



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

El rol de la expectativa en la formación de memorias apetitivas en abejas *Apis mellifera*

María de los Milagros Azcueta

Director: Dr. Martín Klappenbach

Director asistente: Dr. Fernando Locatelli

Laboratorio de Fisiología Sensorial. Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE) - CONICET.

Diciembre 2021

Martín Klappenbach, Director

Fernando Locatelli, Director Asistente

Milagros Azcueta, Tesista

Resumen

Durante la búsqueda de recursos, las abejas *Apis mellifera* deben identificar fuentes de alimento y evaluar su calidad, debido a que los parches florales ofrecen recompensas heterogéneas. La calidad de la recompensa que ofrecen las flores puede variar tanto en el volumen y la concentración del néctar como en la calidad del polen. La evaluación y comparación entre recompensas implica la formación de memorias relacionadas con las mismas. En este trabajo nos propusimos investigar si la memoria que los animales establecen acerca de la calidad de la recompensa conlleva la formación de una expectativa acerca de la calidad de los recursos. La hipótesis general de este trabajo es que el valor subjetivo de la recompensa, entendido como el valor real de la misma en función de la expectativa, modula el aprendizaje positiva y negativamente.

Con el objetivo de evaluar nuestra hipótesis, realizamos tres experimentos basados en el protocolo de condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de la probóscide. Nuestro objetivo fue evaluar si el aprendizaje apetitivo y la formación de memoria dependen del valor absoluto de la calidad de una recompensa, o de su calidad relativa en función a una calidad previamente experimentada. Para ello, generamos contrastes entre recompensas otorgadas a las abejas separados por intervalos temporales de distinta longitud, donde las diferencias en recompensas estuvieron basadas en la concentración de sacarosa. En el primer experimento el contraste entre recompensas fue de muy corto término, ya que fue el tiempo comprendido entre la estimulación de la antena con sacarosa y la ingestión de la misma. En el segundo experimento el contraste fue de medio término, dado por el tiempo comprendido entre los sucesivos ensayos de un mismo experimento. En el tercer experimento, el contraste fue de largo término, dado por el tiempo comprendido entre la captura de los animales y el entrenamiento realizado al día siguiente.

Observamos que las abejas cuyas expectativas de recompensa son superadas (la recompensa obtenida es superior a la anteriormente experimentada) consolidan memorias de largo término de mayor duración que aquellas que reciben recompensas constantes (recompensas de igual concentración durante toda la experiencia). Asimismo, nuestros resultados muestran que las abejas cuyas expectativas son frustradas (la recompensa obtenida es inferior a la anteriormente experimentada) muestran perfiles de adquisición y retención de memoria más débiles que aquellas que reciben protocolos de recompensa constante durante todo el proceso de aprendizaje.

A partir de los resultados obtenidos, concluimos que las abejas *A. mellifera* son capaces de generar expectativas de recompensa en el corto, medio y largo término.

Además, la fuerza asociativa de cada ensayo de condicionamiento guarda relación directa con que la recompensa supere o no alcance dicha expectativa.

Título y resumen en inglés

“The role of expectation in appetitive memory formation in honeybees *Apis mellifera*”.

During foraging, honeybees *Apis mellifera* need to identify and evaluate multiple food sources, due to the heterogeneity of its quality. Rewards offered by flowers can vary in multiple dimensions such as volume and nectar concentration, or pollen quality. The ability to compare between rewards implicitly requires the formation of memories directly related to them. In the present work, we investigated if this memory related with the reward's quality carries the formation of an expectation regarding the quality of the resources. Our main hypothesis is that the subjective value of the reward (understood as its real value in relation with inner expectation) modulates learning both positively and negatively.

In order to evaluate our hypothesis, we carried out three experiments based on the conditioning of the proboscis extension reflex protocol. Our main objective was to evaluate if appetitive learning and memory depend on the absolute value of the rewards given during training, or on its relative quality dependent on past experiences. To do this, we generated contrasts between rewards given during training based on different concentrations of sucrose. These contrasts were separated by different time intervals, ranging from seconds to hours between them. In our first experiment, the time interval of the contrast between rewards was extremely short, in the interval comprehended between the touch of the antennae and the feeding in the proboscis. In the second experiment the contrast was generated in minutes, during the interval between trials. In the third experiment the contrast was generated in 24 hours, given by the interval between the day of capture and the training protocol applied the next day.

We observed that honeybees whose expectations of reward are outbalanced (when the reward given is better than the reward expected) consolidate long term memories of longer duration, in contrast with those animals that receive the same reward during the whole experiment. In addition, honeybees whose expectations of reward are frustrated (when the reward given is worse than the reward expected) show weaker profiles of acquisition and memory retention than those who receive the same reward during the whole experiment.

From the results obtained, we conclude that honeybees *A. mellifera* are able to generate expectations of reward in the short, middle and long term time intervals. Furthermore, the associative strength of each conditioning trial is directly related with the event in which the reward outbalances or not that expectation.

Índice

Capítulo 1. Introducción

1.1. Aprendizaje y memoria	6
1.2. La abeja como modelo de aprendizaje y memoria	9
1.3. Actividad de forrajeo	11
1.4. Expectativa de la recompensa	13
1.5. Hipótesis y objetivos	18

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Animales	20
2.2. Métodos generales	20
2.3. Captura	20
2.4. Arena experimental	21
2.5. Entrenamiento	23
2.6. Evaluación	24
2.7. Análisis de datos	24

Capítulo 3. Resultados

3.1. Experimento 1: contraste intraensayo	28
3.2. Experimento 2: contraste interensayo	31
3.3. Experimento 3: contraste entre días	36

Capítulo 4. Discusión

4.1. Experimento 1: contraste intraensayo	40
4.2. Experimento 2: contraste interensayo	44
4.3. Experimento 3: contraste entre días	47
4.4. Discusión final	50
4.5. Experimentos futuros	56
4.6. Conclusiones	58

Referencias bibliográficas

Anexo estadístico

Capítulo 1. Introducción

1.1. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje puede definirse como la adquisición de una respuesta comportamental como resultado de la experiencia (Thorpe, 1956). Es un proceso fundamental en la vida de cualquier animal, ya que permite la adaptación del comportamiento a cambios producidos en el ambiente. Por otro lado, se considera que se formó una memoria si dichos cambios en las respuestas comportamentales son retenidos en el tiempo. Esta retención es posible gracias a la plasticidad de los circuitos y de la excitabilidad de las neuronas, lo cual conlleva a modificaciones permanentes en la actividad de los circuitos neuronales que subyacen los comportamientos (Dudai, 2002).

El proceso de aprendizaje puede clasificarse en tres grandes grupos: complejo, no asociativo y asociativo. Los aprendizajes complejos engloban muchos casos, como el aprendizaje espacial (mapas cognitivos) (Morris, 1981), el aprendizaje de reglas (Harlow, 1950), los aprendizajes abstractos como la percepción de simetría (Giurfa et al., 1996; Giurfa et al., 2001), entre otros. Dentro de los aprendizajes no asociativos encontramos los fenómenos de habituación y sensibilización. Según (Rankin et al., 2009), la habituación se define como “el decremento de la respuesta comportamental a partir de la presentación repetida del estímulo, el cual no puede ser explicado a partir de adaptación sensorial o fatiga”. En la sensibilización, en cambio, la respuesta comportamental aumenta frente a la presentación de un estímulo novedoso o de mayor intensidad (Dudai, 2002). Por otro lado, el aprendizaje asociativo se divide en dos grandes categorías según el tipo de condicionamiento: condicionamiento instrumental y clásico. El condicionamiento instrumental o *Skinneriano* es un aprendizaje de tipo prueba y error, donde los animales aprenden a partir de las consecuencias de sus propios actos. Al realizar accidentalmente una acción (por ejemplo, presionar una palanca) el animal recibe una recompensa o un castigo. Luego de sucesivos ensayos, aprende que su acción predice la llegada del estímulo incondicionado (de aquí en más, US) (Thorndike, 1898). También puede agregarse un estímulo condicionado (de aquí en más, CS) como una luz, y el animal será capaz de aprender que la presencia de ambos estímulos (su acción y el CS) predicen la llegada del US (Skinner, 1948). El trabajo de esta tesis se centra en el condicionamiento clásico (detallado a continuación) pero cabe destacar que estas categorías no son puras ni excluyentes, y con frecuencia pueden darse dos o más procesos de aprendizaje en simultáneo. Por ejemplo, en (Wood et al., 2000) los ratones debían aprender a recorrer un laberinto en T alternando sus caminos para obtener la recompensa. Es decir, en un ensayo debían girar a la izquierda y en el siguiente a la derecha, y solo en el caso que hicieran esa serie de pasos recibían su

recompensa. Así, estos animales aprendían una serie de reglas (girar alternadamente a la izquierda y la derecha) a partir de un condicionamiento instrumental (realizar una serie de comportamientos para obtener la recompensa, en principio accidentalmente hasta aprender la asociación).

El condicionamiento clásico o pavloviano es un tipo de aprendizaje que ocurre a partir de la asociación de un estímulo neutro (CS) con un refuerzo (US), el cual debe tener relevancia biológica para el animal, pudiendo ser un estímulo positivo o negativo (Garcia & Koelling, 1966). La presencia del US desencadena una respuesta comportamental en el animal que en principio se denomina respuesta incondicionada (de aquí en más, UR). La asociación contingente entre el CS y el US se presenta durante una etapa de entrenamiento, la cual permite que el animal asocie ambos estímulos. Como consecuencia, el estímulo neutro predice la llegada del refuerzo, y la respuesta comportamental -ahora desencadenada a partir del CS- se vuelve una respuesta condicionada (de aquí en más, CR). Un ejemplo de condicionamiento clásico es el condicionamiento del reflejo de extensión de probóscide de la abeja *A. mellifera* (Pavlov, 1927; Takeda, 1961). Durante este protocolo, las abejas aprenden a asociar la presencia de un odorante (en principio neutro) con la llegada de una recompensa azucarada. Este paradigma de aprendizaje es central en este trabajo, y se detalla en la Sección 1.2.

Para maximizar la respuesta condicionada a partir de la asociación predictiva CS-US en un condicionamiento clásico son necesarias, como mínimo, la contigüidad temporal y la contingencia CS-US. La contigüidad temporal se refiere a la sucesión de los estímulos en el tiempo. El condicionamiento que maximiza el poder predictivo del CS sobre el US en las abejas es el de tipo *forward* (Bitterman et al., 1983) donde el CS precede al US de 5 a 1 segundos y, en algunos casos, incluso es favorable que ambos estímulos se superpongan durante 1 segundo (es decir, que el CS co-termine con el inicio del US). Por otro lado, la contingencia se refiere a la aparición correlacionada de ambos estímulos. Si se busca maximizar el aprendizaje asociativo, entonces es deseable que la contingencia CS-US sea lo más alta posible y con una correlación positiva durante la etapa de entrenamiento. Es decir, que siempre que esté presente el CS también esté el US (alta contingencia), que no ocurran eventos donde el US está presente en ausencia del CS, o el CS en ausencia del US (ya que sería un caso de correlación negativa), y que el CS co-termine con la aparición del US (contigüidad temporal).

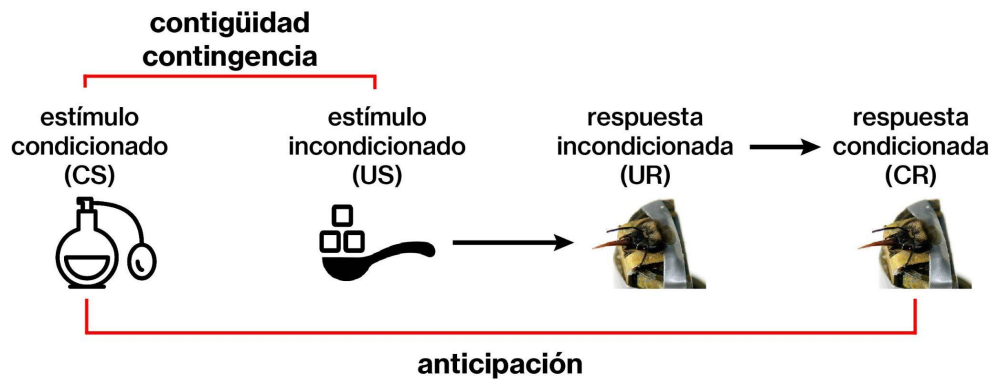


Figura 1.1 - Esquema representando un condicionamiento de tipo *forward*. El animal percibe el estímulo condicionado (CS) seguido del estímulo incondicionado (US), lo cual provoca la respuesta incondicionada (UR). Una vez adquirida la asociación, la sola presencia del CS evoca la respuesta condicionada (CR).

El proceso de memoria es un fenómeno secuencial que puede dividirse en cuatro grandes etapas: adquisición, consolidación, evocación y posible reconsolidación. Durante la adquisición, la experiencia que acaba de ocurrir es codificada en circuitos neuronales (Christian & Thompson, 2003). A partir de síntesis de ARN y proteínas, los cambios sinápticos temporarios son transformados en modificaciones permanentes en un proceso que se conoce como consolidación (McGaugh, 2000). Esta codificación sucede en una etapa transitoria conocida como ventana crítica, donde la memoria almacenada es lábil y susceptible tanto a agentes disruptores como facilitadores (Izquierdo, 1989). Posterior a la consolidación, esa memoria pasa a un estado de inactividad (Lewis, 1979) pudiendo ser evocada posteriormente a partir de un recordatorio (Sara, 2000). Este recordatorio reactiva la traza de memoria durante un período discreto de tiempo durante el cual la misma es nuevamente susceptible a agentes disruptores o facilitadores (Frenkel et al., 2005; Nader et al., 2000), fenómeno que se conoce como labilización. Pasado este período, la memoria vuelve nuevamente a una etapa de inactividad, por lo que se dice que se ha reconsolidado: se labiliza la memoria y, pasado ese período de tiempo, vuelve a ser estable. Como interpretación general, la reconsolidación es un proceso que permite la actualización de una memoria que el animal ya posee con información más novedosa (Forcato et al., 2014). Es un fenómeno que se ha estudiado en diversos modelos animales como humanos (Forcato et al., 2010), roedores (Suzuki, 2004), cangrejos (Pedreira et al., 2002), moscas (Felsenberg et al., 2017), y en menor medida, también abejas (Stollhoff et al., 2008).

Es importante destacar que no siempre que se evoca una memoria la misma es labilizada, pues resultaría poco adaptativo si cada vez que se evoca un recuerdo, esa memoria se pusiera en riesgo de ser debilitada. En primer lugar, es necesaria una incongruencia (como por ejemplo, la presencia del CS sin el US) que sea capaz de

desencadenar el proceso de labilización (Pedreira et al., 2004). Además, no todas las memorias tienen las mismas probabilidades de ser labilizadas. Las memorias más antiguas (Milekic & Alberini, 2002) y las más fuertes (Suzuki, 2004) tienden a ser menos susceptibles a este proceso.

1.2. La abeja como modelo de aprendizaje y memoria

Los invertebrados son modelos animales muy útiles para el estudio del aprendizaje y la memoria. En primer lugar, suelen poseer un tamaño pequeño, ciclos de vida cortos y costos de mantenimiento bajos. Su sistema nervioso se compone de ganglios y arreglos de unos cientos de miles de neuronas que, aunque parezca un número grande, no se compara con el millón de millón que contienen los sistemas nerviosos de los vertebrados. Este menor número de neuronas facilita la identificación de los circuitos que subyacen al aprendizaje y la formación de memorias, pudiendo identificar neuronas particulares encargadas de funciones específicas. Un ejemplo es el caso de la neurona VUM_{mx1}, la cual media el procesamiento del US durante el aprendizaje asociativo en abejas (Martin Hammer, 1993). Esta practicidad permite el registro de la actividad neuronal *in vivo* a partir de tinciones neuronales como en la técnica de *imaging* (Göbel & Helmchen, 2007) o a través del uso de animales transgénicos incapaces de aprender o llevar a cabo ciertas tareas como en los mutantes de la mosca *Drosophila melanogaster* (Hotta & Benzer, 1972). A pesar de tener cerebros muy pequeños, los invertebrados realizan comportamientos de alta complejidad como la comunicación a través de la danza en *A. mellifera* (von Frisch, 1967). Al combinar la practicidad del estudio de los circuitos neuronales y la complejidad de los comportamientos que estos circuitos son capaces de codificar, los invertebrados resultan un modelo único para el estudio de la memoria y el comportamiento en el laboratorio.

Por lo explicado anteriormente, la abeja *A. mellifera* es un modelo muy conveniente para los estudios de procesos cognitivos complejos en invertebrados (Rogers et al., 2013). Cualquier observador puede notar que las abejas son capaces de visitar cientos de flores diariamente, logrando retornar a su colmena y repetir la actividad al día siguiente (von Frisch, 1967). Esta difícil tarea solo es posible si detrás de ese comportamiento subyace un mecanismo de aprendizaje y memoria que permite, como mínimo, la identificación, exploración y reconocimiento de parches florales (Menzel & Erber, 1978). El paradigma de comportamiento más utilizado para estudiar el aprendizaje y la memoria en *A. mellifera* es el condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de la probóscide (de aquí en más, condicionamiento del PER). La primera descripción de este reflejo fue detallada en (Frings, 1944), donde se realizó un condicionamiento de este comportamiento a partir de la asociación de una recompensa con el odorante cumarina. A partir de estos resultados,

Kimihisa Takeda publicó un trabajo fundacional donde describió los primeros resultados del condicionamiento del reflejo de extensión de probóscide a partir del contacto los tarsos de la abeja con una solución azucarada mientras se le presentaba un odorante de valencia neutra (Takeda, 1961). Sin embargo, en el presente trabajo se cita numerosas veces el trabajo de Bitterman y colaboradores ya que fue la primera publicación que realizó un estudio exhaustivo de múltiples protocolos de aprendizaje en base a este comportamiento (*forward*, *backward*, etcétera), estandarizando la metodología y comprobando la naturaleza asociativa de este aprendizaje (Bitterman et al., 1983). Una gran diferencia con el trabajo de Kimihisa Takeda es que Bitterman y colaboradores provocaron la extensión de la probóscide a partir de la estimulación de las antenas con solución azucarada. Esta decisión fue avalada posteriormente por la literatura ya que se observó que la sensibilidad al azúcar es menor en los tarsos que en las antenas (de Brito Sanchez et al., 2008).

