir cuándo la motivación recolectora se encuentra en altos niveles para así garantizar una mayor aceptación e ingestión del tóxico. En el control químico a nivel domiciliario, es posible medir la motivación recolectora indirectamente mediante una evaluación rápida de las respuestas comportamentales de las forrajeras (por ejemplo, evaluando umbrales de aceptación o aceptación de una solución muy diluida). Por otro lado, si se trata de combatir a la hormiga *C. mus*, sería recomendable utilizar la sal borato de sodio y no el ácido bórico, mientras que para otras especies domiciliarias podría ser lo contrario.

De nuestros resultados surgen además nuevas hipótesis que llevarán a estudios complementarios que apunten a la manipulación de la motivación recolectora. Considerando la serotonina como un depresor de la ingestión, es factible pensar que la administración oral de antagonistas de esta amina pueda provocar un incremento en la motivación recolectora, aumentando así la ingestión de cebos azucarados. En el mismo sentido, en el Grupo de Estudio de Insectos Sociales actualmente se están desarrollando con éxito estudios valiéndose de memorias olfativas para aumentar la aceptación de cebos tóxicos. En conjunto, nuestros

estudios podrán contribuir a mejorar la administración de tóxicos con un protocolo sencillo que garantice mayor aceptación, mayor reclutamiento y una amplia distribución del mismo dentro de los miembros de la colonia; en otras palabras, lograr con éxito el control de nidos domiciliarios.

UMBRAL DE ACEPTACIÓN DE AZÚCAR EN HORMIGAS DE DISTINTAS ESPECIES

Con el objetivo de validar el protocolo utilizado en *C. mus* presentado en el capítulo 5 y extenderlo hacia otras especies de hormigas de distintos hábitos alimentarios, llevamos a cabo los siguientes ensayos: en primer lugar se evaluó la respuesta ante la estimulación con sacarosa en antenas y palpos en 7 especies distintas de hormigas silvestres. En segundo lugar, se realizaron ensayos de medición y comparación del UAS en 4 especies de hormigas silvestres, incluyendo *C. mus*.

A.1. MATERIALES Y MÉTODOS

A.1.1. Respuesta a la estimulación en palpos y antenas en distintas especies

Hormigas de 7 especies distintas fueron capturadas en el predio de Ciudad Universitaria y sus alrededores (34° 32' S, 58° 26' O), Buenos Aires, Argentina: *Acromyrmex lundi*, *Cephalotes jheringi*, *Crematogaster* sp., *Solenopsis richteri* (Myrmicinae), *Camponotus punctulatus* (Formicinae), *L. humile* (Dolichoderinae) y *Pseudomyrmex* sp. (Pseudomyrmecinae). Cada especie se mantuvo en subnidos separados con libre acceso a agua en el laboratorio durante 1 ó 2 días para que se aclimaten. El día de la evaluación, las hormigas fueron anestesiadas y encepadas como se describió en materiales y métodos del capítulo 5. Para el encepado de los individuos se utilizaron tips de micropipeta de dos tamaños diferentes: tips de 10–100 µl para las especies más grandes y 0.1–10 µl para las más pequeñas. El resto del procedimiento y análisis de los datos fue realizado tal como se describió en materiales y métodos del capítulo correspondiente (sección 5.2).

A.1.2. UAS para distintas especies

Se evaluó el UAS en hormigas silvestres de 4 especies distintas: *C. mus*, *L. humile*, *C. jheringi* y *A. lundi*. El sitio de estimulación para llevar a cabo este análisis dependió de las respuestas observadas en cada especie. En aquellas especies que

mostraron una mayor proporción de respuesta ante la estimulación en antenas, el UAS fue medido estimulando en antenas. Por el contrario, para las especies que respondieron en mayor proporción a palpos se utilizó esta última estimulación. De esta forma, antenas o palpos de las hormigas encephadas se tocaron con un palillo de madera embebido en solución de sacarosa en concentraciones crecientes, tal como se explicó en el capítulo 5.

En todos los casos la respuesta fue considerada positiva cuando las hormigas lamieron después de contactar la solución y negativa cuando no presentaron este comportamiento. Este último caso incluyó (i) hormigas que no expusieron el complejo labiomaxilar y (ii) aquellas que tenían el complejo expuesto previo a la estimulación pero lo retractaron luego de tocar el palillo embebido. En el caso de las hormigas estimuladas en palpos, cuando la estimulación provocó la extensión del complejo, se contactó el mismo con solución azucarada; nuevamente, la respuesta fue considerada positiva cuando las hormigas lamieron después de contactar la solución y negativa cuando retractaron el complejo luego de tocar el palillo embebido.

Todas las hormigas fueron estimuladas con concentraciones crecientes de azúcar hasta que presentaron la primera respuesta positiva. Luego, fueron apartadas del grupo. La mínima concentración de azúcar que provocó una respuesta positiva en cada hormiga fue considerada como su UAS que es un indicador del nivel de respuesta al azúcar.

A.2. RESULTADOS

A.2.1. Respuesta a la estimulación de palpos o antenas en distintas especies

La respuesta a la estimulación con azúcar en antenas y palpos varió ampliamente entre especies (Tabla A.1). Mientras que *A. lundii* y *Crematogaster* sp. respondieron en mayor proporción a la estimulación en antenas, *L. humile* y *Pseudomyrmex* sp. mostraron mayor proporción de respuesta al ser estimuladas en palpos. Por otro lado, *C. punctulatus* y *C. jheringi* no mostraron diferencias significativas entre ambos sitios de estimulaciones.

Algunas especies mostraron un incremento en la respuesta ante la estimulación en antenas al ser previamente estimuladas en sus palpos (Tabla A.1).

Pseudomyrmex sp., del mismo modo que se observó en *C. mus*, tuvo una respuesta inicial a la estimulación en antenas de 0.2 (grupo antena/palpo), que se incrementó a 0.56 en las hormigas del grupo palpo/antena.

Tabla A.1. Evaluación de la respuesta de lengüeteo después de una estimulación en antenas y palpos.

Especie	Prop. de respuesta (N)	Antena/palpo		Palpo/antena		antena* vs. palpo* (P)
		antena*	palpo	palpo*	antena	
Myrmicinae						
<i>Acromyrmex lundii</i>	0.37 (105)	0.95	0.05	0.11	0.89	<0.001
<i>Cephalotes jheringi</i>	0.31 (117)	0.75	0.69	0.70	0.65	0.26
<i>Crematogaster</i> sp.	0.49 (81)	0.76	0.43	0.35	0.95	0.004
<i>Solenopsis richteri</i> ^a	0.39 (36)	1	-	-	-	-
Formicinae						
<i>Camponotus mus</i> ^b	0.88 (58)	0.04	1	0.96	0.35	<0.001
<i>Camponotus punctulatus</i>	0.95 (20)	1	0.9	1	0.78	1
Doleichoderinae						
<i>Linepithema humile</i>	0.36 (109)	0.32	0.86	0.76	0.35	0.003
Pseudomyrmecinae						
<i>Pseudomyrmex</i> sp.	0.74 (38)	0.2	1	0.72	0.56	0.004

Para cada especie, las hormigas fueron encepadas y separadas en dos grupos equivalentes que fueron estimulados con solución de sacarosa 50%: uno de ellos primero fue estimulado en antenas y luego en palpos y el otro grupo recibió la estimulación en el orden contrario. La proporción de respuesta indica la proporción de hormigas que lamieron (respuesta positiva) en respuesta a alguna o ambas estimulaciones con respecto al total de hormigas encepadas (N). Considerando solo a aquellas hormigas que mostraron una respuesta positiva, la proporción de respuestas a la estimulación en antenas y palpos se muestra para cada grupo. P indica la comparación entre la primera estimulación de cada grupo: antena (grupo antena/palpo) y palpo (grupo palpo/antena) analizado mediante distribución de frecuencias.

