

Tesis Doctoral

Efectos inhibitorios sobre el aprendizaje olfativo en la abeja doméstica (*Apis mellifera*)

Fernández, Vanesa Maribel

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:

Fernández, Vanesa Maribel. (2012). Efectos inhibitorios sobre el aprendizaje olfativo en la abeja doméstica (*Apis mellifera*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fernández, Vanesa Maribel. "Efectos inhibitorios sobre el aprendizaje olfativo en la abeja doméstica (*Apis mellifera*)". 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

Efectos inhibitorios sobre el aprendizaje olfativo en la abeja doméstica

(Apis mellifera)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Vanesa Maribel Fernández

Director de tesis: Profesor Dr. Walter M Farina

Consejero de Estudios: Profesor Dr. Walter M. Farina.

Lugar de trabajo
Grupo de Estudio de Insectos Sociales. IFIBYNE – CONICET. Departamento de Biodiversidad
y Biología Experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2012

Efectos inhibitorios sobre el aprendizaje olfativo en la abeja doméstica (*Apis mellifera*)

Resumen

Entre los múltiples estímulos percibidos del entorno, los animales deben ser capaces de seleccionar aquellos que les sean útiles para sobrevivir. A tal efecto, las experiencias previas permiten diferenciar los estímulos relevantes de aquellos que no lo son; en especial esta Tesis se focalizará en los relacionados con la búsqueda y obtención de alimento. Cuando se pretende asociar un estímulo, que ha sido preexpuesto en el ambiente, a una recompensa, puede resultar difícil establecer una contingencia entre ellos. Este fenómeno ha sido definido como inhibición latente (IL) y se lo ha explorado a lo largo de esta Tesis usando como modelo experimental a la abeja *Apis mellifera*. A partir de ensayos de condicionamiento olfativo se evaluaron los efectos de volátiles preexpuestos tanto en el contexto social de la colmena como bajo condiciones experimentales controladas. Los volátiles preexpuestos en una colmena reducen las preferencias de las abejas hacia una fuente de alimento aromatizada con ese olor. Además, durante un condicionamiento clásico evaluado bajo el protocolo de extensión de probóscide, la preexposición olfativa dificulta la adquisición de una relación predictiva entre el olor preexpuesto y una recompensa. Esta reducción en el aprendizaje varía con la identidad del olor, siendo olor-específica. Si bien este fenómeno fue evidenciado para todas las categorías de edades de la casta obrera, en ninguna de ellas este efecto duró más de 24 hs. Asimismo, la preexposición de volátiles no provocó ningún cambio en la sensibilidad gustativa al azúcar de individuos de edades pre-recolectoras. Sin embargo, sí se observó que exposiciones prolongadas o mayores concentraciones del volátil afectan la persistencia de la IL. Finalmente, se estudiaron las vías aminérgicas involucradas en la IL de la abeja melífera; para lo cual se realizaron tratamientos farmacológicos que involucraron el uso de antagonistas de algunas aminas biogénicas (octopamina, dopamina y serotonina). Los resultados sugieren que la vía serotoninérgica podría estar involucrada en la modulación de la IL en la abeja melífera. Los resultados de esta Tesis muestran, por un lado, que los olores preexpuestos pueden reducir el rendimiento del aprendizaje asociativo si el mismo es subsecuentemente pareado con el alimento. Esta situación puede tener implicancias a nivel social, pudiendo influir en la propagación de información floral olfativa dentro de la colmena. Por otro lado, el hecho de que por primera vez se haya mostrado una interrupción de la IL mediante tratamientos farmacológicos abre nuevas perspectivas con relación al estudio de las vías neurales involucradas en este fenómeno en insectos.

Palabras clave: Inhibición latente, *Apis mellifera*, preexposición olfativa, aprendizaje asociativo, vías aminérgicas.

Inhibitory effects on olfactory learning in the honey bee (*Apis mellifera*)

Abstract

Among all the stimuli perceived by animals in the environment, they must be able to select those that are useful for survival. In this context, previous experiences with the stimuli allow animals to differentiate those stimuli that are relevant from those that are not. This Thesis will focus on the olfactory experiences related to seeking and obtaining food. The retardation of associative learning as a function of prior stimulus exposure has been named Latent inhibition (LI) phenomenon, and it has been explored throughout this thesis by using the honey bee, *Apis mellifera*, as experimental model. The effects of volatile pre-exposure have been studied by using an olfactory conditioning procedure, both in the social environment of the hive and under controlled laboratory conditions. The pre-exposition to a volatile compound in a hive reduces the preferences of the bees for a certain food source scented with this odour. Furthermore, during a classical conditioning protocol assessed under the proboscis extension, olfactory pre-exposure reduces the acquisition of a predictive relationship between the pre-exposed odour and the reward. The LI effect varies with the odour identity and it has been found for the whole range of ages of workers bees. However, its effect did not last more than 24 h., unless the odour concentration was increased or its exposure prolonged. Moreover, the pre-exposition odour did not cause any changes in the gustative responsiveness for pre-foraging age bees. Finally, putative aminergic pathways involved in the LI- phenomenon in honey bees have been studied. Previously pharmacological treated individuals with antagonists of biogenic amines were exposed to a volatile compound, after which, their learning performances were studied. The results suggest that serotonergic pathway may be involved in the modulation of this phenomenon in honey bees. On one hand, the results of this Thesis show that pre-exposed odors may reduce the performance of associative learning if it is subsequently paired with food. This may have implications for the social level, because it may influence the spread of floral scent information within the hive. On the other hand, the fact that for the first time it has been shown a disruption of the IL by drug treatments opens new perspectives on the study of neural pathways involved in this phenomenon in insects.

Keywords: Latent inhibition, *Apis mellifera*, odour pre-exposure, associative learning, aminergic pathways.

Agradecimientos

Nada más difícil que agradecer en una sola página a todos los que sentí estuvieron a mi lado durante el desarrollo de esta tesis. En primer lugar a mi director de Tesis, Walter, quien tiene la habilidad (inexplicable para mí) de ver un resultado en todos los experimentos, hasta en aquellos que yo hubiera descartado o abandonado. Gracias Walter por transmitirme tu pasión por las abejitas y por este trabajo loco de investigar, por ser un director presente, por los resultados discutidos, por la confianza y por seguir aguantándome un tiempo más. También quiero agradecerle a Apisman (alias Andresuti, Arenoides, Andrés). Gracias por las incontables horas de PER y de Jaula de vuelo plagadas de charlas terapéuticas; gracias por las horas que te bancaste la música “de minita”. ¡Por tu mirada crítica y “tira bombas” de los experimentos!. Gracias por ser mi amigo y estar siempre.

Gracias a las reuniones de “sólo chicas”, que fueron fundamentales en este último tiempo para seguir adelante; gracias Gaby, Agus, Pau, Sol y Sofi; por ser amigas y no sólo compañeras de trabajo. Infinitas gracias a todos los INSSOC, que si algo tomamos de nuestros modelos experimentales es el trabajo en grupo; por eso GRACIAS Fran, Lucila, Anita, Agustinita, Caro y Roxy. Gonza, millones de gracias, ¿¡Qué hubiera sido de “ese capítulo” sin aquel sábado de discusión!?. Simplemente gracias a todo INSSOC por los tan necesarios momentos de incoherencia compartidos en el labo.

Muchas gracias al profesor Dr. Martín Giurfa y al Dr Jean Marc Devaud por haberme dado la oportunidad de trabajar en el CRCA (Centre de Recherches sur la Cognition Animale) en Toulouse, Francia. Muchas gracias, no sólo por la oportunidad laboral, sino que también por hacerme sentir tan a gusto y “como en casa” cuando estaba tan lejos.

A mamá, papá, Ser y Leo, mi familia, que siempre creyó en mí, que me ayudaron desde el momento cero en el que decidí estudiar biología. Gracias por estar a mi lado, los quiero mucho. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Ser, inolvidables nuestras charlas de biología y finanzas durante las mañanas de Lanús a Recoleta.

A mis amigas(os) artistas, a los computadoriles, a los científicos, a los financistas, administradores, y por sobre todo a los fanáticos de las rondas de tragos!!: Marie, Karo, Ceci, Fede, Bellota, Nair, Lore. Tito, ¿cuándo se pueden repetir las discusiones estadísticas con vino y empanadas en Brighton?. Marian, gracias por los fernechis compartidos y por hacer, en estos meses, que mis días tengan 26 hs. Débora, muchas gracias por todo tu apoyo y el aguante con los horarios en estos meses. Gaby, la misma Gabita que comparte horas en el labo y, sigue teniendo paciencia fuera del mismo, qué te puedo decir? “Ni Manuel con todos sus amigos tienen tanta paciencia”. Lau, gracias a tus ojos críticos y llenos de color! Gracias por los consejos!!. Ramiro, gracias por la paciencia de poner las tildes, las comas, las correcciones gramaticales (deberían haber sido tres pasta frolas como mínimo!). Sol, ¿quién se ríe de sus “pechorías” y de los “desafíos” (¡¡vos entendes!!)?. Gracias a los amigos que están distribuidos por el mundo, y en especial a los que quedaron en Toulouse. Gracias a internet y a los chat con camaritas, porque nos mantiene comunicados a pesar del océano y los distintos horarios.

¡¡¡Gracias a todos!!!

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1. Aprendizaje	1
1.1.1. Aprendizaje asociativo: clásico y operante	2
1.1.2. Aprendizaje no asociativo	6
1.1.3. La preexposición a un estímulo condicionado	7
1.2. Los insectos como modelos experimentales en estudios de aprendizaje	10
1.2.1. Condicionamiento clásico y operante en la abeja <i>Apis mellifera</i>	12
1.2.2. Condicionamiento clásico: Respuesta de extensión de probóscide (REP).....	13
1.3. El sentido del olfato en los insectos	15
1.3.1. La abeja <i>Apis mellifera</i> : un modelo experimental con implicancias a escala social .	19
1.3.2. La organización de una colmena de abejas <i>Apis mellifera</i>	21
1.3.3. La importancia de la percepción olfativa en la vida social de la colmena	26
1.4. Objetivos e hipótesis	27
2. Materiales y métodos generales.....	30
2.1. Situación natural y cría de abejas en laboratorio	31
2.2. Condicionamiento diferencial de respuesta de extensión de probóscide (REP)	34
2.3. Estimulaciones olfativas	37
2.4. Análisis estadístico	38
3. Las experiencias con olores florales dentro de la colmena afectan las preferencias recolectoras en la abeja <i>Apis mellifera</i>	40
3.1. Introducción	40
3.2. Materiales y métodos	43
3.2.1. Sitio de estudio y animales.....	43
3.2.2. Estimulación olfativa	44
3.2.3. Entrenamiento y evaluación	45

3.2.4. Análisis estadístico	49
3.3. Resultados	49
3.3.1. Evaluación de preferencias en dos alimentadores aromatizados.....	49
3.3.2. Evaluación de preferencias en un alimentador aromatizado vs uno sin aromatizar	52
3.4. Discusión	54
4. Exposición de los volátiles dentro de la colmena y el efecto sobre la discriminación olfativa	59
4.1. Introducción	59
4.2. Materiales y métodos	62
4.2.1. Sitio de estudio y animales experimentales.....	63
4.2.2. Condicionamiento diferencial	64
4.2.3. Protocolo experimental: exposición de volátiles en colmena y en abejas confinadas	65
4.2.4. Análisis estadístico	70
4.3. Resultados	71
4.3.1. Respuesta en abejas de colmena	71
4.3.2. La exposición de volátiles en abejas de colmena de diferentes edades.....	74
4.3.3. El efecto del intervalo temporal entre la preexposición olfativa y el condicionamiento en abejas confinadas.....	77
4.3.4. El efecto de la concentración y la duración de la exposición olfativa en abejas confinadas	78
4.4. Discusión	80
5. La exposición de volátiles durante edades pre-recolectoras: efectos sobre la sensibilidad gustativa y el condicionamiento olfativo a largo término	86
5.1. Introducción	86
5.2. Materiales y métodos	94
5.2.1. Sitio de estudio y animales experimentales.....	95

5.2.2. Experiencias olfativas a edades pre-recolectoras	96
5.2.3. Protocolo de respuesta de umbral al azúcar (URA)	96
5.2.4. Condicionamiento diferencial	99
5.2.5. Análisis estadístico	99
5.3. Resultados	100
5.3.1. Sensibilidad gustativa en abejas pre-recolectoras	100
5.3.2. Condicionamiento olfativo	102
5.4. Discusión	105
6. El rol de las vías aminérgicas en el fenómeno de IL en la abeja <i>Apis mellifera</i>	109
6.1. Introducción	109
6.2. Materiales y métodos	113
6.2.1. Sitio de estudio y animales experimentales.....	113
6.2.2. Tratamientos farmacológicos.....	114
6.2.3. Exposición olfativa.....	115
6.2.4. Condicionamiento diferencial	116
6.2.5. Análisis estadístico	117
6.3. Resultados	118
6.3.1. Serie experimental I: el efecto de flupentixol (DA-) y de mianserina (OA-) en la IL	118
6.3.2. Serie experimental II: el efecto de flufenazina (DA -) y epinastina (OA-) en LI.....	122
6.3.3. Serie experimental III: el efecto de ketanserina (5HT-) y metisergida (5HT-) en LI	123
6.4. Discusión	125
7. Conclusiones generales	131
8. Bibliografía	136

1

1. Introducción

1.1. Aprendizaje

El entorno perceptual de los animales presenta una matriz compleja de estímulos de la que deben establecer cuáles pueden ser útiles para sobrevivir. En ese marco, las experiencias previas permiten diferenciar los estímulos relevantes de aquellos que no lo son. Por tal motivo, la habilidad de aprender se presenta en casi todos los animales y les permite extraer reglas y estructuras para anticiparse a los eventos relevantes del entorno en que viven (Pavlov, 1927; Kandel *et al.*, 1992; Carew, 2000).

En el marco de la teoría del aprendizaje se hace referencia a dos grandes categorías de fenómenos. Por un lado, se denomina aprendizaje asociativo a aquel que surge al establecerse una asociación entre dos o más estímulos contingentes. Este tipo de asociaciones permite establecer relaciones predictivas entre eventos que

coexisten en el medio ambiente y de este modo reducen la incertidumbre del animal (Mackintosh, 1994). Por otro lado, se define al aprendizaje no asociativo como aquel en donde se asume que depende solamente de las propiedades de un estímulo (Squire y Kandel, 1999).

1.1.1. Aprendizaje asociativo: clásico y operante

Suele distinguirse dos clases de aprendizaje asociativo: el condicionamiento clásico (Pavlov, 1927) y el condicionamiento operante (Skinner, 1938). En el condicionamiento clásico los animales aprenden a asociar un estímulo inicialmente neutro o condicionado (EC) que en un principio carece de significado, y un estímulo incondicionado (EI), biológicamente relevante que es capaz por sí mismo de generar una respuesta conspicua y en muchos casos refleja en el individuo. Al generarse un vínculo entre ambos estímulos durante el condicionamiento, el animal es capaz de anticipar su respuesta con la sola presentación del EC. Uno de los primeros investigadores en desarrollar y formalizar un protocolo experimental para estudiar las propiedades del condicionamiento clásico (o simple) fue Ivan Pavlov (1849-1936), fisiólogo ruso, en el año 1927. En condiciones controladas de laboratorio y utilizando al can como modelo experimental, Pavlov demostró que la presentación repetida del sonido de una campana (EC, *a priori* neutro para los sujetos experimentales) seguido de alimento (EI, que generaba por sí mismo una respuesta innata de salivación en los animales), era capaz de desencadenar la salivación ante la sola presentación del

sonido y en ausencia del alimento (Figura 1.1). Sin embargo, Pavlov no fue el único en observar este tipo de condicionamiento. El zoólogo austríaco Karl von Frisch (1914,1915), ya había observado que tanto los peces como las abejas melíferas podían discriminar estímulos visuales recompensados de no recompensados (Figura 1.2).



Figura 1.1: Condicionamiento clásico. Ivan Pavlov con uno de sus colaboradores junto al dispositivo empleado para estudiar las propiedades del condicionamiento clásico con su sujeto experimental (un can). Fuente de imagen (1).

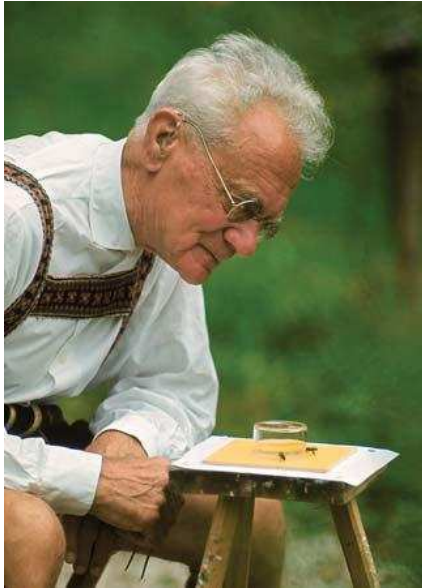


Figura 1.2: Frisch, Karl von (1886-1982), Premio Nobel de fisiología – medicina 1973. En la fotografía se lo puede observar en uno de sus experimentos, entrenando abejas a un alimentador artificial. Fuente de imagen (2).

Se define condicionamiento operante (Skinner, 1938), a aquel mediante el cual los sujetos experimentales aprenden a asociar un comportamiento propio con una recompensa: ante un estímulo se produce una respuesta, que puede ser reforzada de manera positiva o negativa, provocando que la conducta, llamada respuesta operante, se fortalezca o debilite. El clásico experimento de “la caja de Skinner” ilustra claramente este tipo de condicionamiento. Esta experiencia mostró que una rata era capaz de aprender a accionar una palanca (respuesta operante) para obtener alimento (refuerzo positivo), y que a través de los sucesivos eventos de entrenamiento el individuo era capaz de aprender que su respuesta motora antecedió a la obtención del refuerzo (Figura 1.3).

Ambos tipos de condicionamiento asociativo permiten generar una predicción. Es decir, le otorgan al estímulo condicionado (en el condicionamiento clásico) o a la

respuesta operante (en el condicionamiento operante) cierto valor predictivo conforme se establece el vínculo entre ellos. Este vínculo puede variar fuertemente dependiendo, entre otras cosas, de la intensidad, el intervalo entre presentaciones, o de la relevancia o relación que existe en la naturaleza entre los estímulos que pretenden ser asociados (Balsam, 1985; Rescorla *et al.*, 1985; Bhagavan y Smith, 1997).

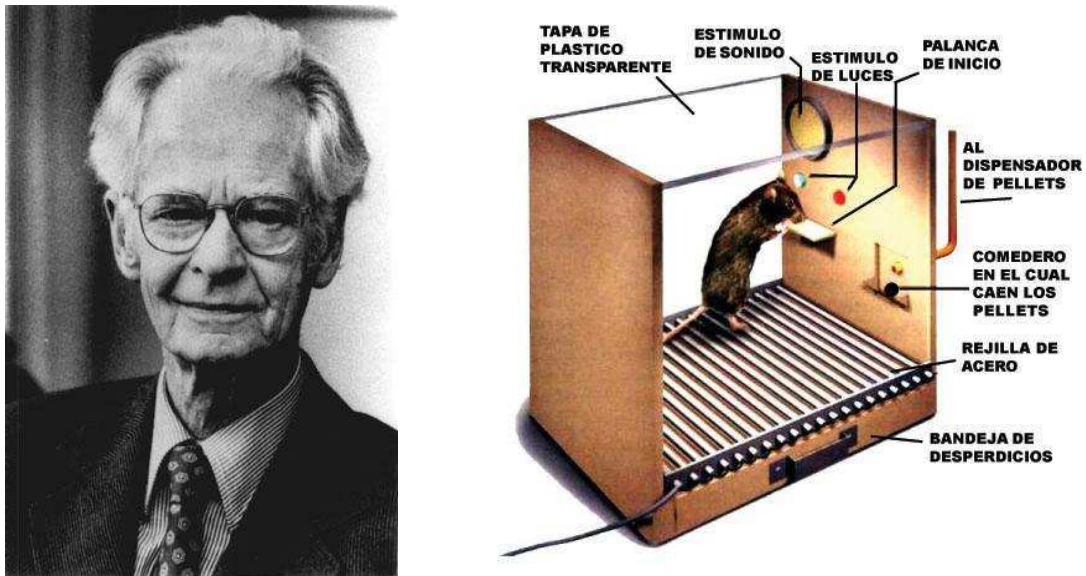


Figura 1.3: Condicionamiento operante. Burrhus Frederic Skinner (1904-1990). Dispositivo experimental (“Caja de Skinner”) equipado con una palanca y un módulo para la entrega de alimento. Además posee un mecanismo electrónico que permite programar el protocolo experimental y registrar las respuestas de manera automática. Fuente de imágenes (3)

1.1.2. Aprendizaje no asociativo

Durante los procesos de aprendizaje no asociativo, se manifiesta un cambio en la conducta del individuo como resultado de la experiencia repetida de un único estímulo, o de dos o más estímulos que no están relacionados en el tiempo o espacio (Squire y Kandel, 1999). Entre los procesos de aprendizaje no asociativo encontramos los procesos de habituación y de sensibilización. La sensibilización es generalmente considerada como un aumento inespecífico de una respuesta causada por la presentación previa de un estímulo de gran intensidad (Dudai, 1989; Kandel *et al.*, 1992). La magnitud de la sensibilización depende de la fuerza del estímulo sensibilizante (Groves *et al.*, 1969; Davis, 1974; Marcus *et al.*, 1988). La misma es generalmente de corto término (Dethier *et al.*, 1965; Krasne y Glanzmann, 1986) sin embargo, la exposición repetida o un aumento en la fuerza del estímulo puede conducir a una sensibilización de largo término (Pinsker *et al.*, 1973; Walters, 1987). En la habituación, el individuo exhibe una disminución paulatina en su respuesta comportamental tras la sucesiva presentación del mismo estímulo. Mientras que la habituación es estímulo-específica, la sensibilización afecta a un rango más amplio de respuestas (Carew, 2000).

1.1.3. La preexposición a un estímulo condicionado

Se ha considerado que el condicionamiento clásico involucra la reconstrucción del conocimiento acerca del estímulo, su relación y predictibilidad (Dickinson, 1980; Holland, 1993; Wasserman y Miller, 1997; Pearce y Bouton, 2001). Al estudiar procesos de aprendizaje asociativo es importante tener en cuenta la historia previa del sujeto experimental con el o los estímulos condicionados. Esta historia previa podría reflejar la representación interna que tiene el sujeto experimental del estímulo que será posteriormente condicionado y provocará alguna modificación en el desempeño del aprendizaje. En particular, nos centraremos en el efecto que puede causar la exposición previa del futuro estímulo condicionado en un posterior condicionamiento asociativo. Para ello nos focalizaremos en dos alternativas: (i) *el aprendizaje latente* (Tolman, 1932), y (ii) *el fenómeno de inhibición latente* (Lubow y Moore, 1959; Lubow 1989).

El aprendizaje latente plantea que la mera continuidad en la presentación de un estímulo es suficiente para formar una asociación (Tolman y Honzik, 1930; Tolman, 1932). Este aprendizaje tiene lugar sin involucrar recompensas ni castigos; y no se hace explícito hasta que se presenta un reforzamiento adecuado (Blodgett, 1929; Tolman y Honzik, 1930). Este aprendizaje fue claramente ilustrado en el conocido experimento de Tolman y Honzik (1930), en el cual se permitía a un determinado número de ratas que exploren un laberinto durante varios ensayos. Cuando los animales lograban alcanzar el final del laberinto se establecían dos grupos experimentales: uno que siempre fue recompensado y otro que no. La primera observación que resultó obvia fue que el grupo recompensado se movía de manera más eficiente dentro del laberinto y cometía menos errores (utilizando menos cantidad

de veces los brazos “ciegos” del laberinto) en los sucesivos ensayos. Luego de un periodo experimental bajo las condiciones descritas, se produjo un cambio en el protocolo: el grupo que no había sido premiado comenzó a ser recompensado al llegar al final del laberinto. Como resultado de esto, en el ensayo posterior los individuos exploraron más eficientemente el laberinto que el primer grupo experimental. Según los autores, el grupo no recompensado había aprendido, aún sin ser reforzado, las características del entorno que recorrían. La recompensa no había sido indispensable para que ocurriera el aprendizaje, pero sí para que éste se manifestara (Tolman y Honzik, 1930).

Existen, además, estudios en otros modelos que ejemplifican este tipo de aprendizaje. Franks y colaboradores (2007) han demostrado que las colonias de hormigas *Temnothorax albipennis* pueden reconocer los alrededores de su nido y efectuar planes para el futuro. Sus resultados experimentales demuestran que las hormigas son capaces de evaluar y retener información acerca de la calidad de los potenciales nuevos nidos, utilizando claves como marcas de terreno o feromonas. Cuando las hormigas buscan un nuevo nido, podría resultar beneficioso ignorar un lugar conocido y poco atractivo; y así usar la información previamente adquirida para optimizar su discriminación, e ir en busca de un sitio novedoso (Franks *et al.*, 2007). Por tal motivo, los autores plantean que estas hormigas parecen ser capaces, de adquirir la información relevante mediante un aprendizaje de tipo latente y, más específicamente, de aprender qué no hacer.

No sólo mediante la exploración del medio circundante se hace evidente este tipo de aprendizaje. La primera vez que este efecto fue evidenciado en animales que previamente habían aprendido que un tipo particular de alimento era “no comestible” (Susswein y Schawarz, 1983), fue mediante estudios en *Aplysia sp.*, un gasterópodo

marino. Recientemente, este tipo de aprendizaje latente ha sido estudiado en *Aplysia sp.* mediante un protocolo de sensibilización del reflejo de retirada del sifón (Philips *et al.*, 2006).

La preexposición a un estímulo que actuará como EC en un protocolo de aprendizaje no sólo tiene un efecto facilitador, como puede ser una memoria latente, sino que podría causar un fenómeno con efectos opuestos como, por ejemplo, la inhibición latente. La inhibición latente es un fenómeno por el cual la exposición a un estímulo irrelevante dificulta u obstaculiza la adquisición de una respuesta condicionada con este mismo estímulo (Lubow y Moore, 1959; Lubow, 1989). La inhibición latente se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal y a pesar de su aparente simplicidad, este fenómeno representa un mecanismo sofisticado y plástico que los organismos han desarrollado para garantizar una interacción eficiente con el medio ambiente (Lubow, 1973). Para entender este fenómeno se han realizado varios experimentos comportamentales, tanto en vertebrados como en invertebrados (Lubow y Weiner, 2010). En vertebrados este fenómeno ha sido observado en un gran número de protocolos de aprendizaje: condicionamiento aversivo en cabras (Lubow y Moore, 1959), reconocimiento de depredadores en peces (Ferrari y Chivers, 2011), aprendizaje de evitación y apetitivo en ratas (Ackill *et al.*, 1969; Boughner y Rapini, 2006) y condicionamiento aversivo gustativo en hámsteres (Dibbatista *et al.*, 2003) entre otros. Incluso la inhibición latente ha sido estudiada en humanos y su déficit ha sido asociado a enfermedades mentales (Baruch *et al.*, 1988a; Baruch *et al.*, 1988b; Weiner, 2003; Lubow y Weiner, 2010).

En invertebrados, la evidencia experimental es menor que la encontrada para vertebrados, aunque se ha comprobado la presencia de este fenómeno inhibitorio mediante el estudio de un aprendizaje apetitivo del tipo olfativo en caracoles (Loy *et*

al., 2006) y en abejas (Chandra *et al.*, 2000; Sandoz *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2010). Además en abejas este fenómeno fue demostrado mediante un protocolo de perturbación durante la búsqueda y recolección de alimento (Abramson y Bitterman, 1986).

1.2. Los insectos como modelos experimentales en estudios de aprendizaje

La clase Insecta (Phylum Arthropoda), además de ser una de las más diversas y de haber conquistado casi todos los ambientes del planeta, es increíblemente abundante y diversificada. Los cambios que ocurren durante el ciclo de vida de los insectos son significativamente cortos en relación a otros modelos experimentales; son de fácil control visual, medibles y muy adecuados para estudios llevados a cabo bajo condiciones de laboratorio. Éstas son algunas de las razones por las que los insectos resultan excelentes como modelos experimentales en estudios relacionados con la estructura, función, comportamiento y ecología en los seres vivos. Además, dada la gran accesibilidad que presentan a nivel neurológico se han convertido en un excelente modelo para el estudio relacionado con el aprendizaje y la memoria. La mayoría de los insectos poseen sistemas nerviosos simples con un número de neuronas mucho menor en relación a los vertebrados. Han adquirido una nueva reputación en el marco de los estudios que se enfocan en ciertas capacidades cognitivas que durante mucho tiempo fueron patrimonio de ciertos vertebrados, como los monos, las palomas y los delfines (Giurfa, 2007). Dentro de la clase Insecta existen

numerosos trabajos que han explorado distintos protocolos de aprendizaje que demuestran las habilidades cognitivas de éstos; y que han aportado información relevante para el entendimiento de las bases fisiológicas del aprendizaje y la memoria (Burrell y Sahley, 2001). Entre estos trabajos podemos citar aquellos realizados en la abeja *Apis cerana* (Srinivasan *et al.*, 1998) y en el abejorro, *Bumble terrestris* (Corlborn *et al.*, 1999), que han demostrado la habilidad de estos insectos para distinguir claves contextuales como colores o distintos patrones visuales. Los estudios llevados a cabo en la langosta *Locusta migratoria* (Raubenheimer y Tucker, 1997) demostraron la capacidad de aprender ciertas claves visuales y olfativas que sirven como indicadores de la presencia de alimentos ricos en proteínas o carbohidratos. También los insectos parasitoides, por ejemplo, son capaces de establecer asociaciones a partir de compuestos, volátiles y no volátiles, específicos de sus hospedadores (avispas, Lewis *et al.*, 1991). Los insectos se pueden emplear en condicionamientos que utilicen estímulos excitatorios que sean tanto de naturaleza aversiva como apetitiva. Las habilidades cognitivas fueron observadas en distintos protocolos de condicionamiento: aversivo en *Drosophila melanogaster* (Tully y Quinn, 1985) y *Apis mellifera* (Vergoz *et al.*, 2007); apetitivo en *Apis mellifera* (Smith y Menzel, 1989; Smith y Cobey, 1994; Bhagavan y Smith, 1997; Couvillon *et al.*, 1997; Smith, 1997) y olfativo en polillas (Hartlieb, 1996; Fan *et al.*, 1997) entre otros.

En particular, la abeja *Apis mellifera* es uno de los insectos más estudiados por presentar una gran versatilidad bajo condiciones de laboratorio que permiten abordar diversos aspectos de su biología. Transformándose de esta manera en un modelo experimental sumamente completo, amplio y de fácil acceso para su estudio, que presenta un gran interés para un amplio abanico de ramas de estudio, desde el área del comportamiento hasta la neurobiológica. Además de ser un excelente modelo para

desarrollar estudios de aprendizaje y memoria (Menzel y Erber, 1978; Menzel, 1993; Menzel, 1985; Giurfa, 2007), ha sido y es un modelo ampliamente utilizado en ambos tipos de condicionamiento (clásico y operante).

1.2.1. Condicionamiento clásico y operante en la abeja *Apis mellifera*

En relación al condicionamiento clásico, el protocolo que mayor uso ha tenido es aquel que utiliza la respuesta de extensión de probóscide (REP). Este protocolo ha permitido realizar condicionamientos con estímulos visuales (Kuwabara, 1957; Mota *et al.*, 2011), táctiles (Scheiner *et al.*, 2001) y olfativos (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). Al inmovilizar a las abejas en tubos para llevar a cabo este protocolo se obtiene un control preciso de los diferentes parámetros del protocolo (Mauelshagen y Greggers, 1993) y una gran accesibilidad a su sistema nervioso, a partir de lo cual se logran estudiar los procesos neurales relacionados con el aprendizaje.

En los estudios de condicionamiento operante en general se permite el libre vuelo de los individuos y la elección entre estímulos (Lindauer, 1963; von Frisch, 1967; Menzel *et al.*, 1974; Bitterman *et al.*, 1983; Menzel, 1990; Greggers y Menzel, 1993). En contraposición al condicionamiento clásico, con este paradigma podemos estudiar a los sujetos experimentales en un ámbito más natural con un nivel muy bajo de manipulación o intervención, pero también con poco control de la situación experimental (duración de los estímulos, tiempo entre estímulos, etc.) (Mauelshagen y Greggers, 1993).

1.2.2. Condicionamiento clásico: Respuesta de extensión de probóscide (REP)

Como se mencionó previamente el protocolo más utilizado para estudiar el condicionamiento clásico en abejas y en otros insectos es el de la respuesta de extensión de probóscide (REP) (Kuwabara, 1957; Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). El primer paso para llevar a cabo este protocolo consiste en amarrar a las abejas experimentales de manera tal que sus movimientos queden limitados solamente a las antenas y a las piezas bucales (Frings, 1944). En estas condiciones experimentales es posible presentar al individuo estímulos neutros de forma ordenada. En el caso del condicionamiento olfativo se comienza con la presentación de un olor que actúa como estímulo neutro, es decir uno que inicialmente no generaba respuesta conspicua en el individuo. El reflejo de extensión de probóscide es una respuesta refleja de la abeja. En la naturaleza este reflejo es parte del comportamiento de recolección y les permite a las abejas obtener néctar de las flores (Figura 1.4). Esta conducta ocurre cuando una abeja contacta sus antenas o tarsos con una solución azucarada. Bajo una situación experimental controlada, en laboratorio, es factible condicionar esta respuesta innata a un olor. Para ello se deben realizar presentaciones sucesivas en las cuales se presentan solapados en el tiempo un olor (EC) y una recompensa (EI, por ejemplo una solución azucarada). El estímulo incondicionado se presenta directamente por contacto en las antenas; al tocarlas con la solución azucarada la abeja extiende su probóscide. De este proceso deviene el nombre del protocolo, REP (Respuesta de Extensión de Probóscide) (Figura 1.5). Al cabo de varias presentaciones de olor y recompensa, seguidas por la ingesta de esta última, se establece una asociación entre ambos estímulos; y se provoca que el estímulo que

antes era neutro ahora sea un estímulo condicionado (EC) y, en consecuencia, capaz por sí mismo de evocar una REP que es ahora una respuesta condicionada (RC).