Durante la primera etapa del protocolo PER las abejas son inmovilizadas en soportes metálicos que sostienen su abdomen y su cabeza, dejando en movimiento libre únicamente las antenas y la mandíbula. Una vez que las abejas se recuperan de este procedimiento, se realiza el condicionamiento. El mismo es de tipo clásico como se describió en la Sección 1.1, en el cual se asocia la presencia de un estímulo condicionado (CS, un odorante) con un estímulo incondicionado (US, una gota de sacarosa en la probóscide). Se utilizan odorantes neutros como CS frente a los cuales los animales *naïve* para este procedimiento no extienden la probóscide. El condicionamiento es de tipo *forward*, donde el CS co-termina con la aparición del US. Luego de un número de ensayos de este protocolo (el cual puede ir de 1 a 10, dependiendo del fenómeno que se quiera estudiar), se mide la formación de la memoria apetitiva a partir de la respuesta condicionada del animal (CR, extensión de la probóscide) frente a la presentación del CS únicamente (Bitterman et al., 1983). La asociación CS-US recapitula la fase final del comportamiento de forrajeo, donde las abejas beben el néctar de una flor con un determinado aroma. Dado que este es el paradigma comportamental utilizado en este trabajo, los detalles relativos a este trabajo se describen en el Capítulo 2.

El paradigma de PER permite el estudio de memorias de corto, medio y largo término (Friedrich et al., 2004; Menzel et al., 2001). Se denomina memorias de corto término a aquellas que duran entre minutos y horas. Para que se consoliden memorias de largo término, es necesario que se produzca síntesis de proteínas y cambios en la excitabilidad sináptica. A partir de los tres ensayos de presentación CS-US, se desencadena la formación de una memoria de largo término que es dependiente de síntesis de proteínas (Matsumoto et al., 2014) y que puede ser evaluada a las 24 o 48 horas posteriores al último ensayo. Sin

embargo, si se realizan tests pocas horas después del entrenamiento, también pueden evaluarse memorias de corto término. Por lo tanto, este paradigma simple pero robusto permite un estudio completo del aprendizaje y la memoria en *A. mellifera*, desde la adquisición hasta la consolidación, pudiendo estudiarse también los mecanismos neuronales y moleculares que subyacen a estos procesos debido a las ventajas del modelo invertebrado descritas al comienzo de esta sección.

1.3. Actividad de forrajeo

La actividad principal de las obreras de *A. mellifera* se relaciona con el mantenimiento de la colmena y la recolección de néctar y polen, tanto para su propia subsistencia como para la del resto de los individuos (Arenas et al., 2021; Sammataro & Avitabile, 1998). Por lo tanto, para poder llevar adelante la recolección de estos recursos, las abejas tienen que ser capaces de encontrar y evaluar constantemente las recompensas otorgadas por distintos parches florales. A pesar de que nuestros experimentos son realizados en el laboratorio, resulta interesante interpretar los resultados obtenidos en relación al contexto natural de los animales.

Durante la búsqueda de recursos, las abejas ejecutan patrones complejos de comportamiento: al navegar, deben aprender e integrar múltiples claves sensoriales simultáneamente a la vez que evitan colisiones durante el vuelo. Más complejo aún, son capaces de recordar con gran precisión las fuentes de alimento visitadas pudiendo visitarlas nuevamente (Menzel & Greggers, 2015; Zhang et al., 2006). El aprendizaje asociativo (ver Sección 1.1) le permite a las abejas asociar estímulos ambientales (odorantes, colores, formas) con sitios donde obtuvieron recompensas azucaradas. De este modo, son capaces de generar memorias apetitivas respecto a los sitios que poseen recursos y, eventualmente, poder acceder a ellos en el futuro (Hussaini et al., 2007). Esta forma de aprendizaje está estrechamente relacionada con el protocolo de condicionamiento del PER que se realiza en el laboratorio. Para poder asociar las claves sensoriales de las flores con la recompensa que otorgan, es necesario que las abejas primero sensen las claves (CS) y luego obtengan la recompensa (US), tal como sucede en un condicionamiento de tipo *forward* (Hammer & Menzel, 1995).

Sin embargo, no todos los sitios que ofrecen recursos son igualmente valiosos. Para poder evaluar posibles locaciones de forrajeo, las abejas deben ser capaces de diferenciar las recompensas que cada sitio ofrece. Esta evaluación de la recompensa les permite ajustar sus esfuerzos y guiar su comportamiento, en base a la cantidad y calidad de recursos disponibles. En experimentos de libre vuelo y a campo, se observó que las abejas

son capaces de distinguir recompensas azucaradas basándose en diferencias tanto en el volumen (Gil & De Marco, 2009; Gil et al., 2007) como en la concentración de azúcares de las mismas (De Marco et al., 2005; Wright et al., 2009). En (Gil et al., 2007), abejas melíferas fueron entrenadas en un parche floral artificial. Un grupo recibía un volumen de sacarosa que aumentaba en cada visita al parche, otro grupo recibía volúmenes decrecientes, y tres grupos recibían volúmenes constantes durante todo el entrenamiento. Se observó que las abejas que habían recibido un protocolo creciente de volumen de sacarosa invertían más tiempo en buscar recompensas en el parche durante la evaluación, en contraste con aquellas que habían recibido un protocolo descendente de recompensa. Respecto a la diferenciación de recompensas en base a su concentración, estos mismos autores realizaron un protocolo donde entrenaron a las abejas a recolectar recompensas de un alimentador (De Marco et al., 2005). Luego, algunos animales recibían concentraciones constantes de azúcar durante toda la recolección mientras que otros recibían azúcar constante (0,6 M) durante cuatro visitas, y una concentración mayor (1,2; 1,8 ó 2,4 M) en la última visita al alimentador. Los investigadores observaron que este repentino aumento en la concentración de la recompensa produjo, en los grupos experimentales, un cambio significativo en los ángulos de divergencia entre los contoneos consecutivos de la danza de comunicación entre obreras. Se puede concluir entonces que las obreras tienen que haber codificado los cambios en el volumen de recompensa (en el primer experimento) y en la concentración (en el segundo) para que se produzcan los cambios observados en la actividad de forrajeo y de la danza respectivamente.

Si las abejas son capaces de diferenciar recompensas en base a diferencias en su concentración y/o su volumen, entonces es coherente pensar que existe algún tipo de representación interna de estas magnitudes, a partir de la cual pueden comparar sus experiencias y así modificar su comportamiento. En (Gil et al., 2008), los investigadores entrenaron abejas bajo un protocolo de condicionamiento del PER (ver Sección 1.2). Un grupo recibió la recompensa azucarada en un protocolo ascendente donde el volumen de la recompensa aumentaba sucesivamente en cada ensayo, otro grupo en un protocolo descendente, y tres grupos constantes que recibieron volúmenes idénticos de solución en todos los ensayos. Pasadas 24 hs del entrenamiento, los investigadores midieron la respuesta *incondicionada* de las abejas: estimulando con sacarosa en las antenas, midieron múltiples variables que reflejaban la fuerza de esa respuesta (tiempo de reacción de extensión de la probóscide, duración de la extensión, etcétera). Los investigadores observaron durante la evaluación, que las abejas que habían recibido la recompensa en volúmenes crecientes extendían su probóscide más rápido y durante más tiempo en contraposición con el grupo que había recibido la recompensa en volúmenes decrecientes.

Este antecedente nos permite interpretar que diferencias en la presentación del estímulo incondicionado (US) tendrán distinta fuerza a la hora utilizarse como refuerzo en un condicionamiento apetitivo.

Interpretando el cuerpo de literatura citado en esta sección, se puede concluir que las abejas *A. mellifera* no solo son capaces de evaluar los sitios de forrajeo a partir de la integración de memorias y claves sensoriales, sino que también son capaces de comparar las recompensas obtenidas. Esta comparación les permite ajustar su comportamiento ya que en los trabajos citados se observa que, en líneas generales, las respuestas comportamentales son menos conspicuas y motivadas cuando las recompensas son de peor calidad (ya sea en relación a disminuciones en el volumen o la concentración de la solución azucarada). A su vez, los animales muestran una mayor motivación (mayor inversión de tiempo en búsqueda de recursos, mayor tiempo de extensión de probóscide) al recibir recompensas que mejoraban a lo largo del tiempo. Por lo tanto, estos resultados dan pie para la sección final de este capítulo y para la premisa de los experimentos presentados: en base a su experiencia previa, las abejas generan una expectativa de las recompensas. La superación o empeoramiento de la misma es capaz de modificar su comportamiento.

1.4. Expectativa de la recompensa

La posibilidad de comparar escenarios en base a experiencias previas le permite a los animales predecir la aparición de estímulos (tanto aversivos como apetitivos) y adaptar su comportamiento. El rol de la expectativa ha sido ampliamente estudiado en modelos vertebrados como roedores (Trapold, 1970), palomas (Peterson et al., 1978) y, en particular, en primates no humanos (Hollerman et al., 1998; Watanabe et al., 2001). El trabajo de Otto Tinklepaugh en monos macacos fue fundamental para sentar las bases del estudio de la temática (Tinklepaugh, 1928). En uno de los experimentos, los monos eran presentados ante una recompensa (una banana) que, luego de la presentación, era escondida debajo de un recipiente. Los monos habían sido entrenados tal que luego de la orden del investigador, procedían a buscar el alimento que les había sido presentado. Sin embargo, antes de darle la orden, el investigador cambiaba la banana por una hoja de lechuga sin que el mono lo notara. Al levantar el contenedor para obtener su recompensa, Tinklepaugh describe que la mona “extiende su mano para alcanzar la comida, pero cae al piso sin siquiera tocarla. Mira el pedazo de lechuga pero, al menos que esté realmente hambrienta, no lo toca”. Para confirmar que la lechuga era aceptada como alimento, pasado un tiempo de este protocolo Tinklepaugh describe que la misma mona acepta la lechuga como alimento y la consume. Con este robusto resultado comportamental, se observa que el primate había generado una expectativa respecto a lo que iba a encontrar debajo del recipiente (una banana), la cual no

se cumple al levantarlo y encontrarse con la lechuga. Esta discordancia entre lo esperado y lo obtenido modifica su comportamiento, haciendo que se aleje del alimento en cuestión.

A pesar de que la expectativa de la recompensa es un tema de suma relevancia en el estudio del comportamiento animal, hay menos información disponible respecto a este proceso en invertebrados. Sobre *A. mellifera* en particular, a partir de los trabajos presentados en la Sección 1.3 se observó que las abejas son capaces de comparar las fluctuaciones en las recompensas obtenidas, tanto en volumen como en concentración de solución azucarada. Esta comparación les permite generar una expectativa respecto a escenarios futuros, la cual se evidencia comportamentalmente en las evaluaciones: las abejas que, en líneas generales, reciben recompensas en un protocolo ascendente, demuestran comportamientos más motivados (mayor tiempo de búsqueda de recursos en los casos de forrajeo libre, mayor tiempo de extensión de la probóscide en el caso del condicionamiento del PER) en los tests. Por lo tanto, podemos decir que las abejas también ajustan su comportamiento en base a las expectativas que generan según sus experiencias previas.

Resultados similares se obtuvieron en trabajos en abejorros (género *Bombus*). En (Waddington et al., 1981), los investigadores realizaron un experimento de forrajeo en flores artificiales con *B. edwardsii*, similar al trabajo de Mariana Gil, Rodrigo De Marco y Randolph Menzel citado en la Sección 1.3 (Gil et al., 2007). En este estudio, los abejorros visitaban flores artificiales en un parche dispuesto por los investigadores. Un grupo de animales recibía en promedio 0,1 μ l de solución azucarada en cada visita a una flor artificial, mientras que otro grupo recibía en promedio 0,4 μ l. Se observó que aquellos abejorros que habían recibido una recompensa más alta aumentaban su tasa de visita a las flores, realizando vuelos más rápidos y directos hacia las flores. En otro trabajo en *B. appositus*, Clayton Hodges realiza una experiencia a campo con abejorros visitando flores naturales manipuladas, inyectando solución azucarada de concentración 2 M en los nectarios de las mismas (Hodges, 1981). Hodges observó que si la primera flor visitada en una planta tenía volúmenes de néctar menores a 0,25 μ l, los animales abandonaban la planta para visitar otra. En cambio, si recibían un volumen mayor al umbral, los abejorros se quedaban en la planta. A partir de la generación de una expectativa respecto a la tasa de recompensas que pueden recibir en una planta, estos animales minimizan el tiempo invertido en plantas de mala calidad a la vez que maximizan la explotación de recursos de alta calidad. Por último, resulta interesante citar una publicación cuyos resultados se relacionan estrechamente con la propuesta de nuestro trabajo. En (Wendt et al., 2019), los investigadores entrenaron a hormigas nectívoras a alimentarse de una gota de solución azucarada que se encontraba al

final de una pasarela. En un primer experimento, las hormigas hacían tres viajes hasta la gota de sacarosa: en los primeros dos recibían la misma recompensa, y en el último viaje la recompensa cambiaba a una concentración de 0,5 M. De este modo, había animales que tenían una historia previa con sacarosa de mayor concentración (contrastes negativos) mientras otros conocían soluciones azucaradas menos concentradas que 0,5 M (contrastes positivos). La aceptación de la recompensa otorgada se midió a partir del consumo ininterrumpido de la sacarosa (la cual es tomada como un *proxy* de aceptación de la recompensa: cuanto más fluida es la alimentación, mayor aceptación de la recompensa) y de la cantidad de marcas feromonales depositadas en el camino hacia el sitio. Los investigadores observaron que los animales que eran sometidos a un contraste negativo aceptaban menos la recompensa (presentaban una alimentación interrumpida en la tercera visita y dejaban menos marcas feromonales que el grupo control). Del mismo modo, los animales sorprendidos con sacarosa de mayor concentración a la esperada en la tercera visita aumentaban la aceptación de la recompensa alimentándose ininterrumpidamente y dejando más marcas feromonales que el grupo control. Como conclusión de estos trabajos, puede decirse que la superación o empeoramiento de las expectativas que estos insectos poseen respecto a las recompensas modifican diferencialmente su comportamiento. Al igual que en los trabajos en *A. mellifera* antes citados, otros insectos se muestran más motivados a buscar o consumir alimento cuando sus expectativas son superadas, y por el contrario se muestran más desmotivados a realizar estas acciones cuando lo obtenido es de peor calidad que lo esperado.

La expectativa de la recompensa no se observa solo comportamentalmente, sino que también puede estudiarse su correlato neuronal. En la actividad de la neurona VUM_{mx1} (mencionada en la Sección 1.2) se observa que la misma responde a las presentaciones inesperadas de sacarosa, pero no a las recompensas esperadas (Hammer, 1993). Resulta interesante entonces preguntarse si estas expectativas, a partir de cambios en las sinapsis, pueden modular la memoria asociativa que se posee sobre una dada recompensa. En 1997, Wolfram Schultz ahondó en el concepto de error en la predicción de la recompensa (de aquí en más, RPE) (Schultz et al., 1997). Este concepto fue propuesto originalmente en el modelo Rescorla-Wagner en 1972 (Rescorla & Wagner, 1972) detallado en la Sección 4.4, y el trabajo de Schultz lo retoma sumando datos de electrofisiología. El RPE puede definirse como “la diferencia entre la recompensa obtenida y la recompensa predicha” (Schultz, 2017). En su trabajo de 1997, Schultz propone que en mamíferos ciertas neuronas dopaminérgicas codifican dichos errores en la predicción, es decir, las situaciones donde lo obtenido no se corresponde con lo esperado por el animal. Las neuronas son activadas con los errores positivos (cuando lo recibido es mejor que lo esperado) e inhibidas con los

En el segundo trabajo, los investigadores encontraron evidencia y plantearon un modelo análogo al anterior pero aplicado a estímulos aversivos (Terao & Mizunami, 2017). Los investigadores aplicaron el mismo entrenamiento para producir un efecto de *blocking* también en grillos. La diferencia está en que en este segundo trabajo el US se trataba de solución salina (NaCl 20%, un estímulo negativo) en lugar de agua para animales sedientos (un estímulo positivo). Con estas dos publicaciones, los investigadores lograron poner a prueba la aplicación del marco teórico del RPE para explicar fenómenos comportamentales en insectos. Sin embargo, aún es necesaria mucha más evidencia sobre RPE para profundizar este tema en invertebrados.