^a Debido a su tamaño, comportamiento y la morfometría de sus piezas bucales, esta especie fue evaluada solo por estimulación en antenas.

^b Datos obtenidos en los experimentos detallados en el capítulo 5.

Se observó que algunos individuos mostraron una respuesta tipo MaLER en lugar de lamer al ser estimulados con solución azucarada. Es decir, mostraron una extensión del complejo, dejándolo inmóvil, al ser estimulados en antenas. Esto solo ocurrió en especies que respondieron más a la estimulación en palpos mientras que en las otras especies evaluadas este comportamiento no se observó en lo absoluto o se presentó en una proporción menor a 0.1. La estimulación en antenas provocó MaLER en el grupo antena/palpo en las siguientes proporciones: 0.04 en *A. lundi*, 0 en *C. punctulatus*, 0.07 en *C. jheringi*, 0.07 en *Crematogaster* sp., 0.39 para *L. humile*, 0.37 para *Pseudomyrmex* sp. y 0.08 en *S. richteri*, respecto al número total de hormigas encephadas.

A.2.2. UAS para distintas especies

UAS fue evaluado en hormigas silvestres de 4 especies distintas y con distintos hábitos alimentarios, incluyendo *C. mus*. Basándose en los resultados de los experimentos previos, usamos estimulación en palpos para las hormigas de la especie *C. mus* y *L. humile* y estimulación en antenas para *A. lundi* (Fig.A.1). Considerando que *C. jheringi* no mostró diferencias entre los dos sitios de estimulación, decidimos realizar la evaluación del UAS mediante estimulación en antenas para esta especie. Durante la evaluación el porcentaje de respuestas (respecto al total de individuos encephados) también varió notablemente entre los grupos: *A. lundi* 69% (N = 29), *C. jheringi* 39% (N = 47), *C. mus* 75% (N = 24) y *L. humile* 69% (N = 32). Todas las especies mostraron una distribución unimodal de respuestas (Fig. A.1) en donde las medianas coincidieron con las modas en todos los casos (*C. mus*: 10%; *L. humile*: 30%; *C. jheringi*: 3%; *A. lundi*: 30% w/w). Al comparar entre especies encontramos que el puntaje UAS varió significativamente ($H_{3, N = 78} = 14.2$, $p = 0.003$, Kruskal–Wallis). El sitio de estimulación (antena o palpo) parece no guardar relación con el puntaje obtenido ya que *L. humile* recibió estimulación en los palpos y *A. lundi* en las antenas y ambas especies tuvieron el mismo puntaje ($p > 0.5$, Comparaciones de Dunn); por otro lado, *C. jheringi* y *A. lundi* recibieron ambos estimulación en antenas mostrando distintos UAS ($p < 0.02$, comparaciones de Dunn). *L. humile* y *C. jheringi* también mostraron diferencias ($p < 0.05$, comparaciones de Dunn), mientras que el resto de las comparaciones no mostraron diferencias significativas.