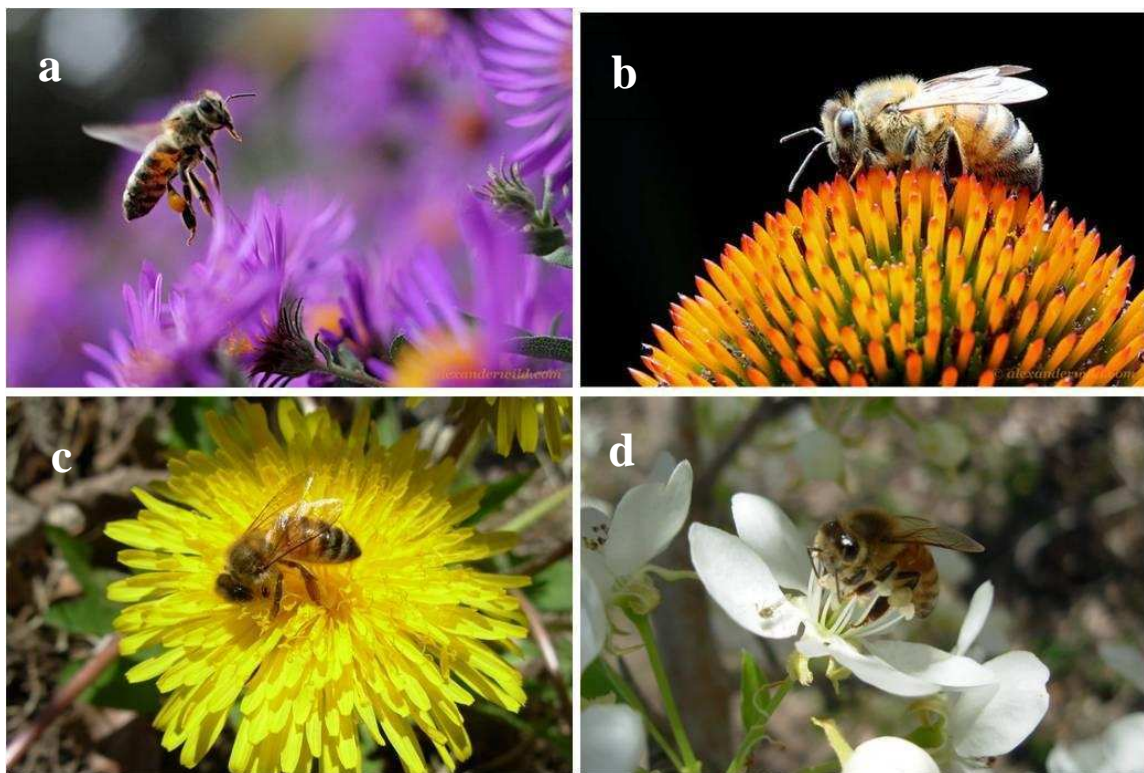


Figura 1.4:a) Abeja con probóscide extendida aterrizando en una flor. b, c y d) Abejas libando néctar. (Crédito de las imágenes a y b: AlexWild www.alexanderwild.com; c y d: Lic. Paula Carolina Díaz).



Figura 1.5: La abeja extiende su probóscide al tocar sus antenas con solución azucarada.

1.3. El sentido del olfato en los insectos

La interacción de los animales con su entorno es factible gracias a sus sistemas sensoriales. El fin principal de estos sistemas es la obtención de información acerca del medio circundante que permite a los animales seleccionar, codificar y organizar los estímulos percibidos para sobrevivir. En los insectos, el sistema olfativo es de vital importancia dado que es el encargado de detectar y procesar los compuestos odorantes. Este tipo de compuestos ocupan un papel importante en la vida de los insectos, ya que se encuentran vinculados a tareas como la búsqueda de alimento, de pareja o de un sitio óptimo para la oviposición. Consecuentemente, el sistema olfativo de los insectos se encuentra altamente desarrollado (Hildebrand y Shepherd, 1997).

En los insectos, la estimulación de los receptores olfativos presenta respuestas moduladas por su afinidad con el compuesto. La afinidad de la unión molécula-receptor depende de su complementariedad, por lo que pueden diferenciarse

receptores especialistas (aquellos que muestran una alta complementariedad con la molécula estimulante) de los generalistas, que muestran menor afinidad pero son capaces de ser activados por un rango más amplio de estímulos (Schneider y Steinbrecht, 1968). Los receptores olfativos se encuentran dentro de cavidades o pelos sensoriales: las sensilias olfativas (Goodman, 2003). Las sensilias olfativas se encuentran en las antenas aunque también pueden estar alojadas en sectores de la boca, las patas, etc. (Snodgrass, 1984; Chapman, 1998). Entre los órganos sensoriales vinculados con la olfacción podemos mencionar las sensilias olfativas que presentan diferentes formas: placoideas, chaéticas, basicónicas y tricoideas. Estas estructuras contienen a neuronas receptoras que detectan volátiles (neuronas receptoras olfativas, NRO), que se encuentran bañadas de hemolinfa y sus terminales dendríticas están protegidas por una linfa secretados por células accesorias que presentan proteínas, muco-polisacáridos, iones y las mismas sustancias odoríferas que han sido retenidas en ese medio.

En todos los sistemas olfativos existe un proceso de transducción que convierte la señal de un olor en actividad eléctrica. Cuando la molécula odorante pasa a través de los poros de las sensilias es capturada por una proteína de unión (*olfactory binding protein*), la cual en estado reducido se une a la molécula odorífera transportándola hasta los receptores ubicados en la membrana de la dendrita (Lerner *et al.*, 1990; van den Berg y Ziegelberger, 1991). Esto causa la excitación de la NRO y la oxidación de la proteína. Finalmente la molécula liberada a la linfa es degradada por enzimas catalíticas luego de su unión con el receptor de membrana (Ziegelberger, 1995). La estimulación del receptor olfativo transmembrana, resulta a la vez en la activación de una proteína G y la generación de segundos mensajeros por la acción de la adenilato

ciclasa que activan canales iónicos generando una señal eléctrica (Hildebrand y Shepherd, 1997).

Los impulsos nerviosos así generados son conducidos a través del nervio antenal hasta el lóbulo antenal (LA). El lóbulo antenal es un centro de integración olfativa y está organizado en subunidades funcionales llamadas glomérulos. Estos son el resultado de la convergencia de NRO y de otras neuronas como las de proyección o las interneuronas (Hildebrand y Shepherd, 1997). En distintas especies de insectos, el número de glomérulos es variable y se correlaciona con el número de neuronas aferentes presentes, NRO, de interneuronas y de neuronas de proyección; así por ejemplo se encuentran 125 glomérulos en *Periplaneta americana*, 60 en *Manduca sexta*, 40 en *Drosophila* y 1000 en *Locusta migratoria*.

En la abeja *Apis mellifera* pueden encontrarse 160 glomérulos por LA que reciben señales de aproximadamente 60000 axones quimio-sensoriales, los que se conectan aproximadamente con alrededor de 4000 interneuronas responsables de vincular a los glomérulos entre sí y a unas 800 neuronas de proyección (neuronas eferentes) que conducen la información a centros de procesamiento superior como el protocerebro lateral o los cuerpos pedunculados. En estos centros de procesamiento superior no sólo se procesa información olfativa, sino que también se reciben información de otros sistemas sensoriales, como el visual y el táctil (Figura 1.6).

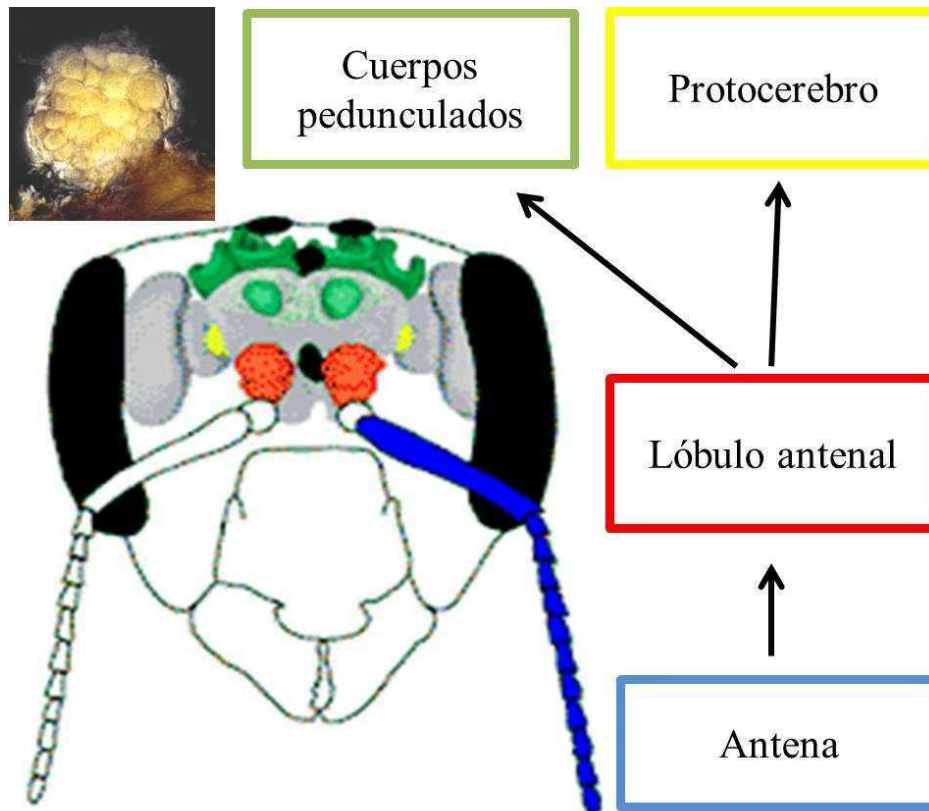


Figura 1.6: Esquema del cerebro de la abeja. Antenas (azul), lóbulo antenal (rojo), protocerebro (amarillo) y cuerpos pedunculados (verde). En el detalle se puede observar una fotografía tomada bajo un microscopio confocal de un lóbulo antenal con los glomérulos dorsales. Crédito fotográfico: Dr. Andrés Arenas (2009).

En los glomérulos se evoca un patrón espacial de actividad característico ante la presentación de un olor; hecho que permitiría a los animales codificar la información olfativa de su entorno (Friedrich y Korsching, 1997; Joerges *et al.*, 1997; Galizia *et al.*, 1998; 1999; Sachse *et al.*, 1999; Rubin y Katz, 1999; Uchida *et al.*, 2000; Carlsson *et al.*, 2002; Sachse y Galizia, 2002). Estos patrones de actividad glomerular son relevados en los LA, donde comienza su decodificación. Luego, la información

parcialmente procesada se dirige hacia centros de procesamiento superior, como los cuerpos pedunculados y el protocerebro lateral, en donde se integra con información proveniente de otras modalidades sensoriales. Los cuerpos pedunculados son neuropilos pares del protocerebro que reciben información sensorial procesada desde regiones olfativas y visuales del cerebro en una región de dendritas llamada el cáliz. Estos centros de procesamiento han sido vinculados con el aprendizaje olfativo y la formación de memorias de olores (Erber *et al.*, 1980; Davis, 1993; De Belle y Heisenberg, 1994; Davis *et al.*, 1995; Hammer y Menzel, 1995).

1.3.1. La abeja *Apis mellifera*: un modelo experimental con implicancias a escala social

La abeja *Apis mellifera* es una de las especies de abejas con mayor distribución en el mundo (Michener, 1974) que pertenece al grupo de insectos que presentan un alto grado de sociabilidad. Dentro de las colonias de los insectos eusociales se realizan actividades con un alto grado de coordinación que involucra a un gran número de individuos. Por ejemplo, actividades como la recolección de recursos, en la cual los individuos que obtienen el recurso en el exterior no son los mismos que se encargan de su procesamiento y almacenamiento en el interior del nido (Oster y Wilson, 1978). Así, el éxito en las tareas realizadas en estas sociedades animales dependerá no sólo de la eficacia individual, sino también de la tarea coordinada de todos los individuos involucrados (Wilson, 1971).

Las abejas son capaces de percibir formas (Srinivasan, 1994; Giurfa y Lehrer, 2001); de estimar distancias recorridas (Srinivasan *et al.*, 1997); así como también tienen la habilidad de distinguir un amplia gama de olores (Vareschi, 1971). En su contexto natural, las abejas poseen la habilidad de aprender y memorizar claves (visuales, olfativas, etc.) características de los lugares de interés, como la colonia o sitios de recolección de alimento (Menzel, 1985; Menzel *et al.*, 1999).

La coordinación de tareas es la clave del éxito de las distintas actividades que realicen las abejas y para ello es fundamental la transferencia de información. Las abejas cuentan con sofisticados sistemas de comunicación en donde se evidencia la transmisión de señales, que involucran mayormente las de tipo acústico vibratorias y olfativas (Bradbury y Vehrencamp, 1988). Además de la muy conocida y estudiada danza de las abejas (von Frisch, 1967), estos insectos establecen una enorme cantidad de interacciones interindividuales dentro de las colmenas que les permiten intercambiar información. Estas interacciones abarcan desde contactos corporales, antenales y boca a boca (trofalaxia) (Figura 1.7). En un contexto de recolección de alimento, los contactos trofalácticos, por ejemplo, permiten establecer asociaciones entre el néctar entregado y el olor de ese alimento dentro de la colmena (Farina *et al.*, 2005; Gil y de Marco, 2005; Farina *et al.*, 2007).



Figura 1.7: Abejas obreras transfiriéndose alimento mediante contactos boca a boca (trofalaxia).
Créditos de la imagen: AlexWild www.alexanderwild.com).

1.3.2. La organización de una colmena de abejas *Apis mellifera*

Como mencionamos anteriormente, las abejas son insectos eusociales, es decir, que presentan división reproductiva del trabajo, cooperación del cuidado de la cría y solapamiento de generaciones que contribuyen a las tareas dentro de la colonia

(Wilson, 1971). Dentro de las colmenas de abejas melíferas encontramos distintas castas reproductivas: la reina, los zánganos y las obreras, todas ellas fácilmente distinguibles y capaces de especializarse en determinadas tareas y roles que contribuyen al mantenimiento y crecimiento de la colonia (Wilson, 1971) (Figura 1.8).

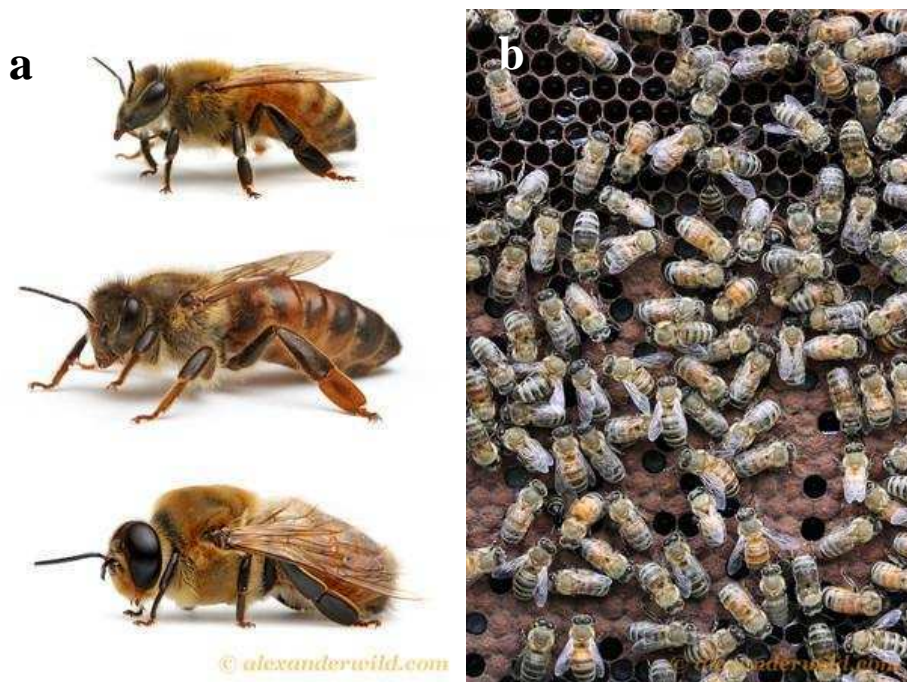
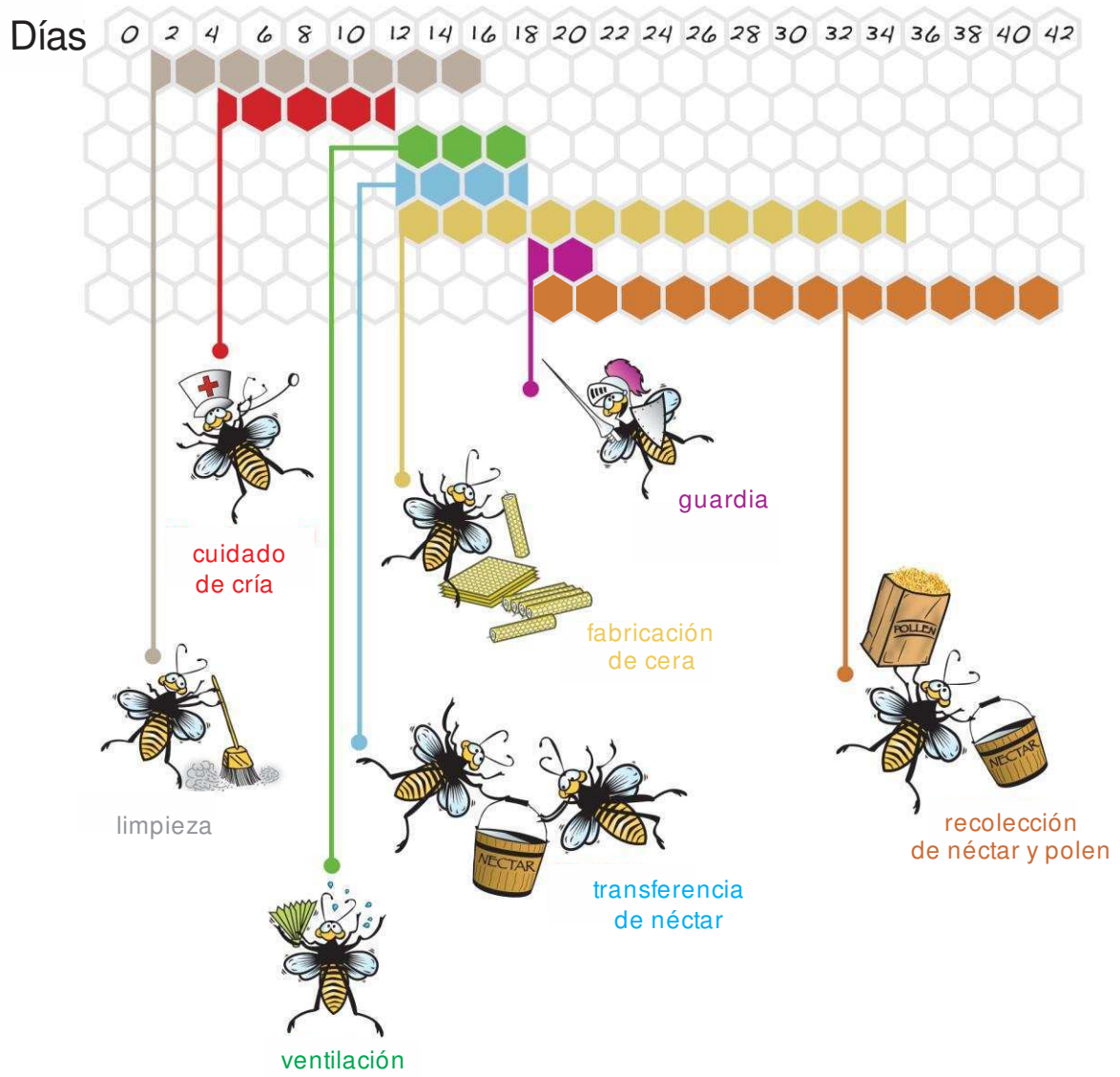


Figura 1.8: a) Abeja obrera, reina y zángano. b) La casta obrera es la más numerosa.
Créditos de las imágenes: AlexWild www.alexanderwild.com.

En las colonias de estas abejas sociales sólo existe una hembra sexualmente funcional, la reina, que puede ser fecundada en sus vuelos nupciales por varios

machos (zánganos). Luego de la etapa de apareamiento, para la reina ya fecundada, se inicia la continua y sostenida puesta de huevos que garantizará el crecimiento y supervivencia de la colonia durante varios años. Además, la reina se encargará de mantener la cohesión de la colonia a través de sus feromonas. Esta cohesión es indefectiblemente necesaria para lograr una óptima coordinación de tareas dentro de la colonia (Seeley, 1995).

El otro grupo reproductivo de la colonia está compuesto por los machos (zánganos), cuya única función es precisamente la de aparearse con reinas vírgenes de otras colonias. El tercer grupo, es el de la casta de hembras estériles, representado por las obreras. Esta casta muestra un alto grado de coordinación y, a su vez, de descentralización en la realización de tareas dentro y fuera del nido. Las tareas que realizan las obreras se organizan en torno a la edad, debido al fenómeno denominado polietismo etario (Wilson, 1980). Mediante este fenómeno las obreras progresan en una serie de tareas programadas según avanzan en edad (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982). De manera generalizada, pero con una alta probabilidad de ocurrencia, las más jóvenes se encargan del cuidado de la cría, de la reina y de la limpieza del nido. Las de edad intermedia reciben y procesan el alimento que ingresa a la colmena y, finalmente comienzan a realizar tareas en el exterior: recolectar recursos y defender el nido (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982) (Figura 1.9) En condiciones naturales, el polietismo permite a la colonia realizar diversas tareas en forma simultánea y coordinada sin la necesidad de que existan jerarquías operativas (Winston, 1987).



17 días de vida las obreras comienzan con las tareas fuera del nido que por su complejidad requieren muy buenas habilidades cognitivas. Fuente de imagen (4).

La recolección de recursos es una de las tareas que las obreras realizan de manera coordinada y eficiente. El alimento líquido obtenido de las flores es transportado por las abejas recolectoras dentro de su buche hasta la colmena; allí ese néctar es transferido a otras obreras (von Frisch, 1967). Una vez en la colonia, el mismo se distribuye rápidamente y se inicia así su procesamiento a miel. Estas tareas poseen distintos niveles de coordinación grupales, que son modulados por factores individuales como los umbrales de respuesta (Lindauer, 1952) y las habilidades cognitivas de las abejas involucradas en la transferencia de néctar dentro de la colmena (Ribbands, 1955).

Todas estas tareas ocurren en la cavidad donde cohabitan miles de individuos (von Frisch, 1967). El ambiente de la colmena podría caracterizarse como un ambiente reducido, parcialmente aislado, en donde los individuos se encuentran confinados durante un periodo prolongado de sus vidas adultas y la totalidad de sus estadios juveniles. A pesar del confinamiento, los individuos que no entran en contacto directo con el exterior pueden intercambiar recursos e información con los que sí tienen acceso. Por ejemplo, en el caso de las obreras que reciben el néctar que traen las recolectoras. Cabe recordar que las demás tareas coordinadas (cuidado de cría, almacenamiento de alimento, construcción de celdas, etc.) entre obreras también se llevan a cabo dentro de la colmena (von Frisch, 1967; Seeley, 1995). En consecuencia las experiencias vividas por las abejas en este ambiente podrían modular tanto las tareas que realicen dentro como fuera de la misma.

1.3.3. La importancia de la percepción olfativa en la vida social de la colmena

Considerando la numerosa cantidad de olores que circulan en su interior, las colmenas de abejas *Apis mellifera* son el ámbito en donde se conforma el primer universo perceptual olfativo de cada individuo. En este contexto las obreras pueden aprender olores vinculados a recompensa (Farina *et al.*, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2007) que incluso pueden recordarse por periodos prolongados (Farina *et al.*, 2005, Arenas y Farina, 2008; Grüter *et al.*, 2009). Sin embargo, dentro de las colmenas de abejas melíferas, no todo el alimento recolectado se encuentra accesible para todos los individuos. Por lo cual, la presencia de volátiles florales bien podría afectar procesos cognitivos ulteriores de las abejas melíferas. Este efecto podría observarse mediante una mejora en las capacidades cognitivas de naturaleza asociativa al presentarse ese olor (priming sensorial, Schacter y Buckner, 1998; Giurfa, 2003) o mediante la inhibición de esas habilidades al presentar el mismo olor (inhibición latente, Lubow y Moore, 1959; Lubow, 1973; Abramson y Bitterman, 1986; Chandra *et al.*, 2000). Esta situación podría ocurrir dentro de la colonia cuando las abejas que solo percibieron volátiles florales ahora tienen un acceso efectivo a un tipo de alimento con ese aroma. El fenómeno de aprendizaje que podría enmarcar esta situación es la inhibición latente (IL), en donde los individuos sometidos a un condicionamiento olfativo muestran una adquisición más retardada frente a la presentación del estímulo condicionado (EC) si el mismo ha sido previamente expuesto sin el pareo del correspondiente refuerzo (Lubow, 1973).

1.4. Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta tesis es evaluar el rol de la exposición de volátiles sobre el aprendizaje apetitivo bajo diferentes contextos conductuales así como sus efectos en diferentes edades de la abeja obrera adulta.

Nuestros objetivos e hipótesis particulares son:

- 1) Estudiar cómo los volátiles florales que circulan en la colmena pueden afectar la toma de decisiones de las abejas durante la recolección. Nuestra hipótesis es que las experiencias olfativas no asociadas al alimento sesgan negativamente la elección del sitio de recolección cuando éste se presenta en ese contexto comportamental.
- 2) Evaluar el efecto de los volátiles florales sobre la discriminación olfativa en abejas de colmena. Encauzaremos nuestro estudio en el posible efecto de esta preexposición sobre las distintas edades de las abejas de la casta obrera criadas en un ámbito natural como es una colmena. Nuestra hipótesis es que el efecto sobre la discriminación de olores es distinto según la edad de la obrera al momento de la exposición.
- 3) Evaluar el efecto de los volátiles florales sobre la discriminación olfativa en abejas confinadas bajo condiciones de cría controladas. Para poder caracterizar los efectos sobre la discriminación de una preexposición olfativa es necesario poder controlar el mayor número posible de variables.

Por ello, centramos nuestro estudio en abejas confinadas (criadas bajo condiciones controladas de laboratorio), en donde evaluaremos el efecto de una exposición olfativa sobre la discriminación de olores según distintos protocolos de exposición; ya sea modificando el intervalo de tiempo entre la exposición y la evaluación, la intensidad del volátil presentado o la duración de dicha exposición. Planteamos como hipótesis que la reducción entre la exposición del volátil y la evaluación, el incremento de la concentración del volátil y la prolongación de su exposición, hacen más evidente el fenómeno de IL.

- 4) Evaluar el efecto de una preexposición olfativa temprana sobre la discriminación olfativa a edades recolectoras. Conduciremos experimentos que nos permitan evaluar si las experiencias olfativas no asociadas al alimento durante edades tempranas del adulto (de 1 a 12 días de edad) evidencian un efecto a edades recolectoras (17 días de edad). Nuestra hipótesis es que el efecto sobre la discriminación de olores a edades recolectoras es distinto según la edad de las abejas al momento de la exposición olfativa.

- 5) Determinar las vías aminérgicas involucradas en el fenómeno de IL en la abeja *Apis mellifera*. Para desarrollar este objetivo consideraremos la participación de algunas de las aminas biogénicas que, se sabe, cumplen un rol importante en la modulación de la conducta de los invertebrados: Octopamina (OA), Dopamina (DA) y Serotonina (5HT) (Kravits, 1988; Bicker y Menzel, 1989; Erber *et al.*, 1993; Roeder, 1999; Blenau *et al.*, 2001;

Kravitz y Huber, 2003). Nuestra hipótesis es que alguna de las tres aminas (OA, DA y 5-HT) cumple un rol fundamental en el fenómeno de inhibición latente, cuando éste es evaluado en el paradigma de extensión de probóscide.

2

2. Materiales y métodos generales

En esta sección se describen los procedimientos experimentales de manera general. Luego en cada capítulo se describirá en detalle el procedimiento de cada experimento. Esta tesis se llevó a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Para cumplir con los objetivos planteados, se llevaron a cabo experimentos utilizando abejas de la especie *Apis mellifera*. En cada situación experimental se detallará si las abejas utilizadas fueron obreras adultas obtenidas de colmenas en una situación natural o criadas en laboratorio.

2.1. Situación natural y cría de abejas en laboratorio

Las colmenas experimentales: a) colmenas de observación o b) colmenas tipo Langstroth, fueron obtenidas del apiario de la FCEN-UBA. Las primeras fueron reducidas a cuatro cuadros de cría, con 1000 obreras aproximadamente cada uno, cría y una reina fecundada; las segundas fueron colmenas de dos cuadros que contenían aproximadamente 4000 obreras, cría y una reina fecundada (Figura 2.1).

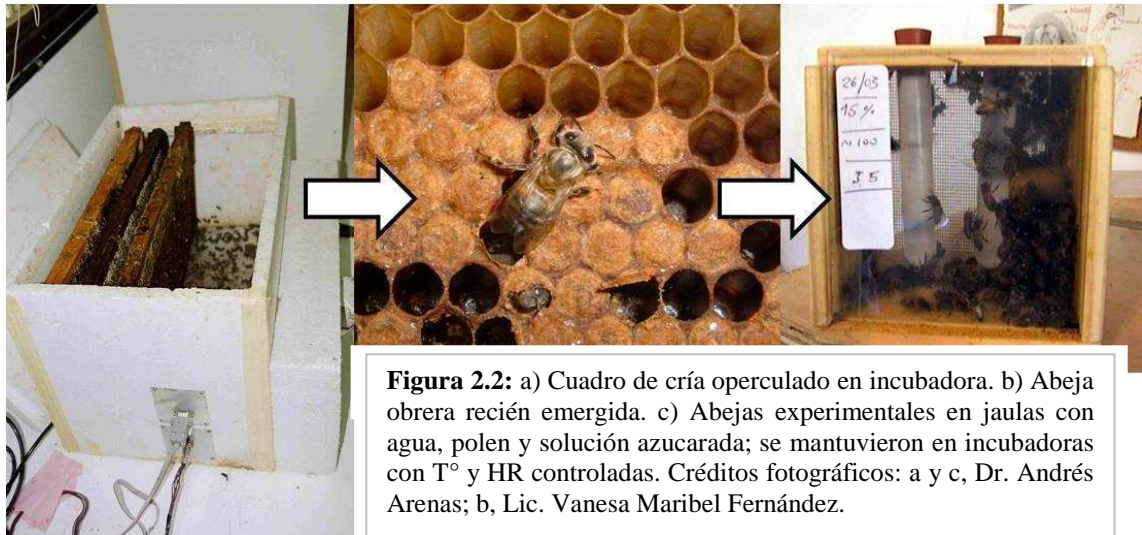


Figura 2.1: a) Colmena de observación con dos cuadros y paneles de acrílicos móviles; b) Colmena tipo Langstroth, con cuatro cuadros. Créditos fotográficos: Dr. Christoph Grüter.

Las colmenas de observación constaban de dos cuadros ubicados uno sobre el otro de manera frontal y sujetos por un marco de madera y cubiertos por paneles de acrílicos móviles. Cada cuadro tenía dos paneles de acrílico, uno por cada cara. Estos paneles se deslizaban de derecha a izquierda y viceversa sobre varillas de madera. A su vez, los paneles contenían una estructura de acrílico, rectangular (4 cm x 55 cm) que contenía en el centro un tubo del mismo material (4 cm de diámetro) con una abertura que permitía el acceso al interior de la colmena. Toda esta estructura se desplazaba hacia arriba y abajo. Esta abertura permanecía cerrada con un tapón de goma espuma que sólo se quitaba si se debían capturar (mediante succión con una manguera plástica) algún individuo en particular para la situación experimental. Las colmenas de observación estaban ubicadas en el interior del laboratorio y se comunicaban al exterior mediante un orificio en la pared, y así quedaba del otro lado la entrada de la piquera. Asimismo en esta entrada se colocó un dispositivo de acrílico que funcionaba de antecámara de la entrada y permitía, además, realizar las estimulaciones olfativas cuando fuera necesario (se dará el detalle de estas estimulaciones en los capítulos correspondientes).

Cuando fue necesario controlar la edad de las abejas, debimos criarlas en el laboratorio. Para ello, se recogieron cuadros de cría operculada (celdillas de cría cerradas) de las colmenas del apiario experimental, que fueron colocados en una incubadora bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (36 °C y 55 % HR) hasta su emergencia como adultos. Cada 24 horas, los cuadros eran revisados y los individuos que emergían eran marcados (cuando fuera necesario) y recolectados en jaulas. Estas jaulas consistían en cajas de madera de 10 cm x 10 cm que presentaban una malla plástica y orificios donde se colocaron los alimentadores. De este modo, los individuos no tenían más de un día de edad al momento de

introducirlos en las jaulas. Las abejas confinadas de esta manera, todas de la casta obrera, fueron alimentadas con solución de sacarosa 50 % p/p sin aromatizar, polen y agua hasta el momento de la estimulación (Figura 2.2). El alimento líquido (solución azucarada) y el agua, fueron ofrecidos en tubos de ensayo plásticos a los cuales se les había realizado una pequeña perforación para que los individuos, de a uno por vez, introdujeran sus probóscides y se alimentaran de ella. El polen fue disuelto con unas gotas de agua y luego ofrecido como una “pasta” en un tubo plástico, por un orificio lateral en la jaula. Estas jaulas eran colocadas en una incubadora, en oscuridad, con temperatura y humedad relativa controladas (32 °C y 55 % HR). Con el uso de esta metodología fue factible conocer la edad de los individuos en todo momento, ya que se registró la fecha en la cual emergieron.



2.2. Condicionamiento diferencial de respuesta de extensión de probóscide (REP)

Durante esta tesis se estudió el aprendizaje olfativo mediante la respuesta de extensión de probóscide (REP, Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). Para ello las abejas experimentales fueron anestesiadas en frío (4 °C) y amarradas en tubos metálicos, de manera tal que sólo pudieran mover libremente sus mandíbulas y antenas. Luego de amarrarlas se las alimentó con una gota de solución azucarada 1.8 M (50 % peso/peso) y se las mantuvo en una incubadora (32 °C, 55 % HR y oscuridad) durante dos horas. Las abejas amarradas fueron sometidas a un protocolo de condicionamiento diferencial en donde dos olores puros fueron presentados (Bitterman *et al.*, 1983), uno recompensado (estímulo condicionado recompensado, EC+) con solución de sacarosa 50 % de peso/peso (estímulo incondicionado, EI) y el otro no recompensado (estímulo condicionado no recompensado, EC-). En éste tipo de condicionamiento el individuo, debe aprender a discriminar entre los dos estímulos y a asociar sólo uno de ellos a la recompensa (Giurfa, 2003). Además, requerir una respuesta a uno de los estímulos y una no-respuesta al otro, permite descartar la presencia de fenómenos de aprendizaje no asociativo, como la sensibilización que generarían un aumento indiscriminado en la respuesta a ambos estímulos (Hammer y Menzel, 1995). Para presentar los olores se utilizó un dispositivo con una corriente de aire continua (50 ml/s); este flujo fue presentado directamente sobre la cabeza de cada individuo a través de un tubo (1 cm Ø) ubicado frente a cada abeja a 2 cm. Un papel de filtro (30 x 3 mm) colocado dentro de la jeringa fue impregnado con olor puro (4 µL). El compuesto volátil fue entregado por una corriente de aire secundaria (2.5 ml/s) inyectado en la corriente de aire principal al momento de ser presentado (Figura 2.3).

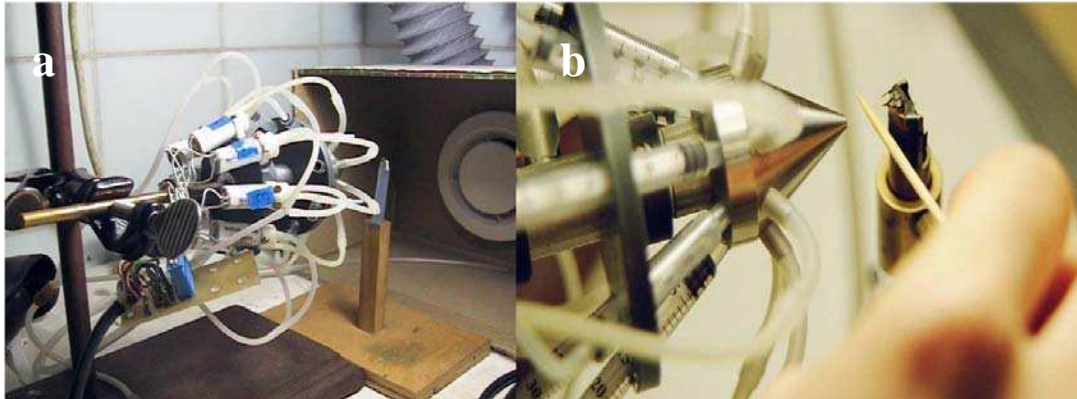


Figura 2.3: Dispositivo para evaluar la respuesta de extensión de probóscide (REP). a) Se observa el cañón con sus respectivas válvulas que permiten el paso de un flujo controlado de aire (limpio o con olor); un extractor de aire ubicado detrás de la salida de los olores, para evitar la contaminación del ambiente. b) Abeja encephada y ubicada en el dispositivo. Se observa cómo al tocar sus antenas con solución azucarada extiende la probóscide. Crédito fotográfico: Dr. Christoph Grüter.