De los trabajos presentados tanto en esta sección como en la Sección 1.3, se puede concluir que existe un buen cuerpo de literatura a favor de las hipótesis planteadas en este trabajo. En la Sección 1.3 se presentaron trabajos donde se observa que las abejas *A. mellifera* son capaces de sensar las fluctuaciones en las recompensas obtenidas y, a partir de las mismas, adaptar su comportamiento. Resultados similares se obtuvieron con abejorros (género *Bombus*) en experimentos a campo, donde se observó que estos insectos cambiaban su actividad de alimentación en relación al mejoramiento o empeoramiento de las expectativas que tenían sobre las recompensas. Además de estos trabajos centrados en el comportamiento y la ecología de estos insectos, se presentaron estudios centrados en su neurofisiología. Por un lado, se discutió el estudio de la neurona VUM_{x1}, central en la codificación de los estímulos incondicionados. Por otro lado, se presentó evidencia a favor de la aplicación de la teoría de RPE en insectos, tanto para aprendizajes con estímulos positivos como negativos. A pesar de que todos estos trabajos tienen como eje central a los insectos y la codificación de los estímulos incondicionados, presentan distintos enfoques. Mientras que los primeros trabajos son exclusivamente comportamentales y en su mayoría realizados a campo o con los insectos en movimiento libre, los últimos trabajos se centran mayormente en la neurobiología con los animales restringidos y en el laboratorio, buscando un correlato neuronal a estos comportamientos. Por lo tanto, consideramos que nuestro trabajo tiene una ventaja respecto a esta división. Los experimentos de este trabajo fueron realizados con abejas en condiciones controladas dentro del laboratorio. A pesar de que se encontraban inmovilizadas para poder trabajar con las mismas, en base al protocolo implementado y la literatura que lo avala es posible estudiar fielmente su comportamiento. Esta combinación de condiciones controladas en laboratorio y comportamiento nos permiten extender el horizonte de los experimentos a realizar: a pesar de que los resultados aquí presentados son comportamentales, es posible estudiar los correlatos neuronales de estos mismos comportamientos en el laboratorio sin la necesidad de adaptar radicalmente nuestros resultados comportamentales previos. En base a este cuerpo de literatura y la

posibilidad de estudiar el comportamiento de expectativa frente a la recompensa desde diversas aristas, se presentan los objetivos e hipótesis de este trabajo en la siguiente sección.

1.5. Hipótesis y objetivos

En base a los antecedentes señalados en el Capítulo 1, en este trabajo nos propusimos como objetivo general estudiar si la formación de la memoria asociativa generada a partir de un condicionamiento apetitivo depende de la relación entre la calidad real de la recompensa y la calidad esperada por los animales. La hipótesis central es que la valoración subjetiva que hacen los animales acerca de la recompensa (y no su valor absoluto) es lo que modula la fuerza del aprendizaje.

Las fases de la memoria olfatoria están estrechamente relacionadas con las etapas de forrajeo en el campo: las memorias de corto término o de trabajo se corresponden con los eventos de pecoreo dentro y entre parches de flores que se suceden durante una salida de forrajeo. Luego, las memorias de término intermedio se relacionan con los intervalos entre vuelos o excursiones de forrajeo que se puedan suceder en un día. Finalmente, las memorias de largo término se relacionan con eventos de búsqueda de recursos separados entre días (Giurfa & Sandoz, 2012). En relación con la existencia de dichas etapas y con el fin de poner a prueba la hipótesis central, planteamos tres objetivos particulares, donde cada uno de ellos corresponde a evaluar la generación de expectativa para distintos intervalos temporales.

Objetivo 1: expectativas de corto término

En el protocolo estándar de condicionamiento del PER, las antenas de la abeja son estimuladas con una solución azucarada al comienzo de cada ensayo para evocar la extensión de la probóscide donde se administra la recompensa (Bitterman et al., 1983). Esto es similar a lo que ocurre en el forrajeo, donde las abejas extienden la probóscide luego de sentir los nectarios de la flor con sus antenas. El primer objetivo fue determinar si las abejas forman una expectativa de extremo corto término acerca de la calidad de la recompensa que detectan con sus antenas, y si la diferencia entre esa expectativa y lo que recibe en la probóscide afecta la fuerza asociativa del ensayo.

Objetivo 2: expectativas de término medio

En el campo, las abejas visitan distintas flores a la vez que comparan las recompensas que otorgan cada una de ellas (Marshall, 1935). Intentando asemejar este escenario natural,

el segundo objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de PER si las abejas comparan la concentración de las recompensas que reciben en sucesivos ensayos a lo largo de un protocolo de entrenamiento, y si diferencias en dichos ensayos afectan la fuerza del aprendizaje y la formación de memoria. La habilidad de detectar diferencias entre ensayos implicaría la formación de expectativas de medio término acerca de la calidad de la recompensa.

Objetivo 3: expectativas de largo término

Habiendo demostrado que las abejas son capaces de diferenciar entre recompensas de distinta concentración y generar una memoria en base a estas diferencias, nos preguntamos si la experiencia con una recompensa el día previo al entrenamiento también modula el aprendizaje. Como último objetivo, nos propusimos demostrar si las abejas generan una expectativa a largo término acerca de la calidad de la recompensa, de modo tal que dicha expectativa tenga un efecto sobre el entrenamiento el día siguiente.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Animales

Los animales utilizados fueron abejas de la especie *A. mellifera*, provenientes de dos colmenas ubicadas dentro del predio de Ciudad Universitaria. Las abejas comienzan su actividad forrajera temprano por la mañana y terminan por la tarde (Abou-Shaara, 2014), por ende la recolección se realizó siempre alrededor de las 10:30 hs, buscando un flujo alto de abejas entrando y saliendo de las colmenas. Con el fin de minimizar la heterogeneidad de la muestra, solo se recolectaron abejas que tuvieran polen visible en sus patas traseras. Esto indica que se trata de abejas forrajeras y que tienen una edad similar, ya que comienzan dicha actividad a partir de los 21 días de edad (Abou-Shaara, 2014).

2.2. Métodos generales

El trabajo consistió en tres experimentos. Cada experimento tuvo tres etapas: captura de los animales, entrenamiento y evaluación (Figura 2.1). Las diferencias entre los protocolos se encontraban en la etapa de entrenamiento. La mitad de las abejas fueron entrenadas con el odorante acetofenona y el resto con 1-hexanol. Los dos odorantes son neutros y percibidos por las abejas según literatura, y se utilizan ambos de manera contrabalanceda para controlar posibles preferencias que puedan existir por un odorante u otro (Chen et al., 2015).

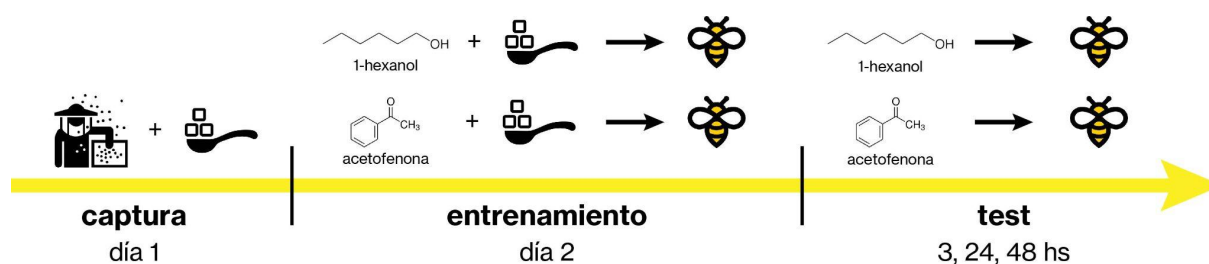


Figura 2.1 - Esquema representando las tres etapas del trabajo.

2.3. Captura

El primer paso de cada experimento fue la recolección, la cual se realizó siempre durante la mañana anterior a la etapa de entrenamiento. La recolección se realizó bloqueando temporalmente la entrada de las colmenas. Luego de esperar unos minutos a que llegaran las abejas que retornaban de forrajear, se colocaba un tubo de plástico para que ingresen al mismo, con pequeños orificios para permitir su ventilación.

En el laboratorio, las abejas fueron enfriadas unos segundos en hielo para adormecerlas y poder colocarlas en soportes metálicos individuales. El abdomen de las abejas fue colocado contra el soporte usando una cinta adhesiva, y la cabeza fue pegada desde la parte posterior hacia otra porción de cinta con cera. El objetivo fue inmovilizar a los animales a excepción de su cabeza, para así poder interactuar con sus antenas y probóscide. Para mayor claridad, la Figura 2.2 muestra una fotografía de una abeja dentro del soporte.

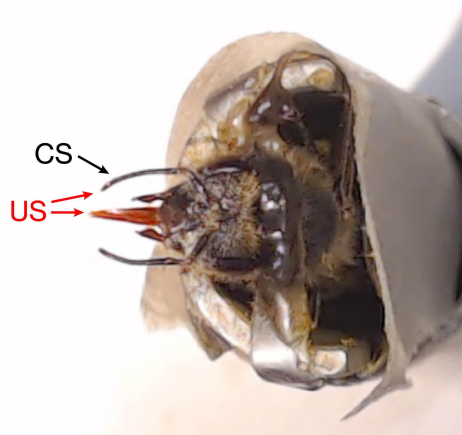


Figura 2.2 - Fotografía de abeja en soporte metálico. Se indican las estructuras que sensan el CS (antenas) y el US (antenas y probóscide).

Inmediatamente luego de recuperarse del enfriamiento y restringidas en los soportes, las abejas fueron alimentadas con una gota (alrededor de 0,4 μ l) de sacarosa 1 M, a excepción de los animales del Experimento 3, que fueron alimentados con sacarosa 0,5 ó 1 M dependiendo del grupo experimental al que pertenecieran. Alrededor de las 18hs del día de captura, se los alimentó hasta saciarse con sacarosa según correspondiese. Luego, se los dejó sin perturbar hasta el día siguiente. Este protocolo de alimentación depriva a las abejas de sacarosa durante más de 12 hs, permitiendo que el día de entrenamiento se encuentren lo suficientemente motivadas como para aprender la asociación del estímulo neutro con la sacarosa utilizada como recompensa (Grünbaum & Müller, 1998). Los soportes metálicos estaban ubicados dentro de un contenedor de plástico con agujeros y un fondo de agua, para permitir la respiración y mantener la humedad. El laboratorio se mantuvo a temperatura ambiente (20-24 °C) en un ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad (Grünbaum & Müller, 1998).

2.4. Arena experimental

Tanto para los entrenamientos como para las evaluaciones, los animales fueron ubicados en una arena experimental de condicionamiento olfativo, similar a la utilizada en

(Felsenberg et al., 2011) (Figura 2.3). Los animales fueron ubicados en la arena de a uno por vez, mientras el resto permanecía en el contenedor donde habían pasado la noche.

La arena experimental consiste de un tubo que entrega un flujo de aire durante el tiempo que se desee, ajustable a través de la conexión con un dispositivo electrónico (Figura 2.3). Un aireador (1) bombea aire que en primera instancia pasa a través de dos filtros (2). De allí, el aire ingresa al flujómetro (3) del cual salen dos mangueras: una con flujo de 500 ml/min y otra con flujo de 50 ml/min. El flujo de 500 ml/min entrega constantemente aire limpio a través del tubo plástico que se observa al pie de la figura. La otra manguera, correspondiente al flujo de 50 ml/min está conectada al pulsador (3'). Cuando se desea, se presiona el botón y el dispositivo permite que salga el aire de este segundo flujo durante el tiempo que se desee, ingrese en el frasco donde está el odorante (4) y empuje las partículas del mismo a través de una jeringa. Esta jeringa está conectada al tubo de plástico (5), por ende, este segundo flujo de aire cargado de odorante se suma al flujo de aire limpio, por lo que el animal termina recibiendo aire portador del odorante de interés. Para mantener la arena experimental limpia de olores entre animales, se coloca un extractor detrás de las abejas que permanece encendido todo el tiempo que la abeja está en la arena experimental (6).

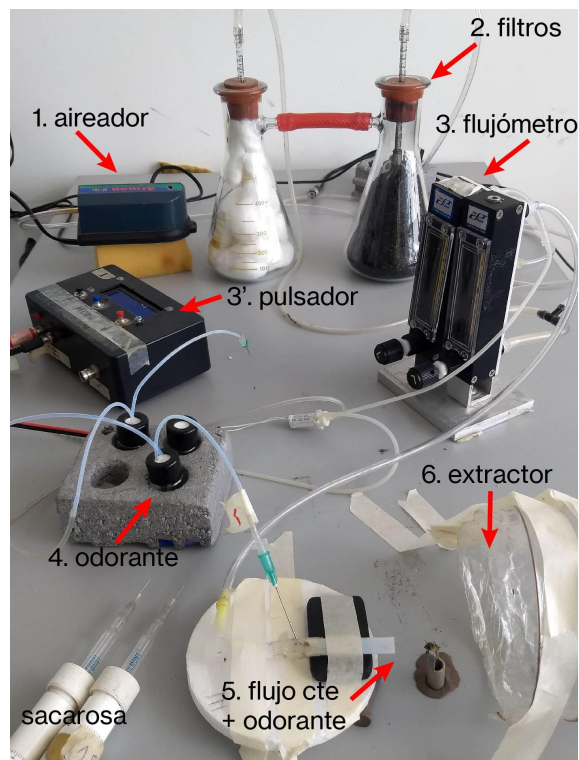


Figura 2.3 - Fotografía de arena experimental utilizada para todos los experimentos.

Previo a cada experimento se prepararon 100 μ l de odorante en viales de vidrio de 5 ml. La mitad de las abejas fueron entrenadas con el olor acetofenona, y la otra mitad con el olor 1-hexanol como estímulo condicionado. Ambos odorantes tenían una dilución 1/10 en aceite mineral. En todos los experimentos se utilizó un flujo de 50 ml/min a través del frasco que contenía el odorante y un flujo de 500 ml/min para el caudal central, lo cual implica que la concentración final recibida por las abejas fue 1/10 de la concentración de equilibrio lograda en los frascos con el odorante. El pulso de olor duró siempre 4 segundos. Todos los compuestos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

2.5. Entrenamiento

Las sesiones de entrenamiento se realizaron entre las 10:00 y las 14:00 hs. Treinta minutos antes del entrenamiento los animales debían pasar una prueba de selección, la cual consistió en tocar las antenas con una gota de sacarosa 1 M ó 0,5 M según correspondiese. Solo los animales que mostraban una extensión de la probóscide rápida y conspicua eran utilizados en los entrenamientos.

Los animales fueron entrenados de acuerdo a el paradigma de condicionamiento olfativo del reflejo de extensión de probóscide (Bitterman et al., 1983; Takeda, 1961): un odorante de valor inicialmente neutro para los animales es presentado durante 4 segundos y cotermina con la estimulación de las antenas con sacarosa. Esto último produce la extensión de la probóscide, y la abeja puede ingerir un volumen y concentración de azúcar determinado por el experimentador. Conforme pasan los ensayos de entrenamiento, se forma una asociación predictiva donde el odorante anticipa la aparición del azúcar (ver Sección 1.2).

En cada ensayo, se toma una abeja y se la ubica en la arena experimental previamente descrita. Veinte segundos después se activa la liberación del odorante, el cual dura 4 segundos. Un segundo antes de detenerse el flujo, las antenas son estimuladas con una gota de sacarosa (aproximadamente 0,4 μ l) cuya concentración dependía del protocolo experimental. Cuando la abeja extiende la probóscide como respuesta al estímulo, la gota de solución azucarada es administrada sobre la probóscide para ser ingerida. Veinte segundos después de terminada la ingestión, la abeja es devuelta a la posición de reposo fuera de la arena experimental. Este ensayo se repite cuatro veces para cada animal (a excepción de los animales del Experimento 2 que recibieron tres ensayos). La bibliografía previa indica que tres ensayos son un número suficiente de ensayos para formar una memoria de largo término (Menzel, 1968). El intervalo entre ensayos para cada abeja fue de diez minutos.

En cada experimento realizado (tres en total), las abejas fueron divididas en distintos grupos/tratamientos que variaban en la concentración de sacarosa que recibían en cada ensayo. Para facilitar la lectura de los resultados, el detalle de los tratamientos y de cada grupo se describe en cada sección junto a la presentación de la figura de resultados obtenidos en cada caso.

2.6. Evaluación

Durante el test o etapa de evaluación se pone a prueba el aprendizaje a distintas escalas temporales. Para hacerlo, los animales fueron nuevamente colocados de a uno por vez en la arena experimental. Veinte segundos después, se presentó únicamente el odorante al cual habían sido entrenados durante la etapa de entrenamiento. Se midió la respuesta de extensión de probóscide evocada por el olor y, veinte segundos después de presentado el odorante, el animal fue devuelto a la posición de reposo fuera de la arena experimental. Esta evaluación se realizó 3, 24 y 48 horas después de finalizado el entrenamiento para todos los experimentos. Se registró la extensión o no de la probóscide ante la presentación del olor como una variable respuesta binaria: Sí o No.

2.7. Análisis de datos

Los datos obtenidos de cada animal en los entrenamientos y tests fueron analizados a nivel poblacional. Los niveles de aprendizaje y retención de memoria fueron definidos como la probabilidad de que suceda el reflejo de extensión de probóscide en un grupo de animales entrenados bajo el mismo tratamiento. Las comparaciones se realizaron entre los distintos grupos experimentales pertenecientes a un mismo experimento, para los ensayos de entrenamiento y los ensayos de evaluación. Se definió un criterio de exclusión de animales: todas aquellas abejas que respondían espontáneamente al odorante durante el primer ensayo del entrenamiento fueron eliminadas del análisis. Asimismo, también se eliminaron los datos correspondientes a animales que no hubieran ingerido sacarosa en al menos dos ensayos de la etapa de entrenamiento.

El análisis se realizó con el software RStudio versión 3.6.1. En todos los experimentos los datos fueron analizados en base a dos modelos lineales generalizados: uno para la etapa de entrenamiento y otro para la etapa de evaluación. Se decidió modelar explícitamente los datos debido a que esto nos permite extender las conclusiones de nuestros experimentos a la población de la cual se extrajeron las muestras. Se utilizaron modelos lineales generalizados marginales o mixtos dependiendo del cumplimiento de supuestos distribucionales en cada caso, ya que ambos permiten el modelado de la falta de independencia entre mediciones realizadas sobre una misma abeja. Cada modelo

estadístico implementado proviene de una selección de modelos previa. En todos los casos se probaron distintos modelos, se los ordenó a partir de sus valores de AIC o QIC (dependiendo de la biblioteca con la que se estuviese trabajando) y se eligió el modelo que optimizara el criterio: a menor AIC o QIC, mejor ajuste del modelo estadístico a los datos (Akaike, 1973; Cui, 2007). Los resultados se basan en las estimaciones de estos modelos estadísticos. Sin embargo, se añade un anexo estadístico donde, para cada experimento, se presenta una tabla con la estadística descriptiva de las medidas muestrales.