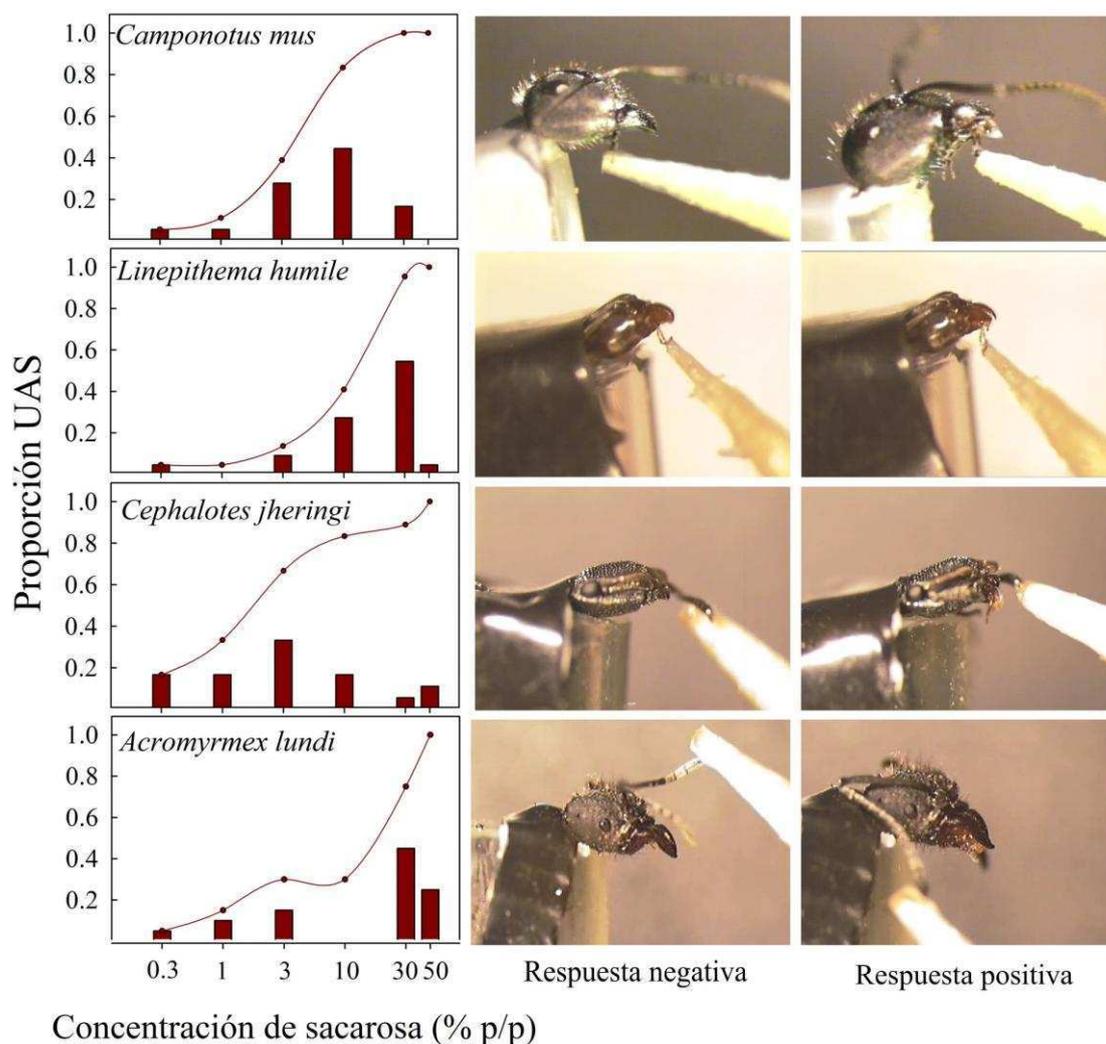


Figura A.1. Evaluación del UAS en hormigas de distintas especies. (A) *C. mus* y (B) *L. humile* fueron estimuladas en los palpos mientras que (C) *Cephalotes jheringi* y (D) *Acromyrmex lundii* fueron estimuladas en antenas. Fotos de la izquierda: individuos con las piezas bucales retraídas al ser estimuladas con una solución de sacarosa de una concentración por debajo del umbral de aceptación. Fotos de la derecha: individuos lamiendo al ser estimulados con la solución de sacarosa que corresponde a su umbral de aceptación (respuesta positiva). Los gráficos muestran la distribución del UAS en estas hormigas capturadas en el campo. UAS se midió como la menor concentración de sacarosa en solución que provocó la respuesta de lamer en las hormigas encephadas. Las barras indican la proporción de respuestas positivas en cada una de las distintas concentraciones (escala logarítmica); las líneas indican la proporción de respuesta acumulada.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA FRECUENCIA DE BOMBEO EN
FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA**

Tablas de resultados del análisis de regresión con variables auxiliares (ver Balzarini et al., 2008)

El análisis fue realizado definiendo las siguientes variables:

Variable dependiente: frecuencia de bombeo

Variable regresora: temperatura

Variable de clasificación (variables auxiliares): día de registro: 7 niveles

Nivel de referencia: febrero de 2010

Ecuación de la frecuencia de bombeo

$$\text{Frecuencia de bombeo} = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 D_1 + \beta_8 D_1 * T + \beta_3 D_2 + \beta_9 D_2 * T + \beta_4 D_3 + \beta_{10} D_3 * T + \beta_5 D_4 + \beta_{11} D_4 * T + \beta_6 D_5 + \beta_{12} D_5 * T + \beta_7 D_6 + \beta_{13} D_6 * T + \varepsilon$$

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Frec	337	0.91	0.9	0.3	534.83	592.13

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

	Coef	Est.(β)	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
β ₀	const	-1.82	0.83	-3.45	-0.18	-2.19	0.0295	
β ₁	Temp	0.29	0.03	0.23	0.36	9.42	<0.0001	101.43
β ₂	Sep09	2.83	1.33	0.21	5.46	2.13	0.0343	17.51
β ₃	Oct09	0.53	1.13	-1.7	2.76	0.47	0.6411	13.22
β ₄	Nov09	1.96	1.21	-0.43	4.34	1.61	0.1078	15.6
β ₅	Ene10	8.52	1.25	6.06	10.98	6.82	<0.0001	59.38
β ₆	Mar10	2.05	1.58	-1.05	5.15	1.3	0.1932	14.7
β ₇	Nov10	1.95	1.06	-0.13	4.04	1.84	0.0665	16.38
β ₈	Sep09*Temp	-0.25	0.07	-0.39	-0.11	-3.49	0.0005	25.16
β ₉	Oct09*Temp	-0.03	0.05	-0.13	0.07	-0.65	0.5163	13.42
β ₁₀	Nov09*Temp	-0.08	0.05	-0.17	0.02	-1.62	0.1072	15.6
β ₁₁	Ene10*Temp	-0.26	0.04	-0.35	-0.18	-6.11	<0.0001	50.23
β ₁₂	Mar10*Temp	-0.1	0.06	-0.21	0.02	-1.67	0.0952	15.79
β ₁₃	Nov10*Temp	-0.13	0.04	-0.21	-0.05	-3.09	0.0021	22.55

Frecuencia de bombeo = $-1.82 + 0.29T + 2.83D1 - 0.25D1*T + 0.53D2 - 0.03D2*T + 1.96D3 - 0.08D3*T + 8.52D4 - 0.26D4*T + 2.05D5 - 0.1D5*T + 1.95D6 - 0.13D6*T$

La ecuación de ajuste resultante para cada fecha se encuentra en la tabla 4.1.

Ecuación de ajuste a la recta

$$a = \beta_0 + \beta(\text{fecha})$$

$$b = \beta_1 + \beta(\text{fecha*temp})$$

Frecuencia = $a + b*Temperatura$

Fecha	a	b
Sep 09	1.01	0.04
Oct 09	-1.29	0.26
Nov 09	0.14	0.21
Ene 10	6.7	0.03
Mar 10	0.23	0.19
Nov 10	0.13	0.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	859.7	13	66.13	242.03	< 0.0001
Temp	24.24	1	24.24	88.7	< 0.0001
Sep 09	1.23	1	1.23	4.52	0.0343
Oct 09	0.06	1	0.06	0.22	0.6411
Nov 09	0.71	1	0.71	2.6	0.1078
Ene 10	12.71	1	12.71	46.52	< 0.0001
Mar 10	0.46	1	0.46	1.7	0.1932
Nov 10	0.93	1	0.93	3.39	0.0665
Sep 09*Temp	3.33	1	3.33	12.19	0.0005
Oct 09*Temp	0.12	1	0.12	0.42	0.5163
Nov 09*Temp	0.71	1	0.71	2.61	0.1072
Ene 10*Temp	10.2	1	10.2	37.34	< 0.0001
Mar 10*Temp	0.77	1	0.77	2.8	0.0952
Nov 10*Temp	2.62	1	2.62	9.58	0.0021
Error	88.25	323	0.27		
Total	947.96	336			

BIBLIOGRAFÍA

- Ali D.W. (1997). The aminergic and peptidergic innervation of insect salivary glands. *Journal of Experimental Biology* 200: 1941-1949.
- Ali D.W. & Orchard I. (1996). Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in the ventral nerve cord of the stick insect, *Carausius morosus*, including neurons innervating the salivary glands. *Cell and Tissue Research* 285: 453-462.
- Anderson C. & McShea D.W. (2001). Individual versus social complexity, with particular reference to ant colonies. *Biological Reviews* 76: 211-237.
- Avery L. & Horvitz H.R. (1990). Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology* 253: 263-270.
- Awad E.W., Amiri M.H. & Stephen R.S. (1997). Developmental changes in biogenic amine levels in the central nervous system and the haemolymph of the eastern death's head hawk moth, *Acherontia styx* (Lepidoptera: Sphingidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 116: 219-225.
- Ayali A. (2004). The insect frontal ganglion and stomatogastric pattern generator networks. *Neurosignals* 13: 20-36.
- Ayali A. & Harris-Warrick R.M. (1999). Monoamine control of the pacemaker kernel and cycle frequency in the lobster pyloric network. *Journal of Neuroscience* 19: 6712-6722.
- Ayali A., Zilberstein Y. & Cohen N. (2002). The locust frontal ganglion: a central pattern generator network controlling foregut rhythmic motor patterns. *Journal of Experimental Biology* 205: 2825-2832.
- Azcárate F.M., Kovacs E. & Peco B. (2007). Microclimatic Conditions Regulate Surface Activity in Harvester Ants *Messor barbarus*. *Journal of Insect Behavior* 20: 315-329.
- Baker H.G. (1975). Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* 7: 37-41.
- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A. & Robledo C.W. (2008). *Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina. Regresión con variables auxiliares (dummies): 136-141.
- Banner S.E., Osborne R.H. & Cattell K.J. (1987a). The pharmacology of the isolated foregut of the locust *Schistocerca gregaria* - I. The effect of a range of putative neurotransmitters. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 88: 131-138.
- Banner S.E., Osborne R.H. & Cattell K.J. (1987b). The pharmacology of the isolated foregut of the locust *Schistocerca gregaria* - II. Characterization of a 5-HT₂-like receptor. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 88: 139-144.
- Barron A.B., Schulz D.J. & Robinson G.E. (2002). Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology A* 188: 603-610.