Las abejas fueron expuestas a los dos estímulos olfativos una determinada cantidad de veces (en forma balanceada, es decir mismo número de veces para el estímulo recompensado como para el estímulo no recompensado). En el desarrollo de esta tesis, para la mayoría de los experimentos los dos estímulos olfativos fueron presentados diez veces en total: cinco cada uno en un orden pseudoaleatorio (EC-, EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+, EC+, EC-). Entre cada presentación de estímulos (ensayos) el intervalo temporal fue de 10-15 min.; el mismo intervalo fue mantenido entre la última presentación de EC y la evaluación (Tabla 2.1).

Condicionamiento Diferencial											
EC+: olor A y EC-: olor B											
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	T	T
B-	A+	A+	B-	B-	A+	B-	A+	A+	B-	A/B	B/A

Tabla 2.1: Protocolo de presentación de olores en un condicionamiento diferencial. Dos olores son presentados 10 veces (ensayos) de manera pseudo aleatoria. Un olor actúa como estímulo condicionado recompensado (EC+: olor A) y otro olor como estímulo condicionado no- recompensado (EC-: olor B). En la evaluación (T) se registran las REP para ambos olores de manera aleatoria.

Sólo aquellas abejas que demostraron tener una respuesta incondicionada (reflejo de extensión de probóscide ante la aplicación de solución de sacarosa de 50 % de p/p sobre sus antenas) y aquellas que no respondieron al estímulo de la corriente de aire (respuesta mecánica) fueron utilizadas para el condicionamiento. Durante el protocolo de condicionamiento un extractor de aire se mantuvo en funcionamiento, con el fin de eliminar los posibles volátiles que quedasen en el ambiente, y evitar, de esta manera, la contaminación del medio circundante a los sujetos experimentales con dichos volátiles. Previo a cada presentación, los individuos fueron colocados durante 15 segundos en el dispositivo frente a la corriente de aire, para familiarizarlos con el sistema y comprobar que no presenten respuesta mecánica. Cada ensayo tuvo una duración de 40 segundos, en donde la presentación del olor (EC) fue de 6 seg. Tres segundos luego del inicio del EC se presentó un refuerzo positivo: solución de sacarosa 1.8 M). Al final del condicionamiento se realizó una evaluación de lo

aprendido: 15 minutos luego de haber terminado el condicionamiento se les presentaban a las abejas ambos olores (EC+ y EC-) sin recompensarlos.

2.3. Estimulaciones olfativas

Las estimulaciones olfativas realizadas en cada experimento serán detalladas en los correspondientes capítulos experimentales; aunque cabe aclarar que en todos los experimentos de esta tesis se trabajó con dos olores puros: linalol y fenilacetaldehído. Desde el punto de vista químico estos dos olores pertenecen a dos grupos funcionales distintos: terpenos (linalol) y aldehídos (fenilacetaldehído); con distintas presiones de vapor, largo de cadena carbonada y estructura (Tabla 2.2). En lo que respecta a su distribución en la naturaleza, ambos se encuentran dentro de los compuestos florales más comunes y ampliamente distribuidos (Kudsen *et al*, 1993).

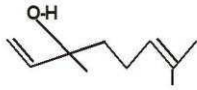
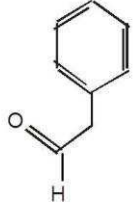
Grupo funcional	Compuesto	Estructura	Largo de la cadena carbonada	Presión de vapor (mmHg-25°C)
Terpeno	Linalol		10	0.16
Aldehído	Fenilacetaldehído		8	0.392

Tabla 2.2: Grupos funcionales, estructuras químicas, largo de cadena carbonada y presión de vapor de los olores utilizados en esta tesis. Linalol y fenilacetaldehído son olores que se encuentran muy distribuidos entre las especies florales (Knudsen et al., 1993).

2.4. Análisis estadístico

Para estudiar las respuestas de extensión de probóscide en los condicionamientos, calculamos por individuo un índice de discriminación (ID) obtenido como la diferencia entre la respuesta al EC+ menos la respuesta al EC- para cada par de ensayos ($ID = EC+ - EC-$). Este índice fue analizado a lo largo de los pares de ensayos del condicionamiento y en la evaluación (15-min luego de finalizar el condicionamiento).

El ID obtenido durante la etapa de entrenamiento fue estudiado mediante un análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA-MR) utilizando un nivel de

significación del 5 %. Es factible aplicar este tipo de pruebas para el análisis de datos dicotómicos cumpliendo con ciertos requisitos: que los grados de libertad del error sean mayores o iguales a 40 (Lunney, 1970) y el diseño sea balanceado. Si la interacción entre los factores resultó significativa, realizamos el análisis de efectos simples; seguidos de ser necesario, por comparaciones de Tukey. Por otro lado en aquellos casos donde la interacción no resultó significativa, pero sí lo hicieron algunos de los factores principales, se realizaron comparaciones *post hoc* de Dunnet.

En aquellos experimentos en donde nos interesó estudiar el ID en la evaluación (Test 15-min) se llevó a cabo un análisis de frecuencias del tipo de homogeneidad (test de G) o una prueba exacta de Fisher. En el primer caso, en caso de presentarse diferencias significativas, se realizaron *a posteriori* comparaciones múltiples planeadas (corrigiendo el nivel de significación según Dunn Sidak, $\alpha' = 1 - (1 - \alpha) 1/k$ donde “k” representa la cantidad de comparaciones) entre cada grupo y el control (Sokal y Rolf, 2000).

3

3. Las experiencias con olores florales dentro de la colmena afectan las preferencias recolectoras en la abeja *Apis mellifera*

3.1. Introducción

Como hemos visto en la introducción de esta tesis, las claves olfativas juegan un rol relevante en los insectos durante la búsqueda de alimento. Además, las decisiones tomadas durante esta actividad pueden ser influenciadas por las experiencias previas de cada sujeto (Ribbands, 1955; von Frisch, 1967; Giurfa *et al.*, 1995, Arenas *et al.*, 2007). Las abejas muestran la habilidad de discriminar claves olfativas relacionadas a una recompensa redituable de aquellas que no lo son (Menzel, 1999); capacidad que permite optimizar la recolección de recursos. Sin embargo, estas

claves olfativas no son exclusivamente aprendidas en el campo (parches florales) sino que, también pueden ser aprendidas dentro del nido. Así, en el contexto social de la colmena, los olores del néctar circulante pueden ser utilizados para reclutar a compañeras de nido hacia fuentes de alimento en el campo (en abejas: von Frisch, 1923; Wenner *et al.*, 1969; Arenas *et al.*, 2007; en abejorros: Dornhaus y Chittka, 1999; en avispa: Jandt y Jeanne, 2005; en hormigas: Roces, 1990, Provecho y Josens, 2009). Durante el reclutamiento hacia fuentes de alimento aromatizadas, los individuos de la colmena asocian el alimento líquido que ingresa con su olor, mayoritariamente por contactos boca a boca, trofalaxia (Farina *et al.*, 2005; Gil y De Marco, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2007); a partir de lo cual obtienen cierta información que podría ser utilizada para tomar decisiones durante el forrajeo.

Ha sido demostrado que al estimular una colmena con alimento (solución azucarada) aromatizado con un olor floral, se verifica un sesgo hacia el olor de esa solución, cuando se evalúan las preferencias de las abejas recolectoras en un dispositivo de elección dicotómica (Arenas *et al.*, 2007). Es decir que un olor ofrecido en el alimento circulante dentro de la colmena aumenta la preferencia hacia ese olor, en un contexto recolector de libre vuelo (operante). Además, se ha demostrado que estos efectos pueden ser observados incluso varios días después de haberse realizado la estimulación olfativa (Arenas *et al.*, 2008).

Con respecto a la sola exposición de volátiles florales, sin estar asociados a recompensa, existen trabajos realizados en abejas obreras criadas bajo condiciones de laboratorio, que muestran un efecto inhibitorio al relacionar posteriormente el olor de la exposición con una recompensa (Pham-Délégué *et al.*, 1990; Sandoz *et al.*, 2000). La exposición olfativa pasiva durante etapas tempranas de la vida de las abejas, como adultas y criadas bajo condiciones de laboratorio, promueve un

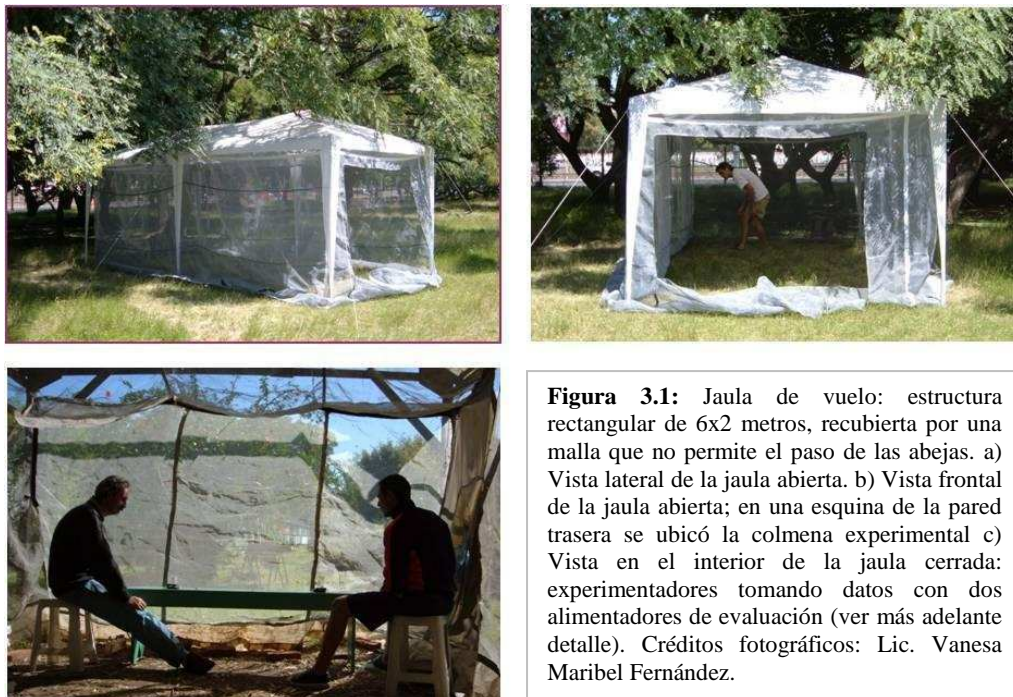
decremento en el rendimiento del aprendizaje; es decir una disminución en la respuesta durante un condicionamiento clásico de respuesta de extensión de probóscide (REP). Esto sugiere un efecto inhibitorio (Sandoz *et al.*, 2000). No obstante, Gerber y colaboradores (1996), luego de haber expuesto a una colmena a la presentación de compuestos volátiles, no detectaron efectos significativos sobre la dinámica del aprendizaje. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la exposición olfativa pasiva no podía ser transferida al contexto clásico de extensión de probóscide (PER).

En este capítulo estudiaremos cómo los volátiles florales que circulan en la colmena pueden afectar la toma de decisiones de las abejas durante la recolección, es decir, a vuelo libre. La hipótesis propuesta es que las experiencias olfativas no asociadas al alimento sesgan negativamente la elección del sitio de recolección cuando se presenta en este mismo contexto los volátiles previamente expuestos. Para poner a prueba esta hipótesis, comparamos los efectos de una clave olfativa (no asociada al alimento que circuló en la colmena) sobre la preferencia de las abejas recolectoras entre el olor preexpuesto, o uno novedoso frente a ningún olor.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Sitio de estudio y animales

Este experimento fue realizado en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O). Las abejas fueron capturadas de las colmenas experimentales (colmenas Langstroth reducidas a cuatro cuadros con 1000 obreras aproximadamente cada uno, cría y una reina fecundada). Durante el desarrollo del experimento, las colmenas fueron mantenidas en una jaula de vuelo; la cual consiste en una estructura de madera rectangular (6 x 3 x 2 metros) que contiene en su interior una malla de polietileno rectangular que cubre todo el volumen de la jaula y con un cierre en uno de sus lados que permite la apertura y cerrado de la misma (Figura 3.1). Durante todo el periodo experimental la jaula permaneció abierta, a excepción de los momentos de entrenamiento y registro de datos (para evitar interferencia de abejas provenientes de otras colmenas). Por lo tanto las abejas fueron capaces al recolectar libremente los recursos en el área circundante.



3.2.2. Estimulación olfativa

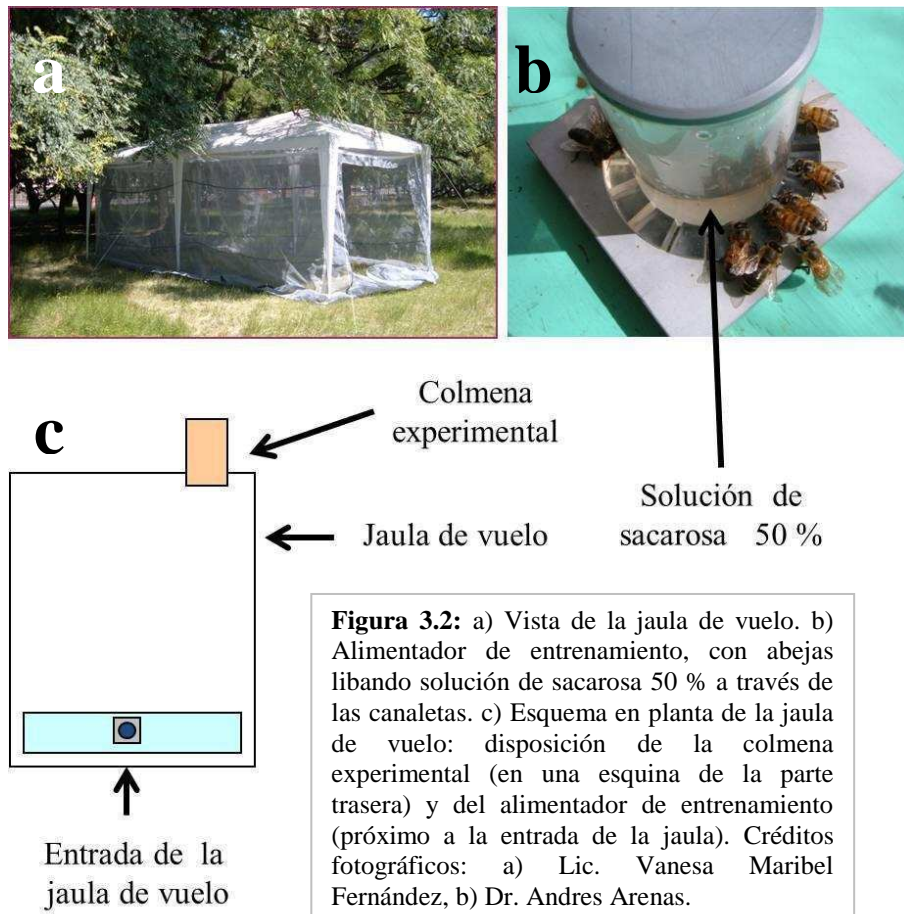
Para determinar si la preferencia hacia una fuente de alimento aromatizado durante la recolección es afectada por una exposición olfativa previa hemos sometido a una colmena de abejas a un estímulo olfativo y luego evaluamos la preferencia de las abejas recolectoras en un contexto operante.

La exposición olfativa a un olor puro (fenilacetaldehído) fue realizada durante cinco días consecutivos. Tres ml de olor puro fueron constantemente ofrecidos en dos

cajas de Petri (20 cm² de superficie de evaporación). Ambas placas de Petri fueron colocadas en la parte inferior de la colmena desde el exterior. Una malla plástica las cubría para evitar que las abejas tengan contacto directo con el olor y evitar de esta manera su ingesta. Una vez finalizado el periodo de exposición olfativa, todos los cuadros e incluso la caja de madera de la colmena fueron sustituidos para evitar la contaminación de olores durante los periodos de no exposición. Los olores utilizados (linalol, LIO, y fenilacetaldehído, PHE) son compuestos naturales, altamente distribuidos en las especies florales (Knudsen *et al.*, 1993); ambos obtenidos de Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania.

3.2.3. Entrenamiento y evaluación

Para poder evaluar la elección de las abejas recolectoras, debimos, en primer lugar, familiarizar y entrenar a los individuos experimentales al área de recolección. Por lo tanto, el experimento fue llevado a cabo en dos etapas: entrenamiento y evaluación. Durante la etapa de entrenamiento las abejas (dentro de la jaula de vuelo) fueron entrenadas a un alimentador artificial *ad libitum* (alimentador de entrenamiento). Éste se encontraba ubicado en el centro de una plataforma de madera (1.6 metros de longitud) ubicada a 6 metros de la entrada de la colmena. Los alimentadores utilizados durante el entrenamiento y el testeo fueron discos de acrílico (6.5 cm de altura, 4 cm de diámetro) invertidos sobre una placa de plexiglás con canaletas dispuestas en forma radial, por donde los individuos tenían acceso al alimento (Figura 3.2).



El alimentador de entrenamiento contenía una solución azucarada no aromatizada 1.8 M (50 % peso/peso), y fue presentado en la jaula de vuelo durante 30 minutos 4 veces por día, varios días (periodo de entrenamiento). Aquellas abejas que fueron entrenadas a las características del alimentador (forma, tamaño, color y ubicación) fueron posteriormente utilizadas para cuantificar preferencias durante la etapa de evaluación. En esta última etapa el alimentador de entrenamiento fue

reemplazado por dos alimentadores similares, para comenzar así la etapa de evaluación.

Los dos alimentadores similares (alimentadores de evaluación) se dispusieron de manera equidistante a unos metros de la colonia sobre la plataforma de madera y a 1.3 m de distancia uno del otro. Las abejas entrenadas que se acercaban al centro de la plataforma de madera (buscando el alimentador de entrenamiento) fueron contadas de acuerdo al alimentador de evaluación que eligieran para aterrizar. Inmediatamente luego del aterrizaje, las abejas fueron capturadas para evitar pseudorréplicas. Los eventos de evaluación tuvieron una duración de 10 minutos y fueron llevados a cabo 4 veces por día, luego de finalizada la fase de entrenamiento y retirado el correspondiente alimentador. Los alimentadores de evaluación fueron rotando en posición para evitar así algún tipo de sesgo. Cada alimentador de evaluación (como así también el de entrenamiento) fue dispuesto sobre una caja de Petri (1 cm de alto y 15 cm de diámetro) cerrada con una malla (55 mm de diámetro). Dentro de la caja de Petri colocamos un papel de filtro; que estaba embebido con 50 μ l de olor puro (alimentador aromatizado con LIO o PHE, según corresponda) o no contenía ningún olor (alimentador sin aromatizar, Arenas *et al.*, 2007; Arenas *et al.*, 2008).

La preferencia recolectora fue estimada a partir del número de abejas que aterrizó en cada alimentador y fue evaluada en tres momentos: antes, durante y luego de la estimulación olfativa pasiva. Un día previo (PRE), 2 y 4 días durante (DURANTE), y 6 y 8 días luego de iniciada la exposición olfativa (POST). La colmena experimental fue estimulada con fenilacetaldéhid (PHE) y luego evaluada en dos situaciones dicotómicas. En la primera, se contabilizaron los aterrizajes en dos alimentadores aromatizados (olor vs olor), uno de ellos con el olor preexpuesto (PHE) y el otro con un olor novedoso (LIO). En la segunda instancia de evaluación se

contabilizaron los aterrizajes en dos alimentadores (olor vs sin olor), uno aromatizado (PHE o LIO) y el otro no (sin olor) (Figura 3.3). Esto fue repetido con otra colmena experimental estimulada con linalol (LIO).

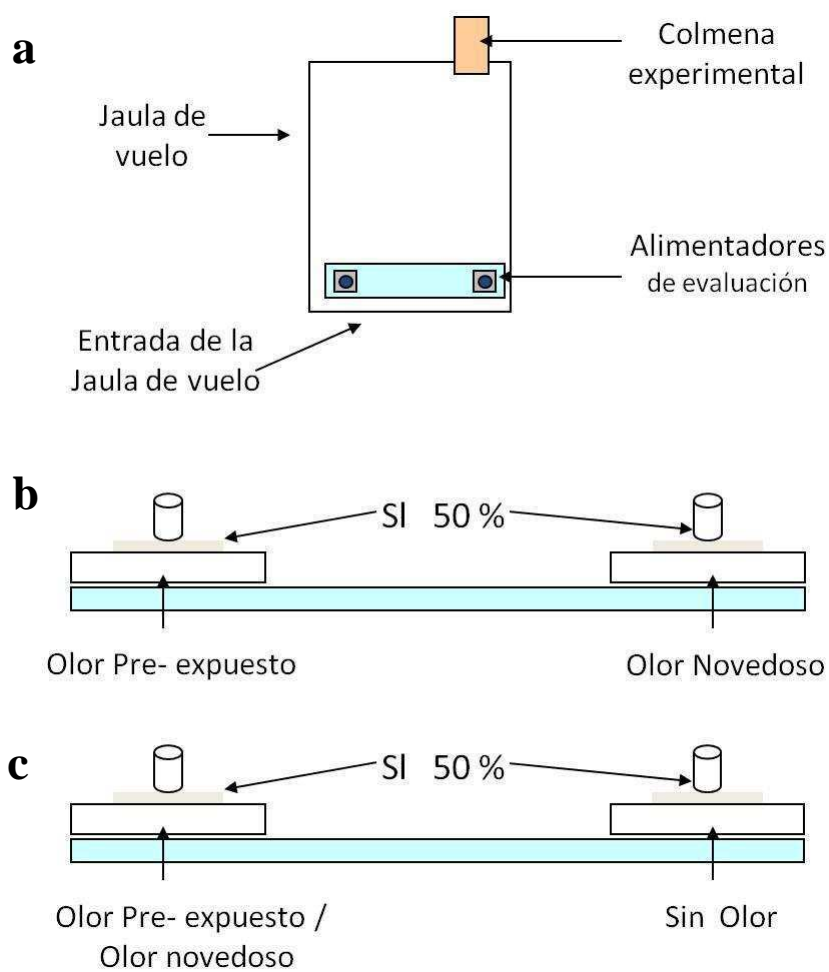


Figura 3.3: a) Vista en planta de la jaula de vuelo con la disposición de la colmena experimental y los alimentadores de evaluación; b) y c) Vista lateral de los alimentadores de evaluación, En una situación experimental se evaluó el olor preexpuesto vs. uno novedoso (b) y en la otra el olor preexpuesto vs. ningún olor (c).

3.2.4. Análisis estadístico

Para ambas situaciones estudiadas (olor vs. olor y olor vs. sin olor) los aterrizajes en los alimentadores fueron comparados a lo largo del tiempo (previa, durante y posteriormente a la estimulación olfativa) utilizando una prueba de homogeneidad de X^2 . Luego llevamos a cabo todas las comparaciones posibles entre los tiempos de evaluación, según el método que utiliza un valor crítico constante, $X^2_{\alpha;(a-1)*(b-1)}$ con $a = 2$ y $b = 3$ (*the simultaneous test procedure*, Sokal y Rohlf, 1995).

3.3. Resultados

3.3.1. Evaluación de preferencias en dos alimentadores aromatizados

En la colmena experimental estimulada con fenilacetaldehído se evaluó la preferencia utilizando el número de abejas aterrizadas como variable, entre un alimentador aromatizado con PHE (olor conocido) y uno con LIO (olor novedoso), a lo largo del tiempo. El número de abejas aterrizadas se cuantificó durante ocho o más eventos de evaluación, en cada uno de los momentos planteados en este estudio (Pre, Durante y Post). Fue necesario realizar mayor número de eventos de evaluación,

debido a que al retirar el alimentador de entrenamiento y colocar los alimentadores de evaluación, las abejas evitaban aterrizar. El número de abejas aterrizadas en ambos alimentadores resultó significativa ($G_n = 8.19$, $p = 0.016$, $GL = 2$, $N = 255$). Estas diferencias se debieron a una disminución en el número de aterrizajes en el alimentador aromatizado con PHE durante la exposición olfativa, con relación al número de aterrizajes registrados antes de dicha estimulación en ese alimentador (contrastes *a priori* Dunn Sidak $p = 0.02$) (Figura 3.4).

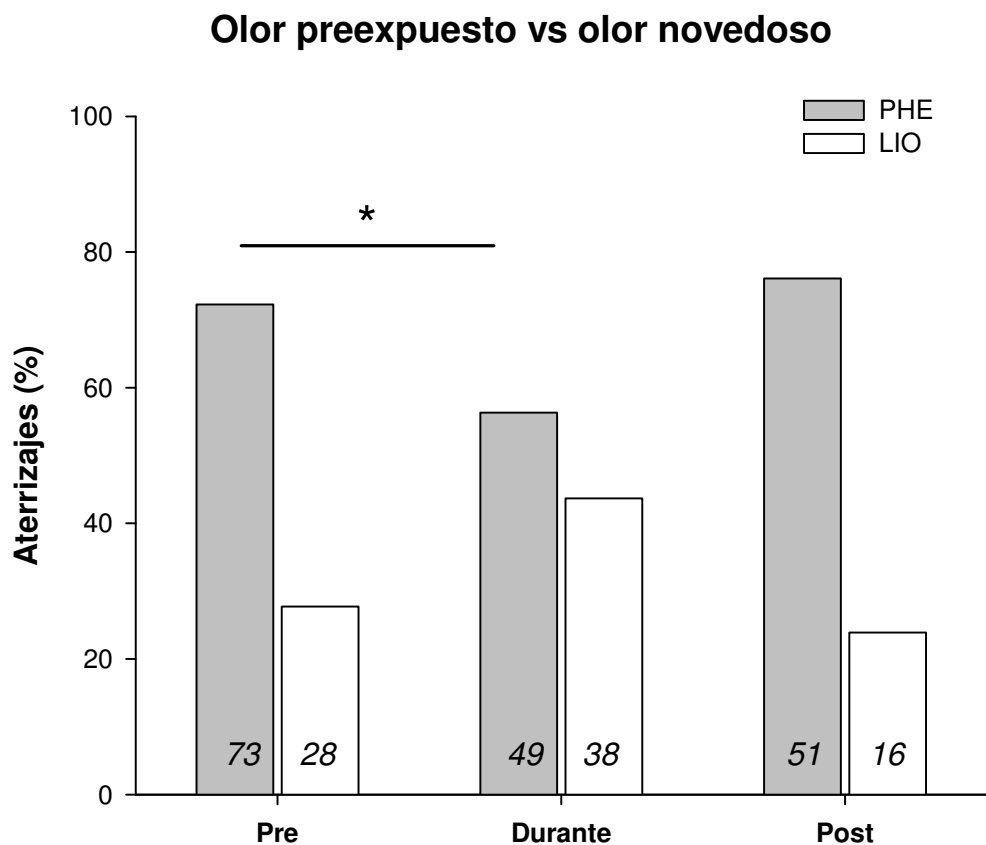


Figura 3.4: Porcentaje de aterrizajes de abejas recolectoras en cada alimentador de evaluación, en tres momentos del experimento: antes (1-2 días previos a la estimulación, Pre), durante (3- 4 días luego de haber iniciado la exposición del volátil en la colmena) y 24 hs luego de haber retirado la fuente de olor y haber reemplazado todos los cuadros de miel, Post). Se cuantificó el número de abejas que aterrizaron en un dispositivo de elección dicotómica, cuando el fenilacetaldehído fue expuesto en el ambiente de la colmena: alimentador con fenilacetaldehído (PHE, olor conocido, en color gris) versus alimentador aromatizado con linalol (LIO, olor novedoso, en color blanco). El número de abejas que aterrizó en cada alimentador se muestra al pie de cada barra. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba de homogeneidad (Test de G, $p < 0.05$).

3.3.2. Evaluación de preferencias en un alimentador aromatizado vs uno sin aromatizar

Con un procedimiento similar al descrito anteriormente se evaluó la preferencia recolectora utilizando el número de abejas aterrizadas como variable, entre un alimentador aromatizado (PHE o LIO) y uno sin aromatizar. El número de abejas aterrizadas se cuantificó durante 4 eventos de evaluación (según lo desarrollado en la sección de *Materiales y métodos*), en cada uno de los momentos planteados en este estudio (Pre, Durante y Post). En todas las instancias del experimento la preferencia hacia el alimento sin aromatizar (alimentador sin olor) fue evidente. Sin embargo cabe destacar que la preferencia hacia LIO (olor novedoso) se mantuvo constante a lo largo del tiempo (LIO, $G_h = 0.56$, $p = 0,75$, $GL = 2$, $N = 309$, Figura 3.5b). Y por el contrario la proporción de individuos que aterrizaron en el alimentador con PHE (olor preexpuesto) disminuyó a lo largo del tiempo (PHE, $G_h = 7.09$, $p = 0,02$, $GL = 2$, $N = 330$, Figura 3.5a). Aquí las diferencias están dadas por el número de abejas aterrizadas antes y después de la estimulación pasiva olfativa ($p = 0.008$).

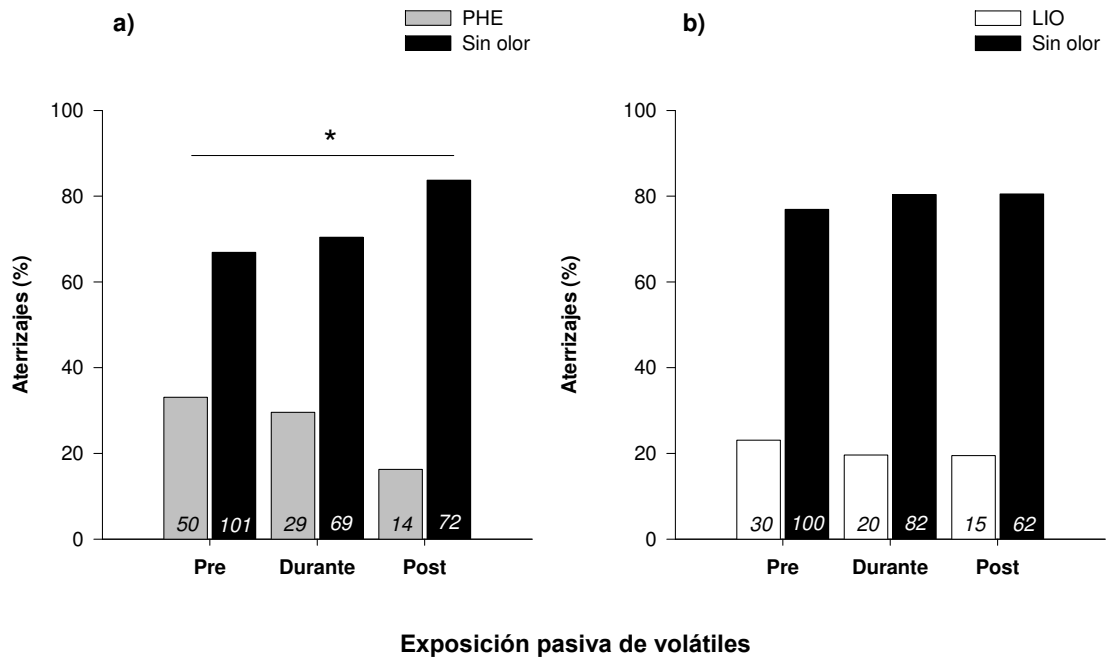


Figura 3.5: Porcentaje de aterrizajes de abejas recolectoras en cada alimentador de evaluación, en tres momentos del experimento: antes (2 y 1 día previos a la estimulación, Pre), durante (2 y 4 días luego de haber iniciado la estimulación olfativa, Durante) y luego de haber finalizado la experiencia olfativa (pocas horas después y 2 días luego de haber retirado la fuente de olor y haber reemplazado todos los cuadros de miel, Post). Se cuantificó el número de abejas que aterrizaron en un dispositivo de elección dicotómica, cuando fenilacetaldéhidó fue expuesto en el ambiente de la colmena: a) alimentador con fenilacetaldéhidó (PHE, olor conocido) versus alimentador sin aromatizar, y b) alimentador con linalol (LIO, olor novedoso) versus alimentador sin aromatizar. Los aterrizajes para LIO están representados en blanco, para PHE en gris y para el alimentador sin aromatizar en negro. El número de abejas que aterrizó en cada alimentador se muestra al pie de cada barra. Los asteriscos indican diferencias significativas en la prueba de homogeneidad (Test de G) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.4. Discusión

Ha sido demostrado que una estimulación olfativa asociada al alimento provoca un sesgo durante la búsqueda de recursos, y un consecuente incremento en la preferencia hacia las fuentes de alimento aromatizadas con el mismo odorante; ya sea manteniendo las reservas aromatizadas (Free, 1969) o no (Arenas *et al.*, 2007). En el estudio de Arenas y colaboradores (2007) la preferencia recolectora hacia el olor de estimulación se extendió durante varios días. Los resultados hallados en este capítulo apoyan la hipótesis relativa a que las experiencias olfativas tienen un papel importante en la búsqueda de alimento, sean estas experiencias recompensadas (asociadas a alimento, Arenas *et al.*, 2007) o no (exposición pasiva de volátiles). Varios experimentos realizados en abejas (Smith, 1993; Sandoz *et al.*, 2001), incluso en abejorros (Laloi *et al.*, 2004) y en polillas (Daly *et al.*, 2001) han demostrado que existen diferencias en los resultados obtenidos con los olores utilizados en este experimento (LIO y PHE); relacionadas en mayor medida a la relevancia biológica de los estímulos en cuestión. Por tal motivo, este experimento fue replicado utilizando otro compuesto (linalol) como olor expuesto en el ambiente de colmena. Sin embargo, los datos de esta serie no serán presentados porque tuvimos varios inconvenientes durante su realización. En primer lugar nuestro experimento se vio afectado por malas condiciones climáticas. Varios días consecutivos de lluvias fuertes imposibilitaron la toma de datos en un contexto recolector. Al mismo tiempo ocurrió una baja de temperatura poco común para la época del año (verano), que provocó una disminución exagerada en el número de viajes de recolección de las abejas de esta colonia experimental. Todos estos inconvenientes climáticos, que no resultaban controlables por nosotros, ocurrieron inmediata e inesperadamente, luego de haberse realizado la

exposición olfativa. En consecuencia, a pesar de tener registros para la situación antes de la estimulación (PRE), los datos están incompletos. Por lo tanto, solo presentaremos para su discusión los resultados registrados para la colmena estimulada con PHE.

Los resultados obtenidos para la situación olor preexpuesto vs. olor novedoso no nos permiten arribar a una clara conclusión del efecto de los volátiles expuestos en el ambiente de la colmena. Una observación cualitativa, pero no por eso menos importante, fue la gran disminución en el número de abejas al cambiar el alimentador de entrenamiento por los alimentadores de evaluación aromatizados (situación olor vs. olor). Esto nos llevó a incrementar el número de eventos de evaluación, aproximadamente al doble de lo descrito en la sección de *Materiales y métodos*. Al trabajar con una colmena que puede recolectar recursos del área circundante libremente no tuvimos el control de muchas variables (olores florales, concentraciones de néctar). Podríamos especular que al momento de realizar la estimulación con PHE existía una preferencia hacia ese olor con relación a LIO (Figura 3.4, situación PRE). Esta preferencia hacia PHE, aunque siguió permaneciendo a lo largo de los eventos de evaluación, parece haber sido afectada en el momento en el que se expuso PHE como volátil no asociado a recompensa (Figura 3.4, situación Durante) y luego recuperada rápidamente al finalizar la estimulación olfativa. Al tratarse de especulaciones, decidimos evaluar la respuesta hacia el olor expuesto como volátil (PHE) y hacia uno novedoso (LIO) con relación a un alimentador sin olor.