Para todos los modelos, se modeló el logaritmo de la probabilidad de respuestas positivas (extensión de la probóscide) dividido la probabilidad de respuestas negativas (no extensión), expresión que se conoce como $\text{logit}(\pi)$. Debido a que la variable respuesta es dicotómica (extensión de la probóscide sí-no), modelar el $\text{logit}(\pi)$ permite obtener una relación lineal y de este modo explicitar un modelo lineal para una distribución de probabilidades Bernoulli. El $\text{logit}(\pi)$ se modeló en función de la interacción entre el tratamiento y el número de ensayo (en el caso del modelo para la etapa de entrenamiento) o tiempo de evaluación (en el caso de los modelos para la evaluación). Además, se agregó la semana de trabajo como una covariable para controlar una mayor cantidad de variabilidad en el modelo. Como aclaración general, es necesario mencionar que a pesar de que se trabajó con dos odorantes de valencia neutra para las abejas (acetofenona y 1-hexanol), el odorante no fue incluido como una variable explicatoria a ninguno de los modelos debido a que se carecía del dato de qué odorante fue utilizado en cada semana de trabajo. Sin embargo, en base a la literatura previa y los trabajos realizados en nuestro laboratorio (ver Sección 2.2) se asume que no habría una preferencia por ninguno de los dos odorantes y que el aprendizaje alcanzado es el mismo independientemente de si se utiliza acetofenona o 1-hexanol como CS.

El modelo propuesto para la etapa de entrenamiento fue el mismo para los tres experimentos. Se implementó un modelo lineal generalizado marginal con la función *geeglm* del paquete *geepack*. Para facilitar la implementación del modelo, se excluyó el ensayo 1 del entrenamiento debido a que se trataba de un vector de ceros únicamente, ya que siempre se partió de animales que no tuvieran una respuesta espontánea frente al odorante. La Ecuación 2.1 describe formalmente el modelo implementado:

$$\log\left(\frac{\pi_{ijk}}{1-\pi_{ijk}}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k$$

$$Y_{ijk} \sim \text{Bernoulli}(\pi_{ijk})$$

Ecuación 2.1 - Modelo marginal para la etapa de entrenamiento. μ es la media poblacional, α_i es el efecto fijo de cada tratamiento, β_j es el efecto fijo del número de ensayo, $\alpha\beta_{ij}$ es la interacción de ambos efectos, y γ_k es el efecto fijo de la semana de trabajo. Debajo del modelo se expresan los supuestos distribucionales: Y es la variable respuesta (extensión de la probóscide sí-no) que sigue una distribución Bernoulli con probabilidad π_{ijk} .

Para los experimentos 1 y 3 se implementó un modelo lineal generalizado condicional con la función *glmmTMB* de la biblioteca *glmmTMB*. Al tratarse de un modelo condicional, se agregó el número de abeja como una variable de efectos aleatorios, con el fin de modelar la falta de independencia entre mediciones realizadas a cada animal. La Ecuación 2.2 describe formalmente el modelo implementado para estos experimentos:

$$\log\left(\frac{\pi_{ijkl}}{1-\pi_{ijkl}}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k + A_{l(ij)(k)}$$

$$Y_{ijkl} \sim \text{Bernoulli}(\pi_{ijkl})$$

$$A_l \sim \text{NID}(0, \sigma_{abeja}^2)$$

Ecuación 2.2 - Modelo condicional para los experimentos 1 y 3. μ es la media poblacional, α_i es el efecto fijo de cada tratamiento, β_j es el efecto fijo del tiempo de evaluación, $\alpha\beta_{ij}$ es la interacción de ambos efectos, γ_k es el efecto fijo de la semana de trabajo, y A_l es el efecto aleatorio de cada abeja. Debajo del modelo se expresan los supuestos distribucionales: Y es la variable respuesta (extensión de la probóscide sí-no) que sigue una distribución Bernoulli con probabilidad π_{ijkl} . A_l es el efecto aleatorio de cada abeja que sigue una distribución normal con media 0 y varianza σ_{abeja}^2 .

Para ambos protocolos del Experimento 2 se implementó un modelo marginal (función *geeglm*). La Ecuación 2.3 describe formalmente el modelo implementado para este experimento:

$$\log\left(\frac{\pi_{ijk}}{1-\pi_{ijk}}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k$$

$$Y_{ijk} \sim \text{Bernoulli}(\pi_{ijk})$$

Ecuación 2.3 - Modelo marginal para el Experimento 2. μ es la media poblacional, α_i es el efecto fijo de cada tratamiento, β_j es el efecto fijo del tiempo de evaluación, $\alpha\beta_{ij}$ es la interacción de ambos efectos, y γ_k es el efecto fijo de la semana de trabajo. Debajo del modelo se expresan los supuestos distribucionales: Y es la variable respuesta (extensión de la probóscide sí-no) que sigue una distribución Bernoulli con probabilidad π_{ijk} .

Para todos los modelos implementados (ecuaciones 2.1 a 2.3), se pusieron a prueba los supuestos distribucionales con el paquete *DHARMA* versión 0.4.4. Luego de poner a prueba el cumplimiento de los supuestos, se realizó una prueba de ANOVA del modelo propuesto y comparaciones entre grupos con la función *emmeans*. En el Capítulo 3 se exponen los resultados obtenidos. Para mayor claridad en la lectura, se detallan únicamente los valores estimados por cada modelo y los p valores para las comparaciones entre tratamientos que arrojaron diferencias significativas o que resultan relevantes para las hipótesis del trabajo. A pesar de que se comprende que la mejor forma de enunciar los resultados del modelo es a partir de los intervalos de confianza estimados para cada comparación entre grupos, se tomó esta decisión para comunicar más claramente los resultados obtenidos. Por esta razón, en el anexo estadístico al final del manuscrito se incluye el detalle de los resultados obtenidos. Para cada experimento, se presenta la salida de la prueba de ANOVA del modelo implementado y todas las comparaciones realizadas a partir de los resultados obtenidos en el ANOVA, incluyendo la interpretación de las magnitudes de efecto para las comparaciones que resultaron significativas.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Experimento 1: contraste intraensayo

En este primer experimento, las abejas fueron divididas en cuatro grupos: dos con contraste de recompensas (CONTRASTE POSITIVO, N=37 y CONTRASTE NEGATIVO, N=33) y dos de recompensa constante (CONSTANTE ALTO, N=31 y CONSTANTE BAJO, N=31). Todos los grupos recibieron cuatro ensayos de entrenamiento donde se presentaron los estímulos de forma pareada (odorante-azúcar), tal como se ilustra en la Figura 3.1.

grupo	día 1 captura	azúcar recibido [M]							
		E1		E2		E3		E4	
constante bajo	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
constante alto	1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
contraste negativo	1	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5
contraste positivo	1	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5

día 2
entrenamiento

Figura 3.1 - Esquema del Experimento 1. En cada ensayo de entrenamiento se indica la concentración de sacarosa aplicada sobre la antena y la aplicada sobre la probóscide.

Las antenas de los animales pertenecientes al grupo CONTRASTE POSITIVO fueron estimuladas con sacarosa de concentración 0,5 M y, luego de que extendieran la probóscide en respuesta al estímulo, se los alimentó con sacarosa 1,5 M. Las antenas de los animales del grupo CONTRASTE NEGATIVO fueron estimuladas con sacarosa 1,5 M, y luego fueron alimentados con sacarosa 0,5 M. El grupo CONSTANTE ALTO recibió tanto en las antenas como en la probóscide sacarosa 1,5 M. El grupo CONSTANTE BAJO recibió en antenas y probóscide sacarosa 0,5 M. El objetivo de este primer experimento fue evaluar si la formación de la memoria asociativa “odorante-recompensa” es sensible al *mismatch* entre la sacarosa esperada y la obtenida. En este caso, la concentración de sacarosa esperada estaría codificada como una memoria de trabajo de alta resolución temporal que se genera cuando el azúcar entra en contacto con las antenas, mientras que el azúcar recibida es sensada segundos después en la probóscide.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de los modelos implementados (Ecuación 2.1 y Ecuación 2.2).

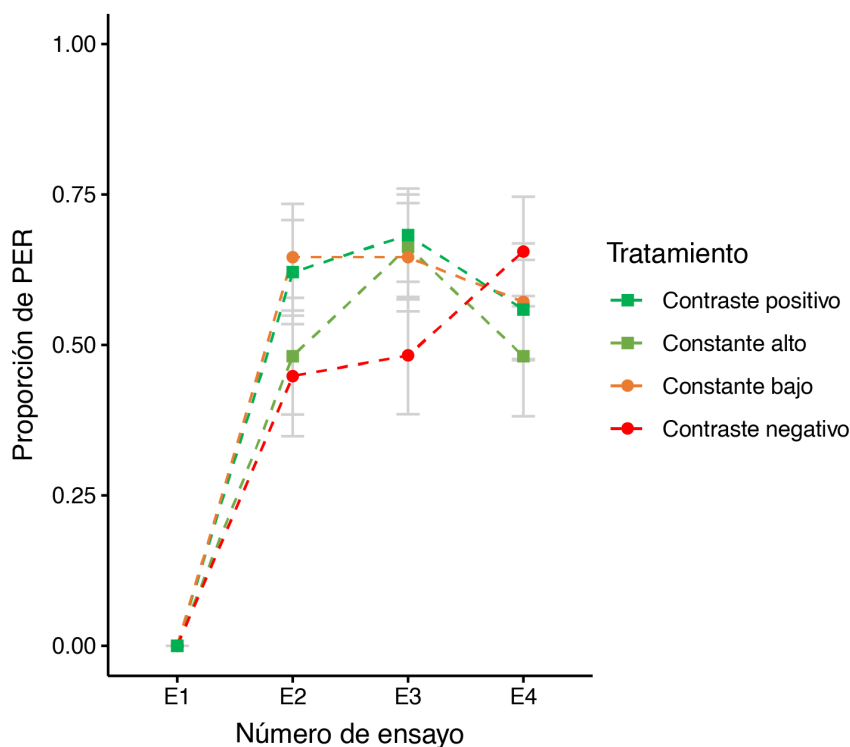


Figura 3.2 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de entrenamiento del Experimento 1 (Ecuación 2.1) para cada tratamiento en cada ensayo.

En la prueba de ANOVA para el modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1) de este experimento, el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo (número de ensayo) fue no significativo ($p > 0,05$). Tampoco fueron significativas las variables tratamiento ni número de ensayo ($p > 0,05$). Cabe recordar que para el modelado del entrenamiento se excluyeron los datos referentes al ensayo 1, que al ser todos ceros dificultaba el modelado de los datos. Por lo tanto, la no significancia del número de ensayo se refiere a los ensayos 2 al 4, donde podemos observar que en el ensayo 2 la proporción de PER había alcanzado niveles similares a los de los otros ensayos. Este resultado demuestra que no hay diferencias significativas según el tratamiento al cual fueron sometidos los animales durante la etapa de entrenamiento. Por lo tanto, se puede concluir que todos los grupos experimentales lograron aprender la asociación odorante-recompensa durante esta primera etapa.

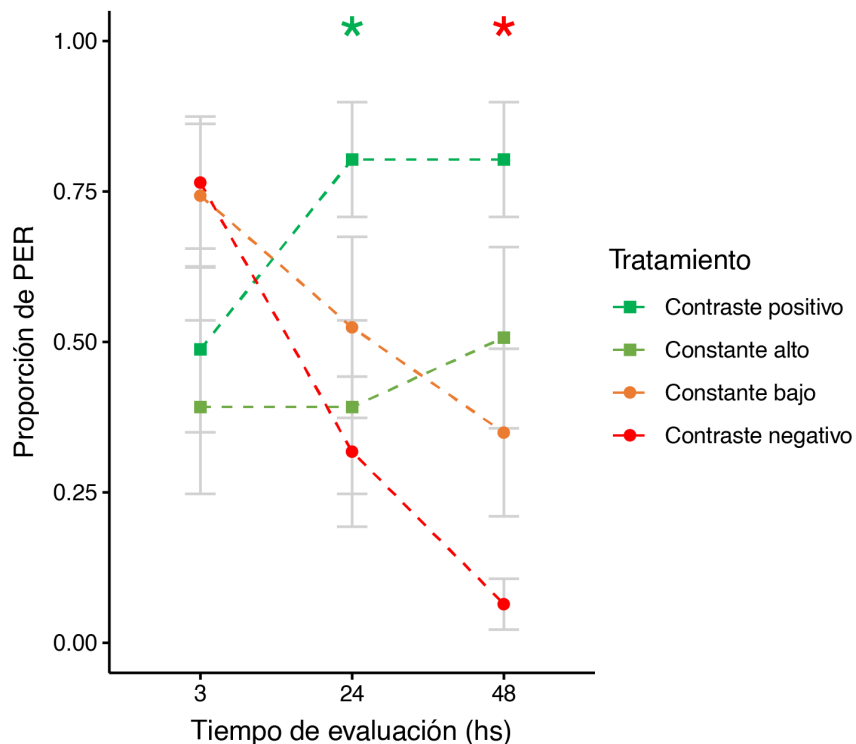


Figura 3.3 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de evaluación del Experimento 1 (Ecuación 2.2) para cada tratamiento en cada tiempo de evaluación.

En la prueba de ANOVA para el modelo de evaluación de este experimento (Ecuación 2.2), el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo de evaluación fue significativo ($p < 0,001$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos simples con contrastes ortogonales: para cada tiempo de evaluación (3, 24, 48 hs) se compararon los grupos CONSTANTE ALTO vs CONTRASTE POSITIVO y CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO.

En el primer tiempo de evaluación (3 hs) no se observaron diferencias significativas en los contrastes ($p > 0,05$). Como se observa en la Figura 3.3, la proporción de PER para los grupos contrastados es muy similar a ese tiempo. A 24 hs se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO. Para el grupo CONSTANTE ALTO la proporción de PER estimada a este tiempo de evaluación fue de 0,39, mientras que para el grupo CONTRASTE POSITIVO la proporción de PER estimada a 24 hs fue de 0,80. Según los contrastes ortogonales realizados, esta diferencia resultó significativa con un $p < 0,05$. No se observaron diferencias significativas en la comparación CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO a 24 hs ($p > 0,05$). En la evaluación a 48 hs, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO. Para el grupo CONSTANTE BAJO la proporción de PER estimada a este tiempo de evaluación fue de 0,35, mientras que para el grupo CONTRASTE

NEGATIVO la proporción de PER estimada a 48 hs fue de 0,06. Según los contrastes ortogonales realizados, esta diferencia resultó significativa con un $p < 0,05$. No se observaron diferencias significativas en la comparación CONSTANTE ALTO vs CONTRASTE POSITIVO a 48 hs ($p > 0,05$), aunque la tendencia de las estimaciones coincide con lo observado a 24 hs.

3.2. Experimento 2: contraste interensayo

Protocolo 0,5-1-1,5 M

El Experimento 2 se divide en dos protocolos de concentraciones: 0,5-1-1,5 M y 0,17-0,5-1,5 M. Para el primer protocolo, los animales fueron divididos en tres grupos: dos experimentales (ASCENDENTE, N=27 y DESCENDENTE, N=26) y un grupo CONSTANTE (N=26). Todos los grupos recibieron tres ensayos de entrenamiento donde se presentaron los estímulos de forma pareada (odorante-azúcar), tal como ilustra la Figura 3.4.

grupo	azúcar recibido [M]		
constante	1	1	1
descendente	1	1,5	0,5
ascendente	1	0,5	1,5
		E1	E2
	día 1	día 2	
	captura	entrenamiento	

Figura 3.4 - Esquema del Experimento 2 para el protocolo de concentraciones 0,5-1-1,5 M. Se indica la concentración de azúcar en la solución de alimentación el día previo al entrenamiento y el de la concentración de azúcar utilizada en cada ensayo del entrenamiento.

Los animales pertenecientes al grupo ASCENDENTE fueron entrenados con un protocolo ascendente en la concentración de solución azucarada: en el ensayo 1 recibieron sacarosa de concentración 0,5 M, en el ensayo 2 sacarosa 1 M, y en el ensayo 3 sacarosa 1,5 M. Los animales del grupo DESCENDENTE fueron entrenados con el protocolo descendente: 1,5 M en el primer ensayo, 1 M en el segundo, 0,5 M en el tercero. El grupo CONSTANTE recibió la misma concentración de sacarosa durante todo el entrenamiento, 1 M. El objetivo del Experimento 2 fue nuevamente evaluar la modulación de la memoria a partir de la diferencia entre lo esperado y lo obtenido durante el entrenamiento. En este caso, la recompensa esperada estaría codificada en una memoria de corto término

generada en el tiempo comprendido entre un ensayo y el siguiente (aproximadamente 10 minutos).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de los modelos estadísticos implementados (Ecuación 2.1 y Ecuación 2.3).