- Barron A.B. & Robinson G.E. (2005). Selective modulation of task performance by octopamine in honey bee (*Apis mellifera*) division of labour. *Journal of Comparative Physiology A* 191: 659-668.
- Barron A.B., Maleszka J., Vander Meer R.K., Robinson G.E. & Maleszka R. (2007). Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. *Journal of Insect Physiology* 53: 187-194.
- Beggs K.T., Glendinning K.A., Marechal N.M., Vergoz V., Nakamura I., Slessor K.N. & Mercer A.R. (2007). Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 2460-2464.
- Bennett A.F. (1985). Temperature and muscle. *Journal of Experimental Biology* 115: 333-344.
- Bicker G. & Menzel R. (1989). Chemical codes for the control of behaviour in arthropods. *Nature* 337: 33-39.
- Blatt J. & Roces F. (2001). Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *Journal of Experimental Biology* 204: 2709-2716.
- Blatt J. & Roces F. (2002a). The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) I. A dynamic process influenced by food quality and quantity? *Journal of Insect Physiology* 48: 643-654.
- Blatt J. & Roces F. (2002b). The control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.) II. Feedback mechanisms. *Journal of Insect Behavior* 48: 683-691.
- Blenau W. & Erber J. (1998). Behavioural pharmacology of dopamine, serotonin and putative aminergic ligands in the mushroom bodies of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research* 96: 115-124.
- Blenau W. & Baumann A. (2001). Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48: 13-38.
- Blüthgen N. & Feldhaar H. (2010). Food and Shelter: How Resources Influence Ant Ecology. En: *Ant Ecology*. Eds.: Lach L., Parr C.L. & Abbott K. Oxford University Press.
- Blüthgen N., Gottsberger G. & Fiedler K. (2004). Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. *Austral Ecology* 29: 418-429.
- Boevé J.L. & Wäckers F.L. (2003). Gustatory perception and metabolic utilization of sugars by *Myrmica rubra* ant workers. *Oecologia* 136: 508-514.
- Bollazzi M. & Roces F. (2011). Information needs at the beginning of foraging: grass-cutting ants trade off load size for a faster return to the nest. *PLoS ONE* 6(3): e17667. doi:10.1371/journal.pone.0017667.
- Bonser R., Wright P.J., Bament S. & Chukwu U.O. (1998). Optimal patch use by foraging workers of *Lasius fuliginosus*, *L. niger* and *Myrmica ruginodis*. *Ecological Entomology* 23: 15-21.
- Borrell B.J. (2006). Mechanics of nectar feeding in the orchid bee *Euglossa imperialis*: pressure, viscosity and flow. *Journal of Experimental Biology* 209: 4901-4907.
- Borrell B.J. (2007). Scaling of nectar foraging in orchid bees. *American Naturalist* 169: 569-580.

- Boulay R., Soroker V., Godzinska A., Hefetz A. & Lenoir A. (2000). Octopamine reverses the isolation-induced increase in trophallaxis in the carpenter ant *Camponotus fellah*. *Journal of Experimental Biology* 203: 513-520.
- Brookhart G.L., Edgecomb R.S. & Murdock L.L. (1987). Amphetamine and reserpine deplete brain biogenic amines and alter blow fly feeding behavior. *Journal of Neurochemistry* 48: 1307-1315.
- Bucy A.M. & Breed M.D. (2006). Thermoregulatory trade-offs result from vegetation removal by harvester ants. *Ecological Entomology* 31: 423-429.
- Cassill D.L. & Tschinkel W.R. (1995). Allocation of liquid food to larvae via trophallaxis in colonies of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Animal Behavior* 50: 801-814.
- Cassill D.L. & Tschinkel W.R. (1999a). Information flow during social feeding in ant societies. En: *Information processing in social insects*. Eds.: Detrain C., Deneubourg J.L., Pasteels J.M. Birkhäuser, Basel (Switzerland).
- Cassill D.L. & Tschinkel W.R. (1999b). Regulation of diet in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Behavior* 12: 307-328.
- Cassill D.L. & Tschinkel W.R. (2000). Behavioral and developmental homeostasis in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology* 46: 933-939.
- Cassill D.L., Stuy A. & Buck R. (1998). Emergent properties of food distribution among fire ant larvae. *Journal of Theoretical Biology* 195: 371-381.
- Cerdá X., Retana J. & Cros S. (1998). Critical thermal limits in Mediterranean ant species: trade-off between mortality risk and foraging performance. *Functional Ecology* 12: 45-55.
- Chapman A.D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world. Report for the Australian Biological Resources Study, 2nd ed. Canberra, Australia.
- Chapman R.F. (1998). *The Insects. Structure and Function*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Charnov E.L. (1976). Optimal foraging, the marginal value theorem. *Theoretical Population Biology* 9: 129-136.
- Cochran D.G. (1995). Toxic effects of boric acid on the German cockroach. *Experientia* 51: 561-563.
- Cohen R.W. (2001). Diet balancing in the cockroach *Rhyarobia madera*: does serotonin regulate this behavior? *Journal of Insect Behavior* 14: 99-111.
- Cole B.J., Smith A.A., Huber Z.J. & Wiernasz D.C. (2010). The structure of foraging activity in colonies of the harvester ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. *Behavioral Ecology* 22: 337-342.
- Cook B.J., Eraker J. & Anderson G.R. (1969). The effect of various biogenic amines on the activity of the foregut of the cockroach, *Blaberus giganteus*. *Journal of Insect Physiology* 15: 445-455.
- Cooper P.D. & He P.H. (1994). Control of foregut contraction in the black field cricket, *Teleogryllus commodus* Walker (Gryllidae, Orthoptera). *Journal Insect Physiology* 40: 475-481.
- Cosens D. & Toussaint N. (1986). The dynamic nature of the activities of the wood ant *Formica aquilona* foraging to static food resource within a laboratory habitat. *Physiological Entomology* 11: 383-395.