En la instancia de evaluación de un alimentador aromatizado y otro sin aromatizar (olor vs. sin olor), las abejas prefirieron siempre el alimentador sin olor al con olor; sin importar si el olor era el preexpuesto (PHE) o uno novedoso (LIO) (Figura 3.5). Creemos que la preferencia hacia el alimentador sin olor podría estar relacionada

con la similitud de éste con el alimentador de entrenamiento. A pesar de que todos los alimentadores (los dos de evaluación) y el de entrenamiento son idénticos en cuanto a forma y color, el de entrenamiento no está asociado a ningún olor. Quizás la ausencia de esta clave olfativa provoque en las abejas una preferencia hacia ese alimentador de evaluación sin aromatizar (con exactamente las mismas características que el alimentador ya conocido).

Los resultados hallados en este experimento muestran la misma tendencia que en Arenas (2010) con relación al alimentador novedoso y al alimentador sin aromatizar. Contrariamente, los aterrizajes cuantificados (en este trabajo y en Arenas 2010) con el olor de la estimulación (en solución o en el ambiente) muestran tendencias opuestas. Por un lado la oferta de un alimento aromatizado incrementó la preferencia hacia ese olor, mientras que la exposición a compuestos volátiles redujo los aterrizajes hacia el alimentador aromatizado. Estos resultados sugieren que las experiencias olfativas que ocurren dentro de la colmena, ya sean asociadas a alimento o no, pueden promover cambios en la recolección de néctar. En ambos casos (exposición olfativa pasiva o pareada al alimento) los individuos fueron capaces de adquirir información relativa al olor (en el interior de la colmena) y luego evocarla en un contexto distinto, pudiendo tomar una decisión en el contexto de recolección (en el exterior de la colmena, en los alimentadores de evaluación). Esta decisión fue tomada sin necesidad de la presencia del olor en el interior de la colmena, dado que al finalizar la estimulación todos los cuadros de reservas e incluso la estructura física de la colmena fueron reemplazados.

La importancia de los resultados hallados en este trabajo radica en una de las primeras evidencias de evitación en el contexto de búsqueda de recursos mediante claves olfativas. Los olores florales que no están directamente vinculados con los

alimentos promueven una reducción en el número de visitas hacia sitios de recolección aromatizados con el mismo olor. Otro trabajo que apoya estos resultados es el de Provecho y Josens (2009) en el que se describe este mismo comportamiento en hormigas. Éste experimento evaluaba la elección dicotómica en un laberinto de “Y” con sus brazos aromatizados con dos olores distintos. Las hormigas que eran evaluadas permanecían previamente en una arena experimental con otra hormiga dadora de solución aromatizada. Cuando estas hormigas dadoras brindaban alimento boca a boca (trofalaxia) a las hormigas experimentales, éstas eligieron el brazo aromatizado con el mismo olor del alimento en el laberinto en “Y”. Contrariamente, si las hormigas experimentales no habían recibido el alimento pero sí habían percibido el olor, por ejemplo vinculado al cuerpo de las dadoras o en la arena experimental, luego en el laberinto elegían el brazo con un olor contrario al de la solución.

La reducción en el número de visitas al alimentador aromatizado con el olor preexpuesto en la colmena (Figura 3.5a) no puede ser explicado sólo por la falta de vinculación entre el olor y la recompensa. Ninguna diferencia en el número de aterrizajes a través del tiempo pudo ser detectada cuando un olor novedoso se presentó en uno de los alimentadores (Figura 3.5b). Por lo tanto, proponemos que un aprendizaje del tipo latente podría ser responsable de la disminución de la respuesta durante y después de la exposición olfativa (Thorpe, 1963). Este resultado plantea la pregunta relativa a si un olor floral expuesto como volátil dentro de la colmena inhibe o facilita la recolección de néctar hacia este tipo de flores en el campo y, de ser así, es debido a una falla o disminución en las habilidades cognitivas de los individuos sometidos a dichas exposiciones. Dada la evidencia experimental hallada, proponemos que los olores expuestos como volátiles, es decir no asociados temporalmente con el alimento, provocarían efectos inhibitorios en una próxima

elección hacia ese olor, empeorando la elección. Podría, incluso, llegar a inhibirla, pero dependería de las claves olfativas utilizadas, la concentración y la historia previa de los sujetos con las mismas.

4

4. Exposición de los volátiles dentro de la colmena y el efecto sobre la discriminación olfativa

4.1. Introducción

El entorno perceptual de los animales presenta una matriz compleja de estímulos de la que deben establecer cuáles pueden ser útiles para sobrevivir, en especial cuáles de estos estímulos les brindan información relevante en relación a la búsqueda y recolección de alimento. Sin embargo, cuando se pretende que un estímulo que ha sido preexpuesto en el ambiente donde habitualmente viven los individuos se asocie luego a una recompensa, resulta difícil establecer este vínculo entre ambos estímulos (el preexpuesto y la recompensa). Lubow y Moore (1959) han demostrado este efecto experimentalmente en cabras y ovejas; en donde la preexposición visual de un estímulo condicionado causó un decremento en el

aprendizaje posterior. Mediante un condicionamiento aversivo, mostraron que las claves preexpuestas no recompensadas (luz intermitente o un rotor que da vueltas) provocaban en los sujetos experimentales una lenta adquisición cuando estas claves se asociaban a un shock eléctrico. Estos resultados han sido interpretados en términos del fenómeno de inhibición latente (IL) (Lubow, 1973). En dicho fenómeno la memoria del primer aprendizaje interfiere con la información del segundo aprendizaje (Lubow, 1973; Bouton y Moody, 2004). Generalmente, la falla o disminución del aprendizaje durante la segunda fase del condicionamiento es atribuida a mecanismos de atención; proceso cognitivo por el cual los sujetos llegan a ignorar un evento que no proporciona ninguna información relevante (Mackintosh, 1975; Pearce y Hall, 1980). De esta manera, los sujetos que han sido preexpuestos a un estímulo condicionado (EC) sin refuerzo, retrasan la respuesta condicionada cuando el EC es apareado con un estímulo incondicionado (EI).

Como mencionamos en la introducción de esta tesis, el efecto inhibitorio provocado por la preexposición no-recompensada de un estímulo sobre el subsiguiente aprendizaje ha sido ampliamente demostrado en vertebrados (por ejemplo, cabras y ovejas: Lubow y Moore, 1959; Lubow, 1965; conejos: Lubow *et al.*, 1968; Reis y Wagner, 1972; perros: Konorski y Szwejkowska, 1952; y ratas: Ackil y Mellgren, 1968; Ackil *et al.*, 1969). Además su efecto también ha sido observado en el sistema olfativo de insectos, utilizando principalmente a la abeja como modelo de estudio. Los primeros experimentos que evidenciaron la IL en abejas fueron bajo un protocolo de perturbación (Abramson y Bitterman, 1986); pero los trabajos más frecuentemente encontrados en la literatura hacen referencia a estudios bajo protocolos de condicionamiento clásico o pavloviano (Getz y Smith, 1991; Sandoz *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001). Estudios realizados bajo

condiciones controladas de laboratorio, con las abejas obreras expuestas a olores, no mostraron ninguna disminución en su habilidad para aprender aquellos olores florales que habían sido preexpuestos; a excepción de algunos compuestos feromonales. (Getz y Smith, 1991). Contrariamente, otros estudios con procedimientos similares evidenciaron una disminución significativa en la tasa de adquisición durante la etapa de adquisición (Chandra *et al.*, 2000; Sandoz *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001).

La exposición de olores volátiles fue estudiada dentro del contexto social de la colmena, en donde se encontró una disminución en la dinámica de la discriminación, durante un protocolo de aprendizaje, entre olores expuestos y no expuestos (Gerber *et al.*, 1996; Chandra *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001). Además, como hemos descrito en el capítulo anterior, los olores expuestos como volátiles dentro de la colmena son posteriormente evitados por abejas recolectoras, cuando son evaluados en un dispositivo de elección dicotómica (capítulo 3 de esta tesis). Aunque el efecto inhibitorio de la exposición pasiva en abejas de un volátil (es decir un olor no asociado a alimento) haya sido discutido, el rol del olor preexpuesto sin recompensa y su efecto a largo plazo dentro de la colonia requieren ser estudiados.

En este trabajo nos preguntamos cómo estos compuestos volátiles afectan el aprendizaje de discriminación de las abejas recolectoras y cuán perdurable es su efecto. Además, la posibilidad de que la exposición al olor no sólo podría reducir la dinámica del aprendizaje sino que también podría facilitar la discriminación entre olores recompensados expuestos y no-expuestos y, así, resultar relevante en insectos sociales donde las claves florales disponibles en el nido podrían ser asociadas al alimento (como un olor diluido en el néctar) o no (por ejemplo, volátiles de la miel almacenada). Considerando las distintas tareas que realizan las obreras en la colonia según su edad, evaluamos los efectos de la preexposición de un olor en función de

distintas edades de las obreras. Las exposiciones no-recompensadas podrían presentar diferencias según el volátil utilizado, ampliando o reduciendo su efecto en función del compuesto volátil. En consecuencia, estudiamos el efecto de una exposición olfativa sobre la discriminación de olores según distintos protocolos de exposición; ya sea modificando el intervalo de tiempo entre la exposición y la evaluación, la intensidad del volátil presentado o la duración de dicha exposición.

4.2. Materiales y métodos

Para evaluar el efecto de olores puros expuestos como volátiles en diferentes condiciones de cría, abejas obreras de la especie *Apis mellifera* fueron sometidas a distintos protocolos de exposición olfativa, ya sea en un medio de cría natural como es una colmena o en situación de confinamiento, en la cual se trabaja con abejas criadas en laboratorio. Las abejas obreras adultas fueron sometidas a un condicionamiento olfativo diferencial utilizando el paradigma de respuesta de extensión de probóscide (REP, Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983).

4.2.1. Sitio de estudio y animales experimentales

Para llevar a cabo este experimento, las abejas (pertenecientes al campo experimental de la FCEN - UBA) fueron capturadas o bien de la entrada de las colmenas experimentales; que fueron reducidas a colmenas Langstroth (cuatro cuadros con 1000 obreras aproximadamente por cada uno, cría y una reina fecundada), o de una colmena de observación de dos cuadros que contiene aproximadamente 4000 obreras, cría y una reina fecundada. Durante todo el periodo experimental estas colonias permanecieron abiertas y las abejas fueron capaces de explorar y recolectar alimento libremente de las fuentes naturales del área circundante. Posteriormente se llevaron a cabo experimentos en una situación controlada de laboratorio, para lo cual se obtuvieron abejas obreras recién emergidas de cuadros de cría (ver detalle en el capítulo *Materiales y métodos* de esta tesis); estas abejas se mantuvieron en incubadoras con temperatura y humedad relativa controladas. Luego, para llevar a cabo la estimulación olfativa correspondiente (según el protocolo experimental) las abejas fueron trasladadas a otra incubadora con las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa. Al finalizar el periodo de exposición olfativa fueron llevadas nuevamente a la primera incubadora hasta el momento del condicionamiento.

4.2.2. Condicionamiento diferencial

El aprendizaje olfativo fue estudiado utilizando la respuesta de extensión de probóscide (REP, Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). Las abejas fueron expuestas a los dos olores puros (linalol y fenilacetaldehído) cada uno de ellos fue presentado cinco veces en un orden pseudoaleatorio (EC-, EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+, EC+, EC-, ver detalles en el capítulo de *Materiales y métodos* de esta tesis). En los experimentos realizados en colmenas los condicionamientos fueron llevados a cabo con ambos olores, por ejemplo si el estímulo condicionado recompensado fue linalol (EC+: LIO) entonces el estímulo condicionado no recompensado fue fenilacetaldehído (EC-: PHE, tabla 4.1a) y viceversa (EC+: PHE y EC-: LIO tabla 4.1b). En cambio para aquellos experimentos realizados en abejas criadas en laboratorio sólo se llevaron a cabo condicionamientos en donde el estímulo condicionado recompensado fue linalol y el no recompensado fenilacetaldehído (EC+: LIO y EC-: PHE) (tabla 4.1a)

a) Condicionamiento diferencial											
EC+: LIO y EC-: PHE											
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	T	T
PHE-	LIO+	LIO+	PHE-	PHE-	LIO+	PHE-	LIO+	LIO+	PHE-	LIO	PHE

b) Condicionamiento diferencial											
EC+: PHE y EC-: LIO											
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	T	T
LIO-	PHE+	PHE+	LIO-	LIO-	PHE+	LIO-	PHE+	PHE+	LIO-	LIO	PHE

Tabla 4.1: Condicionamiento olfativo diferencial de 10 ensayos (5 recompensados y 5 no recompensados). a) El estímulo condicionado recompensado fue linalol (EC+: LIO) y el estímulo condicionado no recompensado fue fenilacetaldehído (EC-: PHE); en (b) se muestra el caso contrario (EC+: PHE y EC-: LIO).

4.2.3. Protocolo experimental: exposición de volátiles en colmena y en abejas confinadas

4.2.3.1. Exposición de compuestos volátiles en colmenas

Con el objeto de estudiar como la exposición pasiva de un volátil dentro de la colonia afecta la subsiguiente asociación olor-recompensa, evaluamos la dinámica del aprendizaje olfativo en abejas recolectoras. Estas abejas fueron capturadas en la entrada de la colmena y sometidas a un protocolo de aprendizaje olfativo en diferentes

momentos del experimento (Figura 4.2a): tres y dos días antes de la exposición de olor (PRE); durante la exposición olfativa, en los días dos, tres y cuatro (DURANTE); y uno y tres días una vez finalizada la estimulación olfativa (POST). El olor puro fue expuesto como volátil durante un periodo de cinco días; para esto, dos cajas de Petri (20 cm² de superficie de evaporación) colocadas sobre el piso de la colmena proporcionaban constantemente 3 ml de olor. Ambas cajas de Petri fueron cubiertas por una malla plástica para impedir que las abejas tengan contacto directo con el compuesto, es decir para evitar la ingesta del olor. Luego de la exposición olfativa, todos los cuadros y hasta la colmena misma fueron substituidos para prevenir la contaminación por olor durante los periodos de no-exposición. En los experimentos de colmena tanto fenilacetaldéido (PHE) como linalol (LIO) fueron utilizados para la exposición olfativa pasiva en el ambiente de la colonia. Luego, realizamos un condicionamiento diferencial utilizando el olor expuesto tanto como estímulo condicionado recompensado o como no recompensado (EC+ y EC-, respectivamente). Por ejemplo, cuando PHE fue preexpuesto, un grupo de abejas recibió PHE como EC+ y LIO como EC- durante el entrenamiento (tabla 4.1b); mientras que para un segundo grupo de abejas preexpuestas a PHE, LIO fue utilizado como EC+ y PHE como EC- (tabla 4.1a). Cuando el olor preexpuesto fue LIO, se realizó un procedimiento similar.

Para determinar el efecto de la exposición de un olor en abejas de colmena de diferentes edades se capturaron abejas obreras de una colmena de observación estimulada olfativamente y luego se evaluaron sus REP mediante un condicionamiento diferencial. Al comienzo del experimento, abejas de 0 a 1 día de edad que fueron obtenidas de cuadros de cría sellados que se mantenían en una incubadora (36 °C, 55 % HR) fueron marcadas con colores (pincelada de pintura acrílica en el tórax o abdomen) e introducidas en la colmena diariamente. Las marcas de color permitieron

determinar la edad de las abejas a lo largo de todo el experimento. Este procedimiento es factible, dado que las colonias de abejas aceptan sin inconvenientes individuos recién emergidos (Breed *et al.*, 2004). Después de la introducción de las primeras abejas desde la incubadora y durante un periodo de 10 días, las abejas marcadas fueron capturadas para evaluar su dinámica de aprendizaje durante un periodo de no-exposición. Al mismo tiempo en que las abejas eran capturadas según el periodo de estimulación olfativa, eran clasificadas (como lo indicara su marca de color) en tres categorías etarias:

- i) abejas recolectoras
- ii) abejas de 4 a 9 días de edad (niñeras)
- iii) abejas de 12 a 16 días de edad (procesadoras de alimento)

Las abejas recolectoras tomadas al azar (con o sin marca de color), fueron capturadas con tubos plásticos cerca de la piquera de la colmena, mientras se alimentaban (solución de sacarosa 50 % peso/peso) en un platillo pequeño (8 cm de diámetro). Las abejas pertenecientes a las otras dos categorías (4 - 9 y 12 - 16 días de edad) fueron capturadas de la colmena mediante el uso de unos paneles móviles con aberturas (3.5 cm de ancho) por las cuales se introducía una manguera plástica con la que se succionaban los individuos (Figura 4.1) (Farina *et al.*, 2007). Posteriormente, la dinámica de aprendizaje de los tres grupos de abejas (recolectoras, de 4 a 9 días y de 12 a 16 días de edad) fueron evaluadas durante el periodo de estimulación olfativa con linalol (Exposición: LIO). Para realizar la exposición del volátil en la colmena de observación, un volumen de olor puro (150 μ l de LIO) fue ofrecido en papeles de filtro (20 cm^2 de superficie de evaporación) ubicados en la zona de entrada y en dos orificios colocados cerca de los cuadros; el olor puro fue renovado dos veces por

semana. Todas las fuentes de olor estaban cubiertas por una red de plástico para evitar que las abejas tomen contacto directo con el olor. Luego llevamos a cabo el condicionamiento diferencial utilizando el olor expuesto (LIO) como EC+ o como EC-; y un olor novedoso (PHE) como EC- y EC+, respectivamente.

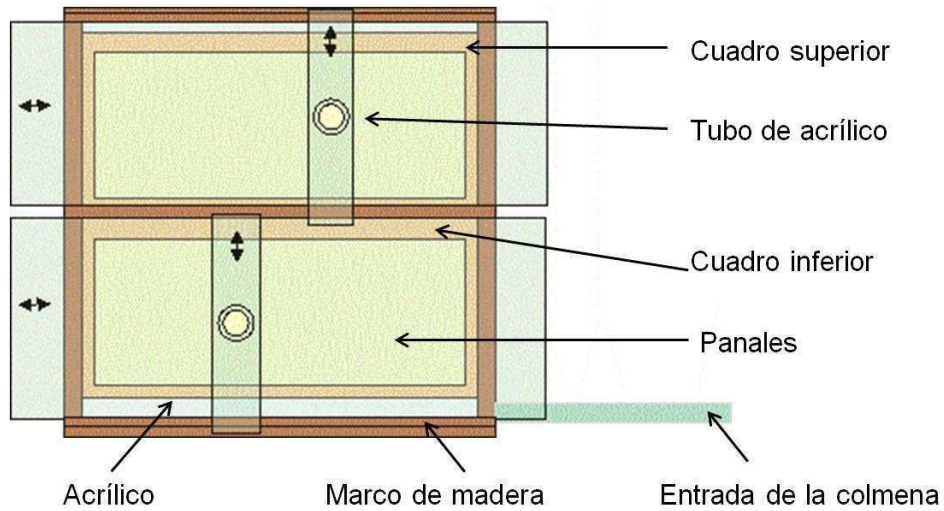


Figura 4.1: Colmena de observación. Dos cuadros cubiertos por paneles de acrílicos móviles con barras laterales deslizables para la captura de los individuos.

4.2.3.2. *Exposición de compuestos volátiles en abejas confinadas*

Con el objetivo de desechar la posibilidad de que la heterogeneidad del ambiente de la colmena pueda afectar las habilidades del aprendizaje (ver Resultados), llevamos a cabo unos experimentos en donde las condiciones fueron controladas en mayor medida, dado que las abejas estuvieron confinadas durante todo el periodo experimental (durante toda su vida). Las abejas experimentales fueron criadas desde su emergencia hasta los 17 días de vida en incubadora (30° C, 55 % humedad relativa y en oscuridad). En una primera serie de experimentos, los individuos fueron expuestos a un olor puro durante un periodo constante de 24 horas con distintos intervalos entre la exposición olfativa y el condicionamiento. En particular, tres intervalos diferentes fueron analizados: pocas horas (< 1d), un día (1d) y dos días después de la exposición (2d). De esta manera la dinámica de aprendizaje de abejas preexpuestas a un volátil fue comparada con un cuarto grupo de individuos que nunca estuvo expuesto al volátil (grupo control). En estas series experimentales sólo LIO fue usado como olor expuesto (Figura 4.4a). Para realizar la exposición olfativa, las jaulitas de abejas fueron trasladadas a otra incubadora (con las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa y en oscuridad). Una vez allí, eran colocadas dentro de unas cajas plásticas (80.5 cm x 48 cm x 35 cm) que en sus paredes contenían papeles de filtro (20 cm² la superficie de evaporación); en estos papeles se colocó el olor puro (150 µl). Para reducir la acumulación de olor conectamos un extractor de aire a la incubadora. Una vez finalizado el periodo de exposición olfativa, las abejas fueron llevadas nuevamente a la primera incubadora (renovando las jaulas), hasta el momento de la evaluación. En una segunda serie experimental con abejas criadas en condiciones de laboratorio, los individuos fueron expuestos a un volátil con distintos

intervalos temporales y/o concentraciones de olor (longitud – concentración). En esta serie se trabajó, como en la serie anterior, con abejas obreras adultas; algunas fueron expuestas durante cuatro días consecutivos (4d) con la misma concentración de olor usada en la serie experimental anterior (150 µl de olor puro renovado cada dos días) y otros individuos fueron expuestos únicamente un día pero con el doble de concentración de olor (1dH; 300 µl). Ambos grupos fueron evaluados 24 hs luego de finalizada la exposición olfativa y comparados con un grupo de abejas que nunca fueron expuestas a ningún volátil (Figura 4.5a).

En estos experimentos llevados a cabo en abejas confinadas utilizamos, durante el condicionamiento olfativo diferencial, el olor expuesto LIO como EC+ y PHE (un olor nuevo) como EC-.

4.2.4. Análisis estadístico

Como se detalló en el capítulo de *Materiales y métodos* de esta tesis, se calculó un índice de discriminación que fue obtenido como la diferencia entre la respuesta al EC+ menos la respuesta al EC- para cada par de ensayos ($ID = EC+ - EC-$). Este índice fue analizado a lo largo de los cinco pares de ensayos del condicionamiento, con un ANOVA-MR (Lunney, 1970). Para analizar el ID en la evaluación (Test 15-min) se llevo a cabo una prueba de homogeneidad (estadístico “Gh”) o una prueba exacta de Fisher (Sokal y Rolf, 2000). En todos los casos en nivel de significación utilizado fue del 5 %.

4.3. Resultados

4.3.1. Respuesta en abejas de colmena

En primer lugar, evaluamos el efecto de PHE como olor expuesto en la colmena. El análisis estadístico (ANOVA-MR de dos factores) reveló diferencias para todas las fuentes de variación cuando este olor preexpuesto (PHE) fue utilizado como EC+ durante el condicionamiento (factor periodos experimentales: $F_{2, 90} = 3.16$, $p = 0.05$; factor ensayo: $F_{4, 360} = 67.33$, $p < 0.001$; interacción de periodos x ensayos: $F_{8, 360} = 2.34$, $p = 0.02$). Dado que la interacción resultó significativa fue necesario llevar a cabo un análisis de efectos simples. Este evidenció diferencias entre los periodos experimentales durante el segundo ($F_{2, 450} = 7.693$, $p = 0.001$) y el tercer ensayo ($F_{2, 450} = 3.78$, $p = 0.024$); como consecuencia de las diferencias entre los niveles de REP antes y durante de la exposición olfativa (comparaciones post hoc de Tukey: $p < 0.05$; Figura 4.2b; paneles izquierdos). Este resultado indicó que una mayor proporción de abejas alcanzó niveles más altos de discriminación de olores antes de la exposición al volátil y no durante la misma. Sin embargo, ningún cambio significativo fue detectado en la evaluación (15 minutos luego de finalizado el condicionamiento; $G_{\text{H}} = 0.13$, $p = 0.94$, $N = 93$, Figura 4.2b; paneles izquierdos). Contrariamente, cuando PHE fue presentado como EC-, el ANOVA-MR sólo reveló un efecto significativo sobre los ensayos ($F_{4, 420} = 62.36$, $p < 0.001$), que reflejó un incremento de los porcentajes de REP a lo largo del condicionamiento. Tanto el factor periodos experimentales ($F_{2, 105} = 1.11$, $p = 0.33$) como la interacción de periodos x ensayo ($F_{8, 420} = 0.34$, $p = 0.94$) resultaron no significativos. Asimismo, durante la evaluación no se detectaron

diferencias entre los periodos experimentales ($G_h = 0.64$, $p = 0.73$, $N = 108$, Figura 4.2b; paneles derechos).

Cuando evaluamos el efecto de LIO como olor preexpuesto, el ANOVA-MR reveló diferencias significativas cuando este olor fue presentado como EC+ durante el condicionamiento para los factores periodos experimentales ($F_{2, 87} = 13.39$, $p < 0.001$) y ensayos ($F_{4, 348} = 49.27$, $p < 0.001$), no así para la interacción de periodos x ensayos ($F_{8, 348} = 1.31$, $p = 0.231$, Figura 4.2c; paneles izquierdos). Luego, se realizaron contrastes *a posteriori* (Dunnett) para estudiar las diferencias entre periodos. Éstos evidenciaron diferencias en los niveles de REP alcanzados antes y durante la exposición al olor ($p < 0.001$); siendo estos últimos menores. Resumiendo, estos resultados mostraron que los individuos de la colmena que fueron preexpuestos a un volátil presentaron una respuesta reducida a lo largo del entrenamiento en comparación con aquellos que no fueron sometidos a dicha exposición olfativa. Durante la evaluación, la respuesta de los individuos que no fueron expuestos al volátil (PRE) fue estadísticamente diferente de la respuesta de los individuos durante la exposición al olor ($G_h = 15.37$, $p < 0.001$, $N = 90$, Figura 4.2c; paneles izquierdos). Cuando las abejas preexpuestas a LIO fueron condicionadas con un segundo olor (PHE) como EC+, mientras que el olor preexpuesto actuó como EC-, el ANOVA-MR sólo reveló un efecto significativo en los ensayos ($F_{4, 276} = 32.40$, $p < 0.001$). Los periodos experimentales ($F_{2, 69} = 0.57$, $p = 0.56$) y la interacción de periodos x ensayos ($F_{8, 276} = 1.8$, $p = 0.08$) no presentaron diferencias significativas (Figura 1c; paneles derechos). El análisis para la evaluación no mostró ninguna diferencia ($G_h = 2.71$, $p = 0.26$, $N = 72$, Figura 4.2c; paneles derechos).

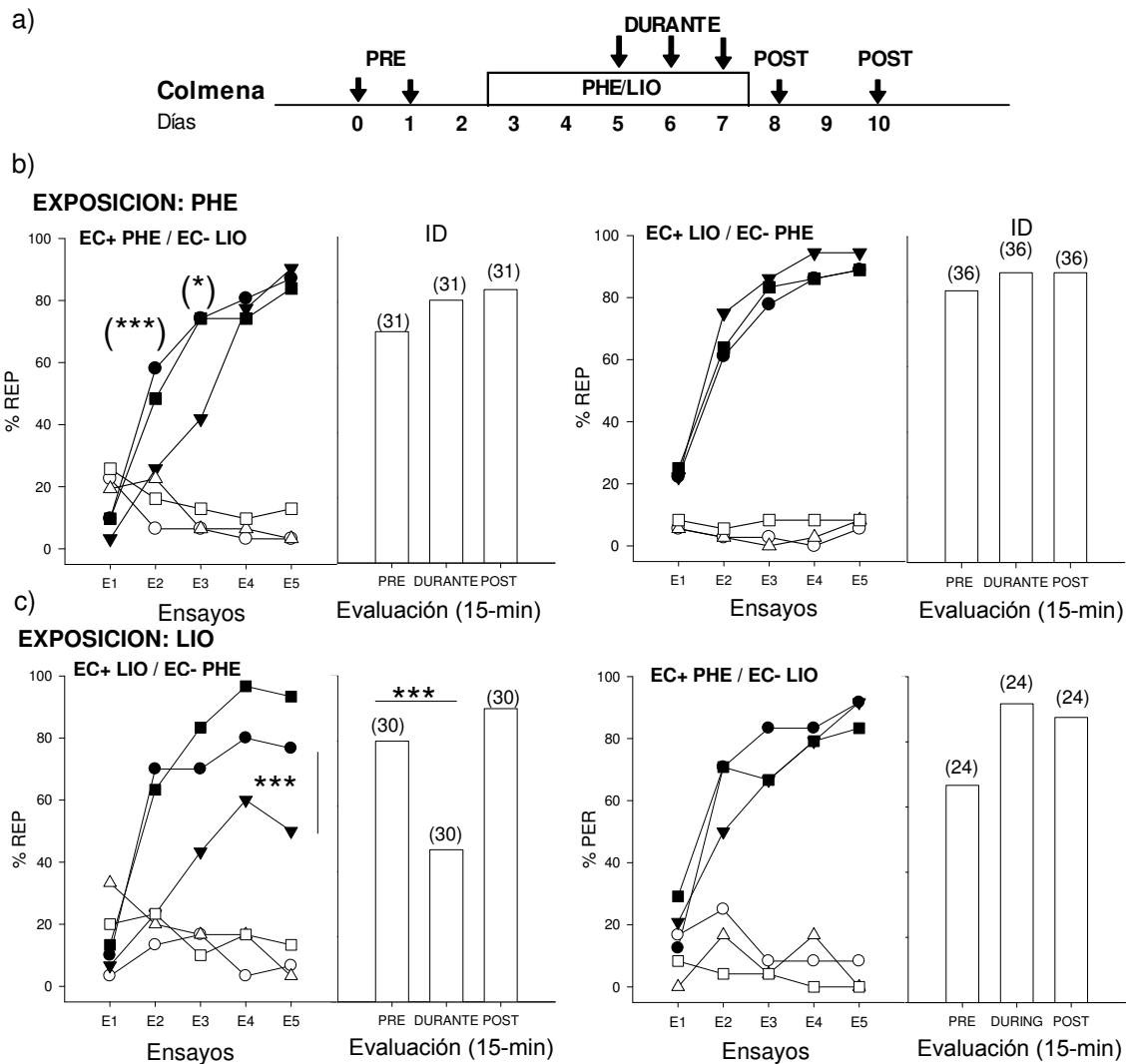


Figura 4.2. Exposición de volátiles en abejas de colmenas y su efecto sobre la discriminación. a) Cronograma del experimento. Las abejas fueron capturadas en la entrada de colmena; posteriormente se evaluó su REP por medio de un condicionamiento olfativo diferencial (flechas negras), en distintos momentos del experimento: 3 y 2 días antes de exposición de olor (días 0 y 1 del periodo experimental, PRE); durante la exposición olfativa (días 5-7 del periodo experimental, DURANTE); y 1 y 3 días después de exposición de olor (días 8 y 10 del periodo experimental, POST). b) Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (% REP) durante cinco pares de ensayos para los diferentes periodos experimentales mencionados (círculos, PRE; triángulos, DURANTE; cuadrados, POST). Para los cinco ensayos del condicionamiento se muestra el % de REP para el EC+ (símbolos negros) y para el EC- (símbolos blancos); y en la evaluación se muestra el índice de discriminación (ID= EC+ - EC-) para los tres momentos del experimento. El olor preexpuesto fue fenilacetaldéhidó (PHE), cuando éste actuó como EC+ (paneles izquierdos) o como EC- (paneles derechos). c) Igual que en b pero en este caso el olor preexpuesto fue linalol (LIO). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas: *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05. El número de abejas condicionadas se indica sobre las barras.

4.3.2. La exposición de volátiles en abejas de colmena de diferentes edades

Posteriormente evaluamos el efecto de una exposición olfativa (LIO-EXPUESTO) en abejas de edades diferentes. En este caso, si el olor utilizado durante el condicionamiento como el EC+ fue el mismo con el cual se realizó la estimulación, el análisis (ANOVA-MR de 3 factores) reveló un efecto significativo de exposición al olor ($F_{1, 138} = 22.16$, $p < 0.001$), los ensayos ($F_{4, 552} = 102.22$, $p < 0.001$) y la interacción de ensayos x edad ($F_{4, 552} = 6.08$, $p < 0.001$). Pero para el factor edad no fue posible detectar diferencias ($F_{2, 138} = 0.48$, $p = 0.62$). Dado que nuestro análisis reveló cambios significativos en la interacción de los ensayos y la exposición al olor, llevamos a cabo un análisis de efectos simples entre estos factores. Éstos mostraron diferencias para el factor exposición al volátil (LIO) en el segundo ($F_{1, 690} = 30.74$, $p < 0.001$), el tercero ($F_{1, 690} = 23.09$, $p < 0.001$) y cuarto ensayo ($F_{1, 690} = 7.68$, $p < 0.001$; Figura 4.3b, paneles izquierdos). Ninguna diferencia significativa fue detectada al estudiar la retención evaluada 15 minutos luego de finalizado el condicionamiento, en todas las categorías etarias (Grupo de 4 - 9 días de edad: $p = 0.059$; grupo de 12 - 16 días de edad: $p = 0.068$ y grupo de abejas recolectoras: $p = 0.38$; Figura 4.3b, paneles derechos).

Cuando LIO fue usado como EC- durante el condicionamiento olfativo, el ANOVA-MR (de tres factores) reveló diferencias significativas para el factor edad ($F_{2, 120} = 9.30$, $p < 0.001$), el factor ensayos ($F_{4, 480} = 90.81$, $p < 0.001$) y la interacción edad x ensayos ($F_{8, 480} = 2.27$, $p < 0.001$). El estudio de los efectos simples resaltó las diferencias existentes en todos los ensayos ($p < 0.05$) a excepción del primero; estas diferencias se debieron a los niveles de REP de las abejas recolectoras con relación a las otras categorías de edades (comparaciones *a posteriori* de Tukey, $p < 0.05$; Figura

4.3c, paneles izquierdos). Como ocurrió cuando el EC+ fue LIO, en este caso (EC+: PHE) ninguna diferencia significativa fue detectada al estudiar la retención evaluada 15 minutos luego de finalizado el condicionamiento, en todas las categorías etarias Grupo de 4 - 9 días de edad: $p = 1$; grupo de 12 - 16 días de edad: $p = 0.34$ y grupo de abejas recolectoras: $p = 1$; Figura 4.3c, paneles derechos). En resumen, cuando el olor expuesto fue usado como EC-, no se evidenciaron cambios significativos durante la etapa de entrenamiento ni durante la evaluación de una memoria de corto término.