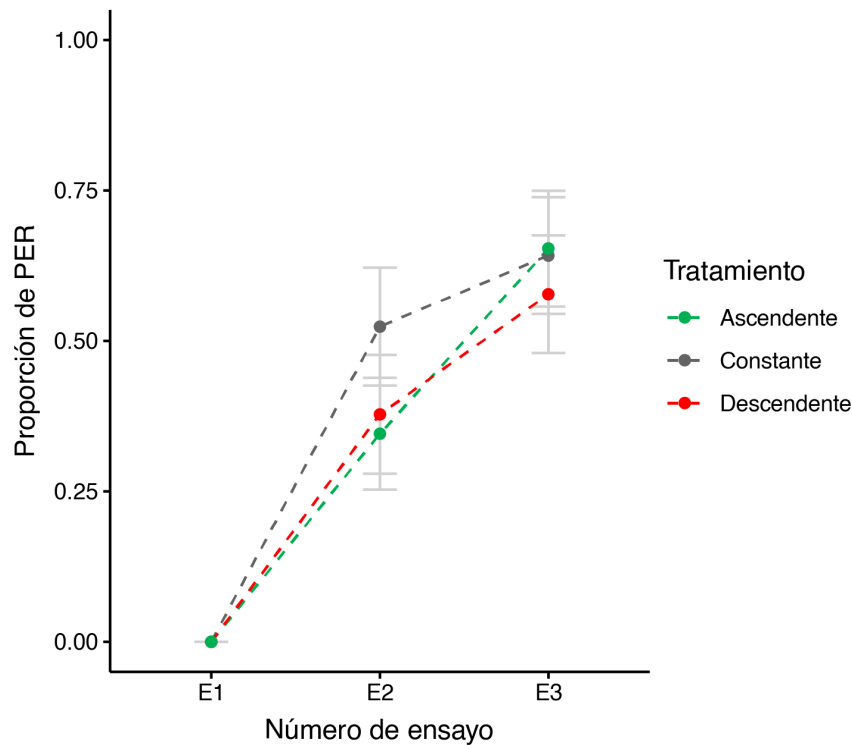


Figura 3.5 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de entrenamiento del Experimento 2 protocolo 0,5-1-1,5 M (Ecuación 2.1) para cada tratamiento en cada ensayo.

En la prueba de ANOVA para el modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1) de este experimento, el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo (número de ensayo) fue no significativo ($p > 0,05$). Tampoco resultó significativa la variable tratamiento ($p > 0,05$). La única variable significativa fue el número de ensayo ($p < 0,01$). Este resultado demuestra que no hay diferencias significativas según el tratamiento al cual fueron sometidos los animales durante la etapa de entrenamiento, pero sí se observa que entre el ensayo 2 y el ensayo 3 la proporción de PER aumenta significativamente. Por lo tanto, se puede concluir que todos los grupos experimentales lograron aprender la asociación odorante-recompensa durante esta primera etapa, alcanzando la máxima proporción de PER en el ensayo 3.

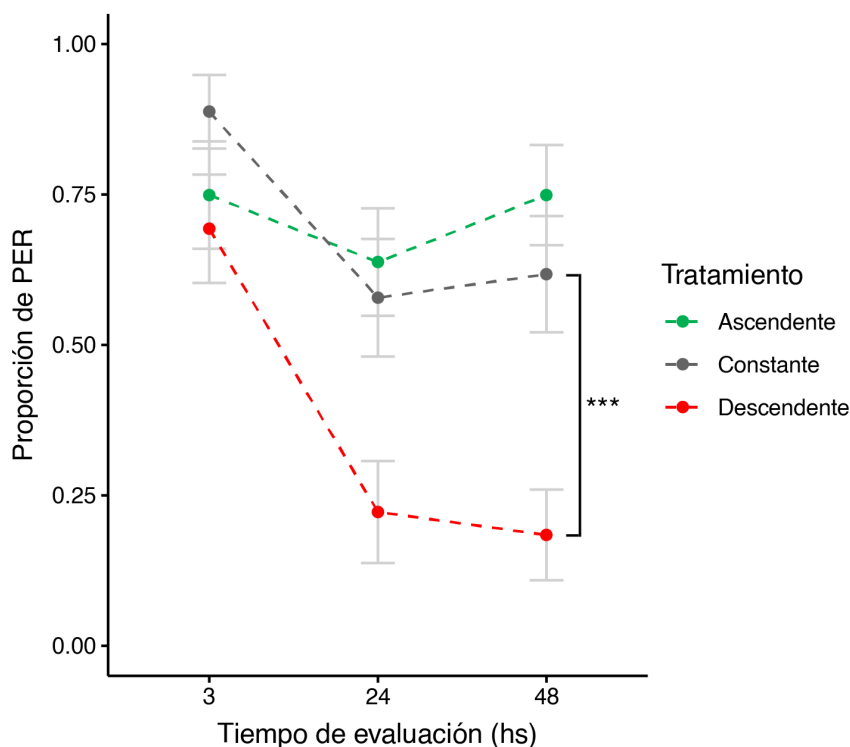


Figura 3.6 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de evaluación del Experimento 2 protocolo 0,5-1-1,5 M (Ecuación 2.3) para cada tratamiento en cada tiempo de evaluación.

En la prueba de ANOVA para el modelo de evaluación de este experimento (Ecuación 2.3), el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo de evaluación fue no significativo ($p > 0,05$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales comparando por tratamiento.

Promediando por los tres tiempos de evaluación, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE y DESCENDENTE. Para el grupo CONSTANTE la proporción de PER promedio estimada fue de 0,72, para el grupo DESCENDENTE la proporción promedio estimada fue de 0,34. Según el test de Tukey realizado, esta diferencia resultó significativa con un $p < 0,001$. No se observaron diferencias significativas en la comparación CONSTANTE vs. ASCENDENTE ($p > 0,05$). A partir de este resultado, se consideró que podría tratarse de un efecto techo el cual dificulta observar diferencias entre los grupos CONSTANTE y ASCENDENTE debido a una alta respuesta del grupo CONSTANTE. Por lo tanto, se procedió a realizar el siguiente protocolo con el fin de reducir el valor de respuesta del grupo CONSTANTE y así dejar en evidencia valores mayores de retención que surgieran tras otro tratamiento.

Protocolo 0,17-0,5-1,5 M

Con el fin de hacer más sensible la posibilidad de observar diferencias entre los grupos CONSTANTE y ASCENDENTE, se realizó un esquema experimental idéntico al anterior pero con un protocolo de concentraciones que comienza con un valor más bajo y en el cual la recompensa del grupo constante es menor: 0,17-0,5-1,5 M. Se decidió disminuir la concentración mínima y mantener una relación del triple de concentración entre ensayos, con el fin de poder aumentar la resolución entre los grupos CONSTANTE y ASCENDENTE. El grupo CONSTANTE tuvo 31 animales, el grupo ASCENDENTE 31 y el grupo DESCENDENTE 34.

grupo	azúcar recibido [M]			
constante	0,5	0,5	0,5	0,5
descendente	0,5	1,5	0,5	0,17
ascendente	0,5	0,17	0,5	1,5
		E1	E2	E3
	día 1 captura	día 2 entrenamiento		

Figura 3.7 - Esquema del Experimento 2 para el protocolo de concentraciones 0,17-0,5-1,5 M. Se indica la concentración de azúcar en la solución de alimentación el día previo al entrenamiento y el de la concentración de azúcar utilizada en cada ensayo del entrenamiento.

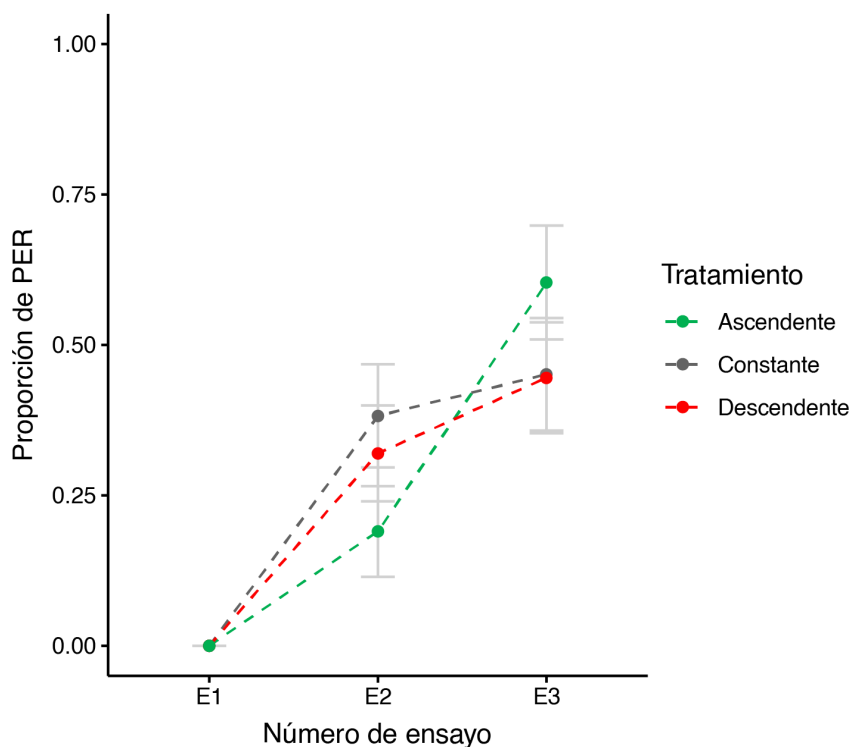


Figura 3.8 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de entrenamiento del Experimento 2 protocolo 0,17-0,5-1,5 M (Ecuación 2.1) para cada tratamiento en cada ensayo.

En la prueba de ANOVA para el modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1) de este experimento, el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo (número de ensayo) fue no significativo ($p > 0,05$). Tampoco resultó significativa la variable tratamiento ($p > 0,05$), pero sí lo fue el número de ensayo ($p < 0,01$). Nuevamente, todos los animales lograron aprender la asociación independientemente del tratamiento al que fueron sometidos (lo que se observa en la proporción de PER alcanzada en cada grupo). Al igual que en el protocolo 0,5-1-1,5 M, el valor máximo de PER también es alcanzado en el tercer ensayo, de allí la significancia de la variable número de ensayo para este modelo. Se puede concluir que todos los grupos experimentales lograron aprender la asociación “odorante-recompensa” durante el entrenamiento, alcanzando la máxima proporción de PER en el ensayo 3.

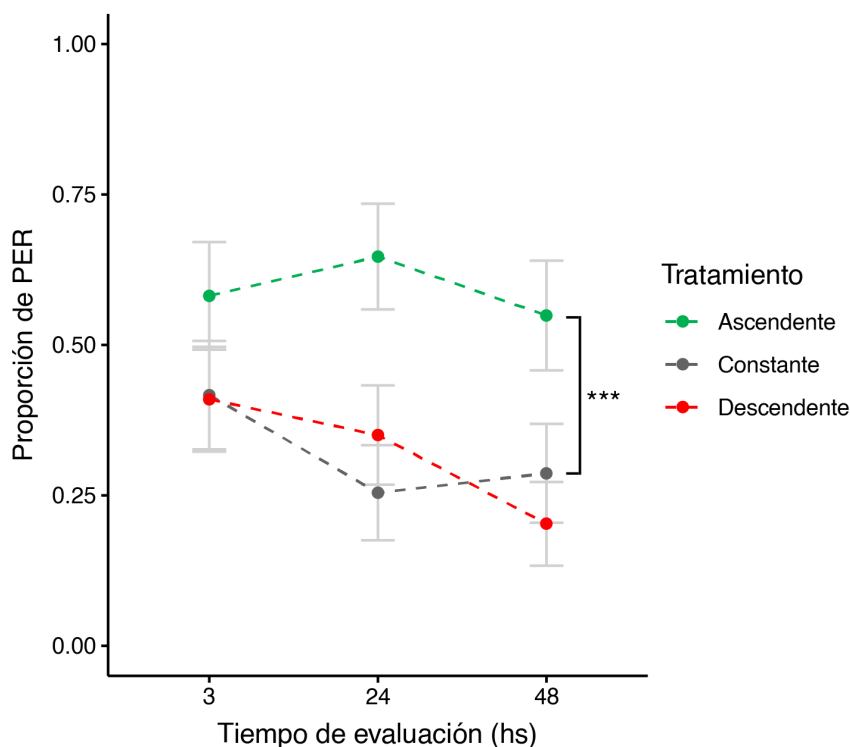


Figura 3.9 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de evaluación del Experimento 2 protocolo 0,15-0,5-1,5 M (Ecuación 2.3) para cada tratamiento en cada tiempo de evaluación.

En la prueba de ANOVA para el modelo de evaluación de este experimento (Ecuación 2.3), el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo de evaluación fue no significativo ($p > 0,05$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales comparando únicamente por tratamiento.

Promediando por los tres tiempos de evaluación, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE y ASCENDENTE. Para el grupo CONSTANTE la proporción de PER promedio estimada fue de 0,31, para el grupo ASCENDENTE la proporción promedio estimada fue de 0,59. Según el test de Tukey realizado, esta diferencia resultó significativa con un $p < 0,001$. No se observaron diferencias significativas en la comparación CONSTANTE vs DESCENDENTE ($p > 0,05$), lo cual es esperable ya que nos ubicamos en el protocolo de concentraciones 0,17-0,5-1,5 M, el cual facilita la observación del efecto del tratamiento ASCENDENTE pero no así para el grupo DESCENDENTE.

3.3. Experimento 3: contraste entre días

Para este último experimento, las abejas fueron divididas en cuatro grupos: dos experimentales (CONTRASTE POSITIVO, N=40 y CONTRASTE NEGATIVO, N=40) y dos constantes (CONSTANTE ALTO, N=47 y CONSTANTE BAJO, N=36). Todos los grupos

recibieron cuatro ensayos de entrenamiento donde se presentaron los estímulos de forma pareada (odorante-azúcar), como se observa en la Figura 3.10.

grupo	azúcar recibido [M]				
	día 1 captura	día 2 entrenamiento			
		E1	E2	E3	E4
constante bajo	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
constante alto	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
contraste negativo	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5
contraste positivo	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Figura 3.10 - Esquema del Experimento 3. Se indica la concentración de azúcar en la solución de alimentación el día previo al entrenamiento y el de la concentración de azúcar utilizada en cada ensayo del entrenamiento.

Durante el día previo al entrenamiento, los animales del grupo CONTRASTE POSITIVO fueron alimentados con sacarosa de concentración 0,5 M. Luego, recibieron el entrenamiento de condicionamiento de la extensión de la probóscide con sacarosa 1,5 M. Los animales del grupo CONTRASTE NEGATIVO fueron alimentados el día anterior con sacarosa 1,5 M, y al día siguiente entrenados con sacarosa 0,5 M. El grupo CONSTANTE ALTO recibió ambos días sacarosa de concentración 1,5 M, y el grupo CONSTANTE BAJO recibió ambos días sacarosa de concentración 0,5 M. En la Figura 3.10 se observa que, en este caso, los contrastes entre concentraciones de azúcar recibido se generan entre el día 1 (barra celeste) y el día 2 (barras rosas).

A diferencia de los experimentos 1 y 2, en este último experimento la recompensa esperada estaría codificada en una memoria de largo término, generada a partir de la solución de azúcar utilizada para alimentar a las abejas el día previo al entrenamiento. De este modo, al recibir recompensas iguales (grupos constantes) o diferentes (grupos contrastes) a las esperadas durante el día de entrenamiento, se buscó evaluar la modulación de la memoria asociativa generada en esta etapa. A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de los modelos implementados (Ecuación 2.1 y Ecuación 2.2).

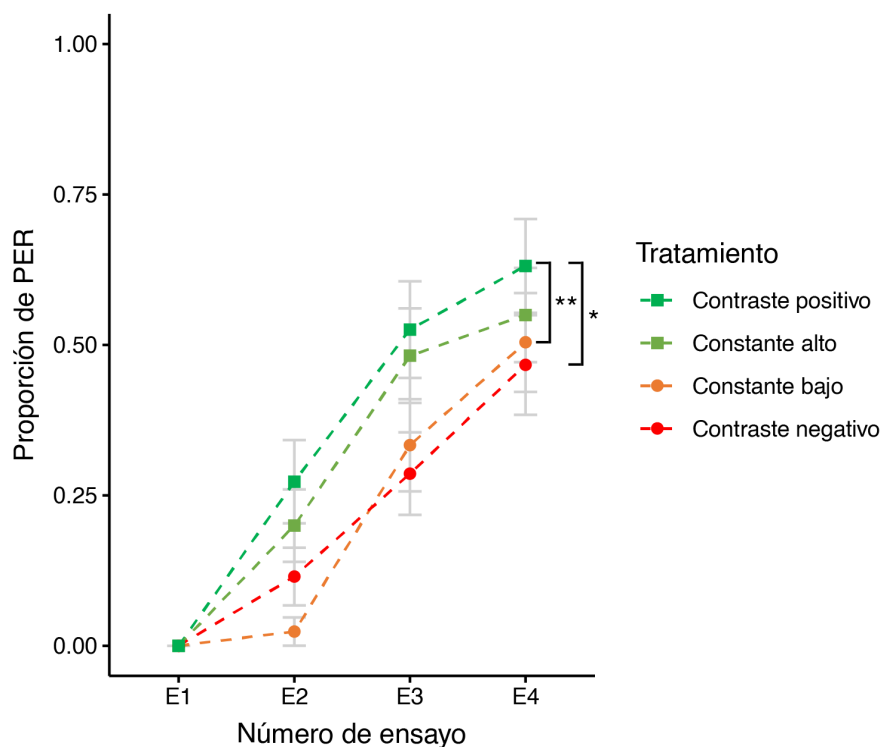


Figura 3.11 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de entrenamiento del Experimento 3 (Ecuación 2.1) para cada tratamiento en cada ensayo.