- Daane K.M., Sime K.R., Hogg B.N., Bianchi M.L., Cooper M.L., Rust M.K. & Klotz J.H. (2006). Effects of liquid insecticide baits on Argentine ants in California's coastal vineyards. *Crop Protection* 25: 592-603.
- Daane K.M., Cooper M.L., Sime K.R., Nelson, E.H., Battany M.C. & Rust, M.K. (2008). Testing baits to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) in vineyards. *Journal of Economic Entomology* 101: 699-709.
- Dacks A.M., Nickel T. & Mitchell B.K. (2003). An examination of serotonin and feeding in the flesh fly *Neobellieria bullata* (Sarcophagidae: Diptera). *Journal of Insect Behavior* 16: 1-21.
- Dacks A.M., Christensen T.A. & Hildebrand J.G. (2008). Modulation of olfactory information processing in the antennal lobe of *Manduca sexta* by serotonin. *Journal of Neurophysiology* 99: 2077-2085.
- Daniel T.L., Kingsolver J.G. & Meyhöfer E. (1989). Mechanical determinants of nectar-feeding energetics in butterflies: muscle mechanics, feeding geometry, and functional equivalence. *Oecologia* 79: 66-75.
- Davidson D.W. (1997). The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 153-181.
- Davidson D.W., Cook S.C. & Snelling R.R. (2004). Liquid-feeding performances of ants (Formicidae): ecological and evolutionary implications. *Oecologia* 139: 255-266.
- Davis N.T. (1985). Serotonin-immunoreactive visceral nerves and neurohemal system in the cockroach *Periplaneta americana* L. *Cell Tissue Research* 240: 593-600.
- Davis N.T. (1987). Neurosecretory neurons and their projections to the serotonin neurohemal system of the cockroach *Periplaneta americana* (L.), and identification of mandibular and maxillary motor neurons associated with this system. *Journal of Comparative Neurology* 259: 604-621.
- Davis N.T. & Hildebrand J.G. (2006). Neuroanatomy of the sucking pump of the moth, *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera). *Arthropod Structure and Development* 35: 15-33.
- DeGrandi-Hoffman G. & Hagler J. (2000). The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux* 47: 302-306.
- Delcomyn F. (1980). Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science* 210: 492-498.
- Dethier V.G. & Arab Y.M. (1958). Effect of temperature on the contact chemoreceptors of the blowfly. *Journal of Insect Physiology* 2:153-158.
- Detrain C. & Deneubourg J.L. (2002). Complexity of environment and parsimony of decision rules in insect societies. *Biological Bulletin* 202: 268-274.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. (2008). *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Downer K.E., Haselton A.T., Nachman R.J. & Stoffolano Jr J.G. (2007). Insect satiety: sulfakinin localization and the effect of drosulfakinin on protein and carbohydrate ingestion in the blow fly, *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Insect Physiology* 53: 106-112.
- Dupuy F., Sandoz J.C., Giurfa M. & Josens R. (2006). Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Animal Behaviour* 72: 1081-1091.

- Dussutour A. & Simpson S.J. (2008). Carbohydrate regulation in relation to colony growth in ants. *Journal of Experimental Biology* 211: 2224-2232.
- Duyck P.F., Rouse P., Ryckewaert P., Fabre F. & Quilici S. (2004). Influence of adding borax and modifying pH on effectiveness of food attractants for melon fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 1137-1141.
- Eastham L.E.S. & Eassa Y.E.E. (1955). The feeding mechanism of the butterfly *Pieris brassicae* L. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 239: 1-43.
- Edgecomb R.S. & Murdock L.L. (1992). Central projections of axons from taste hairs of the labellum and tarsi of the blowfly, *Phormia regina* Meigen. *Journal of Comparative Neurology* 315: 431-444.
- Edgecomb R.S., Murdock L.L., Smith A.B. & Stephen M.D. (1987). Regulation of tarsal taste threshold in the blowfly, *Phormia regina*. *Journal of Experimental Biology* 127: 79-94.
- Eisner T. & Wilson E.O. (1952). The morphology of the proventriculus of formicine ant. *Psyche* 59: 47-60.
- Evans P.D. (1985). Octopamine. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 11. Pergamon Press, Oxford: 499-529.
- Fail P.A., Chapin R.E., Price C.J. & Heindel J.J. (1998). General, reproductive, developmental, and endocrine toxicity of boronated compounds. *Reproductive Toxicology* 12: 1-18.
- Falibene A. & Josens R. (2008). Nectar intake rate is modulated by changes in sucking pump activity according to colony starvation in carpenter ants. *Journal of Comparative Physiology A* 194: 491-500.
- Field H.C., Evans W.E., Hartley R., Hansen L.D. & Klotz J.H. (2007). A survey of structural ant pests in the southwestern U.S.A. (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 49: 1-14.
- Fernández P. & Josens R. (2001). Tesis de Maestría: Grado de aceptación y carga de buche durante la recolección de cebos tóxicos en la hormiga *Camponotus mus*.
- Gillette R. (2006). Evolution and function in serotonergic systems. *Integrative and Comparative Biology* 46: 838-846.
- Grüter C., Acosta L.E. & Farina W.M. (2006). Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 707-715.
- Guarneri A.A., Diotaiuti L., Gontijo N.F., Gontijo A.F. & Pereira M.H. (2000). Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *Journal of Insect Physiology* 46: 1121-1127.
- Guarneri A.A., Diotaiuti L., Gontijo N.F., Gontijo A.F. & Pereira M.H. (2003). Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. *Acta Tropica* 87: 361-370.
- Guerrieri F. & D'Ettoire P. (2010) Associative learning in ants: Conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *Journal of Insect Physiology* 56: 88-92.

- Habes D., Morakchi S., Aribi N., Farine J.P. & Soltani N. (2006). Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84: 17-24.
- Hansen L.D. & Klotz J.H. (2005). *Carpenter ants of the United States and Canada*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca and London.
- Harder L.D. (1986). Effects of nectar concentration and flower depth on flower handling efficiency of bumble bees. *Oecologia* 69: 309-315.
- Haselton A.T., Downer K.E., Zylstra J. & Stoffolano Jr. J.G. (2009). Serotonin inhibits protein feeding in the blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *Journal of Insect Behavior* 22: 452-463.
- Hayes M.R. & Covasa M. (2005) CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT₃ receptors. *Peptides* 26: 2322-2330.
- Hayes M.R., Chory F.M., Gallagher C.A. & Covasa M. (2006). Serotonin type-3 receptors mediate cholecystokinin-induced satiation through gastric distension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291: R115-R123.
- Heinrich B. (1993). *The hot-blooded insects. Strategies and mechanisms of thermoregulation*. Springer-Verlag.
- Heyneman A.J. (1983). Optimal sugar concentration of foral nectars- dependence on nectar energy flux and pollinator foraging cost. *Oecologia* 60:198-213.
- Hölldobler B. & Wilson E.O. (1990). *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge.
- Hölldobler B. & Wilson E.O. (2008). *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. W.W. Norton & Co. Ltd., New York, USA.
- Hooper-Bui L.M. & Rust M.K. (2000). Oral toxicity of abamectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 858-864.
- Howard D.F. & Tschinkel W.R. (1980). The effect of colony size and starvation on food flow in the fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 7: 293-300.
- Huddart H. & Oldfield A.C. (1982). Spontaneous activity of foregut and hindgut visceral muscle of the locust, *Locusta migratoria*: II. The effects of biogenic amines. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 73: 303-311.
- Hurlbert A.H., Ballantyne IV F. & Powell S. (2008). Shaking a leg and hot to trot: the effects of body size and temperature on running speed in ants. *Ecological Entomology* 33: 144-154.
- Isabel G., Gourdoux L. & Moreau R. (2001). Changes of biogenic amine levels in haemolymph during diapausing and non-diapausing status in *Pieris brassicae* L. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128: 117-127.
- Jakobsen H.B. & Kristjánsson K. (1994). Influence of temperature and florent age on nectar secretion in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74: 327-334.
- Janet C. (1905). *Anatomie de la tete de Lasius niger*. Limoges, Imprimerie-libraire Ducourtieux et Gout, Paris.