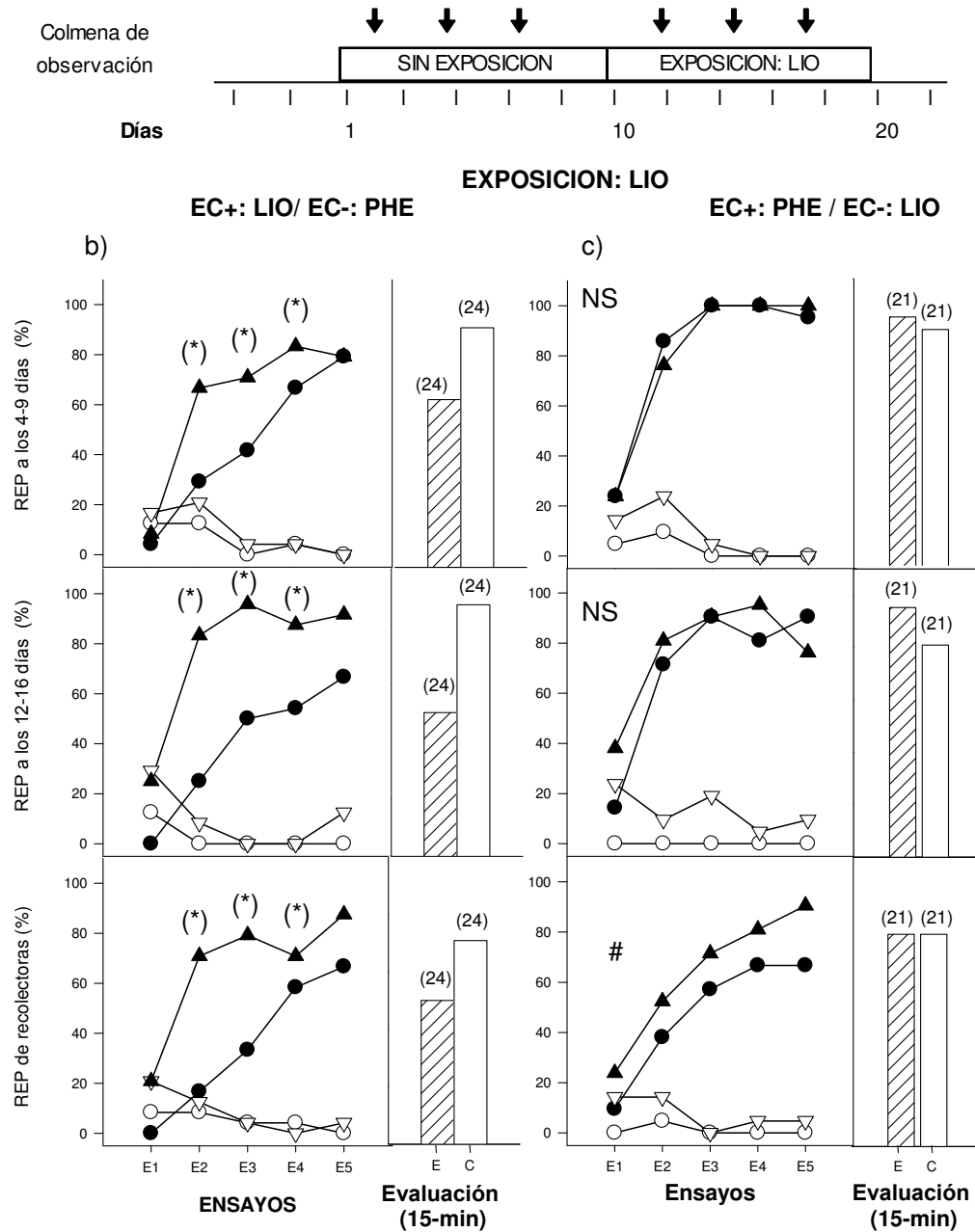


Figura 4.3. Exposición de volátiles en abejas de colmena de diferentes edades. a) Cronograma del experimento: las abejas fueron capturadas ya sea del interior (marcadas con colores: 4-9 y 12-16 días de edad) o en la entrada de colmena (marcadas y no marcadas: recolectoras); luego se les evaluó la REP mediante un condicionamiento olfativo diferencial (flechas negras) antes (sin olor) y durante una estimulación olfativa pasiva. El olor preexpuesto fue Linalol (LIO), que actuó como EC+ (paneles izquierdos) o como EC- (paneles derechos) durante el condicionamiento. b) Porcentaje de abejas de 4-9 días de edad que extendieron su probóscide (% REP) durante el condicionamiento (EC+: símbolos negros y EC-: símbolos blancos) en dos momentos: antes (triángulos) o durante la exposición (círculos) olfativa. En la evaluación se muestra el índice de discriminación (ID=EC+ - EC-). c) Igual que en b pero para abejas de 12 a 16 días de edad. d) Igual que en b pero para abejas recolectoras. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas: * p < 0.05. Ver detalles en el texto (resultados). Sobre las barras se indica el número de abejas

4.3.3. El efecto del intervalo temporal entre la preexposición olfativa y el condicionamiento en abejas confinadas

Evaluamos el efecto LIO como olor expuesto en el ambiente en distintos intervalos temporales entre la exposición olfativa y el condicionamiento en abejas criadas durante toda su vida adulta en laboratorio (ambiente más controlado). Mediante un ANOVA-MR de dos factores se detectaron diferencias significativas para ambos factores: los intervalos ($F_{3, 105} = 4.18, p = 0.007$) y los ensayos ($F_{4, 420} = 78.91, p < 0.001$). Contrariamente la interacción entre intervalos y ensayos no resultó significativa ($F_{12, 420} = 1.32, p = 0.11$, Figura 4.4b). Las comparaciones *a posteriori* (*Dunnet*) para los intervalos de evaluación - exposición de olor mostraron una diferencia significativa entre los valores de REP obtenidos para el grupo de control (C) y $< 1d$ ($p < 0.01$). A pesar de la tendencia similar observada en tratamientos 1d y 2d, principalmente para el segundo par de ensayos, no fue posible detectar diferencias significativas entre ellos. Asimismo el análisis efectuado para la evaluación no mostró diferencias estadísticas ($G_h = 3.18, p = 0.36$, la $N = 108$, Figura 4.4c). Los resultados aquí hallados concuerdan con los obtenidos en abejas expuestas al olor en el ambiente de colmena mostrando una dinámica de aprendizaje reducida, probablemente causada por las condiciones controladas de cría (confinamiento).

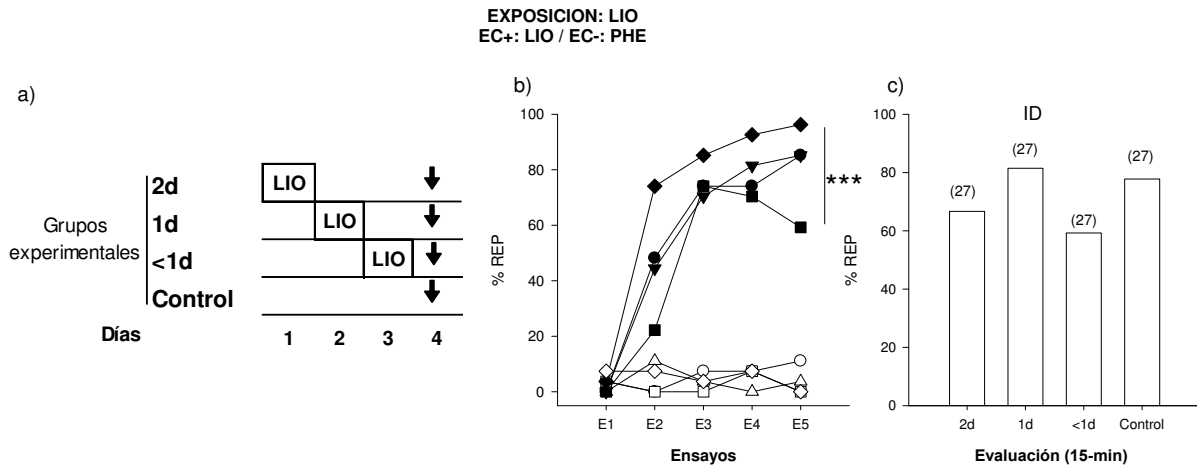


Figura 4.4. El efecto del intervalo temporal entre la pre-exposición olfativa y el condicionamiento en abejas confinadas. a) Cronograma del experimento: las abejas fueron criadas en el laboratorio; luego se les evaluó la respuesta de extensión de probóscide (% REP) a los 17 días de edad (flechas negras). Los grupos experimentales de abejas en jaulitas (confinadas) fueron expuestos a linalol (LIO-EXPOSICIÓN) durante un periodo de 24h (cuadrados) y luego evaluadas por medio de un condicionamiento olfativo diferencial (flechas negras) en intervalos de tiempo diferentes: pocas horas (1 < d), un día (1d) y dos días (2d) luego de finalizar la exposición olfativa. Un grupo de abejas (control) que nunca estuvo expuesta a LIO fue incluido en estudio. b) Porcentaje de las abejas que extendieron su probóscide (% REP) durante cinco pares de ensayos (EC+: símbolos negros y EC-: símbolos blancos) para los tres intervalos entre la exposición y la evolución (dos días: círculos, un día: triángulos; unas horas: cuadrados y nunca expuestos (control): rombos) y c) Índice de discriminación (ID= EC+ - EC-) para la respuesta evaluada 15 minutos luego de haber finalizado el condicionamiento. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas: *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05. El número de abejas condicionadas se indica sobre las barras

4.3.4. El efecto de la concentración y la duración de la exposición olfativa en abejas confinadas

En esta serie de experimentos estudiamos el efecto a largo plazo de la exposición pasiva de un olor (LIO-EXPOSICIÓN) ya sea aumentando su concentración (1dH) o prolongando el tiempo de exposición (4d) y lo comparamos con un grupo de

control (abejas nunca expuestas al olor). El análisis (ANOVA-MR de dos factores) no detectó diferencias significativas para los tratamientos ($F_{2, 99} = 0.36$, $p = 0.70$), aunque sí para los ensayos ($F_{4, 396} = 44.4$, $p < 0.001$) y para la interacción entre tratamientos y ensayos ($F_{8, 396} = 2.3$, $p = 0.02$, Figura 4.5b). En consecuencia procedimos con el análisis de los efectos simples, que evidenciaron que en el segundo par de ensayos ($F_{2, 495} = 4.02$, $p = 0.02$) diferencias (REP del grupo expuesto a alta concentración, 1dH, menor que la del grupo control). Durante el análisis de la evaluación ninguna diferencia fue encontrada entre tratamientos ($G_h = 0.34$, $p = 0.84$, $N = 99$; Figura 4.5c).

Como ha sido mostrado en los experimentos previos realizados con abejas confinadas (criadas en laboratorio, Figura 3b), el efecto a largo plazo sólo se evidenció al comienzo del entrenamiento, donde la dinámica de aprendizaje de abejas preexpuestas del tratamiento 1dH presentaron valores inferiores a las abejas controles, pero no durante la etapa de evaluación.

mostrados indican inequívocamente que la reducción es estímulo - específica, ya que la disminución en la respuesta sólo fue encontrada cuando el estímulo condicionado recompensado (EC+) fue el olor previamente expuesto en el ambiente (Figura 4.2 y 4.3). Además encontramos claras diferencias en cuanto al aprendizaje y memoria según la identidad del olor preexpuesto. Aunque ambos olores puros redujeron la dinámica de aprendizaje cuando fueron usados como EC+, las abejas de colmena preexpuestas a LIO mostraron un mayor déficit en aprender y memorizar que aquellas preexpuestas a PHE, olor que sólo redujo los niveles de adquisición pero que fue memorizado de modo similar entre los distintos tratamientos. A pesar de que la exposición a LIO evidenció una respuesta más marcada (mayor reducción de la REP, es decir mayor IL) durante el condicionamiento con relación a PHE, ningún efecto a largo plazo fue encontrado luego de quitar la fuente de olor y sustituir todos los cuadros y la caja de madera de la colmena (Figura 4.2). Las asimetrías aquí encontradas en cuanto a la retención entre LIO y PHE ya han sido descritas en abejas, al ser evaluadas en un condicionamiento clásico, por ejemplo, (Sandoz *et al.*, 2000) o en un contexto operante (Arenas, 2010). Estas diferencias, podrían estar relacionadas con la relevancia biológica de los estímulos, es decir, si los volátiles cumplen un rol comunicacional o no, como ha sido propuesto para polillas (Daly *et al.*, 2001) y abejorros (Laloi *et al.*, 2004).

En congruencia con estudios anteriores (Sandoz *et al.*, 2000; Arenas, 2010), previo a la exposición olfativa las abejas no demostraron ninguna preferencia hacia ninguno de los dos olores. Además, se descarta que la concentración de volátil expuesto haya sido demasiado alta, al menos en comparación con las ya usadas en otros trabajos (Sandoz *et al.*, 2000). Consideramos que los individuos no presentan *per se* ni atracción ni rechazo hacia los olores utilizados en este trabajo para las

estimulaciones volátiles. Por lo tanto, se pueden explicar las respuestas disminuidas como una consecuencia del efecto de inhibición latente (IL, Lubow, 1973).

Cuando el olor preexpuesto en la colmena fue usado como estímulo condicionado no recompensado (EC-) y un nuevo olor como estímulo recompensado (EC+), no se detectó ningún cambio ni en la dinámica de aprendizaje (adquisición), ni cuando al evaluarse memorias a corto plazo (Figura 4.2). A pesar de las respuestas nulas hacia el olor preexpuesto halladas en algunos experimentos (Figura 4.2c y 4.3), no hemos encontrado que esto optimice la discriminación de estímulos entre los olores conocidos y nuevos como podría esperarse después de la evidencia existente en mamíferos y otros insectos sociales (ratas: Blodgett, 1929; Tolman y Honzik, 1930; hormigas: Frank *et al.*, 2007). En consecuencia, los resultados de este trabajo no sustentan la afirmación de que los olores expuestos en la colmena reducen la generalización de olores durante las tareas de recolección. Sin embargo, es importante mencionar que la pregunta sobre si un olor preexpuesto afecta la discriminación entre olores novedosos durante el condicionamiento, se haya aun sin respuesta en el caso de las abejas.

Las abejas de colmena de todas las edades evaluadas en el paradigma de REP antes y durante la exposición al olor mostraron respuestas similares en cuanto a la dinámica de aprendizaje (Figura 4.3). Las abejas asociadas a tareas de cuidado de cría (niñeras, de 4 a 9 días de edad), las procesadoras de alimento (de 9 a 12 días de edad) y las recolectoras mostraron una disminución en la adquisición en el paradigma de REP. A pesar de no detectarse diferencias significativas en la memoria evaluada a los 15 min se observa en todas las categorías etarias una menor REP durante la exposición al olor, aunque las diferencias observadas no sean significativas, desde el punto de vista estadístico. Esta diferencia en las abejas recolectoras podría ser una

consecuencia de los diferentes tiempos de exposición al olor (menores para las recolectoras) y las tareas llevadas a cabo por estas obreras. En edades recolectoras, las obreras pasaron gran parte del tiempo fuera de la colmena, mientras realizaban precisamente tareas de búsqueda y recolección de néctar. Este hecho podría explicar el alto grado de eficiencia que podrían poseer estas abejas para tomar decisiones en forma rápida con respecto a una potencial fuente de alimento a explotar. Las diferencias en intensidad y duración de la IL en la adquisición y memoria parecen estar más relacionadas con las características de olor (por ejemplo, su identidad) que con la capacidad de aprender de las abejas que pertenecen a grupos etarios o de tareas particulares. Los experimentos llevados a cabo en laboratorio (abejas confinadas) con sujetos de la misma edad y con exposiciones al olor controladas van más allá de estos resultados e indican que la presencia de un efecto inhibitorio a largo término depende de la intensidad de EC preexpuesto, ya sea en términos de concentración y/o tiempo de exposición. Intervalos de tiempo, entre la preexposición y el condicionamiento, menores a 24 horas claramente redujeron la dinámica de aprendizaje (Figura 4.4). Luego, si la concentración del volátil su aumentaba durante un periodo de exposición de 24 horas (Figura 4.5) o el tiempo de exposición se prolongaba a cuatro días (Figura 4.5), la dinámica de aprendizaje disminuía.

La ausencia de IL a largo plazo para los experimentos de colmena concuerda con otros estudios realizados en mamíferos, en los que no se encontró ningún efecto de IL cuando los tiempos entre el EC preexpuesto y su condicionamiento fue mayor a unas pocas horas (Suboski *et al.*, 1964). Sin embargo otros estudios han demostrado que este fenómeno es factible de encontrarse en periodos (entre exposición de EC y evaluación) de 24 horas (Lubow *et al.*, 1968; Siegel, 1970; James, 1971), e incluso hasta 48 horas (Carlton y Vogel, 1967; Lubow y Siebert; 1969). Nuestros resultados

sugieren que las diferencias cualitativas o cuantitativas de los estímulos preexposados usados en estos trabajos podrían ser los causantes de la variabilidad observada.

Se sabe que la adquisición de néctar en la abeja *Apis mellifera* es una tarea particionada en la que las forrajeras recolectan los recursos y los llevan a la colmena, en donde son rápidamente distribuidos y compartidos entre los individuos de la colonia. Entonces, podemos pensar que una colmena de abejas funciona como un centro de información en el cual diferentes tipos florales son simultáneamente explotados por muchos individuos (Seeley, 1995) y que la diversidad de los volátiles en la colmena podría causar distintos comportamientos dentro y fuera de la colonia. Por lo tanto la presencia de olores dentro de la colmena, previamente asociados a recompensa, afectan los patrones de interacción entre las forrajeras y sus compañeras de nido (Goyret y Farina, 2005; Grüter y Farina, 2009). En consecuencia, las experiencias con olores florales pueden influenciar la organización de la adquisición del néctar a un nivel social. Como resultado, las interacciones entre las abejas, ya sean negativas o positivas, y estén basadas en las experiencias olfativas previas, podrían afectar la distribución del néctar y la información de propagación de los olores florales dentro de la colonia. Las experiencias olfativas apetitivas tendrán consecuencias en el comportamiento recolector a mayor escala debido al establecimiento de memorias a largo término (Farina *et al.*, 2005; Arenas y Farina, 2008; Arenas, 2010), mientras que la exposición de volátiles dentro de la colmena podrían tener efectos más heterogéneos sobre el comportamiento apetitivo (Gerber *et al.*, 1996; los resultados mostrados en este capítulo) dependiendo de las características del volátil expuesto, como su identidad e intensidad. Consecuentemente, no es sorprendente que las abejas muestren un breve efecto de IL, ya que esto podría resultar de gran utilidad para enfrentar los cambios repentinos

que ocurren en las fuentes de recursos (por ejemplo parches florales que aparecen y desaparecen repentinamente debido a cambios climáticos), permitiendo a las abejas reajustar sus preferencias forrajeras.

5

5. La exposición de volátiles durante edades pre-recolectoras: efectos sobre la sensibilidad gustativa y el condicionamiento olfativo a largo término

5.1. Introducción

Las primeras experiencias en la vida de un organismo pueden provocar efectos relevantes y duraderos en el comportamiento adulto. Esta temática ha sido estudiada desde principios del siglo XX pasado mediante variados enfoques por biólogos, zoólogos y psicólogos; abarcando una amplia gama de variables, métodos de investigación, especies analizadas, tratamientos experimentales y patrones de comportamiento (Sabogal y Otero, 1975). El caso más extremo es el “imprinting”, en donde aquellas experiencias que ocurren en las primeras etapas de la vida de un

animal, durante un periodo determinado y acotado de su vida, pueden moldear irreversiblemente su comportamiento de adulto (Lorenz, 1935). El desarrollo de la conducta de un organismo se refiere a la complementación de los procesos de maduración y aprendizaje a través del tiempo. Durante este proceso, el organismo atraviesa por diferentes etapas relacionadas a la edad, cada una de las cuales involucra ciertos eventos y procesos que aparecen por primera vez, así como también otros que desaparecen o cambian. En consecuencia, la edad de adquisición ha sido una de las variables que más se ha tenido en cuenta en el estudio de las experiencias tempranas, ya que con ella aparecen nuevas formas de adaptación al ambiente. Scott (1962) ha definido el término *periodos críticos* como aquellas fases del desarrollo en las que aparecen por primera vez ciertas capacidades potenciadas (sensoriales, motoras, etc.), que le confieren al organismo una óptima sensibilidad para aprender.

Ha sido demostrado que el aislamiento a edades tempranas en ambientes empobrecidos tiene consecuencias negativas sobre las habilidades cognitivas del individuo adulto. Contrariamente, las experiencias cognitivas y sensoriales que ocurren a edades tempranas parecen jugar un papel importante en la maduración de ciertos comportamientos. En los seres humanos por ejemplo, la adquisición del lenguaje resulta afectada negativamente cuando los niños crecen en un medio ambiente con ausencia de modelos de habla (Neal, 1972); pero cuando los niños crecen en un entorno multilingüe parecen mejorar el desarrollo lingüístico (Bialystok, 2001). En ratas, el aprendizaje espacial, por ejemplo puede ser alterado si las crías son separadas de las madres, o son sometidas a manipulaciones predestete (Cramer *et al.*, 1988; Cornwell-Jones *et al.*, 1988; Pryce y Feldon, 2003). Contrariamente si luego de nacer son criadas en un ambiente enriquecido, es decir un ambiente con una

amplia variedad de estímulos sensoriales de diferentes modalidades, las capacidades cognitivas así como las motoras mejoran (Hebb, 1947; Escorihuela *et al.*, 1995).

En los insectos adultos también se hacen evidentes estos efectos; dado que muestran respuestas conductuales plásticas frente a ciertas experiencias que ocurren a edades tempranas. Se observó que los comportamientos de insectos maduros son influenciados por los estímulos que experimentan durante los primeros días de su vida adulta (Ichikawa y Sasaki, 2003). En los insectos sociales el entorno de cría que comparten con sus compañeros de nido representa un factor esencial para el desarrollo de las capacidades cognitivas (Oitzl *et al.*, 2000; Iso *et al.*, 2007; Ichikawa y Sasaki, 2003). En particular Ichikawa y Sasaki (2003) mostraron que las abejas aisladas de los estímulos que comúnmente se encuentran en la colmena sufrían un déficit en la retención de memorias olfativas. De esta forma demostraron que la ausencia de ciertas experiencias en adultos jóvenes puede influenciar respuestas comportamentales futuras. En una colmena, en un instante dado, es factible encontrar obreras de distintas edades y por ende con distintos grados de maduración del sistema olfativo (Ray y Ferneyhough, 1997). En consecuencia, es esperable encontrar entre los individuos diferencias en la percepción sensorial y en el procesamiento de información. Esto sugiere que las memorias olfativas adquiridas a distintas edades podrían no ser retenidas de igual forma. Utilizando el paradigma de REP, Arenas y Farina (2008) determinaron que las experiencias olfativas adquiridas a diferentes edades tempranas de la vida adulta de la abeja (Pham-Delegue *et al.*, 1990; Bhagavan *et al.*, 1994; Ray y Ferneyhough, 1997) pueden ser recordadas varios días después, a edades en que las abejas comienzan a realizar tareas de recolección fuera del nido (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982), dependiendo tanto del momento en que se adquiere la información como del medio ambiente en donde se desarrolla el

individuo. En estos experimentos, abejas obreras de edades pre recolectoras (de 1 a 16 días de vida), fueron alimentadas durante cuatro días consecutivos con alimento aromatizado en distintos periodos dentro de la franja etaria mencionada: entre los 1 - 4, 5 - 7, 9 - 12 o 13 - 16 días de edad. Como método alternativo al protocolo de condicionamiento clásico olfativo, los autores ofrecieron a los sujetos experimentales alimento aromatizado para establecer asociaciones entre el olor y el alimento (Farina *et al.*, 2005; Gil y De Marco, 2005; Grüter *et al.*, 2006; Farina *et al.*, 2007). A pesar de que la elección de las franjas etarias (ventanas temporales) haya sido arbitraria, son representativas de periodos en los que los cambios anatómicos y funcionales en la abeja interactúan con el desarrollo de las actividades sociales dentro de la colmena.

Inmediatamente después de la emergencia (24 a 48 hs), una abeja obrera apenas realiza tareas dentro del nido (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982), mientras que su sistema olfativo se encuentra todavía en desarrollo. Como mencionamos anteriormente en la introducción de esta tesis, una semana después de la emergencia, las obreras cuidan activamente a la cría y realizan tareas de mantenimiento y limpieza del nido, en ese momento, la maduración del sistema olfativo está finalizando (Masson *et al.*, 1993; Winnington *et al.*, 1996; Farris *et al.*, 2001). Las abejas de mediana edad (es decir, 9 - 12 días de vida) generalmente desempeñan tareas relacionadas al procesamiento del alimento, actividad en la cual fundamentalmente manipulan y almacenan el néctar cosechado. Individuos de mayor edad (13 - 16 días) también pueden realizar tareas de procesamiento del néctar; aunque su actividad más frecuente está relacionada con la recepción del alimento cosechado por la recolectora (Lindauer, 1952).

En el estudio de Arenas y Farina (2008), las memorias evaluadas a edades recolectoras (17 días de edad), de los individuos recompensados con solución

aromatizada a los 5 - 8 ó 13 - 16 días presentaron niveles de retención mayores que los obtenidos en abejas condicionadas a los 9 - 12 días de edad. Incluso las abejas expuestas a un olor recompensado entre los 5 y 8 días de la vida adulta presentaron los niveles de REP más altos medidos al día 17 (Figuras 5.1a y b). Estos resultados mostraron que las abejas criadas bajo condiciones de laboratorio son capaces de retener la información de los olores del alimento desde los cinco días después de emerger y que pueden formar memorias olfativas estables y de largo plazo. La retención de las memorias olfativas tempranas varía con el periodo en que ocurren las experiencias, no así con el intervalo de tiempo entre la adquisición y la evaluación; por lo tanto la retención de este tipo de memorias depende de la edad en la que la experiencia fue adquirida (Arenas y Farina, 2008).

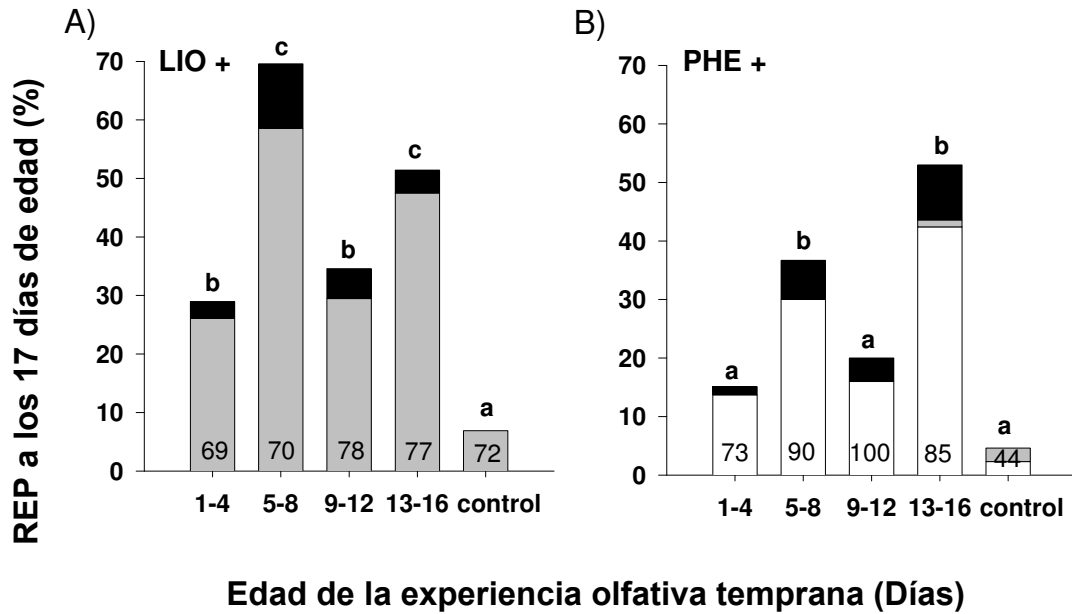


Fig. 5.1: La respuesta de extensión de probóscide (REP) en abejas enjauladas criadas en laboratorio que fueron alimentadas durante 4 días con solución de azúcar aromatizada. A) LIO como el olor diluido en la solución de azúcar (■), PHE como olor novedoso (□), y las respuestas suscitado por ambos olores (■). B) PHE como olor diluido en la solución de azúcar y LIO como novedoso. Letras diferentes indican diferencias significativamente con $P < 0.05$. El tamaño de las muestras se presenta en la parte inferior de cada barra. (Figura obtenida de Arenas y Farina (2008), con permiso de los autores).

Bajo otra situación experimental (Arenas y Farina, 2008), donde las abejas fueron criadas en colonias hospedadoras, las experiencias adquiridas en aquellas abejas de 9 - 12 días de edad presentaron altos niveles de respuestas (similares a los obtenidos en abejas estimuladas a los días 5 - 8 ó 13 - 16, Figura 5.2). Según los autores, este resultado sugiere que la recuperación de las memorias no sólo depende

de la edad de la adquisición, sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la abeja como adulta.

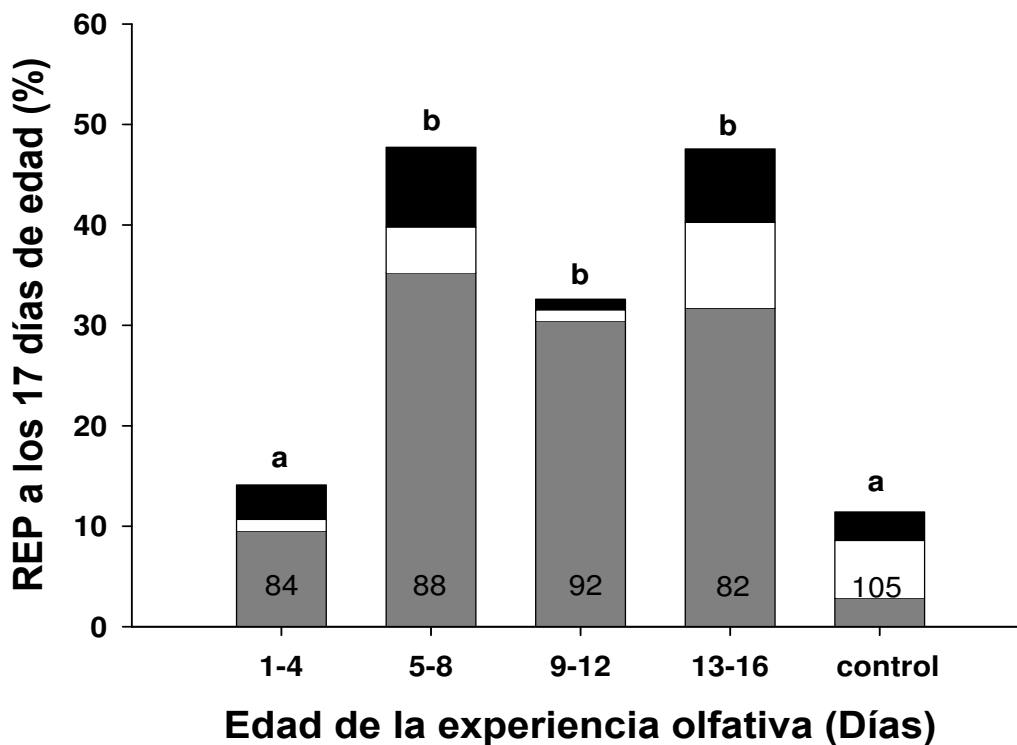


Figura 5.2: La respuesta de extensión de probóscide (REP) en abejas enjauladas criadas en el interior de una colmena que fueron alimentadas durante 4 días con solución de sacarosa aromatizada. Olor diluido en la solución de sacarosa (gris), olor novedoso (blanco), y las respuestas a ambos olores (negro). Letras diferentes indican diferencias significativas con un P-valor < 0.05. El tamaño de las muestras se presenta en la parte inferior de cada barra. (Figura obtenida de Arenas y Farina (2008), con permiso de los autores).

Las diferencias en la retención entre los distintos grupos etarios podrían ser explicadas, en parte, por la ontogenia del sistema olfativo de los insectos y por las consecuentes variaciones en la sensibilidad gustativa. Algunos estudios han sugerido la existencia de un periodo a partir de 3 días antes a 4 - 8 días después de la emergencia del individuo como adulto en el cual el desarrollo del sistema olfativo permanece sensible a los cambios ambientales (Masson *et al.*, 1993). Los distintos niveles de respuesta para los grupos etarios hallados por Arenas y Farina (2008), sugieren que entre los días 5 y 8 de vida de la abeja adulta existe un periodo especialmente sensible para la retención de memorias olfativas.

Por otro lado, las diferencias en la retención entre las distintas edades podrían deberse a variaciones en la sensibilidad gustativa, por ejemplo, si la eficacia de una solución de sacarosa como estímulo incondicionado estuviera sujeta a diferencias en la motivación o el grado de maduración del sistema químico - sensorial. En el estudio de Arenas y Farina (2008) no se detectaron diferencias en cuanto a la respuesta incondicionada a la solución de sacarosa de 1.8 M, pero los umbrales de respuesta al azúcar podrían ser diferentes entre los grupos etarios (Pankiw y Page, 2003). Si este fuera el caso, es factible que ocurran cambios en los umbrales de respuesta al azúcar en distintas edades de la vida de la abeja adulta. Ramírez (2008) estudió la modulación de los umbrales de respuesta al azúcar en abejas de edades pre-recolectoras que fueron estimuladas con una solución aromatizada. Sus resultados no evidenciaron cambios en la sensibilidad gustativa para abejas de una semana de vida pero si para aquellas de dos semanas de vida. En éstas últimas, se observó una disminución en los umbrales de respuesta al azúcar luego de haber sido alimentadas durante 24 hs con una solución aromatizada. Asimismo esta disminución en los

umbrales correlacionó con un aumento en la respuesta de extensión de probóscide hacia el mismo olor de estimulación.

En esta tesis hemos brindado evidencia de que la exposición de volátiles no tiene implicancias a largo plazo (capítulos 3 y 4). Esto fue evidente para las abejas de edades recolectoras o pre-recolectoras, criadas en colmena; como para las recolectoras criadas en condiciones controladas de laboratorio. En este capítulo nos proponemos como primer objetivo evaluar el efecto de la exposición de volátiles en edades pre-recolectoras y su persistencia a los 17 días de vida adulta, edad en la cual las abejas obreras tienen una alta probabilidad de iniciar sus actividades recolectoras en el exterior (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982). El segundo objetivo propuesto es evaluar a edades pre-recolectoras, el efecto de la exposición a volátiles en el medio sobre la sensibilidad gustativa.

5.2. Materiales y métodos

Realizamos experimentos para evaluar si las experiencias olfativas no asociadas al alimento durante edades pre-recolectoras (de 1 a 14 días de vida aproximadamente) provocaron algún efecto sobre la sensibilidad gustativa a estas mismas edades (7 y 14 días de vida) o sobre la discriminación olfativa a edades recolectoras (17 días de edad).

5.2.1. Sitio de estudio y animales experimentales

Este estudio fue realizado en el campo experimental de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' W). Las abejas obreras utilizadas en estos experimentos fueron obtenidas de cuadros de cría que eran mantenidos en incubadoras (36° C, 55 % humedad relativa y oscuridad) y recolectadas al momento de emerger, como se ha explicado anteriormente (ver detalle en el capítulo de Materiales y métodos de esta tesis). Las abejas experimentales se mantuvieron en incubadoras con condiciones controladas (30° C, 55 % humedad relativa y oscuridad) y alimento (solución de sacarosa, agua y polen) *ad libitum*. El alimento brindado fue una solución de sacarosa de concentración 15 % peso/peso para las abejas cuya sensibilidad gustativa fue evaluada según el protocolo experimental de Ramirez (2008) y del 50 % peso/peso para las abejas condicionadas olfativamente a los 17 días de edad. Según el procedimiento experimental las abejas fueron trasladadas a otra incubadora con las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa para someterlas a la exposición de un volátil. Al finalizar la estimulación olfativa retornaron a la primera incubadora, donde permanecieron hasta el momento de la evaluación (sensibilidad gustativa o condicionamiento olfativo).