En la prueba de ANOVA para el modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1) de este experimento, el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo (número de ensayo) fue no significativo ($p > 0,05$). Por otro lado, sí resultaron significativas las variables tratamiento ($p < 0,01$) y número de ensayo ($p < 0,001$). Al realizar un análisis de efectos principales para el tratamiento, el grupo CONTRASTE POSITIVO presenta una proporción de PER significativamente mayor que el grupo CONSTANTE BAJO. Además, el grupo CONTRASTE POSITIVO presenta una proporción de PER significativamente mayor que el grupo CONTRASTE NEGATIVO. Para facilitar la lectura y dado que estos análisis no corresponden a las hipótesis planteadas en este trabajo, se omite la descripción de las magnitudes de efecto correspondientes a las comparaciones mencionadas (ver: anexo estadístico). En este experimento los animales poseen una experiencia previa con la sacarosa que data de 24 hs antes de la etapa de entrenamiento, y es probable que esta experiencia pueda explicar que se observen diferencias durante el entrenamiento. Esta discusión es ampliada en la Sección 4.3. Respecto a la variable de número de ensayo, nuevamente la proporción de PER aumenta significativamente en los sucesivos ensayos y para todos los grupos, por lo tanto esta significancia es reflejo de que los animales de todos los tratamientos lograron aprender la asociación odorante-sacarosa.

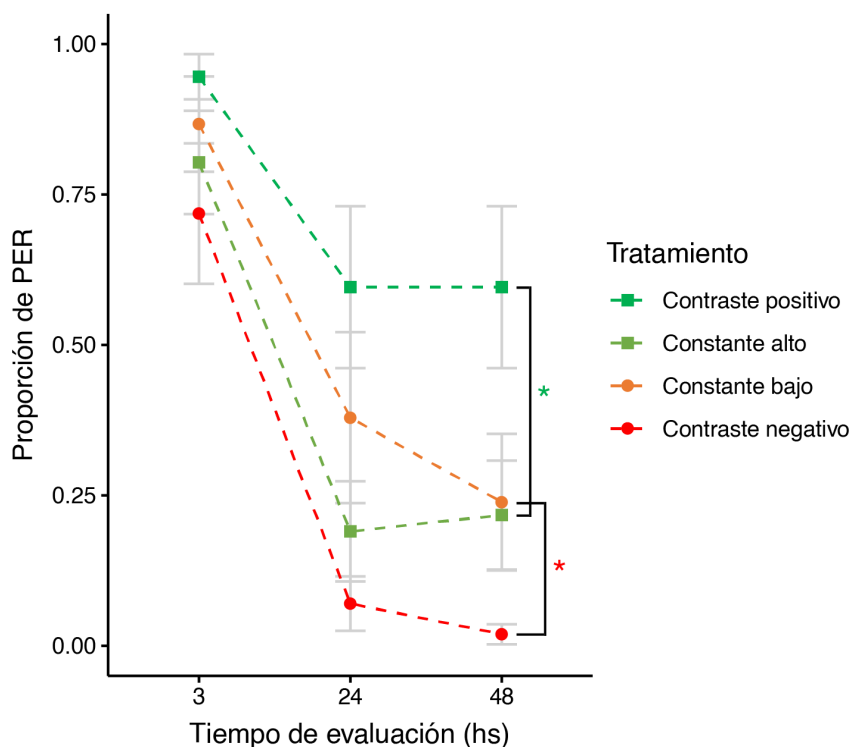


Figura 3.12 - Proporción de PER frente al odorante \pm error estándar estimada por el modelo estadístico aplicado a los datos de evaluación del Experimento 3 (Ecuación 2.2) para cada tratamiento en cada tiempo de evaluación.

En la prueba de ANOVA para el modelo de evaluación de este experimento (Ecuación 2.2), el término referente a la interacción entre el tratamiento y el tiempo de evaluación fue no significativo ($p > 0,05$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales comparando por tratamiento.

Promediando por los tres tiempos de evaluación, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO. Para el grupo CONSTANTE ALTO la proporción de PER promedio estimada fue de 0,39, para el grupo CONTRASTE POSITIVO la proporción promedio estimada fue de 0,77. Según el test de Tukey realizado, esta diferencia resultó significativa con un $p < 0,05$. Además de estas diferencias, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO. Para el grupo CONSTANTE BAJO la proporción de PER promedio estimada fue de 0,52, para el grupo CONTRASTE NEGATIVO la proporción promedio estimada fue de 0,13. Según el test de Tukey realizado, esta diferencia resultó significativa con un $p < 0,05$.

Capítulo 4. Discusión

En el presente trabajo nos propusimos como objetivo general determinar si la fuerza de un estímulo incondicionado para generar un aprendizaje y una memoria depende de su valor absoluto, o de un valor subjetivo generado por el propio animal a partir de la diferencia entre la calidad real y la calidad esperada de la recompensa.

4.1. Experimento 1: contraste intraensayo

En la naturaleza las abejas visitan parches florales buscando fuentes de néctar y polen, ejecutando patrones complejos de comportamiento y recordando las fuentes de alimento visitadas (Zhang et al., 2006). Estas recompensas pueden variar tanto en los volúmenes de néctar como en su composición, así como también en la cantidad y calidad de polen ofrecidos. Por lo tanto, es de esperar que la información fluctuante que las abejas encuentran en su camino sea procesada a través de una memoria de trabajo de alta resolución temporal que les permita comparar las distintas fuentes de alimento (Zhang et al., 2005). En este primer experimento evaluamos la posibilidad de modular una memoria asociativa en base a cambios en esta memoria de trabajo, a partir de la estimulación de las antenas con sacarosa y la disposición de una gota de sacarosa de igual o distinta concentración en la probóscide del animal. Según los resultados obtenidos, se puede aseverar que las abejas forman una expectativa de extremo corto término en el intervalo de tiempo comprendido entre la estimulación de la antena y la administración de sacarosa en la probóscide, la cual estaría codificada en una memoria de trabajo. La diferencia entre lo esperado (codificado en esta expectativa) y lo obtenido (el azúcar que las abejas reciben en la probóscide) permite la modulación de la memoria a partir de los sucesivos ensayos de entrenamiento, lo que se evidencia en los resultados de las evaluaciones a 24 y 48 horas posteriores al entrenamiento.

La forma de trasladar al laboratorio la estimulación que reciben las abejas en las antenas segundos antes de consumir la recompensa del nectario de una flor, y a la vez lograr manipular experimentalmente esta experiencia, fue estimular diferencialmente las antenas y la probóscide con sacarosa de distintas concentraciones. Este escenario es prácticamente inexistente en la naturaleza, ya que al posarse sobre una flor que otorga néctar, las abejas sensan con las antenas y los tarsos el néctar que segundos después consumirán y el mismo no varía en ese breve intervalo temporal. Sin embargo, esta manipulación artificial en el laboratorio nos permitió contrastar nuestras hipótesis en relación a la posibilidad de modular la formación de memorias de largo término a partir de la generación de diferentes memorias de trabajo en cada grupo experimental. A partir de la

estimulación antenal las abejas forman, en segundos, una memoria de trabajo relacionada con la valencia de dicho estímulo (Menzel, 1987). Más aún, existen protocolos de condicionamiento donde es posible entrenar a las abejas a asociar un estímulo neutro con una solución azucarada que es sensada únicamente a través de las antenas (Bitterman et al., 1983; Wright et al., 2007). Debido a que la asociación está codificada en una memoria de trabajo que no es reforzada con un estímulo post-ingestivo de dicho azúcar, estas memorias de condicionamiento basadas en estimulación antenal decaen rápidamente en el tiempo. En el contexto de nuestro experimento, esta memoria de trabajo codificaría la expectativa que la abeja tiene de un evento que ocurrirá en un breve intervalo temporal: si una solución azucarada de concentración 0,5 M tocó las antenas, entonces es de esperarse que una solución azucarada idéntica sea ingerida segundos después. Los resultados obtenidos muestran que el proceso de formación de la memoria entre el olor y una recompensa es sensible a la diferencia de estimulación que existe entre lo sensado por las antenas y lo recibido en la probóscide: los animales que recibieron algo mejor a lo esperado presentaron una mayor proporción de PER en la sesión de evaluación, y el caso opuesto ocurrió con las abejas que recibieron recompensas peores a las esperadas. En base a estos resultados podemos concluir que las abejas efectivamente forman una expectativa acerca de la calidad de la recompensa en base a lo sensado por la antenas.

La Figura 3.3 muestra que cuando la expectativa de la recompensa fue superada (lo ingerido era superior a lo sensado en las antenas), la memoria de largo término que le permitió a las abejas de ese grupo predecir la llegada de la recompensa con la sola presencia del odorante fue significativamente más fuerte que las memorias generadas en los animales del grupo CONSTANTE ALTO. Estas diferencias fueron significativas en la evaluación a las 24 hs pero no a las 48 hs, aunque en esta última medición se observa que continúa la tendencia de que el grupo CONTRASTE POSITIVO tenga una mayor proporción de PER. Por otro lado, cuando las abejas eran “decepcionadas” (lo ingerido era inferior a lo anticipado por las antenas), la memoria a largo término sobre la recompensa resultó significativamente más débil que las memorias generadas en las abejas del grupo CONSTANTE BAJO. Para esta comparación las diferencias fueron significativas a las 48 hs pero no a las 24 hs aunque, al igual que la comparación anterior, durante la medición a 24 hs también se observa la tendencia de menor respuesta del grupo CONTRASTE NEGATIVO.

En la evaluación a 3 hs no se observaron diferencias significativas en los contrastes ortogonales, sin embargo, resulta de interés discutir la tendencia de los resultados obtenidos. En la Figura 3.3 se observa que, a 3 hs, los grupos CONSTANTE BAJO y

CONTRASTE NEGATIVO se ubican en una proporción de PER estimada alrededor de 0,75. Los otros dos grupos, por el contrario, poseen proporciones de PER estimadas alrededor de 0,5. Esta tendencia es contraria tanto a lo esperado por las hipótesis como a los resultados obtenidos en las otras dos evaluaciones (24 y 48 hs). Esta tendencia puede interpretarse analizando en detalle el protocolo experimental. Los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO ingieren azúcar de concentración 0,5 M (independientemente de lo recibido en las antenas) durante 4 ensayos sucesivos. Por otro lado, los grupos CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO ingieren azúcar 1,5 M. Tres horas después de finalizado el último ensayo, todos los grupos son evaluados con una única presentación del odorante que estuvo asociado a dichas recompensas. Durante los protocolos de aprendizaje asociativo, es necesario que los animales estén motivados tanto para aprender la asociación del estímulo con la recompensa como para expresar posteriormente esa memoria adquirida frente a la presentación del estímulo condicionado. Por ejemplo, si se desea asociar la presencia de un odorante con la llegada de sacarosa, es conveniente que los animales posean un número considerable de horas de ayuno para tener cierta motivación a aprender el valor predictivo del odorante (y para que, justamente, la sacarosa sea considerada una recompensa *per se*) (Friedrich et al., 2004). En el caso de nuestros experimentos, las abejas llegan al día de entrenamiento con más de 12 hs de ayuno para estar motivadas a aprender la asociación odorante-azúcar. Teniendo en cuenta esta condición previa de los animales, es probable que las abejas de los grupos que ingirieron sacarosa 1,5 M durante el entrenamiento alcancen niveles de saciedad más altos que las abejas que ingirieron sacarosa 0,5 M. De este modo, al presentar a todos los animales con el odorante 3 hs después, las abejas que siguen motivadas a aprender la asociación por haber ingerido azúcar de peor calidad nutricional (grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO) serán aquellas que respondan al estímulo en mayor proporción.

Respecto al resultado obtenido para la comparación CONSTANTE ALTO - CONTRASTE NEGATIVO (diferencias significativas en la evaluación a 24 hs pero no a 48 hs), es posible interpretar la ausencia de diferencias significativas a 48 hs en base a la distribución de probabilidades de los datos. En una distribución Bernoulli (donde la variable respuesta es dicotómica, como en este trabajo), la varianza se define como $Var(Y) = \pi(1 - \pi)$ donde π es la probabilidad de extensión de probóscide en este caso. Por ende, el punto de máxima varianza se alcanza cuando $\pi = 0,5$. En este trabajo, sería el caso en el cual el 50% de las abejas extiende su probóscide y el 50% no lo hace, bajo un mismo tratamiento. Debido a que la proporción de PER estimada para el grupo CONSTANTE ALTO a 48 hs es de 0,51, este grupo tiene la máxima varianza posible para esta distribución de probabilidades. Por lo tanto, a pesar de que se mantiene la misma

tendencia observada en la evaluación a las 24 hs, la comparación con el grupo CONTRASTE POSITIVO resulta no significativa en este caso. Al reducirse levemente la diferencia entre ambos grupos y tener una probabilidad estimada de $\pi = 0,51$ para el constante, la misma tendencia entre grupos ya no resulta significativa.

Respecto al resultado obtenido para la comparación CONSTANTE BAJO - CONTRASTE NEGATIVO (diferencias significativas en la evaluación a 48 hs pero no a 24 hs), es posible interpretarlo en relación a la búsqueda de fuentes de alimento. A pesar de que el grupo CONTRASTE NEGATIVO recibe azúcar de peor calidad que la esperada por el contacto con las antenas, igualmente recibe un estímulo positivo y de valor nutricional. Si trasladamos la evaluación a 24 hs al entorno natural del animal, se relaciona con la evocación de una memoria de un sitio que otorga recompensas pero que no alcanzan la calidad esperada por la abeja. Es probable que la relación de compromiso entre un estímulo positivo (presencia de una recompensa) y un estímulo menos motivante (que la recompensa no sea de la calidad esperada) genere que los animales igualmente visiten la fuente de alimento (en este caso sería análogo a responder al odorante). Sin embargo, pasadas 48 hs del encuentro con ese sitio, es altamente probable que ese mismo animal haya encontrado una locación que le permita obtener recursos de mayor calidad. Por lo tanto, se propone que en el grupo CONTRASTE NEGATIVO se genera una traza mnésica debilitada en relación a la degradación de la recompensa esperada, que resulta evidente en la evaluación a 48 hs.

Hasta este punto, hemos observado que:

- Las abejas poseen una expectativa de la recompensa que están a punto de ingerir, la cual se produce en el instante posterior a que la solución azucarada estimula las antenas.
- Esta expectativa estaría codificada en una memoria de trabajo de alta resolución temporal generada a partir de la estimulación de la sacarosa en las antenas, resultados en la misma línea que el trabajo de (Zhang et al., 2005) antes citado.
- El *mismatch* entre lo esperado por la expectativa y lo recibido en la probóscide permitió la modulación de las trazas mnésicas, produciendo memorias a largo término de distinta intensidad, medidas como la proporción de PER en la etapa de evaluación (Figura 4.1).
- Las abejas que recibieron un contraste positivo entre lo recibido en las antenas y la probóscide mostraron una proporción de PER significativamente mayor que las abejas que recibieron una solución idéntica a la que ingirió este grupo (1,5 M) en

ambos sitios. A pesar de que esta diferencia fue significativa a 24 hs únicamente, a 48 hs se observa la misma tendencia entre los grupos, y se propuso una interpretación estadística para este resultado.

- Las abejas que recibieron un contraste negativo mostraron una proporción de PER significativamente menor que las abejas que recibieron sacarosa sin contraste y de igual calidad que la ingerida por este grupo (0,5 M). La diferencia se observó a 48 hs pero no a 24 hs, y se propuso una interpretación biológica para este resultado.

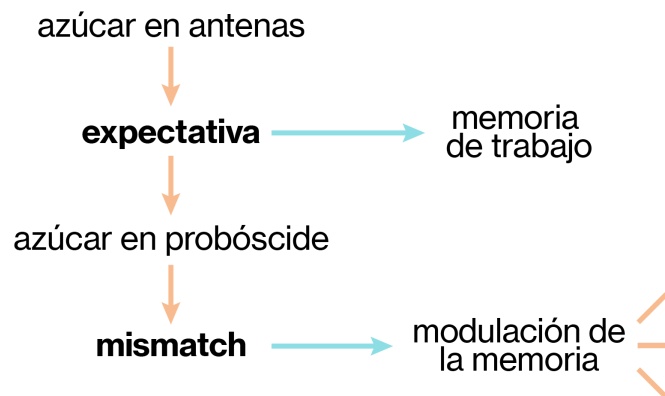


Figura 4.1 - Esquema de los resultados obtenidos para el Experimento 1. La modulación de la memoria se refiere a la memoria odorante-recompensa.

4.2. Experimento 2: contraste interensayo

En esta segunda etapa nos propusimos determinar si esta modulación de la memoria a largo término a partir de las expectativas de la recompensa se genera también cuando los contrastes ocurren en intervalos mayores de tiempo. En este caso, el intervalo temporal fue el comprendido entre un ensayo y otro dentro del mismo protocolo experimental (alrededor de 10 minutos). Pudimos comprobar que, si los animales recibían recompensas sucesivamente mejores, formaban memorias más fuertes a largo término (evidenciadas como una mayor proporción de PER en la etapa de evaluación). Por el contrario, si recibían recompensas sucesivamente peores formaban memorias más débiles respecto al grupo en el que se otorgaban recompensas constantes (Figuras 3.6 y 3.9). Los resultados obtenidos están respaldados por literatura previa, donde se encontró que las abejas prefieren flores artificiales que ofrecen volúmenes de recompensa ascendentes en lugar de volúmenes descendentes (De Marco & Farina, 2001; Gil et al., 2007).

En este experimento se trabajó con dos protocolos de concentraciones distintos (0,5-1-1,5 M y 0,17-0,5-1,5 M) con el fin de evitar los efectos “piso” y “techo” respectivamente. En el caso del protocolo 0,5-1-1,5 M, la respuesta de los animales

alcanzaba valores de saturación para el grupo que recibía 1 M en todos los ensayos (efecto techo), pero permitió evidenciar las diferencias entre los grupos DESCENDENTE y CONSTANTE. En el segundo protocolo, el aprendizaje del grupo constante era mínimo (efecto piso) ya que era entrenado constantemente con sacarosa 0,5 M. Esto permitió evidenciar las diferencias entre los grupos ASCENDENTE y CONSTANTE que no se podían observar en el caso anterior.