- Jørgensen K., Kvello P., Almaas T.J. & Mustaparta H. (2006). Two closely located areas in the suboesophageal ganglion and the tritocerebrum receive projections of gustatory receptor neurons located on the antennae and the proboscis in the moth *Heliothis virescens*. *Journal of Comparative Neurology* 496: 121-134.
- Josens R.B. (2002). Nectar feeding and body size in the ant *Camponotus mus*. *Insectes Sociaux* 49: 326-330.
- Josens R. & Roces F. (2000). Foraging in the ant *Camponotus mus*: nectar-intake rate and crop filling depend on colony starvation. *Journal of Insect Physiology* 46: 1103-1110.
- Josens R. & Farina W.M. (2001). Nectar feeding by the hovering hawk moth *Macroglossum stellatarum*: intake rate as a function of viscosity and concentration of sucrose solutions. *Journal of Comparative Physiology A* 187: 661-665.
- Josens R., Farina W.M. & Roces F. (1998). Nectar feeding by the ant *Camponotus mus*: intake rate and crop filling as a function of sucrose concentration. *Journal of Insect Physiology* 44: 579-585.
- Josens R., Falibene A. & Gontijo A.F. (2006). Electrical signals during nectar sucking in the carpenter ant *Camponotus mus*. *Journal of Insect Physiology* 52: 1234-1242.
- Josens R., Eschbach C. & Giurfa M. (2009). Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *Journal of Experimental Biology* 212: 1904-1911.
- Kaufmann L., Schürmann F., Yiallourous M., Harrewijn P. & Kayser H. (2004). The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on a locust (*Locusta migratoria*) and an aphid (*Myzus persicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 138: 469-483.
- Kay A. (2002). Applying optimal foraging theory to assess nutrient availability ratios for ants. *Ecology* 83: 1935-1944.
- Kay A. (2004). The relative availabilities of complementary resources affect the feeding preferences of ant colonies. *Behavioral Ecology* 15: 63-70.
- Kingsolver J.G. & Daniel T.L. (1979). On the mechanics and energetics of nectar feeding in butterflies. *Journal of Theoretical Biology* 76, 167-179.
- Klemm N., Hustert R., Cantera R. & Nässel D.R. (1986). Neurons reactive to antibodies against serotonin in the stomatogastric nervous system and in the alimentary canal of locust and crickets (Orthoptera, Insecta). *Neuroscience* 17: 247-261.
- Klotz J.H., Vail K.M. & Williams D.F. (1997). Toxicity of a boric acid-sucrose water bait to *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 488-491.
- Klotz J.H., Greenberg L. & Venn E. (1998). Liquid boric acid bait for control of the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 91: 910-914.
- Klotz J.H., Greenberg L.E.S., Amrhein C. & Rust M.K. (2000). Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 1256-1258.
- Klowden M.J. (2002) *Physiological systems in insects*. Academic press. California-London.

- Knight R.L. & Rust M.K. (1990). Repellency and efficacy of insecticides against foraging workers in laboratory colonies of argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 83: 1402-1408.
- Kusnezov N. (1951). El género *Camponotus* en la Argentina (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Zoológica Lilloana* XII: 182-252.
- L'Hélias C.L., Callebert J., Beaudry P. & Launay J.M. (1995). N-acetyl transferase activity during the photoperiodic-dependent *Pieris brassicae* development. *Journal of Insect Physiology* 41: 827-835.
- Lange A.B., Orchard I. & Lloyd R.J. (1988). Immunohistochemical and electrochemical detection of serotonin in the nervous system of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology* 8: 187-201.
- Lange A.B., Orchard I. & Barrett F.M. (1989). Changes in haemolymph serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 35: 393-397.
- Lanza J., Vargo E.L., Pulim S. & Chang Y.Z. (1993). Preferences of the fire ants *Solenopsis invicta* and *S. geminata* (Hymenoptera: Formicidae) for amino acid and sugar components of extrafloral nectars. *Environmental Entomology* 22: 411-417.
- Lawton J.H. & Heads P.A. (1984). Bracken, ants and extrafloral nectaries. I. The components of the system. *Journal of Animal Ecology* 53: 995-1014.
- Lighton J.R.B. & Turner R.J. (2004). Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two sympatric desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. californicus*. *Journal of Experimental Biology* 207: 1903-1913.
- Long T.F. & Murdock L.L. (1983). Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 80: 4159-4163.
- Maestro J.L., Aguilar R., Pascual N., Valero M.L., Piulachs M.D., Andreu D., Navarro I. & Bellés X. (2001). Screening of antifeedant activity in brain extracts led to the identification of sulfakinin as a satiety promoter in the German cockroach. Are arthropod sulfakinins homologous to vertebrate gastrins-cholecystokinins? *European Journal of Biochemistry* 268: 5824-5830.
- Mailleux A.C., Deneubourg J. L. & Detrain C. (2000). How do ants assess food volume? *Animal Behaviour* 59: 1061-1069.
- Mailleux A.C., Deneubourg J.L. & Detrain C. (2003). How does colony growth influence communication in ants? *Insectes Sociaux* 50: 24-31.
- Mailleux A.C., Detrain C. & Deneubourg J.L. (2006). Starvation drives a threshold triggering communication. *Journal of Experimental Biology* 209: 4224-4229.
- Mailleux A.C., Sempo G., Depickère S., Detrain C. & Deneubourg J.L. (2011). How does starvation affect spatial organization within nests in *Lasius niger*? *Insectes Sociaux* 58: 219-225.
- Marder E. (2000). Motor pattern generation. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 691-698.
- Marder E. & Bucher D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology* 11: 986-996.