5.2.2. Experiencias olfativas a edades pre-recolectoras

Para evaluar los posibles efectos de una exposición olfativa pasiva sobre la sensibilidad gustativa en abejas pre-recolectoras de una o dos semanas de vida (7 y 14 días), las abejas experimentales fueron sometidas a una exposición olfativa durante 24 horas. Otro objetivo planteado fue evaluar los posibles efectos a largo término de un volátil sobre un condicionamiento olfativo, las abejas de los grupos experimentales (1 - 4, 5 - 8 y 9 - 12 días de vida) fueron expuestas durante cuatro días consecutivos (Figura 5.2a) a un olor puro (linalol o fenilacetaldéhid). En ambos casos, las exposiciones olfativas se llevaron a cabo siguiendo los protocolos experimentales detallados en el capítulo 4 de esta tesis.

5.2.3. Protocolo de respuesta de umbral al azúcar (URA)

La misma respuesta de extensión de probóscide que se registra durante un condicionamiento del tipo olfativo, puede ser utilizada para analizar umbrales de respuesta al azúcar (URA). En el primer caso la extensión de la probóscide es en respuesta a un estímulo neutro aprendido (respuesta condicionada, RC), como un olor, y en el segundo caso es una respuesta al contacto de la solución azucarada sobre la antena (respuesta incondicionada, RI).

En la abeja, como en otros insectos succionadores, la extensión de la probóscide es una respuesta refleja frente al contacto de solución azucarada en sus

antenas (Frings, 1944). La observación de esta respuesta refleja permite evaluar la sensibilidad del individuo a ese estímulo específico si se realizan sucesivas presentaciones de soluciones de azúcar de creciente concentración sobre las antenas (Page *et al.*, 1998). De esta manera, puede establecerse la mínima concentración de sacarosa que provoca la extensión de la probóscide de una abeja, y ser así considerada como el umbral de respuesta para el individuo.

El protocolo de URA consiste en la presentación a abejas amarradas pero con sus piezas bucales y antenas libres (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983), una sucesión de soluciones azucaradas (sacarosa) en orden creciente de concentración, intercalando agua entre cada presentación (Page *et al.*, 1998; Pankiw y Page, 1999). En el presente estudio se realizó el protocolo de umbrales de respuesta al azúcar según Ramirez (2008), que presenta algunas modificaciones con respecto al protocolo originalmente utilizado por Page y colaboradores (1998). Estos últimos autores presentan seis concentraciones en orden creciente de solución de sacarosa intercalando agua en cada presentación. En el protocolo modificado se incluyó una concentración adicional, la de 50 % p/p, lo que aumenta el máximo puntaje de respuesta al azúcar a siete (Ramirez, 2008). Esto permitió extender el intervalo de medición y así poder incluir en el estudio a aquellos individuos que pudieran presentar umbrales de respuesta al azúcar muy elevados. Entre cada concentración de azúcar presentada, se ofreció agua a cada abeja; aquellos individuos que respondieron con la extensión de su probóscide ante la presentación del agua fueron saciados con la misma para evitar que la sed interfiriera en los resultados obtenidos (es decir que no extiendan la probóscide por sed ante las presentaciones de soluciones de azúcar). Además la respuesta al agua antes de presentar cada concentración de azúcar, fue utilizada como control, para descartar sensibilización o habituación (Page *et al.*, 1998).

Las antenas de cada abeja fueron tocadas una vez con un palillo de madera embebido con solución de sacarosa 0.1 % p/p, y así sucesivamente en orden creciente de concentración se presentaron las siguientes soluciones de sacarosa: 0.3 %, 1 %, 3 %, 10 %, 30 % y 50 % p/p. El intervalo entre la presentación de una concentración de solución de sacarosa y la subsiguiente, tanto para el agua como para el azúcar, fue de al menos 4 minutos.

Aquellos individuos que respondieron por lo menos a la solución más concentrada (sacarosa 50 % p/p) fueron incluidos en el análisis. Los individuos que no respondieron a ninguna de las concentraciones ofrecidas fueron excluidos debido a que no se podían determinar las causas de la ausencia de respuesta, las cuales podía deberse a individuos con un umbral mayor, saciados, u otros factores que no podrían ser determinados en nuestro estudio.

Luego, para cada individuo se registró el número de concentraciones para las cuales extendió su probóscide. Sumando dichas respuestas se obtuvo un puntaje para cada uno (Page y Erber, 2002). Este puntaje abarcó un rango del uno (1) al siete (7); siendo el valor uno (1) el puntaje correspondiente a la respuesta del individuo ante la solución de sacarosa 50 % p/p y siete (7) el que representa el puntaje de una abeja que respondió a las siete (7) concentraciones. Cabe destacar que la mayoría de los individuos que respondieron a bajas concentraciones de sacarosa también extendieron su probóscide a las de mayor concentración. Si alguna abeja no respondió a una concentración de sacarosa determinada, pero sí extendió su probóscide ante la concentración menor que la antecede y a la mayor que la precede durante el protocolo, el puntaje registrado se corresponde con la mínima concentración de sacarosa a la cual el individuo respondió. Los puntajes fueron calculados para dos grupos de edades pre-recolectoras (7 y 14 días) durante tres momentos: al inicio de la

estimulación olfativa (0hs), un tiempo después (6hs) y al finalizar la estimulación olfativa (24 hs). Estos tiempos fueron seleccionados según el protocolo de Ramírez (2008).

5.2.4. Condicionamiento diferencial

El aprendizaje olfativo fue estudiado utilizando la respuesta de extensión de probóscide (REP, Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). Las abejas fueron expuestas a los dos olores puros (linalol y fenilacetaldehído) cada uno de ellos fue presentado cuatro veces en un orden pseudoaleatorio (EC-, EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+, ver detalles en el capítulo de *Materiales y métodos* de esta tesis). Luego, los condicionamientos fueron llevados a cabo con ambos olores, por ejemplo si el estímulo condicionado recompensado fue linalol (EC+: LIO) entonces el estímulo condicionado no recompensado fue fenilacetaldehído (EC-: PHE) y viceversa (EC+: PHE y EC-: LIO).

5.2.5. Análisis estadístico

Por un lado realizamos el análisis de los umbrales de respuesta al azúcar (URA), comparando los puntajes obtenidos para cada grupo experimental mediante un

análisis no paramétrico, Kruskal – Wallis (Sokal y Rohlf, 1995; Zar, 1999). Por otro lado el condicionamiento diferencial olfativo fue analizado según detallamos, en capítulos anteriores de esta tesis, con un ANOVA-MR. En los casos en donde encontramos diferencias significativas para algún factor o para la interacción de éstos, realizamos contrastes *a posteriori* (Dunnet, Sokal y Rohlf, 1995).

5.3. Resultados

5.3.1. Sensibilidad gustativa en abejas pre-recolectoras

Estudiamos si la exposición de un volátil en el ambiente provoca algún efecto en la sensibilidad gustativa de las abejas con una o dos semanas de vida (7 y 14 días). Cuando las abejas de 7 días de edad fueron expuestas a un volátil (LIO) en el ambiente, no fue posible detectar diferencias estadísticas (K-W: $H=5.41$, $p=0.067$, $N=163$; Figura 5.3b) entre los puntajes obtenidos en los distintos tiempos desde la estimulación evaluados (0, 6 y 24 hs). Igualmente cuando abejas de 14 días de edad fueron expuestas al mismo volátil (LIO) en el ambiente, los puntajes no se vieron afectados (K-W: $H=4.79$, $p=0.091$, $N=157$; Figura 5.3b) a lo largo de los tiempos de evaluación observados (0, 6 y 24 hs).

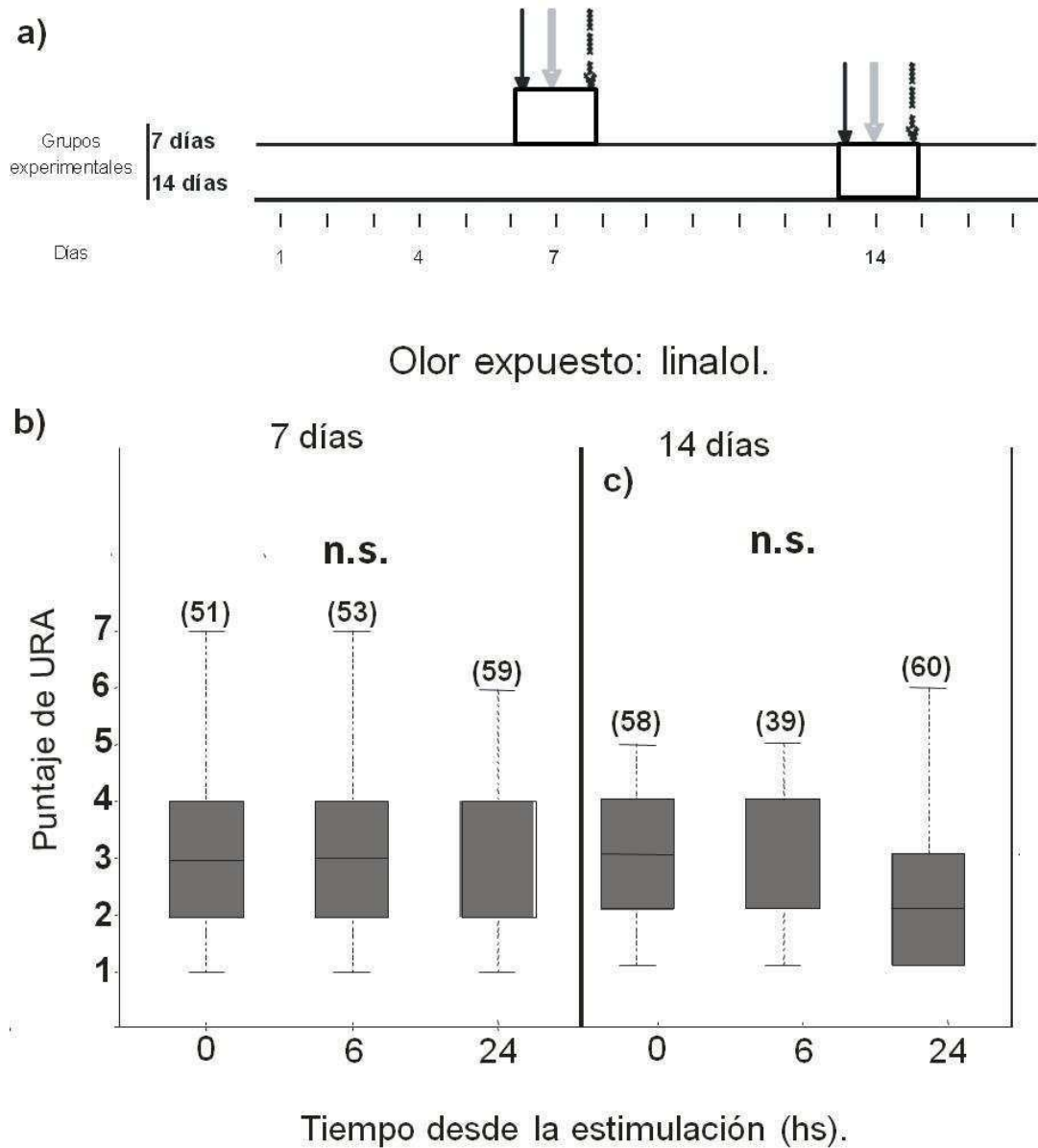


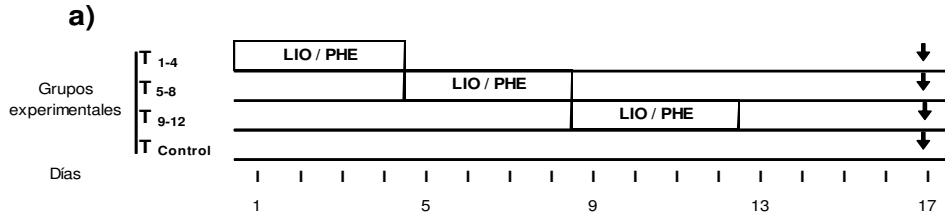
Figura 5.3 Sensibilidad gustativa. a) Protocolo experimental. Abejas de 7 y 14 días de vida respectivamente fueron mantenidas desde su emergencia en incubadora con condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (oscuridad, 32° C y humedad relativa). Durante toda su vida fueron alimentadas con solución azucarada 15%. Luego a los 7 y 14 días respectivamente fueron trasladadas a una incubadora para exponerlas a un volátil (LIO) en el medio (rectángulos blancos). La respuesta gustativa al azúcar fue evaluada en tres momentos distintos (desde la estimulación olfativa: 0 hs (flecha negra), 6 hs (flecha gris) y a las 24 hs (flecha punteada). Puntaje de umbral de respuesta al azúcar en función del tiempo transcurrido (0, 6 y 24 hs), desde una estimulación olfativa en el ambiente para las abejas experimentales de 7 (b) y 14 (c) días de edad. Se muestra un gráfico de caja y bigotes, en el cual la caja indica el rango intercuartil, la línea negra la mediana y los bigotes muestran los valores mínimos y máximos excluyendo "outliers". Entre paréntesis se indica el número de observaciones.

5.3.2. Condicionamiento olfativo

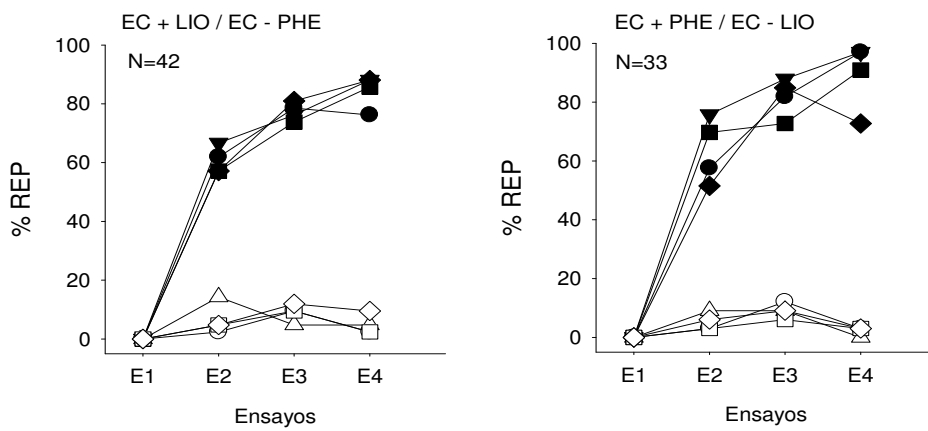
En primer lugar evaluamos el efecto de LIO como olor expuesto en la colmena. El análisis estadístico (ANOVA-MR de dos factores) reveló diferencias solo para el factor ensayos cuando este olor preexpuesto (LIO) fue utilizado como EC+ durante el condicionamiento (factor ensayo: $F_{3, 492} = 149.49$, $p < 0.001$). El factor grupo experimental (edades estimuladas con volátil en el ambiente) y la interacción de este con los ensayos no evidenciaron cambios significativos (factor grupo experimental: $F_{3, 164} = 0.033$, $p = 0.99$; interacción de grupo x ensayos: $F_{9, 492} = 0.42$, $p = 0.92$; Figura 5.4b). Asimismo cuando LIO fue presentado como EC-, el ANOVA-MR sólo reveló un efecto significativo sobre los ensayos ($F_{3, 490} = 159.92$, $p < 0.001$), Tanto el factor periodos experimentales ($F_{3, 127} = 1.19$, $p = 0.31$) como la interacción de periodos x ensayo ($F_{9, 490} = 1.77$, $p = 0.07$) resultaron no significativos Figura 5.4b). En ambos casos, las diferencias encontradas reflejaron un incremento en los porcentajes de REP a lo largo del condicionamiento.

Cuando evaluamos el efecto de PHE como olor preexpuesto, el ANOVA-MR reveló diferencias significativas cuando este olor fue presentado como EC+ durante el condicionamiento para los factores ensayos ($F_{3, 228} = 97.94$, $p < 0.001$) y la interacción entre ensayos y grupo experimental ($F_{9, 228} = 3.27$, $p < 0.001$), no así para los grupos experimentales ($F_{3, 76} = 2.25$, $p = 0.08$, Figura 5.4c). Dado que la interacción resultó significativa fue necesario llevar a cabo un análisis de efectos simples. Éste evidenció diferencias entre los grupos experimentales durante el segundo ensayo ($F_{3, 304} = 11.12$, $p < 0.001$), como consecuencia de las diferencias entre los niveles de REP entre el grupo experimental 5 - 8 y el control (comparaciones *post hoc* de Dunnett, $p < 0.005$). Los individuos sometidos a una exposición olfativa durante el periodo de 5 a 8

días de edad presentaron un nivel de respuesta de extensión de probóscide mayor a aquellos que nunca fueron sometidos a tal exposición olfativa. Cuando las abejas preexpuestas a PHE fueron condicionadas con un segundo olor (LIO) como EC+, mientras que el olor preexpuesto actuó como EC-, el análisis evidenció diferencias para el factor ensayos ($F_{3,300} = 134.33$, $p < 0.001$) y para la interacción de éste con los grupos experimentales ($F_{9,300} = 2.04$, $p < 0.03$). Los grupos experimentales ($F_{3,100} = 1.7$, $p = 0.16$) no mostraron diferencias (Figura 5.4b). Dado que la interacción resultó significativa fue necesario llevar a cabo un análisis de efectos simples. Este evidenció diferencias entre los grupos experimentales durante el segundo ($F_{3,400} = 3.49$, $p = 0.016$) y el tercer ensayo ($F_{3,400} = 3.96$, $p = 0.01$); como consecuencia de las diferencias entre los niveles de REP entre el grupo experimental 5 - 8 y el control (comparaciones *post hoc* de Dunnet, $p < 0.05$). Los individuos sometidos a una exposición olfativa durante el periodo de 5 a 8 días de edad presentaron un nivel de respuesta de extensión de probóscide mayor a aquellos que nunca fueron sometidos a tal exposición olfativa.



b) Exposición: LIO



c) Exposición: PHE

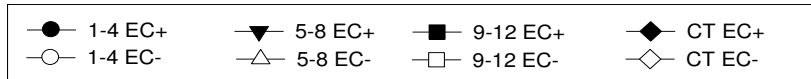
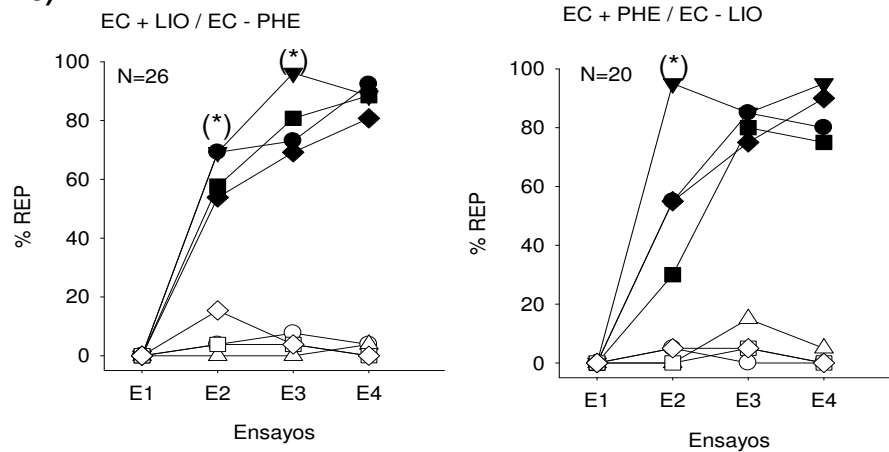


Figura 5.4: Exposición de volátiles en distintos periodos etarios de la vida de la abeja obrera y su efecto sobre la discriminación olfativa a los 17 días. a) Esquema del protocolo de estimulación olfativa: en distintos periodos de la vida de la abeja (1 a 4, 5 a 8 y 9 a 12 días de vida) las abejas experimentales fueron sometidas a una estimulación olfativa pasiva con un olor puro (linalol o fenilacetaldéhid). Un grupo de abejas control (CT) nunca fue expuesto a ningún olor. Luego a los 17 días de edad fueron evaluadas mediante un condicionamiento diferencial de cuatro pares de ensayos (flecha negra). b) Porcentaje de abejas que extendieron su probóscide (% REP) durante cuatro pares de ensayos para los diferentes grupos experimentales mencionados (círculos, 1 a 4 días de vida; triángulos, 5 a 8 días de vida; cuadrados, 9 a 12 días de vida y rombos, grupo control). Para los cuatro ensayos del condicionamiento se muestra el % de REP para el EC+ (símbolos negros) y para el EC- (símbolos blancos). El olor preexpuesto fue Linalol (LIO), y se evaluó su rol tanto como EC+ (panel izquierdo) como EC- (panel derecho). c) Igual que en b pero en este caso el olor preexpuesto fue fenilacetaldéhid (PHE). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas a un nivel del 5%. El número de abejas condicionadas se indica sobre las barras.

5.4. *Discusión*

En las abejas de edades pre-recolectoras y bajo ciertas condiciones experimentales, las estimulaciones olfativas asociadas al alimento pueden modular la sensibilidad gustativa en abejas jóvenes (Ramirez, 2008). Además, se sabe que existen periodos temporales sensibles, en los cuales las experiencias olfativas asociadas al alimento provocan mejoras en la retención de memorias a edades recolectoras (Arenas y Farina, 2008).

En este capítulo mostramos que los estímulos olfativos, experimentados como volátiles no asociados a recompensa, a edades pre-recolectoras no provocan cambios en la sensibilidad gustativa (Figura 5.3). Así como tampoco provocan una mejoría

significativa en la discriminación de olores a edades recolectoras que parece verse afectada por la identidad del olor preexpuesto (Figura 5.4).

En primer lugar la falta de modulación de la exposición de volátiles sobre los URA podría indicar la ausencia de interacción entre la sensibilidad gustativa y la IL. El mismo protocolo de estimulación olfativa que hace evidente al fenómeno de IL no provoca cambios significativos en la sensibilidad gustativa. Estos resultados podrían llevarnos a pensar en distintos mecanismos para estos procesos.

Además, la exposición a un volátil en el medio no interfiere a nivel sensorial; las abejas mantienen la capacidad de percibir información de naturaleza gustativa ya sea en situaciones variables (Ramírez, 2008) o constantes (este capítulo). Los resultados aquí obtenidos van en la misma dirección del realizado por Chandra y colaboradores (2000), que mostraron que la preexposición olfativa no tiene efectos sobre la actividad eléctrica de antenas aisladas (registros electroantenográficos). Es decir, se evidencia con ambos estudios (Chandra *et al.*, 2000; el presente capítulo) que el déficit del aprendizaje asociativo producto de una preexposición olfativa específica no es causada ni por una adaptación sensorial periférica (Chandra *et al.*, 2000), ni por una interferencia del volátil pre-expuesto con la respuesta gustativa que involucra un patrón de conducta más complejo (este trabajo; ver Lubow, 1973).

A nivel neurofisiológico las vías gustativas y por ende los URA parecen estar controlados por un grupo de interneuronas VUM (*ventral unpaired median interneuron*) cuyos somas se ubican en el ganglio subesofágico (Kreissl *et al.*, 1994; Schröter *et al.*, 2006); en particular por la neurona VUMmx1 (*ventral unpaired median interneuron of maxillary neuromere 1*) (Hammer, 1993, 1997). Al contactar la probóscide o las antenas, de una abeja, con solución azucarada la neurona VUMmx1, liberadora de octopamina, responde con una ráfaga de potenciales de acción (Hammer, 1997;

Schröter *et al.*, 2007). Además, inerva los neuropilos del cerebro que están involucrados en el procesamiento de olores como, por ejemplo, el lóbulo antenal, el protocerebro lateral y los cuerpos pedunculados (Hammer, 1993). Por ende, los mecanismos de los cambios en los umbrales a estímulos excitatorios como el azúcar parecen estar regidos más por vías centrales que periféricas.

Nuestros resultados muestran que las experiencias olfativas durante edades tempranas (1 a 12 días de vida) no mejoran *per se* la discriminación de olores a edades recolectoras. Tanto en este estudio como en el de Arenas y Farina (2008), los individuos fueron privados durante toda su vida del complejo entorno social de la colmena y, sometidos durante ciertos periodos a una estimulación olfativa (asociada o no al alimento). Cuando la estimulación olfativa fue asociada a alimento (Arenas y Farina, 2008), un único olor fue suficiente para generar cambios en la retención de los adultos. Contrariamente, cuando la estimulación olfativa no fue asociada al alimento (este estudio), el medio quimio-sensorial generado por un único olor parece no ser suficiente para generar algún cambio significativo en ciertas habilidades cognitivas, como la discriminación y la adquisición en los adultos. Las mínimas diferencias que se observaron para la situación del PHE preexuesto no permiten sugerir un fenómeno marcado de facilitación provocado por el ambiente enriquecido a nivel quimio-sensorial durante edades adultas tempranas. Sin embargo, sí sugiere que la identidad de un olor puede manifestar o no estas diferencias bajo determinadas condiciones de cría.

En resumen, nuestros resultados sugieren fuertemente que en la abeja, la preexposición olfativa durante edades pre-recolectoras no mejoran *per se* la discriminación de olores a edades en que el sistema olfativo se encuentra completamente maduro, así como tampoco modifican los umbrales de sensibilidad gustativa en abejas adultas jóvenes. Por lo tanto, la disminución en la adquisición

provocada por la preexposición olfativa, es un fenómeno que no estaría relacionado con la edad del individuo, ni con un proceso de adaptación sensorial, aunque sí las interacciones entre los diferentes factores ambientales expuestos durante el desarrollo, podrían tener efectos sobre las habilidades cognitivas de la abeja obrera madura.

6

6. El rol de las vías aminérgicas en el fenómeno de IL en la abeja *Apis mellifera*

6.1. Introducción

Como se había mencionado en capítulos anteriores el condicionamiento simple clásico es un tipo de aprendizaje en el cual ocurre una asociación entre al menos dos estímulos, uno neutro y uno biológicamente relevante (Pavlov, 1927). El primero actuará como estímulo condicionado (EC) y el segundo como incondicionado (EI). El desempeño durante el proceso de adquisición puede ser modulado por diferentes factores, como por ejemplo, la experiencia previa del sujeto experimental con relación a los estímulos involucrados. En particular, es factible observar un retraso en la adquisición de la asociación entre los estímulos si el sujeto experimental fue previamente expuesto al EC. Como hemos explicado anteriormente en el desarrollo de

esta tesis, este efecto puede ser explicado por el nombrado fenómeno de inhibición latente (IL) (Lubow y Moore, 1959; Lubow, 1973).

Dentro de las especies de animales vertebrados, la IL ha sido ampliamente observada en un gran número de especies bajo una variedad de protocolos de entrenamiento. Algunos ejemplos claros son los trabajos que demostraron condicionamiento aversivo en cabras (Lubow y Moore, 1959), reconocimiento de depredadores en peces (Ferrari y Chivers, 2011), aprendizaje de evitación y apetitivo en ratas (Ackill *et al.*, 1969; Boughner y Rapini, 2006) y condicionamiento aversivo gustativo en hámsteres (Dibbatista *et al.*, 2003). El déficit en el fenómeno de inhibición latente ha sido asociado a enfermedades mentales en humanos (Baruch *et al.*, 1998 a, b). A pesar de este hecho, se cuenta con poca información acerca de los procesos neurales que subyacen a este fenómeno. Antagonistas y agonistas de dopamina (DA) modulan la IL en ratas y en humanos saludables: mientras que los agonistas de DA interrumpen la IL, los antagonistas aumentan su efecto (Swerdlow *et al.*, 2003). Además, la IL es interrumpida en ratas debido a un déficit en glutamato, 5HT y acetilcolina (Bills *et al.*, 2005). Identificar los sustratos neurales de la inhibición latente y como los cambios que ocurren en ellos modifican el comportamiento es un objetivo clave para comprender algunas de las enfermedades mentales en humanos (Lubow y Weiner, 2010). En invertebrados, la evidencia experimental es menor que aquella encontrada para vertebrados. La IL ha sido observada mediante un protocolo de perturbación en abejas (Abramson y Bitterman, 1986), aprendizaje apetitivo olfativo en caracoles (Loy *et al.*, 2006) y en abejas (Chandra *et al.*, 2000; Sandoz *et al.*, 2000, Ferguson *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2010; capítulo 4 de esta tesis).

En base a la evidencia experimental con la que se cuenta se plantea la siguiente pregunta: ¿están los mecanismos neurales que subyacen a la IL

conservados entre las especies?. Para responder a esta pregunta es necesario estudiar de manera comparativa el rol de los neurotransmisores y de las regiones del cerebro en un amplio número de especies. En este capítulo se abarcará parte de este objetivo; para lo cual se estudiará la señalización de las vías aminérgicas que subyacen a la IL en una especie de invertebrados, la abeja melífera.

La OA, DA y 5HT son las principales aminas biogénicas en invertebrados, estas poseen un rol importante en la modulación de la conducta de estos animales (Kravits, 1988; Bicker y Menzel, 1989; Erber *et al.*, 1993; Roeder, 1999, Blenau *et al.*, 2001; Kravitz y Huber, 2003; Giurfa, 2006; Scheiner *et al.*, 2006; Schroll *et al.*, 2006; Mitzunami y Matsumoto, 2010). En la abeja melífera las aminas biogénicas actúan como importantes neuromoduladores, neurohormonas y neurotransmisores además de modular el comportamiento y la memoria de diferentes maneras (Scheiner *et al.*, 2002; Scheiner *et al.*, 2006; Giurfa, 2007).

Ha sido demostrado el rol importante que tiene la octopamina en los procesos de adquisición y establecimiento de memorias en un contexto apetitivo (Farooqui *et al.*, 2003; Schroll *et al.*, 2006; Mitzunami y Matsumoto, 2010). Además, esta amina se encuentra involucrada en la modulación de la división del trabajo (Schulz y Robinson, 2001; Barron *et al.*, 2002; Barron y Robinson, 2005), el comportamiento higiénico (Spivak *et al.*, 2003) y el reconocimiento de compañeras de colmena (Robinson *et al.*, 1999). Así como también ha sido relacionada con umbrales de actividad general (Schultz y Sullivan, 2002; Pankiw y Page, 2003; Bloch y Meshi, 2007; Barron *et al.*, 2007). No sólo variables comportamentales han sido estudiadas con relación al rol de la OA; sino que además se encuentra involucrada en determinados circuitos neuronales del cerebro de la abeja que participan en el aprendizaje apetitivo; dado que la señalización de la OA representaría el refuerzo de un EI en el cerebro de la abeja

(Hammer y Menzel, 1995, 1998; Menzel *et al.*, 1999). Consecuentemente, si la OA está involucrada en la modulación de la IL, un posible mecanismo podría ser que las presentaciones previas del olor no recompensado conduzcan a una reducción en la señalización de la OA durante un subsecuente condicionamiento.

Contrariamente, la dopamina se encuentra relacionada con procesos aversivos en *Drosophila*, abejas y grillos (Schroll *et al.*, 2006; Vergoz *et al.*, 2007; Unoki *et al.*, 2005). Por lo tanto, si es la DA la amina involucrada en el fenómeno de IL, un mecanismo posible podría depender de la activación de la vía aversiva como consecuencia de la repetida y no recompensada exposición de los individuos al EC, que luego se revertiría con los sucesivos ensayos de un condicionamiento apetitivo.

Por último, varios estudios han demostrado la participación de la 5HT en la disminución de las tasas de respuestas condicionadas en un contexto de aprendizaje (Mercer y Menzel, 1982; Menzel *et al.*, 1999). Entonces, de estar 5HT involucrada en el fenómeno de IL, es factible que las presentaciones no recompensadas del EC induzcan un aumento de la señalización de 5HT, que afectaría negativamente el subsecuente condicionamiento apetitivo.

Para llevar a cabo el objetivo de este capítulo, que es determinar las vías aminérgicas involucradas en el fenómeno de IL en la abeja melífera, consideraremos la participación de las nombradas aminas (OA, DA y 5HT). Teniendo en cuenta estas aminas realizamos varias series experimentales combinando tratamientos farmacológicos con un protocolo de inhibición latente (exposición de volátiles en el medio) para evaluar habilidades cognitivas en el paradigma de extensión de probóscide (REP).

6.2. Materiales y métodos

Estudiamos el rol de las aminas biogénicas en el fenómeno de inhibición latente, sometiendo a abejas de la especie *Apis mellifera* a distintos procedimientos experimentales. En primer lugar, las abejas obreras fueron tratadas con antagonistas de las principales aminas biogénicas (OA, DA y 5HT). Luego, bajo condiciones controladas de laboratorio, fueron expuestas a la circulación de un olor volátil en el medio. Finalmente se evaluó la discriminación olfativa de esas abejas utilizando el paradigma de extensión de probóscide (REP, Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983).

6.2.1. Sitio de estudio y animales experimentales

En este estudio se utilizaron colonias de abejas europeas (*Apis mellifera*) ubicadas en los apiarios de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34° 32' S, 58° 26' O) y de la Universidad Paul Sabatier, Francia (43° 33' N, 1° 28' E). Las series experimentales fueron realizadas durante los meses de verano del año 2010 (enero y febrero en Argentina, y junio y julio en Francia). Las abejas experimentales fueron capturadas en la entrada de las colmenas, anestesiadas a 4° C y amarradas en tubos metálicos de manera tal que sólo podían mover libremente sus piezas bucales y antenas. Además, fue necesario inmovilizar la cabeza de cada individuo para realizar las inyecciones; para ello se fijó con una gota de cera la cabeza al soporte metálico. Estas abejas se mantuvieron en una incubadora (30° C, 55 % de humedad relativa y oscuridad) hasta el momento en

que fueron sometidas al procedimiento experimental, unas 24 hs aproximadamente. Durante ese lapso, cada una de ellas fue alimentada con 20 µl de solución azucarada 50 % peso/peso.

6.2.2. Tratamientos farmacológicos

Los antagonistas de las aminas biogénicas fueron disueltos en una solución buffer (PBS, NaCl 137 mm, 2.8mm KCl, NaH₂PO₄ 5.1mm, 1.5mm KH₂PO₄). Las soluciones farmacológicas o PBS sólo (Grupo “sham” o control) se inyectaron a través del tracto ocelar medio; al cual se accedía al quitar el ocelo con un bisturí. A cada individuo se le inyectó un volumen de 200 nL (Vergoz *et al.*, 2007) de solución (farmacológica o PBS) con una micro-jeringa Hamilton (aguja biselada 33g NanoFil, WPI, Sarasota, FL. USA) controlada por un micro-manipulador, bajo microscopio estereoscópico (Leica MZ8). Experimentos previos (Erber *et al.*, 1993; Scheiner *et al.*, 2002; Vergoz *et al.*, 2007) demostraron que este tipo inyecciones farmacológicas evidencian su efecto aproximadamente 30 minutos luego de la aplicación de las mismas; en consecuencia, realizamos las inyecciones 30 minutos antes de la exposición del volátil en el medio (Figura 6.1).

Para bloquear de los receptores de OA (en adelante: OA-) se usó una dosis 4 mM de epinastina (un antagonista selectivo) y una dosis 3 mM de mianserina (un antagonista no selectivo) (Roeder *et al.*, 1998; Degen *et al.*, 2000). Los receptores de DA (en adelante: DA-) fueron bloqueados con dosis 1.9 mM de flufenazina y 2 mM de flupentixol (Vergoz *et al.*, 2007). Finalmente, ketanserina y metisergida, ambos con

dosis 1 mM, fueron utilizados como antagonistas selectivos de los receptores de serotonina (en adelante: 5HT-) (Colas *et al.*, 1995; Blenau y Erber, 1998; Tierney, 2001; Il-han *et al.*, 2010). Las dosis utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas de acuerdo a trabajos anteriores (Vergoz *et al.*, 2007).