Esta batería de experimentos permitió poner en evidencia que las abejas valoran subjetivamente las recompensas obtenidas en relación a lo que ocurrió minutos antes con otra recompensa. Para estos animales, obtener una recompensa de sacarosa 1 M no tiene la misma valencia si minutos antes se recibió una recompensa de concentración 0,5 M ó 1,5 M. A pesar de que en ambos casos (contraste con 0,5 M ó 1,5 M) la solución ingerida es de igual concentración (1 M), las abejas evalúan la situación de obtención de recompensa como parte de un contexto general, y esto genera una motivación mayor o menor (respectivamente) en las situaciones subsiguientes. Finalmente, la repetición de una expectativa que es superada (grupo ASCENDENTE) o que es desmejorada (DESCENDENTE), genera una memoria más fuerte o más débil a largo término, respectivamente. En definitiva, nuevamente se observa que el valor objetivo de la recompensa obtenida no es lo único que le permite a estos animales formar una memoria de largo término, sino también el estado motivacional de la abeja al momento de recibir esa recompensa, que es dependiente de su historia previa.

Durante el día, las abejas se encuentran constantemente realizando vuelos desde su colmena hacia los parches florales cercanos para obtener néctar y polen (Abou-Shaara, 2014). Las recompensas que otorguen dichos parches serán variables ya que dependen de las condiciones climáticas, la explotación del recurso por parte de otros polinizadores, la morfología floral y disponibilidad de las mismas, entre otras (Bertsch, 1983; Corbet, 1978; Jones et al., 2021; Southwick et al., 1981). Las abejas deben enfrentarse diariamente a esta variabilidad, intentando maximizar su consumo de néctar y optimizar su eficiencia energética (Stabentheiner & Kovac, 2016). Extrapolando los resultados obtenidos en el laboratorio hacia esta situación natural, podemos inferir que no solo la variación de estos factores influirá directamente sobre el éxito de la colmena, sino que también lo hará el estado motivacional de las abejas. Teniendo en cuenta que en nuestros resultados se observa la formación de memorias significativamente más débiles para una situación donde la recompensa obtenida empeora cada vez, podría plantearse la situación hipotética donde malas condiciones climáticas provocan el deterioro sucesivo del parche floral en breves períodos de tiempo. En ese caso, se esperaría que las abejas que son expuestas a

recompensas que empeoran sucesivamente tengan un estado motivacional disminuido y trazas de memoria que se debilitan a medida que se deteriora el recurso. Comportamentalmente se observarían menos intentos de forrajeo en dicho sitio en los días siguientes al deterioro, lo que probablemente modifique la zona de búsquedas de recursos. De este modo, contextualizar los estímulos sería una habilidad crucial para la supervivencia. En un caso como el antes propuesto, este proceso le permitiría concluir al animal que el parche está en un proceso de deterioro (aunque probablemente siga otorgando recompensas, pero sucesivamente peores) y que es necesario tomar una decisión respecto a su explotación. Si un parche floral se deteriora rápidamente, deja de ser de utilidad para la explotación por parte de las abejas. De este modo, sería acertado suponer que el mantenimiento de una memoria sobre un sitio que no es de utilidad en términos de recursos no resultaría adaptativo para estos insectos nectívoros. Debido a que interpretamos que el deterioro de la recompensa no se codificaría como un estímulo puramente negativo sino como una disminución del estímulo positivo, entonces es razonable pensar que la debilitación de una traza mnésica que ya no aporta información relevante para la supervivencia del animal sea algo adaptativo. La situación análoga puede plantearse para un recurso que se recupera luego de una mala condición climática: a medida que el recurso se recupera, las abejas tendrán mayor motivación por visitar ese sitio y por ende se fortalecerán las trazas mnésicas que se relacionan con ese parche floral.

De esta segunda sección, se resume que:

- Las abejas contextualizan las recompensas obtenidas en relación a lo que sucedió minutos antes.
- Un estímulo de igual concentración y volumen puede resultar en una disminución de la expectativa de la recompensa si previamente se ingirió una recompensa de mejor calidad, al menos en base a la concentración de la solución. En este caso, la expectativa de la recompensa estaría codificada en una memoria de corto término (Figura 4.2).
- Los animales que recibieron protocolos ascendentes de recompensa mostraron memorias más fuertes a largo término en contraste con los animales que recibieron la misma recompensa en cada ensayo. El caso opuesto sucedió con los animales que recibieron protocolos descendentes. Estas diferencias fueron observadas en dos protocolos experimentales distintos.
- Se propone que el debilitamiento de la traza mnésica para los grupos con protocolos descendentes sería un proceso adaptativo que permitiría no utilizar recursos en sitios

que ya no resultan ventajosos para las abejas. El caso opuesto sucedería para los grupos con protocolos ascendentes.

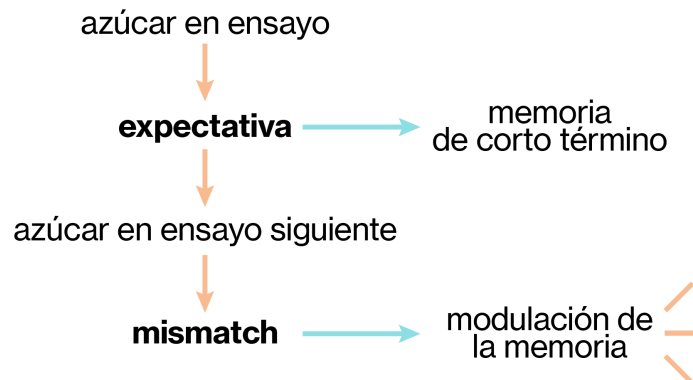


Figura 4.2 - Esquema de los resultados obtenidos para el Experimento 2. La modulación de la memoria se refiere a la memoria odorante-recompensa.

4.3. Experimento 3: contraste entre días

En esta última sección nos propusimos evaluar la posibilidad de que la influencia de la historia previa del animal sobre el aprendizaje se extendiera tan atrás en el tiempo como 24 horas. Para eso, las abejas fueron alimentadas el día anterior al día de entrenamiento con sacarosa de distintas concentraciones según el grupo experimental al que pertenecieran. El grupo CONTRASTE NEGATIVO fue alimentado siempre con sacarosa 1,5 M y luego entrenado el día siguiente con sacarosa 0,5 M. Por el contrario, el grupo CONTRASTE POSITIVO tuvo su historia previa con sacarosa de 0,5 M para luego ser entrenado con sacarosa 1,5 M. Los grupos constantes fueron alimentados y entrenados con sacarosa de concentración 1,5 M para el grupo CONSTANTE ALTO y 0,5 M para el grupo CONSTANTE BAJO.

Los resultados muestran que, también en este caso, los animales generan una expectativa de la sacarosa que van a recibir basados en su experiencia previa (Figura 3.12). En el grupo CONTRASTE NEGATIVO esta expectativa no es alcanzada durante el día del entrenamiento, ya que su experiencia previa es con sacarosa de concentración 1,5 M. Al recibir sacarosa un orden de magnitud menos concentrada, la expectativa no se cumple y la asociación que se forma entre la solución y el odorante resulta significativamente más débil que en el CONSTANTE BAJO. En el caso opuesto, el grupo CONTRASTE POSITIVO recibe una mejora con respecto a lo esperado: en base a su experiencia en el laboratorio los animales esperan recibir sacarosa 0,5 M, pero son sorprendidos con una recompensa de concentración 1,5 M. Esta disrupción positiva entre lo esperado y lo obtenido para el animal genera una memoria asociativa significativamente más fuerte que el grupo CONSTANTE

ALTO. Para los animales pertenecientes a los grupos constantes, el entrenamiento no tiene una saliencia tan significativa como para los animales que son sorprendidos con sacarosa de distintas concentraciones, ya que su experiencia previa (la alimentación durante el día de captura) coincide con lo obtenido el día del entrenamiento (sacarosa de igual concentración que el día anterior).

De los experimentos presentados, este es el único en el cual se observaron diferencias significativas en la etapa de entrenamiento (ver: Sección 3.3). Las curvas de aprendizaje siguen una tendencia según lo esperado: durante todos los ensayos, el grupo con mayor porcentaje de PER es el CONTRASTE POSITIVO seguido del CONSTANTE ALTO, CONSTANTE BAJO, y finalmente CONTRASTE NEGATIVO (para estos dos últimos grupos el orden se invierte en el ensayo 2). En particular, el grupo CONTRASTE POSITIVO demostró una proporción de PER significativamente mayor que los grupos CONTRASTE NEGATIVO y CONSTANTE BAJO. Consideramos que estas diferencias observadas en la etapa de entrenamiento no son casuales. Debido a que los animales sometidos a este protocolo experimental reciben los contrastes entre recompensas separados por 24 hs, los grupos de contraste comienzan a ser sorprendidos a partir del primer ensayo de entrenamiento. Por lo tanto, es de esperarse que se observen diferencias durante esta etapa: el grupo CONTRASTE POSITIVO tendría un estado motivacional mayor al ser entrenado con una concentración de sacarosa mayor a la conocida el día previo, de la cual se asume ya tiene una memoria consolidada, mientras que el grupo CONTRASTE NEGATIVO sería el caso opuesto.

En base a la memoria que las abejas poseen sobre su experiencia el día anterior al entrenamiento, resulta interesante añadir una interpretación de los resultados obtenidos para el Experimento 3 desde la óptica de la reconsolidación. La reconsolidación es un proceso que ocurre cuando un estímulo (recordatorio) labiliza una memoria ya consolidada, volviéndola inestable y susceptible a facilitación o interrupción durante cierta ventana temporal (Sara, 2000). El concepto de reconsolidación se encuentra estrechamente relacionado con el de error en la predicción de la recompensa (RPE, ver Sección 1.4). Recapitulando la presentación del concepto que se realizó en la Sección 1.4, la teoría de RPE propone que los errores en las predicciones que los animales realizan respecto a un determinado escenario permiten la modulación de las memorias tanto positiva como negativamente. Combinando ambos conceptos teóricos, en (Forcato et al., 2014; Krawczyk et al., 2017) se discute que el error en la predicción sería aquello que permite la actualización de memorias consolidadas a partir de un proceso de reconsolidación: al presentarse un estímulo diferente al esperado durante la etapa de labilización, ocurre un error en la predicción que permite

actualizar la memoria y reconsolidarla. En los experimentos de este trabajo no se exploró de forma directa la ocurrencia de la reconsolidación ya que no se realizó un protocolo de reconsolidación clásico (donde se realiza un entrenamiento de asociación CS-US para luego labilizar esa memoria de manera específica). Sin embargo, se asume que la memoria que las abejas poseen respecto a la sacarosa recibida el día de entrenamiento es evocada durante el entrenamiento (ya que el contexto de alimentación y entrenamiento es prácticamente idéntico, dentro del laboratorio y en condiciones controladas) y la misma se actualiza a partir de la sacarosa recibida en los ensayos. Además de esta interpretación, trabajos previos presentan evidencia respecto a la ocurrencia de procesos de reconsolidación en la abeja *A. mellifera* (Stollhoff, 2005; Stollhoff et al., 2008).

Por ende, para el Experimento 3 se propone que las abejas de los grupos de contrastes estarían actualizando la información que poseen sobre la recompensa ingerida en el contexto de laboratorio el día de captura con la nueva recompensa obtenida el día de entrenamiento (mejorada en los casos de CONTRASTE POSITIVO, empeorada para el grupo CONTRASTE NEGATIVO). Este escenario de actualización de una memoria previa puede trasladarse fácilmente al contexto natural de las abejas. Un concepto estudiado en la literatura sobre *A. mellifera* es el de constancia floral: estudios previos muestran que las abejas visitan reiteradamente las mismas flores hasta agotar sus reservas antes de cambiar al siguiente parche (Grant, 1950; Waser, 1986). Así, es de esperarse que para una abeja en particular sea habitual visitar una misma flor o parche floral durante días consecutivos. Por condiciones climáticas adversas, la calidad de las recompensas que otorga ese parche podría disminuir drásticamente entre un día y el siguiente, o bien podría ocurrir la situación inversa (al mejorar las condiciones climáticas, las recompensas de las flores podrían recuperarse en un lapso de 24 hs o menor). Por lo tanto, resulta altamente adaptativo actualizar la memoria que el animal tiene sobre ese recurso en relación a la nueva información que encuentra al volver a visitarlo. Este último experimento sería la situación reproducida en el laboratorio: el día previo al entrenamiento las abejas reciben sacarosa de cierta concentración en el contexto del laboratorio. Al día siguiente durante el entrenamiento y para los grupos de contrastes, esa recompensa es empeorada (CONTRASTE NEGATIVO) o mejorada (CONTRASTE POSITIVO). Durante la evaluación, se observa que estos grupos actualizan dichas memorias: mientras que el grupo CONTRASTE POSITIVO tiene memorias significativamente más fuertes que el grupo CONSTANTE ALTO, para el grupo CONTRASTE NEGATIVO la traza mnésica relacionada con la asociación odorante-recompensa se debilita respecto al CONSTANTE BAJO, ya que la nueva información sobre esta recompensa azucarada sería que la misma empeoró y ya no resultaría de interés para esos animales.

Sobre esta tercera y última etapa, se concluye que:

- Las abejas generan una expectativa de la sacarosa que van a recibir en base a lo obtenido el día previo al entrenamiento. En este último experimento, se propone que la expectativa de la recompensa estaría codificada en una memoria de largo término (Figura 4.3).
- A pesar de que no se realizó un protocolo clásico de reconsolidación, se propone que los errores en la predicción de la recompensa son los que permiten la actualización de la memoria del azúcar recibido el día previo.
- Para los animales que recibieron un contraste positivo, el error en la predicción produce que las sesiones de entrenamiento resulten más salientes para ese grupo de animales que para el grupo CONSTANTE ALTO.
- Para los animales que recibieron recompensas peores a las esperadas, el error negativo en la predicción provocaría que la traza de memoria del azúcar recibido el día previo al entrenamiento resultase más débil en comparación con los animales del grupo CONSTANTE BAJO.

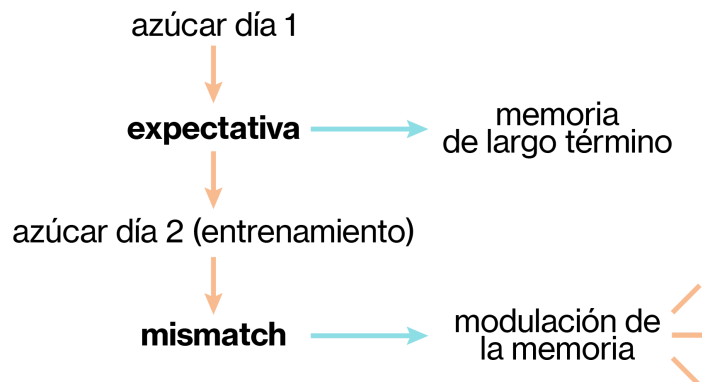


Figura 4.3 - Esquema de los resultados obtenidos para el Experimento 3. La modulación de la memoria se refiere a la memoria odorante-recompensa.

4.4. Discusión final

A modo de cierre, resulta interesante discutir de manera global los tres protocolos en base a sus diferencias y similitudes. También se proponen temas de investigación futuros para ampliar los resultados obtenidos.

Modelo Rescorla-Wagner. Error en la predicción de la recompensa

La condición mínima para que ocurra un proceso de aprendizaje asociativo es la presencia de dos estímulos, el CS y el US, donde el estímulo neutro debe preceder al estímulo incondicionado para poder generar una asociación predictiva CS-US (Bitterman et al., 1983). Sin embargo, condiciones adicionales pueden modular significativamente la fuerza de la asociación, tal como se observa en los resultados de este trabajo. De este modo, resulta interesante analizar los resultados obtenidos bajo el modelo de Rescorla-Wagner ("R-W") (Rescorla & Wagner, 1972). La regla de Rescorla-Wagner propone que el grado de condicionamiento de un dado estímulo depende del grado de asociabilidad del CS, la saliencia del US, y el error de predicción (la diferencia entre lo esperado y lo sucedido) (Smith et al., 2006). En particular, la predicción de la recompensa es un tema central tratado en este trabajo. Una predicción permite señalar lo que puede ocurrir según un acontecimiento dado, que en este caso es la llegada de solución azucarada de cierta calidad. En este trabajo nos propusimos modificar los resultados de esas predicciones, haciendo que el azúcar recibida coincidiera (o no) con lo esperado en cada caso. Como se discutió en la Sección 1.4, en 1997 Wolfram Schultz exploró el concepto de error en la predicción de la recompensa (RPE), concepto que se monta sobre la teoría previa de la regla R-W. Wolfram Schultz estudió desde la electrofisiología aquellas situaciones donde la recompensa obtenida no coincide con la esperada (Schultz et al., 1997). Recapitulando lo discutido en la Sección 1.4, Schultz observó que ciertas neuronas dopaminérgicas del cerebro de mamíferos eran activadas con los errores positivos (cuando lo recibido era mejor que lo esperado) e inhibidas con los errores negativos (caso contrario). Además de este fuerte hallazgo en mamíferos, también se mencionaron dos trabajos de Kanta Terao y Makoto Mizunami, en los cuales concluyeron que el RPE es un concepto aplicable en insectos. Estos trabajos nos permiten discutir con mayor libertad este concepto con el modelo animal utilizado en este trabajo (Terao et al., 2015; Terao & Mizunami, 2017). De este modo, el marco teórico del RPE podría explicar parcialmente los resultados obtenidos en este trabajo. Los errores positivos que se producen en los grupos que recibieron recompensas mejores a las esperadas (contrastes positivos y ascendentes) permitirían un aprendizaje reforzado en estos grupos. En los grupos de contrastes negativos y descendentes los errores negativos generarían trazas mnésicas debilitadas que se evidencian en memorias más débiles evaluadas durante la etapa de evaluación (Schultz, 2017). Por lo tanto, en los experimentos presentados, debido al error en la predicción provocado por los contrastes entre recompensas ocurriría un fenómeno de facilitación o disrupción de la memoria cuando los contrastes fueron positivos o negativos respectivamente.