- Martinez A. & Farina W.M. (2008). Honeybees modify gustatory responsiveness after receiving nectar from foragers within the hive. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 529-535.
- May P.G. (1985). Nectar uptake rates and optimal nectar concentrations of two butterfly species. *Oecologia* 66: 381-386.
- Mazda T., Yamamoto H., Fujimura M. & Fujimiya M. (2004). Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT₃ receptors in conscious rats. *American Journal of Physiology -Gastrintestinal and Liver Physiology* 287: 228-235.
- Medan V. & Josens R. (2005). Nectar foraging behaviour is affected by ant body size in *Camponotus mus*. *Journal of Insect Physiology* 51: 853-860.
- Miggiani L., Orchard I. & TeBrugge V. (1999). The distribution and function of serotonin in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. A comparative study with the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 45: 1029-1036.
- Miles C.I. & Booker R. (1998). The role of the frontal ganglion in the feeding and eclosion behavior of the moth *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology* 201: 1785-1798.
- Mitchell B.K., Itagaki H. & Rivet M.P. (1999). Peripheral and central structures involved in insect gustation. *Microscope Research and Technique* 47: 401-415.
- Molaei G. & Lange A.B. (2003). The association of serotonin with the alimentary canal of the African migratory locust, *Locusta migratoria*: distribution, physiology and pharmacological profile. *Journal of Insect Physiology* 49: 1073-1082.
- Morgan D.E. (2009). Trail pheromones of ants. *Physiological Entomology* 34: 1-17.
- Napolitano L.M., Ford S.C., Tompkins L. (1986). The effects of developmental and experimental temperature on responses of *Drosophila melanogaster* adults to sucrose. *Journal of Insect Physiology* 32: 937-940.
- Nässel D.R. (1988). Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Progress in Neurobiology* 30: 1-85.
- Nässel D.R. & Elekes K. (1984). Ultrastructural demonstration of serotonin- immunoreactivity in the nervous system of an insect (*Calliphora erythrocephala*). *Neurosciences Letters* 48: 203-210.
- Neckameyer W.S., Coleman C.M., Eadie S. & Goodwin S.F. (2007). Compartmentalization of neuronal and peripheral serotonin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain and Behavior* 6: 756-769.
- Neville A.C. & Weis-Fogh T. (1963). The effect of temperature on locust flight muscle. *Journal of Experimental Biology* 40: 111-121.
- Núñez J.A. (1977). Nectar flow by melliferous flora and gathering flow by *Apis mellifera ligustica*. *Journal of Insect Physiology* 23: 265-275.
- Núñez J.A. (1982). Honeybee foraging strategies at food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural Research* 21: 139-150.
- O'Brien K.S. & Hooper-Bui L.M. (2005). Hunger in red imported fire ants and their behavioral response to two liquid bait products. *Entomological Society of America* 98: 2154-2159.

- O'Donnell S. & Bulova S.J. (2007). Worker connectivity: a review of the design of worker communication systems and their effects on task performance in insect societies. *Insectes Sociaux* 54: 203-210.
- Orchard I. (2006). Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 144: 316-324.
- Orchard I., Lange A.B. & Barrett F.M. (1988). Serotonergic supply to the epidermis of *Rhodnius prolixus*: evidence for serotonin as the plasticising factor. *Journal of Insect Physiology* 34: 873-879.
- Orians G.H. & Pearson N.E. (1979). On the theory of central place foraging. *Analysis of Ecological Systems*. Eds.: Horn D.J., Mitchell R.D. & Stairs C.R.: 154-177. Ohio State University Press, Columbus, Ohio.
- Osborne R.H., Banner S.E. & Wood S.J. (1990). The pharmacology of the gut of the desert locust *Schistocerca gregaria* and other insects. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 96: 1-9.
- Page R.E. Jr, Erber J. & Fondrk M.K. (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A* 182: 489-500.
- Pankiw T. & Page R.E. Jr (1999). The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A* 185: 207-213.
- Pankiw T. & Page R.E. Jr (2000). Response thresholds to sucrose predicts foraging division of labor in honey bees. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 47: 265-267.
- Pankiw T. & Page R.E. Jr (2003). Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A* 189: 675-684.
- Pankiw T., Page R.E. Jr & Fondrk M.K. (1998). Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 44: 193-198.
- Pankiw T., Waddington K.D. & Page R.E. Jr (2001). Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *Journal of Comparative Physiology A* 187: 293-301.
- Pankiw T., Nelson M., Page R.E. Jr & Fondrk M.K. (2004). The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55: 286-292.
- Paul J. & Roces F. (2003). Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *Journal of Insect Physiology* 49: 347-357.
- Paul J., Roces F. & Hölldobler B. (2002). How do ants stick out their tongues? *Journal of Morphology* 254: 39-52.
- Pearson K.G. (1993). Common principles of motor control in vertebrates and invertebrates. *Annual Review of Neuroscience* 16: 265-297.
- Pearson K.G. & Iles J.F. (1971). Innervation of coxal depressor muscle in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology* 54: 215-232.

- Pol R. & Lopez de Casenave J. (2004). Activity patterns of harvester ants *Pogonomyrmex pronotalis* and *Pogonomyrmex rastratus* in the central monte desert, Argentina. *Journal of Insect Behavior* 17: 647-661.
- Porter S.D. (1988). Impact of temperature on colony growth and developmental rates of the ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology* 34: 1127-1133.
- Porter S.D. & Tschinkel W.R. (1993). Fire ant thermal preferences: behavioural control of growth and metabolism. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32: 321-329.
- Provecho Y. & Josens R. (2009). Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *Journal of Experimental Biology* 212: 3221-3227.
- Radwan, W.A., Granger, N.A. & Lauder, J.M. (1989). Development and distribution of serotonin in the central nervous system of *Manduca sexta* during embryogenesis. I. The brain and frontal ganglion. *International Journal of Developmental Neuroscience* 7: 27-41.
- Rand D., Gueijman A., Zilberstein Y. & Ayali A. (2008). Interactions of suboesophageal ganglion and frontal ganglion motor patterns in the locust. *Journal of Insect Physiology* 54: 854-860.
- Rast G.F. & Bräunig P. (1997). Pilocarpine-induced motor rhythms in the isolated locust suboesophageal ganglion. *Journal of Experimental Biology* 200: 2197-2207.
- Rast G.F. & Bräunig P. (2001a). Feeding-related motor patterns of the locust suboesophageal ganglion induced by pilocarpine and IBMX. *Journal of Insect Physiology* 47: 43-53.
- Rast G.F. & Bräunig P. (2001b). Insect mouthpart motor patterns: central circuits modified for highly derived appendages? *Neuroscience* 108: 167-176.
- Rice M.J. (1970). Cibarial stretch receptors in the tsetse fly (*Glossina austeni*) and the blowfly (*Calliphora erythrocephala*). *Journal of Insect Physiology* 16: 277-289.
- Rust M.K. (1986). Managing household pests. En: *Advances in urban pest management*. Eds.: Bennett G.W. & Owens J.M. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Rust M.K., Haagsma K. & Reiersen D.A. (1996). Barrier sprays to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) *Journal of Economic Entomology* 89: 134-137.
- Rust M.K., Reiersen D.A. & Klotz J.H. (2004). Delayed toxicity as a critical factor in the efficacy of aqueous baits for controlling argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 1017-1024.
- Rehder V. (1989). Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *Journal of Comparative Neurology* 279: 499-513.
- Robacker D.C., Flottum P.K., Sammataro D. & Erickson E.H. (1983). Effects of climatic and edaphic factors on soybean flowers and on the subsequent attractiveness of the plants to honey bees. *Field Crops Research* 6: 267-278.
- Roces F. (1993). Both evaluation of resource quality and speed of recruited leaf-cutting ants (*Acromyrmex lundi*) depend on their motivational state. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 33: 183-189.
- Roces F. & Núñez J.A. (1993). Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants. *Animal Behavior* 45: 135-143.