Como no fue posible realizar todas las de inyecciones farmacológicas al mismo tiempo, realizamos tres series experimentales con un diseño que contemplo un control para cada serie, a efectos de evitar cualquier tendencia en las respuestas debidas al momento de realización del experimento. De esta manera, las distintas drogas farmacológicas para la misma amina biogénica fueron utilizadas generalmente en distintas series experimentales. Las tres series realizadas se denominaron: **I)** flupentixol (DA-) y mianserina (OA-); **II)** flufenazina (DA-) y epinastina (OA-) y **III)** ketanserina (5HT-) y metisergida (5HT-) (Tabla 6.1).

6.2.3. Exposición olfativa

Una vez que las abejas fueron inyectadas, se las colocó en un tubo de vidrio en donde se las expuso, según correspondió, a un ambiente con o sin la presencia de un volátil expuesto durante 60 min. De esta manera, la exposición olfativa fue realizada de manera individual ya que cada abeja fue colocada en un tubo de vidrio que contenía un papel de filtro en su pared con 2 µl de un olor puro, linalol (LIO), (abejas expuestas) o sin olor (abejas no expuestas). El tiempo de exposición y la cantidad de olor fueron determinados según experimentos preliminares. Una vez finalizado el periodo de exposición olfativa, cada abeja fue retirada del tubo de vidrio y sometida al

condicionamiento clásico diferencial en donde se utilizó como estímulo condicionado reforzado (EC+) al olor preexpuesto (LIO) y como estímulo condicionado no recompensado (EC-) un olor novedoso (fenilacetaldéhido, PHE) (Figura 6.1).

6.2.4. Condicionamiento diferencial

Como se menciona anteriormente la respuesta de extensión de probóscide fue estudiada mediante un condicionamiento olfativo diferencial (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). Este condicionamiento constó de cinco pares de ensayos, según se detalló en el capítulo *Materiales y métodos* de esta tesis. Los resultados mostrados en esta tesis, así como también los datos bibliográficos (Smith, 1993; Sandoz *et al.*, 2001; Daly *et al.*, 2001; Laloi *et al.*, 2004). Dado que se quiere detectar la interrupción o algún tipo de interferencia de la IL debida a los tratamientos farmacológicos, fue necesario utilizar una combinación de olores que induzcan altos y consistentes niveles de IL en los grupos controles. Esta situación se hace evidente cuando linalol fue utilizado como olor preexpuesto y subsecuentemente como estímulo condicionado recompensado (EC+) y, fenilacetaldéhido como estímulo condicionado no recompensado (EC-) (capítulo 4 de esta tesis y pruebas preliminares). Por este motivo en el desarrollo de estas series experimentales las abejas solo fueron expuestas a LIO. Subsecuentemente este olor preexpuesto fue evaluado en su rol como EC recompensado, intercalando presentaciones de un olor novedoso como EC no recompensado.

6.2.5. Análisis estadístico

Para estudiar la adquisición a lo largo de los ensayos para los diferentes tratamientos de farmacología y de exposición a un olor calculamos un índice de discriminación (ID), obtenido como la diferencia entre la respuesta al EC+ menos la respuesta al EC- para cada par de ensayos ($ID = EC+ - EC-$). El ID entre abejas expuestas y no expuestas a un volátil fue comparado para cada tratamiento farmacológico mediante un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA-MR; Lunney, 1970).

Serie experimental (Inyección farmacológica)		
Serie experimental I (n=40)	Serie experimental II (n=38)	Serie experimental III (n=45)
PBS	PBS	PBS
Flupentixol (DA-) 2 mM	Flufenazina (DA-) 1.9 mM	Ketanserina (5HT-) 1mM
Mianserina (OA-) 3.3 mM	Epinastina (OA-) 4mM	Metisergida (5HT-) 1mM

Tabla 6.1: Series experimentales para estudiar los efectos de diferentes antagonistas de dopamina (DA-), octopamina (OA-) y serotonina (5HT-), sobre el condicionamiento olfativo en abejas pre-expuestas y no pre-expuestas a un volátil (linalol). El número de abejas (N) utilizadas y la concentración de las soluciones farmacológicas se indican en cada serie experimental.

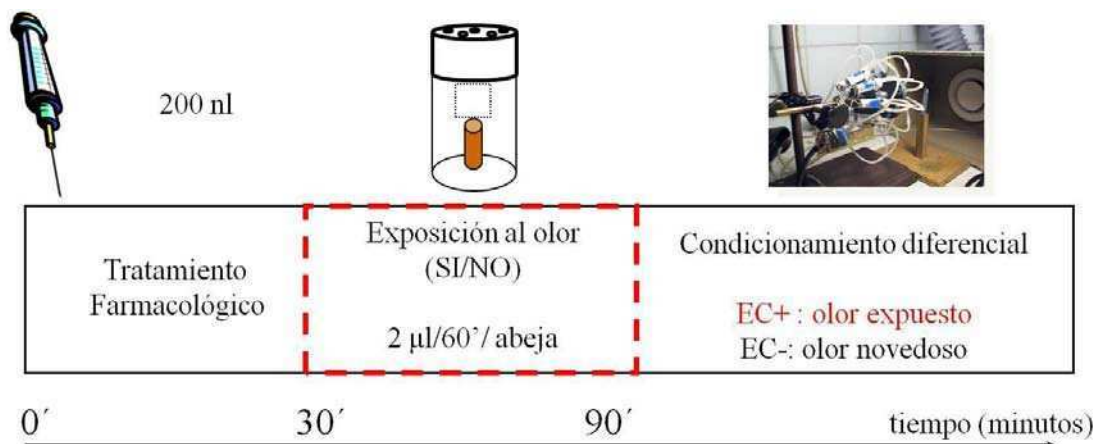


Figura 6.1: protocolo experimental. Las abejas ya capturadas, amarradas y mantenidas en incubadora durante unas 24 hs fueron inyectadas con el tratamiento farmacológico correspondiente (ver detalle de las series experimentales en el texto). Treinta minutos después un grupo de abejas (inyectadas con antagonistas de aminas biogénicas) fue sometido a una exposición olfativa pasiva con un olor puro (linalol); de manera individual (2µl LIO/ abeja) durante 60 minutos. Otro grupo (Sham, inyectadas con PBS) fue expuesto a un ambiente idéntico al anterior pero sin olor puro en el medio. Posteriormente las abejas experimentales fueron evaluadas en el paradigma de extensión de probóscide (REP) mediante un condicionamiento diferencial olfativo, en donde el olor preexpuesto actuó como estímulo condicionado recompensado (EC+) y un olor nuevo (fenilacetaldehído) actuó como estímulo no recompensado (EC-).

6.3. Resultados

6.3.1. Serie experimental I: el efecto de flupentixol (DA-) y de mianserina (OA-) en la IL

Flupentixol y mianserina son antagonistas que se usan habitualmente para inhibir dopamina y octopamina respectivamente (Vergoz *et al.*, 2007). Teniendo esto en cuenta, evaluamos la discriminación de olores en un condicionamiento olfativo,

cuantificando la REP en abejas que fueron inyectadas antes de ser expuestas a un olor puro (LIO) con PBS (Figura 6.2a), flupentixol (DA-; figura 6.2b) o mianserina (OA-; figura 6.2c) y las comparamos con las REP de abejas no-expuestas. Para aquellas abejas inyectadas con PBS, el ANOVA-MR de dos factores reveló diferencias para la preexposición ($F_{1, 78} = 9.62$, $p = 0.003$) y los ensayos ($F_{4, 312} p = 36.27$, $p < 0.001$), pero no para la interacción de ambos factores ($F_{4, 312} = 1.05$, $p = 0,37$; figura 6.2a; tabla 6.2). Estos resultados evidencian que las abejas previamente expuestas a un olor mostraron una reducción en su adquisición, en comparación con aquellos sujetos que no fueron previamente expuestos al olor que se condicionó.

El efecto de flupentixol (DA-) reveló diferencias significativas para todas las fuentes de variación (preexposición: $F_{1, 78} = 7.73$, $p = 0.007$; ensayos: $F_{4, 312} p = 21.82$, $p < 0.001$; y la interacción entre ambos: $F_{4, 312} = 2.54$, $p = 0,04$; figura 6.2b, tabla 6.2). Por lo tanto bloquear el sistema dopaminérgico no causaría cambios significativos en la ocurrencia del fenómeno de IL.

Contrariamente, las abejas inyectadas con mianserina (OA-) mostraron un aumento en el nivel de REP durante el condicionamiento para ambos grupos de abejas, preexpuestas y no preexpuestas (ensayos: $F_{4, 312}$, $p = 20.255$, $p < 0,001$; preexposición: $F_{1, 78} = 0.34$, $P = 0,56$). La interacción entre los ensayos y la preexposición fue no significativa ($F_{4, 312} = 0,42$, $p = 0.79$; figura 6.2c; tabla 6.2).

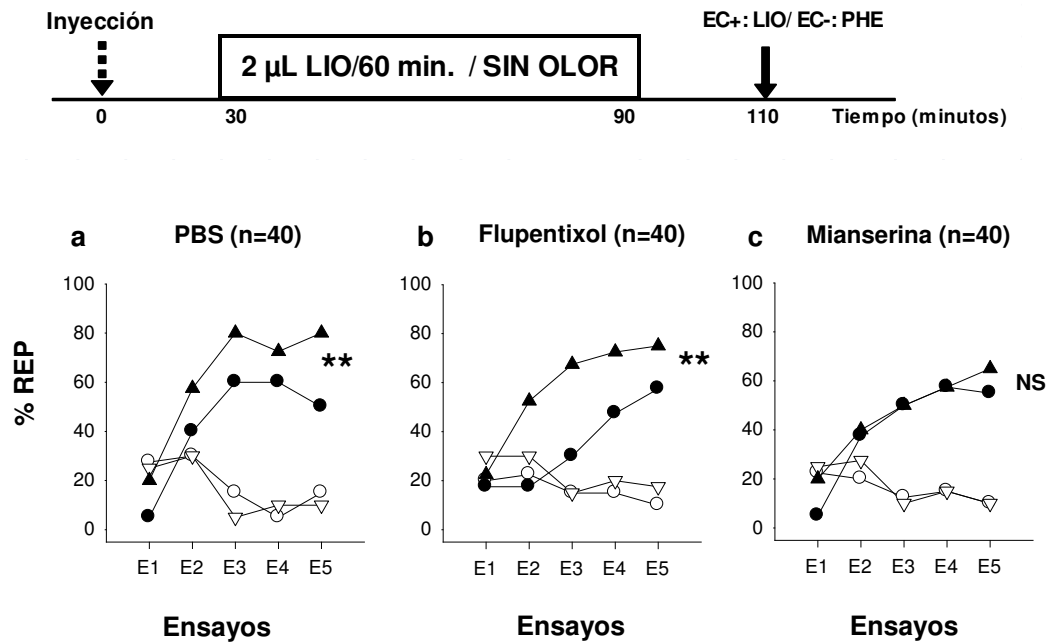


Figura 6.2: Panel superior: Esquema de las series experimentales. Las abejas fueron capturadas e inyectadas (flechas punteadas), según el tratamiento que corresponda (ver texto y tabla 1 para detalles). Luego de 30 minutos, las abejas inyectadas fueron o expuestas a un olor puro (2 μ L de Linalol) o no expuestas durante un tiempo de 60 minutos. Veinte minutos luego de haber finalizado la exposición al olor fueron evaluadas mediante un condicionamiento clásico diferencial (flechas negras). Panel inferior: Efecto de flupentixol (DA-) y mianserina (OA-) en la IL (serie experimental I). Porcentaje de abejas que extienden su probóscide (%PER) durante 5 pares de ensayos (5 recompensados: símbolos negros y 5 no-recompensados: símbolos blancos) para abejas preexpuestas (círculos) y no preexpuestas (triángulos). a) PBS; b) flupentixol 2 mM (DA-); c) mianserina 3.3 mM (OA-). Los asteriscos indican diferencias significativas: *** p <0.0001, ** p <0.01, * p <0.005; NS, diferencias no significativas. El tamaño de la muestra está indicado entre paréntesis.

Inyecciones		EC+ : LIO / EC- : PHE		
		Resultados del ANOVA-MR		
Serie experimental		Preexposición	Ensayos	Ensayos X Preexposición
I n=40	PBS	**	***	NS
	Flupentixol (DA-)	**	***	*
	Mianserina (OA-)	NS	***	NS
II n=38	PBS	***	***	***
	Flufenazina (DA-)	***	***	NS
	Epinastina (OA-)	*	***	NS
III n=45	PBS	**	***	NS
	ketanserina (5HT-)	NS	***	NS
	Metisergida (5HT-)	NS	***	NS

Tabla 6.2: El efecto de los diferentes antagonistas de dopamina (DA-), octopamina (OA-) y serotonina (5HT-), sobre el condicionamiento olfativo en abejas pre-expuestas y no pre-expuestas a un volátil (linalol). Todas las inyecciones de drogas y el control (PBS), fueron realizadas 30 minutos antes de la exposición al volátil, y el efecto de la pre-exposición olfativa (abejas pre-expuestas o no a un volátil) fue analizado durante 5 pares de ensayos de un condicionamiento clásico diferencial (factor ensayo). Los asteriscos indican diferencias significativas: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.005$; NS, diferencias no significativas. Para cada serie experimental se indica el número de abejas utilizadas en cada tratamiento farmacológico.

6.3.2. Serie experimental II: el efecto de flufenazina (DA-) y epinastina (OA-) en LI

Con el objeto de seleccionar un nuevo par de antagonistas de aminas biogénicas, utilizamos flufenazina como antagonista de dopamina (Vergoz *et al.*, 2007) y epinastina, un antagonista específico de octopamina (Roeder *et al.*, 1998; Degen *et al.*, 2000). Esta serie experimental, como ya lo mencionamos, tuvo su propio grupo control (abejas inyectadas con PBS). Entonces, en primer lugar evaluamos la discriminación de olores en el condicionamiento REP para las abejas que fueron inyectadas con PBS; comparando la respuestas entre abejas expuestas a un olor puro (LIO) y abejas no-expuestas. El ANOVA-MR de dos factores reveló diferencias significativas para todas las fuentes de variación (preexposición: $F_{1, 74} = 45.28$, $p < 0.001$; ensayos: $F_{4, 296} = 33.08$, $p < 0.001$ y la interacción entre ambos: $F_{4, 296} = 7.6$, $p < 0.0001$; figura 6.3a; tabla 6.2). Las abejas inyectadas con flufenazina (DA-) mostraron diferencias estadísticas en relación a las no-expuestas para el factor preexposición ($F_{1, 74} = 14.32$, $p < 0.0001$), el factor ensayos ($F_{4, 296} = 31.82$, $p < 0.001$) y la interacción entre ambos ($F_{4, 296} = 1.40$, $p = 0.04$; figura 6.3b; tabla 6.2). Aquellas abejas que fueron inyectadas con epinastina (OA-), contrariamente a los resultados hallados con mianserina, evidenciaron diferencias significativas para el factor preexposición ($F_{1, 74} = 4.21$, $p = 0.04$, figura 6.3c; tabla 6.2) y el factor ensayos ($F_{4, 296} = 19.33$, $p < 0.001$), pero no para la interacción entre ambos ($F_{4, 296} = 1.37$, $p = 0.24$).

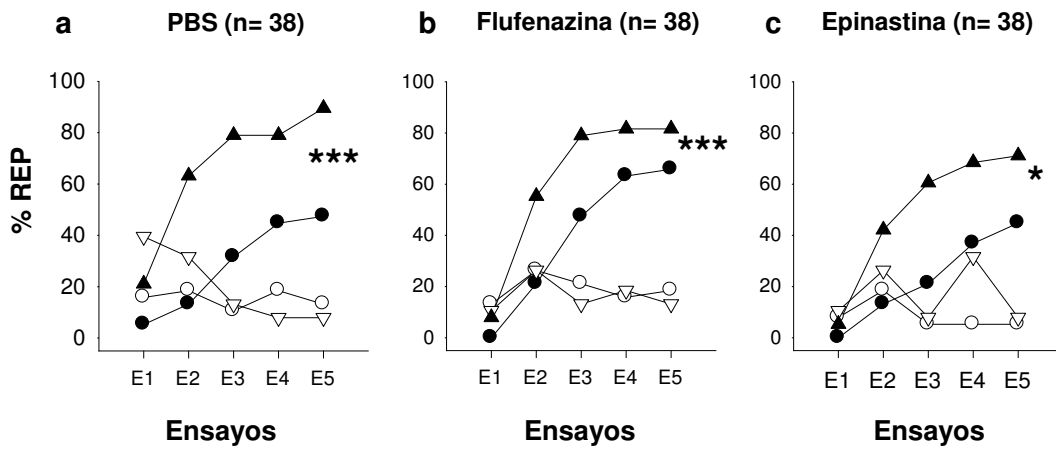


Figura 6.3: Efecto de flufenazina (DA-) y epinastina (OA-) en la IL (serie experimental II). Porcentaje de abejas que extienden su probóscide (%PER) durante 5 pares de ensayos (5 recompensados: símbolos negros y 5 no-recompensados: símbolos blancos) para abejas preexpuestas (círculos) y no preexpuestas (triángulos). a) PBS; b) flufenazina 1.9 mM (DA-); c) epinastina 4 mM (OA-). Los asteriscos indican diferencias significativas: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.005$; NS, diferencias no significativas. El tamaño de la muestra está indicado entre paréntesis.

6.3.3. Serie experimental III: el efecto de ketanserina (5HT-) y metisergida (5HT-) en LI

Luego de haber encontrado resultados diferentes con mianserina y epinastina, ambos antagonistas de octopamina, realizamos otra serie experimental en donde bloqueamos la señalización de serotonina. Al igual que en las series experimentales anteriores el grupo inyectado con PBS reveló diferencias significativas para la preexposición ($F_{1, 88} = 15.52$ $p < 0.0002$) y los ensayos ($F_{4, 352} = 40.83$, $p < 0.001$),

pero no para el interacción de ambos ($F_{4, 352} = 1.04$, $p = 0,38$; figura 6.4a; tabla 6.2). Ambos antagonistas de 5-HT, ketanserina y metisergida, solo evidenciaron diferencias significativas en los ensayos (ketanserina: $F_{4, 352} = 33.20$, $p < 0.001$; metisergida: $F_{4, 352} = 43.84$, $p < 0.001$), revelando un incremento de los niveles de PER a lo largo del condicionamiento. El factor de preexposición (ketanserina: $F_{1, 88} = 2.04$, $p = 0,15$; metisergida: $F_{1, 88} = 0.94$, $p = 0.33$) y la interacción entre los ensayos y la preexposición (ketanserina: $F_{4, 352} = 1,32$, $p = 0,26$; metisergida: $F_{4, 352} = 0,87$, $p = 0,48$; Figura 6.4b y c; tabla 2) no presentaron variación alguna.

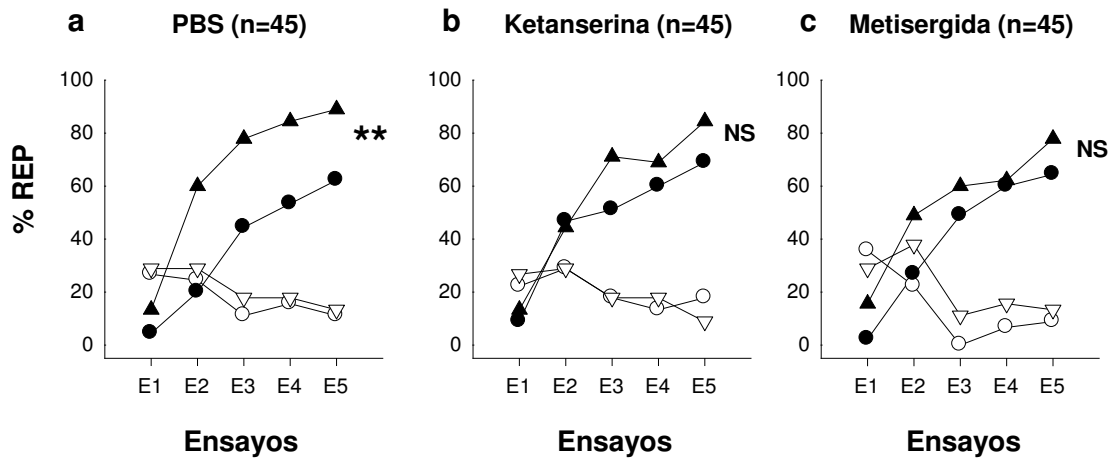


Figura 6.3: Efecto de ketanserina (5HT-) y metisergida (5HT-) en la IL (serie experimental II). Porcentaje de abejas que extienden su probóscide (%PER) durante 5 pares de ensayos (5 recompensados: símbolos negros y 5 no-recompensados: símbolos blancos) para abejas preexpuestas (círculos) y no preexpuestas (triángulos). a) PBS; b) ketanserina 1 mM (5HT-); c) metisergida 1 mM (5HT-). Los asteriscos indican diferencias significativas: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.005$; NS, diferencias no significativas. El tamaño de la muestra está indicado entre paréntesis.

6.4. Discusión

En este capítulo se han explorado las posibles vías aminérgicas que subyacen al fenómeno de IL (Lubow y Moore, 1959; Lubow, 1973) en la abeja *A. mellifera*, un fenómeno que ha sido demostrado en repetidas ocasiones en el marco del condicionamiento olfativo mediante el uso de la respuesta de extensión de probóscide (Chandra *et al.*, 2000; Sandoz *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2010; esta tesis). En este caso, aprender que un olor está asociado a una recompensa disminuye si las abejas que se condicionan son previamente expuestas a dicho olor. En este capítulo se estudió el rol de las aminas biogénicas como posibles mediadores del mencionado fenómeno de IL. Para ello se planteó un enfoque neurofarmacológico en el que se bloquearon las vías octopaminérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas con el objeto de establecer el efecto de dichos bloqueos en la expresión de la IL, por primera vez con un invertebrado como modelo experimental. Se debe tener en cuenta que estos experimentos excluyen la posibilidad de un déficit a nivel motor en REP causado por la inyección de las drogas, dado que tanto las abejas expuestas como las no-expuestas fueron inyectadas, sin embargo, la ocurrencia de IL fue diferente. Esto es particularmente importante cuando se estudia el efecto de alguna droga inyectada, ya que de esta manera se anula la posibilidad de que el análisis refleje la acción de algún antagonista en alguna vía que controle solo el reflejo de la extensión de probóscide, independientemente de la posible asociación al olor.

En primer lugar, los resultados hallados brindan evidencia para descartar la hipótesis de que la IL esté basada en la activación de las vías aversivas debido a la repetida y no recompensada exposición del EC, que luego se recuperaría debido a un condicionamiento apetitivo. Si la presentación repetida de un olor sin recompensa

fuera percibida como un evento aversivo, la fase de preexposición al volátil podría haber activado las vías dopaminérgicas. En efecto, la DA inhibe la recuperación de las memorias apetitivas (Mercer y Menzel, 1982) y ha sido relacionada con la presentación de un refuerzo negativo en el cerebro de las abejas (Vergoz *et al.*, 2007). En este caso, la inyección con antagonista de DA debería haber inhibido esa activación y en consecuencia las abejas preexpuestas no deberían haber evidenciado el fenómeno de IL. Los resultados hallados muestran que este no fue el caso y que las abejas preexpuestas al volátil e inyectadas con antagonistas de DA (flupentixol y flufenazina) siempre evidenciaron el fenómeno de IL.

De manera similar, los experimentos aquí desarrollados indican que la señalización con OA no necesariamente se encuentra involucrada en la IL. El bloqueo de la OA afecta los umbrales de respuesta al azúcar, así como también los procesos de adquisición (asociación olor - recompensa) debido a que la OA está involucrada en la señalización del aprendizaje apetitivo en el cerebro de la abeja (Kreissl *et al.*, 1994; Hammer y Menzel, 1995; Hammer y Menzel, 1998; Menzel *et al.*, 1999; Farooqui *et al.*, 2003; Pankiw y Page, 2003; Farooqui *et al.*, 2007). Por lo tanto, un posible mecanismo para la IL, podría implicar que las presentaciones previas de un olor sin recompensa llevaran a una reducción en la señalización de OA durante el subsiguiente condicionamiento. Los resultados aquí mostrados indican que la señalización de OA no se encuentra, necesariamente, involucrada en la IL. Se obtuvieron diferentes efectos en los grupos de abejas inyectados con mianserina y epinastina, ambos antagonistas de OA. Las abejas inyectadas con mianserina no mostraron ningún déficit en asociar el olor preexpuesto y la recompensa; en cambio las abejas inyectadas con epinastina sí evidenciaron el fenómeno de IL. A pesar de que ambos bloquean OA, difieren en cuanto a la afinidad y especificidad; siendo la selectividad de la epinastina

mucho mayor que la de mianserina (Roeder, 1999; Roeder, 2005). En este sentido vale la pena destacar que la epinastina no solo tiene una alta selectividad por los receptores de OA, sino que además posee muy baja afinidad por los receptores de otras aminas biogénicas del sistema nervioso de los insectos (Roeder *et al.*, 1998). Entonces, teniendo en cuenta las características farmacológicas de los antagonistas utilizados y los resultados aquí hallados, se sugiere que la interrupción del fenómeno de IL observado en aquellas abejas inyectadas con mianserina, no ha sido necesariamente debido a un bloqueo del sistema octopaminérgico.

En consecuencia, podría pensarse que la interrupción de la IL observada en abejas inyectadas con mianserina podría ser debido a su conocido efecto sobre los receptores de 5HT (Colas *et al.*, 1995; Tierney, 2001; Il-han *et al.*, 2010). Del mismo modo, al bloquear el sistema serotoninérgico se evitó la disminución en la adquisición promovida por la preexposición del EC. Para ello se utilizaron dos antagonistas de 5HT, ketanserina y metisergida, que interrumpieron la IL de manera similar a la mianserina. De esta manera surge como conclusión que la variación en los niveles de 5HT es determinante en el fenómeno de IL. Este fenómeno podría ser la consecuencia de un aumento en los niveles de 5HT, debido a la exposición repetida del EC sin recompensa que puede ser asociada a un estado inhibitorio (o de excitabilidad reducida) que dificultarían una futura asociación EC – recompensa. Esto concuerda con estudios previos en donde las inyecciones de 5HT evidenciaron una reducción en la adquisición durante un protocolo de aprendizaje (Mercer y Menzel, 1982; Menzel *et al.*, 1999). Aun así no se puede excluir la participación de otras aminas biogénicas; por lo que estos resultados abren el camino para las futuras investigaciones sobre el fenómeno de IL.

Los centros de procesamiento de información centrales parecen ser cruciales para el fenómeno de IL, que ha sido relacionado con procesos atencionales, como posible explicación en el retraso de la adquisición durante la fase de condicionamiento posterior a una fase de preexposición del EC.

Los trabajos que estudiaron los procesos que subyacen al desarrollo de la IL en vertebrados han demostrado que un estímulo preexpuesto retarda la adquisición ya sea en condicionamientos excitatorios como en inhibitorios (Rescorla, 1969, 1971; Reiss y Wagner, 1972; Mackintosh, 1975; Moore y Stickney, 1980; Schmajuk y Moore, 1989). Estos resultados fueron el puntapié inicial que utilizaron algunos teorizadores del aprendizaje para proponer que la preexposición no reforzada de un estímulo condicionado (EC) disminuye la atención a dicho estímulo, sin afectar su fuerza asociativa (Wagner y Rescorla, 1972; Mackintosh, 1975; Lubow *et al.*, 1981). En consecuencia, debido a la preexposición de los olores condicionados, los animales pueden aprender a ignorar a aquellos estímulos que son irrelevantes o que carecen de importancia. La atención es un proceso cognitivo por el cual un sujeto tiene la capacidad de ignorar un evento o característica del medio ambiente que no proporciona ninguna información relevante (Mackintosh, 1975; Pearce y Hall, 1980). Sería esperable, entonces, que centros más complejos de integración participen de este proceso cognitivo. En abejas, los procesos periféricos relacionados con la percepción olfativa, como la adaptación sensorial hacia un olor que ha sido utilizado tanto en una preexposición olfativa como en un subsiguiente condicionamiento, pueden ser excluidos como una posible explicación de la IL. Se han realizado registros electro-fisiológicos en abejas que mostraron una adquisición reducida hacia un olor, debido a la IL. Dichos registros evidenciaron que esa disminución en la respuesta no era causada por procesos periféricos como la adaptación sensorial, ya que no

presentaron diferencias en relación a aquellos registros de abejas no expuestas al volátil (Chandra *et al.*, 2000). Además, los umbrales de respuesta al azúcar de abejas pre-recolectoras que fueron expuestas a un volátil no presentaron cambios, descartando la posibilidad de algún tipo de interferencia de este estímulo con la respuesta gustativa (capítulo 5 de esta tesis). Resultados similares fueron reportados para moscas que fueron preexpuestas a un volátil durante cuatro días (Devaud *et al.*, 2001). Estas moscas evidenciaron ciertas adaptaciones específicas hacia el olor preexpuesto sin ninguna correlación con las respuestas electro-fisiológicas. Por lo tanto, parece ser viable que centros de orden superior estén implicados en el desarrollo de la IL.

Las investigaciones de los procesos que subyacen al desarrollo de la IL en vertebrados han demostrado que los estímulos preexpuestos, ya sean del tipo excitatorio o inhibitorio, retrasan la adquisición (Rescorla, 1969, 1971, Reiss y Wagner, 1972; Mackintosh, 1975; Moore y Stickney, 1980; Schmajuk y Moore, 1989). Una posible explicación a estas respuestas fue que la exposición no recompensada al EC disminuye la atención, o la asociatividad de dicho estímulo, sin afectar la fuerza asociativa (Wagner y Rescorla, 1972; Mackintosh, 1975; Lubow *et al.*, 1981). Esta explicación sería consistente con la falta de efecto de IL luego de interferir específicamente con la OA o DA, que modulan las asociaciones EC-EI. De esta manera, a través de la preexposición del olor condicionado, las abejas aprenderían a ignorar aquellos olores que sean irrelevantes o sin ninguna consecuencia aparente. La atención es un proceso cognitivo multidimensional que incluye la habilidad de seleccionar y focalizar un aspecto del medioambiente mientras se ignoran otros (James, 1890; Gaddes y Edgell, 1994) y por ende se piensa que recae en centros de integración de orden superior en el cerebro. En vertebrados, algunos centros

sensoriales de orden superior como el hipocampo están involucrados en la inhibición latente (Chamizo, 2006; Lubow y Weiner, 2010). Es posible, entonces que al igual que en vertebrados, en los invertebrados, centros de integración de orden superior se encuentren involucrados en el desarrollo de la IL. En este sentido, los neuropilos candidatos son los cuerpos pedunculares, que están involucrados en el aprendizaje y memoria, en la decodificación sensorial y en el control motor (Menzel y Erber, 1978; Hammer y Menzel, 1995; Heisenberg, 2003; Giurfa, 2007). Estos exhiben una amplia inervación de 5HT (Schürmann y Klemm, 1984) y OA (Hammer, 1993; Schröeter *et al.*, 2007; Sinakevitch *et al.*, 2011) y una alta densidad de sitios de unión para estas aminas biogénicas (Erber *et al.*, 1993). Bloquear de manera reversible los MB con una inyección de procaina (Devaud *et al.*, 2007) permitiría poner a prueba esta hipótesis. En este caso, el bloqueo de los MB afectaría significativamente la expresión de la IL.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que es posible estudiar este fenómeno de IL ampliamente distribuido tanto a nivel comportamental como a nivel neural. Nuevos estudios deberían realizarse para estudiar en detalle los mecanismos, la dinámica temporal y el rol de los cuerpos pedunculares en la LI en las abejas melíferas y proporcionar de este modo una visión integradora sobre cómo la preexposición a un estímulo afecta el aprendizaje ulterior de ese estímulo.

7

7. Conclusiones generales

Es sabido que la abeja *Apis mellifera* es un modelo experimental muy utilizado en estudios relacionados al aprendizaje y la memoria (von Frisch, 1967; Menzel 1999; Giurfa, 2004); no sólo por sus buenas habilidades para aprender y memorizar, sino también porque es factible acceder a su sistema nervioso con el fin de correlacionar sus cambios con variables comportamentales. En esta tesis nos focalizamos en un fenómeno ampliamente presente en numerosos taxones, como es la *inhibición latente*. Este fenómeno fue analizado en la abeja *Apis mellifera* por primera vez por Abramson y Bitterman (1986), quienes desarrollaron un protocolo de perturbación durante la recolección de alimento en abejas de libre vuelo. Luego, varios estudios analizaron este tópico bajo condiciones controladas de laboratorio (Chandra *et al.*, 2000; Sandoz *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001; Gerber *et al.*, 1996; Chandra *et al.*, 2010), en donde

la IL se estudió en el marco del condicionamiento clásico de extensión de probóscide (REP, Bitterman, 1983). A lo largo de esta tesis hemos comprobado que la abeja *A. mellifera* es un excelente modelo experimental para ahondar esta temática, dado que es factible llevar a cabo protocolos experimentales de laboratorio como de vuelo libre; incluso fue posible realizar estudios tanto desde lo conductual como desde lo farmacológico.

En primer lugar exploramos los efectos de los volátiles preexpuestos en el ambiente de la colmena sobre las preferencias recolectoras (capítulo 3). Se brindó con este estudio una de las primeras evidencias que muestran una clara conducta de evitación en un contexto recolector, hacia fuentes de alimento aromatizadas con el olor preexpuesto. Los olores florales que no están directamente pareados con el alimento en el contexto social de la colmena promovieron una reducción en el número de visitas hacia sitios de recolección que ofrecían solución azucarada aromatizada con el mismo olor preexpuesto.

Se exploraron también los efectos de la preexposición de volátiles sobre un aprendizaje olfativo del tipo apetitivo (capítulo 4). En particular estudiamos cómo esta preexposición olfativa actúa sobre algunas de las habilidades cognitivas de la abeja, como por ejemplo la discriminación y la adquisición de olores. Nuestros resultados mostraron una disminución en la tasa de adquisición a lo largo del aprendizaje cuando el olor condicionado recompensado era el preexpuesto en el ambiente social. Contrariamente, si el olor preexpuesto era utilizado como estímulo condicionado no recompensado, los individuos no presentaban ninguna mejora en la adquisición; comprobando que la preexposición a volátiles ni mejora la discriminación de nuevos olores recompensados ni promueve una inhibición generalizada a cualquier olor recompensado, siendo entonces olor-específica. Este fenómeno fue evidenciado en

abejas de colmena, contemplando varias categorías etarias: en abejas jóvenes (4 a 6 días), en abejas de edades intermedias (9 a 12 días) y en recolectoras. Todas estas categorías de edades, evidenciaron IL frente a la exposición de volátiles y su efecto fue de corta duración. Bajo condiciones controladas de laboratorio, es decir con abejas emergidas de incubadoras que vivieron toda su vida adulta en un ambiente controlado, se evaluó la exposición de volátiles a edades recolectoras que oscilaron entre 13 y 17 días de vida, comprobándose IL a largo término al aumentar la intensidad del EC preexposición; ya sea en términos de concentración del volátil y/o tiempo de exposición del mismo (capítulo 4).

Por otro lado, también bajo condiciones controladas de laboratorio, estudiamos la exposición de los volátiles durante edades pre-recolectoras y su efecto en el condicionamiento olfativo a largo término (edades recolectoras). El efecto de la preexposición al volátil sobre la sensibilidad gustativa en abejas de edad pre-recolectora (7 y 14 días de vida) también fue evaluado (capítulo 5). Ningún efecto marcado fue registrado a largo término aun cuando la exposición del volátil se haya realizado durante edades tempranas que han sido sugeridas como críticas para adquirir información quimio-sensorial en abejas *A. mellifera*. Por lo tanto se infiere que la IL es un proceso cognitivo que puede tener lugar en individuos de cualquier edad, al menos en el estadio adulto. Además podemos descartar que la IL esté causada por un efecto de adaptación sensorial, ya que los umbrales de sensibilidad gustativa no difirieron entre abejas expuestas o no expuestas a volátiles en el medio.

Por último, realizamos estudios farmacológicos y de conducta para dilucidar si alguna de las aminas biogénicas (octopamina, dopamina y serotonina) que tienen un rol relevante en el comportamiento y fisiología en insectos, podrían estar involucradas en la modulación de este fenómeno (capítulo 6). Evaluando el efecto de distintos

antagonistas de las aminas mencionadas, hallamos que la serotonina es capaz de interrumpir la IL. Los resultados de este estudio son los primeros en mostrar una interrupción de este fenómeno en invertebrados; además de abrir nuevos interrogantes y perspectivas con relación al estudio de las vías neurales involucradas.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir efectos a escala individual y colectiva en la abeja *Apis mellifera*. Por un lado, su versatilidad experimental permitió aproximaciones conductuales y neurobiológicas que hasta el presente no estaban esclarecidas, que permitieron determinar: i) La preexposición de volátiles solo promueve un déficit durante el establecimiento de la contingencia si el olor preexpuesto es presentado como estímulo condicionado recompensado (EC+). ii) Si el olor preexpuesto es presentado como EC-, no genera efectos facilitatorios en la discriminación olfativa. iii) No se evidencia efectos a largo término, salvo en las situaciones puntuales mencionadas anteriormente. iv) Afecta a individuos adultos de cualquier edad. v) Las vías serotoninérgicas serían las involucradas en la modulación de este fenómeno.

Por otro lado, las consecuencias a escala colectiva de la IL permiten realizar inferencias respecto a la propagación de información quimio-sensorial dentro del nido y la consecuente coordinación de actividades relacionadas con la recolección de néctar. Con esto nos referimos a que la preexposición de volátiles florales dentro de la colmena puede tener un efecto negativo en la propagación de información floral olfativa referida a ese tipo floral, así como sobre el reclutamiento de nuevos individuos hacia fuentes de néctar que ofrezcan esos volátiles. De esta manera, a partir de un modelo experimental ideal para realizar estudios integrativos desde varios niveles de complejidad, como lo es la abeja melífera, fue posible abordar, a partir de estudios de

fisiología del comportamiento tópicos neurobiológicos. Asimismo fue factible inferir hipótesis a una escala de biología social, que esperamos puedan ser profundizadas en futuras líneas de investigación del laboratorio.

8

8. Bibliografía

- Abramson CI y Bitterman ME (1986). Latent inhibition in honeybees. *Anim Learn Behav* 14:184–189.
- Ackil J, Mellgren RL, Halgren C y Frommer S P (1969). Effects of CS pre-exposure on avoidance learning in rats with hippocampal lesions. *J Comp Physiol Psychol* 69:739-747.
- Ackil JE y, Mellgren RL (1968). Stimulus preexposure and instrumental learning. *Psychon Sci* 11:339.
- Arenas A, Farina WF (2008). Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *J Comp Physiol A* 194:629–640
- Arenas A, Fernández VM, Farina WM (2007). Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissenschaften* 94, 218-222
- Arenas A, Fernandez VM, Farina WM (2008). Floral scents experienced within the colony affect long-term foraging preferences in honeybees. *Apidologie* 39:714–722
- Arenas Andrés (2010). Tesis Doctoral: Aprendizaje olfativo temprano en la abeja (*Apis mellifera*) y su rol en la toma de decisiones relacionadas con la obtención de recursos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Balsam, PD (1985). The function of context in learning and performances. In: *Context and Learning* (Ed. by P. D. Balsam & A. Tomie), pp. 1–22. Hillsdale, New Jersey: L. Erlbaum.
- Barron AB, Maleszka R, Vander Meer RK y Robinson GE (2007). Octopamine modulates honey bee dance behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1703-1707
- Barron AB, Schulz DJ, y Robinson G E (2002). Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 188, 603-610.
- Barron AB, y Robinson GE (2005). Selective modulation of task performance by octopamine in honey bee (*Apis mellifera*) division of labour. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 191, 659-668.

- Baruch I, Hemsley D y Grat JA (1988a). Differential performance of acute and chronic schizophrenics in a latent inhibition task. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 176, 598-606.
- Baruch I, Hemsley D y Gray J A (1988b) Latent inhibition and “psychotic proneness” in normal subjects. *Personality and Individual Differences*, 9, 777-783.
- Bhagavan S y Smith BH (1997). Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity *Physiology and Behavior* 61:107-117
- Bhagavan S, Benatar S, Cobey S, Smith BH (1994) Effect of genotype but not of age or caste on olfactory learning performance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim. Behav.*, 48: 1357-1369
- Bialystok E (2001). *Bilingualism in development: language, literacy, and cognition*. Cambridge University Press.
- Bicker G y Menzel R (1989). Chemical codes for the control of behavior in arthropods. *Nature*, 337 (6202):33-39.
- Bills C, Schachtman T, Serfozo P, Spooren W, Gasparini F y Simonyi A (2005). "Effects of metabotropic glutamate receptor 5 on latent inhibition in conditioned taste aversion". *Behavioural Brain Research* 157: 71-8.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A y Schafer S (1983). Classical-conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97:107-119
- Blenau W y Erber J (1998). Behavioural pharmacology of dopamine, serotonin and putative aminergic ligands in the mushroom bodies of the honeybee (*Apis*). *Brain Research*, 96, 115 - 124.
- Blenau W y 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.
- Bloch G y Meshi A (2007). Influences of octopamine and juvenile hormone on locomotor behavior and period gene expression in the honeybee, *Apis mellifera*. Volume 193, Number 2, 181-199
- Blodgett HC (1929). The effect of the introduction of reward upon the maze performance of rats. *Univ Calif Publ Psychol* 4:113-134
- Boughner RL y Papini MR (2006). Appetitive latent inhibition in rats: Preexposure performance does not predict conditioned performance. *Behavioural Processes* 72, 42-51.
- Bouton ME y Moody EW (2004). Memory processes in classical conditioning. (Special issue: Neurobiology of cognition in laboratory animals: challenges and opportunities) *Neurosci Biobehav Rev* 28: 663-674
- Bradbury JW y Vehrencamp SL (1998). *Principles of animal communication*. Sinauer, Sunderland.
- Breed MD, Perry S y Bjostad LB (2004). Testing the blank slate hypothesis: why honey bee colonies accept young bees. *Insectes Soc* 51:1216
- Burrell, B. D., & Sahley, C. L. (2001). Learning in simple systems. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 757-764.
- Carew TJ (2000). *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Carlsson MA, Galizia CG y Hansson BS (2002). Spatial representation of odours in the antennal lobe of the moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Senses*. 27: 231-244.

- Carlton PL y Vogel JR (1967). Habituation and conditioning. *J Comp Physiol Psychol* 63:348-351
- Chamizo M (2006). Características experimentales y neurobiología de la inhibición latente en el paradigma de aprendizaje aversivo gustativo. *Psicológica*, 27, 169-194.
- Chandra SBC, Hosler JS y Smith BH (2000). Heritable Variation for Latent Inhibition and Its Correlation with Reversal Learning in Honeybees (*Apis mellifera*) these correlation responses can therefore be crucial to. *Journal of Comparative Psychology* 1, 86-97.
- Chandra SBC, Wright GA y Smith BH (2010). Latent inhibition in the honey bee, *Apis mellifera*: Is it a unitary phenomenon? *Animal cognition*, 10:805-815.
- Chapman (1998). *The Insects: Structure and Function*. By R.F. Chapman 770 pp. Cambridge University Press.
- Colas JF, Launay JM, Kelelermann O, Rosay P y Maroteaux L (1995). *Drosophila* 5-HT2 serotonin receptor: coexpression with fushi tarazu during segmentation. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 92, 5441-5445.
- Corlborn M, Ahmad-Annuar A, Fauria K y Collet T (1999). Contextual modulation of visuomotor associations in bumble bees (*Bombus terrestris*). *Proc. R. Soc. Lond. B* December 7, 1999 266: 2413-2418; doi:10.1098/rspb.1999.0940
- Cornwell-Jones CA, Velasquez P, Wright EL y McGaugh JL (1988). Early experience influences adult retention of aversively motivated tasks in normal, but not DSP4-treated rats. *Dev. Psychobiol.* 21: 177-185
- Couvillon PA, Arakaki L y Bitterman ME (1997). Intramodal blocking in honeybees. *Animal Learning and Behavior* 25 (3): 277-282.
- Cramer CP, Pfister JP y Haig KA (1988). Experience during suckling alters later spatial learning. *Dev Psychobiol* 21: 1-24
- Daly KC, Durtschi ML y Smith BH (2001). Olfactory-based discrimination in the moth, *Manduca sexta*. *J Insect Physiol* 47:375-384
- Davis M (1974). Sensitization of the rat startle response by noise. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 87:571-581
- Davis RK, Cherry J, Dauwalder B, Han PL y Skoulakis, E. (1995). The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Molecular and Cellular Biochemistry* 149-150, 271-278
- Davis RL (1993). Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* 11 (1): 1-14
- De Belle JS y Heisenberg M (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263 (5147): 692-695
- Degen J, Gewecke M, y Roeder T (2000). Octopamine receptors in the honey bee and locust nervous system: pharmacological similarities between homologous receptors of distantly related species. *Animals*, 587-594.
- Dethier VG, Solomon RL y Turner LH (1965). Sensory input and central excitation and inhibition in the blow fly. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 60, 303-313
- Devaud JM, Acebes A y Ferrús A (2001). Odour exposure causes central adaptation and morphological changes in selected olfactory glomeruli in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 21 (16): 6274 – 6282

- Devaud JM, Blunk A, Poduffall J, Giurfa M y Grünewald B (2007). Using local anaesthetics to block neuronal activity and map specific learning tasks to the mushroom bodies of an insect brain *European Journal of Neuroscience*, 26 (11): 3193-3206 doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05904.x
- Dibattista D, Hollis - Walker L y Hague L (2003). The CS pre-exposure effect in conditioned taste-aversion learning in golden hamsters. *The Journal of General Psychology*, 130, 446-461.
- Dickinson A (1980). *Contemporary animal learning theory*. Cambridge University Press, Cambridge
- Dornhaus A y Chittka L (1999). Evolutionary origins of bee dances. *Nature* 401, 38
- Dudai Y (1989). *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends*. New York: Oxford Univ. Press.
- Erber J, Kloppenburg P y Scheidler A (1993). Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia* 49, 1073-1083.
- Erber J, Masuhr T y Menzel R (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* 5: 343-358.
- Escorihuela RM, Tobena A y Fernández-Teruel A (1995). Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learning & Memory* 2, 40-48.
- Fan R, Anderson P y Hansson B (1997). Behavioral analysis of olfactory conditioning in the moth *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Exp. Biol.* 200, 2969–2976.
- Farina WM, Grüter C, Acosta LE y Mc Cabe S (2007). Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften* 94:55-60
- Farina WM, Grüter C, y Diaz PC (2005). Social learning of floral odours within the honeybee hive. *Proc. R. Soc. B* 272, 1923-1928
- Farooqui T (2007). Octopamine-Mediated Neuromodulation of Insect Senses. *Neurochem Res* (2007) 32:1511–1529
- Farooqui T, Robinson K, Vaessin H, y Smith BH (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *The journal of Neuroscience* 23, 5370-5380.
- Farris SM, Robinson GE y Fahrbach SE (2001). Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *J. Neurosci.* 21(16): 6395–6404
- Ferguson HJ, Cobey S y Smith BH (2001). Sensitivity to a change in reward is heritable in the honeybee, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 61:527-534
- Ferrari MCO y Chivers DP (2011). Learning about non-predators and safe places: the forgotten elements of risk assessment. *Anim Cog* DOI 10.1007/s10071-010-0363-4
- Franks NR, Hooper JW, Dornhaus A, Aukett PJ, Hayward AL y Berghoff S (2007). Reconnaissance and latent learning in ants. *Proc R Soc B* 274:1505-1509
- Free JB (1958). Attempts to condition bees to visit selected crops. *Bee World* 39(9), 221-230
- Friedrich RW y Korsching SI (1997). Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18: 737–752.
- Frings H (1944). The loci of olfactory end organs in the honeybee *Apis mellifera*. *Linn J Exp Zool* 97: 123-134.

- Gaddes WH y Edgell D (1994). Learning disabilities and brain function: A neuropsychological approach. Berling- Springer- Verlag.
- Galizia CG, McIlwrath SL y Menzel R (1999). A digital three-dimensional atlas of the honeybee AL based on optical sections acquired using confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 295: 383–394.
- Galizia CG, Nägler K, Hölldobler B y Menzel R (1998). Odour coding is bilaterally symmetrical in the AL of honeybees (*Apis mellifera*). *Eur. J. Neurosci.* 10, 2964–2974.
- Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J, Kowalksy O, Wüstenberg D y Menzel R (1996) Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 52:1079–1085
- Getz WM y Smith KB (1991). Olfactory perception in honeybees: concatenated and mixed odorant stimuli, concentration, and exposure effects. *J Comp Physiol A* 169:215–230
- Gil M y De Marco RJ (2005). Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 208, 671-680
- Giurfa M (2003). Cognitive neurothology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr. Opin Neurobiol.* 13, 726-735
- Giurfa M (2006). Associative learning: The Instructive Function of Biogenic Amines. *Curr Biol* 16(20): 892-895.
- Giurfa M y Lehrer M (2001). Honeybee vision and floral displays: from detection to close-up recognition. In: Chittka L, Thomson JD (eds) *Cognitive ecology of pollination*. Cambridge University Press, pp 61-82.
- Giurfa M, Núñez JA, Chittka L y Menzel R (1995). Colour preferences of flower-naive honeybees. *J Comp Physiol A* 177:247–259
- Giurfa, M (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *J. Comp. Physiol A* 193 (8): 801-824
- Goodman L (2003). Form and Function in the Honey Bee. Westdale Press, Cardiff in de Brito Sanchez MG, Giurfa M, Rolla de Paula Mota T y Gauthier M (2005). Electrophysiological and behavioural characterization of gustatory responses to antennal bitter taste in honeybees. *European journal of Neuroscience*, vol 22, pp. 31161-3170
- Goyret J y Farina WM (2005). Non-random nectar unloading interactions between foragers and their receivers in the honeybee hive. *Naturwissenschaften* 92: 440–443
- Greggers U y Menzel R (1993) Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. *Behavioral ecology and Sociobiology* 32:17-29.
- Groves PM, Lee D y Thompson RF (1969). Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat. *Physiology and Behavior* 4: 383-388.
- Grüter C y Farina WM (2009). Past experiences affect interaction patterns among foragers and hive-mates in honeybees. *Ethology*. *Ethology* 115 (2009)790–797.
- Grüter C, Acosta LE y Farina WM (2006). Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60, 707-715
- Hammer M (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59–63

- Hammer M (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees *Trends Neurosci.* (1997) 20, 245–252
- Hammer M y Menzel R (1995). Learning and Memory in the honeybee. *The Journal of Neuroscience* 15, 1617-1630.
- Hammer M y Menzel R (1998) Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem* 5: 146–156.
- Hartlieb E (1996). Olfactory conditioning in the moth *Heliothis virescens*. *Naturwissenschaften* 83, 87-88.
- Hebb DO (1947). The effects of early experience on problem-solving at maturity. *American Psychologist*, 2, 306-307. En: Dukas, R., y Mooers, A. Ø. (2003). Environmental enrichment improves mating success in fruit flies. *Methods*, 741-749.
- Heisenberg M (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature reviews Neuroscience* 4, 266-75
- Hildebrand JG y Shepherd GM (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla *Annu. Rev. Neurosci.*, 20: 595-631
- Holland PC (1993). Cognitive aspects of classical conditioning. *Current Opinion in Neurobiology*, 3,230–236. En Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends.* New York: Oxford Univ. Press.
- Ichikawa N y Sasaki M (2003). Importance of social stimuli for the development of learning capability in honeybee. *Appl. Entomol. Zool.*, 38: 203-209.
- Il-han J, Janes T y Lukowiak K. (2010). The role of serotonin in the enhancement of long-term memory resulting from predator detection in *Lymnaea*. *Journal of Experimental Biology*, 3603-3614.
- Iso H, Simoda S y Matsuyama T (2007). Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behav. Brain Res.* 179: 90–98
- James JP (1971). Latent inhibition and the preconditioning interval. *Psychonomic Science* 24:97-98
- James W (1890). *Principles of Psychology.* New York: Henry Holt.
- Jandt JM y Jeanne RL (2005). German yellowjacket (*Vespula germanica*) foragers use odors inside the nest to find carbohydrate food sources. *Ethology* 111, 641-651
- Joerges J, Küttner A, Galizia CG y Menzel R (1997). Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387: 285–288.
- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (Eds.) (1992). *Principles of neural science.* New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier.
- Knudsen JT, Tollsten L y Bergstrom LG (1993). Floral scents - A checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry* 33, 253-280.
- Konorski J y Szwejkowska G (1952). Chronic extinction and restoration of conditioned reflexes. IV. The dependence of the course of extinction and restoration of conditioned reflexes on the history of the conditioned stimulus (the principle of primacy of first training). *Acta Biologiae Experimentalis* 16:95-113
- Krasne FB y Glanzman DL (1986). Sensitization of the crayfish lateral giant escape reaction. *J. Neurosci.* 6: 1013-1020.

- Kravitz E (1988). Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobsters. *Science (New York, N.Y.)* 241, 1775-81
- Kravitz EA y Huber R (2003). Aggression in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 736-743.
- Kreissl S, Eichmüller S, Bicker G, Rapus J y Eckert M (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology* 348:583-595.
- Kuwabara M (1957). Bildung des bedingten ReXexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifera*. *J Fac Hokkaido Univ Serv VI Zool* 13:458-464.
- Laloi D y Pham-Delègue MH (2004). Bumble Bees Show Asymmetrical Discrimination Between Two Odors in a Classical Conditioning Procedure. *J Insect Behav* 17, 3, 385-396.
- Lerner RL, Gyorgy TK, Reagan J, Roby-Shemkovitz A, Rybcynski R y Vogt RG (1990). Peripheral events in moth olfaction. *Chem. Senses* 15: 191-198
- Lewis W J, Tumlinson J H, y Kmsnoff S (1991). Chemically mediated associative learning: an important function in the foraging behavior of *Microplites croceipes* (Cresson). *J. Chem. Ecol.* 17: 1309-1325.
- Lindauer M (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z vergl Physiol.*, 34: 299-345
- Lindauer M (1963). Allgemeine Sinnesphysiologie. Orientierung im Raum. *Fortschr Zool* 16:58-140.
- Lorenz K (1935). Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. *Zeitschrift für Ornithologie*, 83: 137-213, 289-413
- Loy I, Fernández V y Acebes F (2006). Conditioning of tentacle lowering in the snail (*Helix aspersa*): acquisition, latent inhibition, overshadowing, second-order conditioning, and sensory preconditioning. *Learning & behavior: a Psychonomic Society publication* 34, 305-14.
- Lubow RE (1965). Latent inhibition: Effects of frequency of non-reinforced preexposure to the CS. *J Comp Physiol Psychol* 60:454-455
- Lubow RE (1973). Latent inhibition. *Psychol Bull* 79: 398-408.
- Lubow RE (1989). Latent inhibition and conditioned attention theory. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lubow RE y Moore AU (1959). Latent Inhibition: The effect of nonreinforced pre-exposure to the conditional stimulus. *J Comp Physiol Psychol* 52:416-419
- Lubow RE, Markhan RE y Allen J (1968) Latent inhibition and classical conditioning of the rabbit pinna response. *J Comp Physiol Psychol* 60:454-455
- Lubow RE y Siebert L (1969). Latent inhibition within the CER paradigm. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1969, 68,136-138. En Lubow RE (1973). Latent inhibition. *Psychological Bulletin* 79,6: 398-407.
- Lubow R y Weiner I (2010). Latent Inhibition: Cognition, Neuroscience and Application to Schizophrenia. Edited by Professor R.E. Lubow y Professor Ina Weiner. Cambridge University Press
- Lubow RE, Weiner I y Schnur P (1981). Conditioned attention theory. InG. H. Bower (Ed.), *The Psychology of Learning and Motivation*, vol. 15. New York: Academic Press, pp.1-49.
- Lunney GH (1970). Using analysis of variance with a dichotomous dependent variable: an empirical study. *J Educ Meas* 7:263-269
- Mackintosh NJ (1975). A theory of attention: Variations in the associability of stimuli with reinforcement. *Psychol Rev* 82: 276-298

- Mackintosh NJ (1994). *Animal learning and cognition*. Academic Press, London, UK .
- Marcus EA, Nolen TG, Rankin CH y Carew TJ (1988). Behavioral dissociation of dishabituation, sensitization, and inhibition of *Aplysia*. *Science* 241: 210-213.
- Masson C, Pham-Delègue MH, Fonta C, Gascuel J, Arnold G, Nicolas G y Kerszberg M (1993). Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in the honeybee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 24: 169-194
- Mauelshagen J y Greggers U (1993). Experimental access to associative learning in honeybees. *Apidologie* 249-266.
- Menzel R (1985). Learning in honey bees in an ecological and behavioural context. *Fortschritte der Zoologie*, BD. 31 Hölldobler/Lindauer (Hrsg.): *Experimental Behavioral Ecology* G Fischer Verlag. Stuttgart. New York.
- Menzel R (1990). Learning, memory and cognition in honey bees. *Neurobiology of Comparative Cognition*. Erlbaum Inc, Hillsdale, NJ, 237-292.
- Menzel R (1993). Associative learning in honey bees. *Apidologie* 24: 157-168.
- Menzel R (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185: 323-340
- Menzel R y Erber J (1978). Learning and memory in the honeybee. *Scientific American* 239 (1) 80-87
- Menzel R, Erber J y Masuhr T (1974). Learning and memory in the honeybee. *Experimental Analysis of Insect Behaviour*, 195-217
- Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B y Fiala A (1999). Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-realising functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behavioral Neuroscience* 113, 4: 744-754.
- Mercer AE y Menzel R (1982). The effect of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 145:363-368.
- Michener CD (1974). *The Social Behavior of Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press, Cambridge
- Mitzunami M y Matsumoto Y (2010). Roles of aminergic neurons in formation and recall of associative memory in crickets. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Vol 4, 1-11
- Moore JW y Stickney KJ (1980). Formation of attentional-associative networks in real time: role of the hippocampus and implications for conditioning. *Physiological Psychology*, 8, 207-217
- Mota T, Yamagata N, Giurfa M, Gronenberg W y Sandoz JC (2011). Neural organization and visual processing in the anterior optic tubercle of the honeybee brain. *J Neurosci*. 31(32):11443-56.
- Neal WR (1972). The effect of environmental deprivation on speech and language development : Implications for child care workers. *Child Care Quarterly* 1:157-172.
- Oitzl MS, Workel JO, Flutterm M, Frosch F y De Kloet ER (2000). Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: Amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. *Eur. J. Neurosci*. 12 (10): 3771-3780.
- Oster GF y Wilson EO (1978). *Caste and ecology in the social insects*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.

- Page RE y Erber J (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89:91-106
- Page RE, Erber J y Fondrk MK (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 182:489-500.
- Pankiw T y Page RE (1999). The effects of genotype, age, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees. *J Comp Physiol A* 185:207-213.
- Pankiw T y Page RE (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.
- Pavlov IP (1927). *Lectures on conditioned reflexes*. International publishers, New York.;
- Pearce JC y Hall G (1980). A model for pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol. Rev.* 87 : 532-552.
- Pearce JM y Bouton ME (2001). Theories of associative learning in animals. *Annual Review of Psychology*, 52, 111-139. En Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends*. New York: Oxford Univ. Press.
- Pham-Delègue MH, Roger B, Charles R y Masson C (1990). Effet d'une prè-exposition olfactive sur un comportement d'orientation en olfactomètre dynamique à quatre voies chez l'abeille (*Apis mellifera* L.) *Insectes Soc* 37: 181-187.
- Philips GT, Tzvetkova EI, Marinesco S y Carew TJ (2006). Latent memory for sensitization in *Aplysia* Latent memory for sensitization in *Aplysia*. *Learning & Memory*, 224-229.
- Pinsker H, Hening W, Carew TJ y Kandel ER (1973) Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 182: 1039.
- Provecho y Josens R (2009). Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *Journal of Experimental Biology* 3221-3227.
- Pryce CR y Feldon J (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav R* 27: 57-71
- Ramirez GP (2008). Tesis de Licenciatura: Sensibilidad gustativa luego del aprendizaje olfativo en la abeja *Apis mellifera*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Buenos Aires. Bs. A., Argentina.
- Raubenheimer D y Tucker D (1997). Associative learning by locusts: Pairing of visual cues with consumption of protein and carbohydrate. *Anim. Behav.* 54 (6): 1449-1459
- Ray S y Ferneyhough B (1997). The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *NeuroReport* 8: 789-793
- Reiss S y Wagner AR (1972). CS habituation produces a "latent inhibition effect" but no active "conditioned inhibition." *Learning and Motivation*, 3, 237-245.
- Rescorla R.A, Durlach PJ y Grau JW (1985). Context learning in Pavlovian conditioning. In: *Context and Learning* (Ed. by P. D Balsam & A. Tomie), pp. 23-56. Hillsdale, New Jersey: L. Erlbaum.
- Rescorla RA (1969). Pavlovian conditioned inhibition. *Psychol Bull* 72:77-94
- Rescorla RA (1971). Summation and retardation tests of latent inhibition. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 75, 77-81.

- Ribbands CR (1955). The scent perception of the honeybee. *Proc R Entomol Soc Lond B* 143:367-379.
- Robinson GE, Heuser LM, LeConte Y, Lenquette F y Hollingworth RM (1999). Neurochemicals aid bee nestmate recognition. *Nature*, 399:534-535
- Roces F (1990). Olfactory conditioning during the recruitment process in a leaf-cutting ant. *Oecologia* 83, 261-262
- Roeder T (1999). Octopamine in invertebrates. *Progress in neurobiology* 59, 533-61.
- Roeder T, Degen J y Gewecke M (1998). Epinastine, a highly specific antagonist of insect neuronal octopamine receptors. *European journal of pharmacology* 349, 171-7.
- Roeder T. (2005). Tyramine and Octopamine: Ruling Behavior and Metabolism. *Annual Rev. of Entom.* 50: 447-477. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130404
- Rösch GA (1925). Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z vergl Physiol.*, 2: 571-631
- Rubin BD y Katz LC (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 23: 499-511
- Sabogal y Otero (1975). Aprendizaje temprano: una revisión. *Revista Latinoamericana de Psicología*, año/vol. 7, número 002. Fundación Universitaria Konrad Lorenz. Bogotá, Colombia. Pp 173-203.
- Sachse S y Galizia CG (2002). The role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.*, 87, 1106–1117.
- Sachse S, Rappert A y Galizia CG (1999). The spatial representation of chemical structures in the AL of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur. J. Neurosci.* 11: 3970–3982.
- Sandoz JC, Laloi D, Odoux JF y Pham-Delègue MH (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim Behav* 59:1025–1034
- Sandoz JC, Pham-Delegue MH, Renou M y Wadhams LJ (2001) Asymmetrical generalisation between pheromonal and floral odours in appetitive olfactory conditioning of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 187: 559–568.
- Schacter DL y Buckner RL (1998). Priming and the brain. *Neuron* 20,185-195
- Scheiner R, Baumann A y Blenau W (2006). Aminergic control and Modulation oh Honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology* 4:259-276.
- Scheiner R, Page RE y Erber J (2001). The Effects of Genotype, Foraging Role, and Sucrose Responsiveness on the Tactile Learning Performance of Honey Bees (*Apis mellifera* L.) *Neurobiol. Learn. Mem.* 76: 138–150
- Scheiner R, Plückhahn S, Öney B, Blenau W y Erber J (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav. Brain Res* 136: 545–553.
- Schmajuk NA y Moore JW (1989). Effects of hippocampal manipulations on the classically conditioned nictitating membrane response: Simulations by an attentional-associative model. *Behavioral Brain Research*, 32, 173-189.
- Schneider D y Steinbrecht RA (1968). Checklist of insect olfactory sensilla. *Symp. Zool. Soc.* 23: 279-297
- Schroeter U, Malun D y Menzel R (2007). Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurones in the honeybee brain. *Cell Tissue Res.* 327,647-667.

- Schroll C, Riemensperger T, Bucher D, Ehmer J, Völler T, Erbguth K, Gerber B, Hender T, Nagel G, Buchner E y Fiala A (2006). Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr Biol* 16: 1741–1747.
- Schulz DJ, Robinson GE (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 187, 53-61.
- Schröter U, Malun D y Menzel R (2007). Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurones in the honeybee brain. *Cell and tissue research* 327, 647-67.
- Schultz D y Sullivan J (2002). Juvenile hormone and octopamine in the regulation of division of labor in honey bee colonies. *Hormones and Behaviour* 42: 222-231.
- Schulz DJ y Robinson GE (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A* 187: 53-61.
- Schürmann F y Klemm N (1984). Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol.* 225,570-580.
- Scott JP (1962). Critical Periods in Behavioral Development. *Science* 138: 949-958.
- Seeley TD (1982). Adaptive significance of the age polytheism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11 (4): 287-293
- Seeley TD (1995). *The Wisdom of the Hive*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Siegel S (1970). Retention of latent inhibition. *Psychonomic Science* 20:161-162
- Sinakevitch I, Mustard JA y Smith BH (2011). Distribution of the octopamine receptor AmOA1 in the honey bee brain. *PlosOne* 6 (1):e14536.
- Skinner BF (1938). *The behavior of organisms*. Appleton, New York.
- Smith BH (1993). Merging mechanism and adaptation: An ethological approach to learning and generalization. In Papaj, D. R., and Lewis, A. C. (ed.), *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*, Chapman and Hall, New York, pp. 126–157.
- Smith BH (1997). An analysis of blocking in binary odorant mixtures: an increase but not a decrease in intensity of reinforcement produces unblocking. *Behavioral Neuroscience* 111: 57–69.
- Smith BH y Cobey S (1994). The olfactory memory of honey bee, *Apis mellifera*: II. Blocking between odorants in binary mixtures. *J. Exp. Biol.* 195: 91–108.
- Smith BH y Menzel R (1989). The use of electromyogram recordings to quantify odorant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 35: 369–375
- Snodgrass RE (1984). *Anatomy of the Honey bee*. Cornell University Press Ltd., London
- Sokal RR y Rohlf FJ (2000). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. State University of New York, New York.
- Spivak M, Masterman R, Ross R y Mesce KA (2003). Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *Journal of neurobiology* 55, 341-54.
- Squierre J y Kandel ER (1999). *Memory: from mind to molecules*. Scientific American Library.
- Srinivasan MV (1994). Pattern recognition in the honeybee: recent progress. *J Insect Physiol* 40:183–194

- Srinivasan MV, Zhang SW y Bidwell NJ (1997) Visually mediated odometry in honeybees. *J Exp Biol* 200:2513–2522
- Srinivasan MV, Zhang SW y Zhu H (1998). Honeybees link sights to smells. *Nature* 396: 637–638
- Suboski MD, Di Lollo V y Gormezano I (1964). Effects of unpaired preacquisition exposure of CS and UCS on classical conditioning of the nictitating membrane response of the albino rabbit. *Psychol Reports* 15:571-576
- Susswein AJ y Schwarz M (1983). A learned change of response to inedible food in *Aplysia*. *Behav. Neural Biol.* 39: 1–6.
- Swerdlow NR, Stephany N, Wasserman LC, Talledo J, Sharp R y Auerbach PP (2003). Dopamine agonists disrupt visual latent inhibition in normal males using a within-subject paradigm. *Psychopharmacology* 169 (3-4): 314–20.
- Takeda K (1961). Classical conditioned response in the honeybee. *JInsect Physiol* 6:168–179
- Thorpe WH (1963). *Learning and instinct in animals*, 1st ed. London, UK: Methuen.
- Tierney AJ (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 128, 791–804.
- Tolman EC (1932). *Purposive Behavior in Animals and Men*. New York: Century.
- Tolman EC y Honzik CH (1930). Introduction and removal of reward, and maze performance in rats. *U Cal Pub Psych* 4:257–275
- Tully T y Quinn WG (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* 157,263–277.
- Uchida N, Takahashi YK, Tanifuji M y Mori K (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat. Neurosci.*, 3: 1035–1043.
- Unoki S, Matsumoto Y y Mizunami M (2005). Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *The European journal of neuroscience* 22, 1409-1416.
- van den Berg MJ y Ziegelberger G (1991). On the function of the pheromone binding protein in the olfactory hairs of *Antheraea polyphemus*. *J. Insect Physiol.* 3: 79-85
- Vareschi E (1971). Duftunterscheidung bei der Honigbiene-Einzelzell-Ableitungen und Verhaltensreaktionen. *Z Vergl Physiol* 75: 143-173.
- Vergoz V, Roussel E, Sandoz JC y Giurfa M (2007) Aversive Learning in Honeybees Revealed by the Olfactory Conditioning of the Sting Extension Reflex. *PLoS ONE* 2(3): e288. doi:10.1371/journal.pone.0000288.
- von Frisch K (1923). Über die "Sprache" der Bienen. *Zool Jahrb (Zoologie und Physiologie)* 40, 1-186
- von Frisch, K 1914. Demonstration von Versuchen zum Nachweis des Farbensehens bei angeblich total farbenblinden Tieren. *Verhandl. Deutsch. Zool. Ges* 24: 50-58.
- von Frisch, K 1914/1915. Der Farbensinn und Formensinn der Bienen. *Zool. Jahresber. (Physiol.)* 35: 1-88.
- von Frisch, K. (1967) *The dance language and orientation of bees*. Harvard University Press.

- Wagner AR, y Rescorla RA (1972). Inhibition in Pavlovian conditioning: application of a theory. In R. A. Boakes & M.S. Halliday (Eds.), *Inhibition and Learning*. New York: Academic Press.
- Walters ET (1987). Multiple sensory neuronal correlates of site-specific sensitization in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience* 7:408-417
- Wasserman EA y Miller RR (1997). What's elementary about associative learning? *Annual Review of Psychology*, 48: 573–607.
- Weiner I (2003). The "two-headed" latent inhibition model of schizophrenia: modelling positive and negative symptoms and their treatment. *Psychopharmacology* 169, 257-97.
- Wenner AM, Wells PH y Johnson DL (1969). Honey bee recruitment to food sources: olfaction or language? *Science* 164:84–86
- Wilson EO (1971). *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Wilson EO (1980). Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) I. The overall pattern in *A. sexdens*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 7: 143–156
- Winnington A, Napper RM y Mercer AR (1996). Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *J. Comp. Neurol.* 365: 479-490.
- Winston M (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press. Cambridge, Mass.
- Zar JH (1999). *Biostatistic Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 663pp.
- Ziegelberger G (1995). Redox-shift of the pheromone-binding protein in the silk moth *Antheraea polyphemus*. *European Journal of Biochemistry* 232 (3): 706-711.

Fuente de imágenes:

- 1) http://3.bp.blogspot.com/_RrESn5vsMxs/SpUUf5C4J6I/AAAAAAAAAg4/s1uA90KYrq8/s1600-h/pavlov.png
- 2) http://3.bp.blogspot.com/_qZbTANhofuk/TXvFeVLccgI/AAAAAAAAAm0/X91v5f2D_xs/s1600/kvfrisch.jpg
- 3) <http://blog.pucp.edu.pe/item/13330/el-conductismo-de-skinner>
<http://www.cienciafacil.com/ManualdeCajasSkinner.html>
- 4) <http://www.agriculture.technomuses.ca/english/bees/life-in-a-hive/role-timeline.php>