- Roces F., Blatt J. (1999). Haemolymph sugars and the control of the proventriculus in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 45: 221-229.
- Roeder T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology* 59: 533-561.
- Sant'Anna M.R.V., Diotaiuti L., Gontijo A.D.F., Gontijo N.F. & Pereira M.H. (2001). Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *Journal of Insect Physiology* 47: 1459-1465.
- Schachtner J. & Bräunig P. (1993). The activity pattern of identified neurosecretory cells during feeding behaviour in the locust. *Journal of Experimental Biology* 185: 287-303.
- Scheiner R., Baumann A. & Blenau W. (2006). Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology* 4: 259-276.
- Scheiner R., Plückhanh, S., Öney B., Blenau W. & Erber J. (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Brain Research* 136: 545-553.
- Scheiner R., Sokolowski M. B. & Erber J. (2004). Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learning and Memory* 11: 303-311.
- Schilman P.E. & Roces F. (2003). Assessment of nectar flow rate and memory for patch quality in the ant *Camponotus rufipes*. *Animal Behaviour* 66: 687-693.
- Schilman P.E. & Roces F. (2006). Foraging energetics of a nectar-feeding ant: metabolic expenditure as a function of food-source profitability. *Journal of Experimental Biology* 209: 4091-4101.
- Schilman P.E. & Roces F. (2008). Haemolymph sugar levels in a nectar-feeding ant: dependence on metabolic expenditure and carbohydrate deprivation. *Journal of Comparative Physiology B* 178: 157-165.
- Schoener T.W. (1971). Theory of feeding strategies. *Annual Review of Ecology Systematics* 2: 369-404.
- Schulz D.J. & Robinson G.E. (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A* 187: 53-61.
- Seeley T.D. (1989). The honey bee colony as a superorganism. *American Scientist* 77: 546-553.
- Seeley T.D. (1995). The wisdom of the hive. The physiology of honey bee colonies. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Siju K.P., Hansson B.S. & Ignell R. (2008). Immunocytochemical localization of serotonin in the central and peripheral chemosensory system of mosquitoes. *Arthropod Structure and Development* 37: 248-256.
- Silverman J. & Roulston T.H. (2001). Acceptance and intake of gel and liquid sucrose compositions by the argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economical Entomology* 94: 511-515.
- Smith J.J.B. (1979). Effect of diet viscosity on the operation of pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Biology* 82: 93-104.
- Smith L.M., Appel A.G. & Keever G.J. (1996). Cockroach control methods can cause other pest problems. *Highlights in Agricultural Research* 43: 5-6.

- Sola F., Falibene A. & Josens R. Asymmetrical behavioral response to two boron toxicants in ants depends on the species (en preparación).
- 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. *Journal of Neurobiology* 55: 341-354.
- Stevenson R.D. & Josephson R.K. (1990). Effect of operating frequency and temperature on mechanical power output from moth flight muscle. *Journal of Experimental Biology* 78: 61-78.
- Sudd J.H. & Sudd M.E. (1985). Seasonal changes in the response of wood-ants (*Formica lugubris*) to sucrose baits. *Ecological Entomology* 10: 89-97.
- Sudlow L.C., Edgecomb R.S. & Murdock L.L. (1987). Regulation of labellar and tarsal taste thresholds in the black blowfly, *Phormia regina*. *Journal of Experimental Biology* 130: 219-234.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Tecott L.H. (2007). Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metabolism* 6: 352-361.
- Thomson A.J. & Holling C.S. (1974). Experimental component analysis of blowfly feeding behaviour. *Journal of Insect Physiology* 20:1553-1563.
- Tinti J.M. & Nofre C. (2001). Responses of the ant *Lasius niger* to various compounds perceived as sweet in humans: a structure-activity relationship study. *Chemical Senses* 26: 231-237.
- Tripp J.M., Suiter D.R., Bennett G.W., Klotz J.H. & Reid B.L. (2000). Evaluation of control measures for black carpenter ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 1493-1497.
- Tsuji E., Aonuma H., Yokohari F. & Nishikawa M. (2007). Serotonin-immunoreactive neurons in the antennal sensory system of the brain in the carpenter ant, *Camponotus japonicus*. *Zoological Science* 24: 836-849.
- Ulloa-Chacón P. & Jaramillo G.I. (2003). Effects of boric acid, fipronil, hydramethylnon, and diflubenzuron baits on colonies of ghost ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 856-862.
- van Haeften T. & Schooneveld H. (1992). Serotonin-like immunoreactivity in the ventral nerve cord of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: identification of five different neuron classes. *Cell and Tissue Research* 270: 405-413.
- van Oudenhove L., Billoir E., Boulay R., Bernstein C. & Cerdá X. (2011). Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. *Naturwissenschaften* 98: 1009-1017.
- Vander Meer R.K., Preston C.A. & Heftz A. (2008). Queen regulates biogenic amine level and nestmate recognition in workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Naturwissenschaften* 95: 1155-1158.
- Völkl W., Woodring J., Fischer M., Lorenz M.W. & Hoffmann K.H. (1999). Ant-aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences. *Oecologia* 118: 483-491.
- von Frisch K. (1923). Über die Sprache der Bienen. *Zool JB Physiol* 40:1-186.

- Wada A., Isobe Y., Yamaguchi S., Yamaoka R. & Ozaki M. (2001). Taste-enhancing effects of glycine on the sweetness of glucose: a gustatory aspect of symbiosis between the ant, *Camponotus japonicus*, and the larvae of the lycaenid butterfly, *Niphanda fusca*. *Chemical senses* 26: 983-92.
- Wang Z., Singhvi A., Kong P. & Scott K. (2004). Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell* 117: 981-991.
- Wei Z., Baggerman G., Nachman R.J., Goldsworthy G., De Verhaert P., Loof A. & Schoofs L. (2000). Sulfakinins reduce food intake in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology* 46: 1259-1265.
- Weiger W.A. (1997). Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 72: 61-95.
- Whim M.D. & Evans P.D. (1989). Age-dependence of octopaminergic modulation of flight muscles in the locust. *Journal of Comparative Physiology A* 165: 125-137.
- Wilson E.O. (1971). *The insects societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Wolf A.V., Brown M.G. & Prentiss P.F. (1984). Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables. En: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 64th ed. Florida, CRC Press: D223-D272.
- Xue R.D. & Barnard D.R. (2003). Boric acid bait kills adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology* 96: 1559-1562.
- Yarmolinsky D.A., Zuker C.S. & Ryba N.J.P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139: 234-244.
- Yu P.L., Fujimura M., Hayashi N., Nakamura T. & Fujimiya M. (2001). Mechanisms in regulating the release of serotonin from the perfused rat stomach. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 280: 1099-1105.
- Zilberstein Y. & Ayali A. (2002). The role of the frontal ganglion in locust feeding and moulting related behaviours. *Journal of Experimental Biology* 205: 2833-2841.