La expectativa en la formación de la memoria

La generación de una expectativa y la formación de una memoria a largo término confieren ventajas para las abejas. Por un lado, una representación interna de las recompensas obtenidas es un parámetro decisivo en el proceso de decisión de la colonia respecto a permanecer forrajeando en el mismo parche floral o cambiar a otro. Por ejemplo, si las recompensas otorgadas en un sitio de alimento empeoran sucesivamente, entonces lo más conveniente resulta cambiar de parche para obtener más beneficios (Seeley et al., 1991). Por otro lado, la formación de una memoria a largo término permite realizar una asociación entre el estímulo (apetitivo o aversivo) y el estímulo neutro que lo acompaña (un odorante, el contexto, etcétera) (Bitterman et al., 1983). En nuestro trabajo todos los estímulos fueron positivos ya que los animales siempre recibieron recompensas azucaradas. Sin embargo, algunas abejas ingirieron concentraciones mayores a las esperadas y otras ingirieron concentraciones menores a las esperadas. La literatura previa muestra que el valor del estímulo incondicionado que otorgamos a los animales durante el condicionamiento no sería tal, sino que el mismo depende del contexto. Por ejemplo, en un protocolo de condicionamiento tipo *backward*, la recompensa azucarada -que en términos generales activa circuitos neuronales excitatorios- es presentada antes del estímulo condicionado. Al realizar un entrenamiento de esta naturaleza se observa que este estímulo, en principio considerado positivo, genera una traza mnésica inhibitoria (Felsenberg et al., 2014). En (Yin et al., 2009) se observó un caso opuesto utilizando el modelo de *D. melanogaster*, donde un estímulo aversivo (choque eléctrico) puede ser codificado como un estímulo apetitivo si posteriormente se presenta un choque de mayor intensidad.

En el caso de los grupos que recibieron recompensas mejores a las esperadas, la disrupción positiva entre lo esperado y lo obtenido produce que las sesiones de entrenamiento resulten más salientes para ese grupo de animales que para los grupos de recompensa constante. Como resultado, se observó que los grupos de contrastes positivos o ascendentes mostraron una proporción de PER significativamente mayor que los de recompensa constante durante la etapa de evaluación, por lo que se interpreta que la memoria asociativa fue facilitada gracias al error positivo en la predicción de esa recompensa. Sin embargo, la situación es diametralmente opuesta para los grupos de contrastes negativos o descendentes. En la literatura de aprendizaje por condicionamiento se observa que estímulos apetitivos (como la ingestión de sacarosa) o aversivos (como un choque eléctrico) pueden ser codificados por los animales con la valencia opuesta dependiendo del contexto. Por ejemplo en moscas *Drosophila*, cuando un choque eléctrico suave precede uno de mayor intensidad, el primero es codificado de manera positiva (Yin et

al., 2009). Un fenómeno similar es el de *pain relief*, donde un odorante es asociado a la presencia de un choque eléctrico y otro odorante se presenta solo. Luego del entrenamiento las moscas muestran una preferencia por el segundo odorante, ya que se asocia con el cese de la experiencia aversiva (Yarali et al., 2008). Relacionado a estos experimentos, en un novedoso trabajo de Martín Giurfa se observó que la degradación sucesiva de la calidad de una recompensa azucarada puede codificarse como un estímulo negativo (Lai et al., 2020). Tomando como punto de partida estos conceptos, esperaríamos que para los animales entrenados con secuencias de contrastes negativos o descendentes el empeoramiento de la recompensa sea codificado como una experiencia tanto novedosa (por la sorpresa) como aversiva (por su valencia negativa). Así, se propone una hipótesis en relación al tema central de este trabajo: el estado motivacional de los animales. Hemos discutido que durante el proceso de consolidación de memorias de largo término no solo es importante la valencia de los estímulos y el contexto en que son presentados, sino que también es de gran importancia el estado interno del animal. De esta manera, se propone que en los animales que reciben contrastes negativos o descendentes estaría ocurriendo un proceso de degradación del estado motivacional que produce respuestas significativamente menores que los observados en animales con recompensas constantes. Al recibir una recompensa peor que la esperada, se propone que los animales de estos grupos ven empeorado su estado motivacional durante el entrenamiento. Trabajos previos demuestran que el estado motivacional de los animales es crucial para los procesos de aprendizaje (Daw & Shohamy, 2008; Mosberger et al., 2016). En particular, en (Lai et al., 2020) se explora la degradación de una memoria apetitiva a partir de la asociación de la misma con quinina (sustancia amarga no tóxica) en *A. mellifera*. Los resultados de este reciente manuscrito se encuentran alineados con los resultados obtenidos en este trabajo para los grupos de contrastes negativos o descendentes. En ambos casos, se propone que el estímulo incondicionado es devaluado debido al estado interno del animal donde se produjo el contraste (en el trabajo citado el contraste es con la sustancia amarga, en este caso es con sacarosa de una concentración menor a la esperada). Por este motivo, se observa que los animales de contrastes negativos o descendentes responden significativamente menos que los grupos de recompensa constante, apoyando la hipótesis de que el estado motivacional es fundamental en la determinación de la fuerza de una memoria, y que los contrastes negativos generarían trazas mnésicas debilitadas sobre la asociación odorante-recompensa.

Expectativa en insectos

Bitterman realizó un trabajo pionero en abejas en 1976 sobre el incentivo por contrastes que presenta una relación directa con este manuscrito, donde se combinan tanto

contrastes positivos como negativos (Bitterman, 1976). En el mismo, las abejas eran entrenadas a alimentarse de una fuente con sacarosa que podía estar concentrada al 20% o al 40%. Luego eran evaluadas con sacarosa de la concentración complementaria (40% ó 20% respectivamente) y se medía su comportamiento. Bitterman observó que mientras las abejas que habían recibido un contraste positivo (20-40) se alimentaban ininterrumpidamente al llegar a la fuente de alimento, los animales que habían recibido un contraste negativo (40-20) interrumpían constantemente el contacto con el alimento. Como se discutió en la Sección 1.4, la alimentación ininterrumpida es un *proxy* de aceptación de la recompensa. A pesar de haber obtenido este interesante descubrimiento, Bitterman fue cauteloso al aclarar que esta aceptación diferencial no necesariamente estaba asociada a un aprendizaje sobre la recompensa. Por otro lado, el trabajo de (Wendt et al., 2019) citado en la Sección 1.4 toma la misma premisa que el trabajo de Bitterman en 1976 y la utilizada en este trabajo: evaluar el comportamiento a partir de diferencias en la calidad de la recompensa, basadas únicamente en diferencias en su concentración. Recordando los resultados de esta publicación, los investigadores observaron que hormigas neotrópicas de la especie *Lasius niger* mostraban mayor aceptación por recompensas azucaradas cuando recibían contrastes positivos (la concentración de la recompensa aumentaba en el último ensayo), y menor aceptación cuando los contrastes eran negativos (la concentración disminuía en el último ensayo), respecto al control. Además de este resultado, resulta interesante para esta sección debatir otro experimento del mismo trabajo. En el mismo, los investigadores entrenaron a las hormigas bajo un protocolo de condicionamiento diferencial: durante ocho ensayos consecutivos, las hormigas recibían sacarosa 0,25 M asociada a un perfume A y sacarosa 1,5 M asociada a un perfume B. En el ensayo número nueve, recibían el perfume A ó B y una recompensa de 0,5 M. Por lo tanto, el primer grupo era sometido a un contraste positivo (porque debido a la presentación del olor A, esperaban una recompensa de 0,25 M) y el segundo a un contraste negativo (porque debido al olor B esperaban una recompensa de 1,5 M). Los investigadores observaron que los animales que habían recibido el contraste negativo (olor B con recompensa de 0,5 M) presentaban una aceptación de esta recompensa significativamente menor que las hormigas sometidas a un contraste positivo (olor A con recompensa de 0,5 M). Por ende, una diferencia sustancial con el trabajo de Bitterman es que tanto en el manuscrito citado como en el presente trabajo, en ambos casos sí se evalúa la formación de memorias relacionadas con las expectativas que los animales poseen de las recompensas. Este último manuscrito aporta evidencia a favor de los resultados de nuestro trabajo pero en otro modelo de insecto: las diferencias entre la recompensa esperada y la obtenida son capaces de modular diferencialmente el comportamiento de los insectos neotrópicos, dependiendo de si se trata de diferencias positivas o negativas.

Si trasladamos los resultados obtenidos a un entorno natural, podemos situarnos en una situación similar al trabajo de (Greggers & Menzel, 1993): si al forrajear dentro de un mismo parche se visitan flores con grandes recompensas, la memoria apetitiva de ese sitio les permite volver a visitarlo en un futuro cercano. Respecto a los grupos de contrastes negativos en base a los resultados obtenidos y la literatura citada, proponemos que en estos animales se produce una traza mnésica debilitada respecto a ese sitio que empeoró en un lapso de tiempo (ya sea de minutos o entre días). La traza excitatoria producida por la ingestión del azúcar sería modulada por los contrastes negativos entre lo esperado y lo obtenido, obteniéndose así una traza más debilitada para la memoria consolidada, que se evidencia en las evaluaciones a 24 y 48 horas. Sin embargo, al medir la extensión de la probóscide como única respuesta comportamental, observamos solamente una disminución o aumento de esta respuesta que se relaciona con la presencia o memoria de un estímulo positivo. No observamos ausencia total de extensión de probóscide, así como tampoco medimos otros comportamientos que denoten aversión *per se*, como por ejemplo, aguijoneo (Vergoz et al., 2007). Por lo tanto, para los grupos de contrastes negativos o descendentes sería interesante investigar en mayor profundidad la codificación de esa situación empeorada: si se trata de un estímulo que pasa de ser positivo a negativo debido a los contrastes, o si podría ser solamente un estímulo positivo que no es de la calidad esperada.

Señal post-ingestiva y formación de la memoria

La diferencia central entre los tres experimentos es el intervalo temporal entre la historia previa con la recompensa y el entrenamiento. En el Experimento 1, este intervalo es de apenas unos segundos (y además, el contraste es entre el azúcar recibido en las antenas y en la probóscide). En el Experimento 2, este tiempo asciende a aproximadamente 10 minutos. En el Experimento 3, la brecha se extiende a 24 horas. En todos los casos, la sacarosa es sensada a través del contacto con las antenas provocando la extensión de la probóscide que le permite ser ingerida. Por lo tanto, en primer lugar hay una señal periférica (contacto de la sacarosa con las antenas y la probóscide) y horas después una señal post-ingestiva (Musso et al., 2015; Wright et al., 2007). Si la señal periférica no es acompañada de la señal post-ingestiva, la estimulación antenal produce una memoria de corto término, la cual en el caso del Experimento 1 permite la comparación de sacarosa entre antena y probóscide. El refuerzo con una señal post-ingestiva le permite al animal consolidar una memoria de largo término del PER. En particular, Pierre Musso y colaboradores publicaron un trabajo sobre *D. melanogaster* con evidencia contundente en favor de la necesidad de la señal post-ingestiva para generar memorias de largo término (Musso et al., 2017). A partir de un condicionamiento similar al utilizado en este trabajo, los

investigadores asociaron la presencia de un odorante con una recompensa de L-glucosa (enantiómero dulce pero no alimenticio de la D-glucosa). Los investigadores observaron que las moscas aprendían significativamente menos la asociación que animales control entrenados con azúcares nutritivos. El sabor azucarado de la L-glucosa funcionaba como predictor de la llegada de una solución calórica, pero la ausencia de calorías posteriores a la ingestión generaba una devaluación del edulcorante, produciendo una memoria que los autores llamaron “memoria de frustración calórica” (CFM, por sus siglas en inglés). Además del robusto resultado comportamental, estudiaron los circuitos neuronales implicados en estos resultados. A partir de experimentos con *imaging* de calcio, observaron que las neuronas dopaminérgicas (que codifican la llegada de la solución azucarada a los *mushroom bodies*) mostraban una actividad disminuida frente a la L-glucosa, incluso si antes habían ingerido D-glucosa (dulce y nutritiva). En base a estos resultados, los investigadores concluyeron que los edulcorantes (dulces y no calóricos) generan una experiencia negativa en el cerebro.

4.5. Experimentos futuros

En los experimentos 1 y 2 los contrastes entre recompensas suceden en intervalos temporales breves (segundos y minutos respectivamente). Dentro de estos intervalos no es posible que se haya formado la señal post-ingestiva antes discutida, debido al tiempo que la misma requiere para ser procesada. Sin embargo, se observan diferencias significativas entre los grupos cuando las memorias se ponen a prueba durante la etapa de evaluación. ¿Cómo es posible que los animales procesen las diferencias en las concentraciones de la sacarosa ingerida y formen una memoria a largo término, si el intervalo entre estas recompensas no es suficiente para que las señales se diferencien en la post-ingestión? La teoría del etiquetado comportamental permite explicar la formación de memorias de largo término a partir de eventos menores que normalmente no lo harían (Moncada et al., 2015). Esta teoría propone que un evento menor genera una marca en el circuito neuronal, y que dicha marca permite aprovechar recursos celulares provistos por otra actividad temporalmente cercana y relevante. La integración entre marcas iniciadas por una experiencia y los recursos provistos por otra permitirían estabilizar la memoria. Bajo esta teoría, se puede pensar que la aplicación de la recompensa sobre las antenas generaría un mecanismo de etiquetado. Esta etiqueta sensorial le brindaría la resolución temporal al aprendizaje, para luego ser validada por un refuerzo post-ingestivo. Nos proponemos como objetivo para futuras investigaciones descubrir si existe un mecanismo de etiquetado pre-ingestivo (antenal) por medio del cual los estímulos condicionados son “marcados” durante el entrenamiento. Este marcado permitiría asociarlos específicamente a la señal

nutricional en las horas posteriores. Para poner a prueba esta propuesta, se realizará una batería de experimentos de condicionamiento antenal según (Wright et al., 2007): los animales serán estimulados en sus antenas con sacarosa, pero no será ingerida en ese momento. En cambio, serán alimentados una cierta cantidad de horas posteriores a la estimulación, para poder determinar si existe un tiempo a partir del cual no logren formar una memoria de largo término debido a que las señales pre- y post-ingestivas están muy separadas temporalmente. Estos resultados indicarán cuál es la duración del etiquetado por recompensa en la antena.

Por último, es importante resaltar un problema en el diseño de los experimentos 1 y 2. En los mismos, los contrastes entre concentraciones de azúcar que son tomados en cuenta para explicar los resultados son los existentes entre antena y probóscide (Experimento 1) y entre ensayos (Experimento 2). Es decir, en ambos casos los contrastes ocurren durante el día de entrenamiento únicamente. Sin embargo, estos animales también fueron alimentados el día anterior (día de captura) para garantizar su supervivencia hasta el momento del entrenamiento. La alimentación fue realizada con sacarosa de una concentración intermedia en relación a las concentraciones recibidas el día de entrenamiento (0,5 M ó 1 M según correspondiese). A pesar de esto, esta alimentación no es tomada en cuenta como un posible factor que podría modular el aprendizaje de los animales para estos dos experimentos, a pesar de que en el Experimento 3 se observó que la experiencia con sacarosa 24 horas antes del entrenamiento es capaz de modular la memoria asociativa. En particular, en el Experimento 1 podría estar ocurriendo un efecto aditivo de los contrastes. Los animales del grupo CONTRASTE POSITIVO reciben un contraste de recompensas entre el azúcar que toca sus antenas (0,5 M) y el ingerido (1,5 M). Además, al haber sido alimentados con azúcar 1 M el día previo y 1,5 M el día del entrenamiento, ese es otro contraste positivo que se suma al anterior. Del mismo modo, los animales del CONTRASTE NEGATIVO reciben un contraste negativo entre antenas y probóscide el día del entrenamiento (1,5 M - 0,5 M) sumado al contraste negativo entre el azúcar ingerida el día anterior (1 M) y la ingerida durante el entrenamiento (0,5 M). De esta manera, estos contrastes sumados podrían estar reforzando y exacerbando los efectos del contraste que realmente interesa estudiar (el del día del entrenamiento únicamente). Por lo tanto, se decidió tomar esta posible fuente de error como puntapié para realizar nuevos experimentos. Nos proponemos realizar un experimento idéntico al Experimento 1 pero controlando esta fuente de variación. Los animales se dividirán en este caso en tres grupos experimentales: CONSTANTE, CONTRASTE POSITIVO y CONTRASTE NEGATIVO. Los animales de los contrastes seguirán recibiendo en sus antenas las concentraciones de contraste (0,5 M para el contraste negativo y 1,5 M para el positivo), pero consumirán sacarosa 1 M (en lugar de

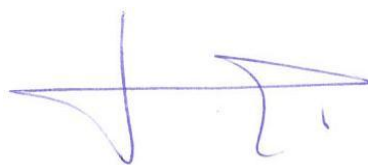
1,5 M y 0,5 M respectivamente). Por su parte, el grupo constante recibirá tanto en las antenas como en la probóscide sacarosa 1 M. Todos los grupos serán alimentados con sacarosa 1 M el día previo al entrenamiento. De este modo, el contraste antena-probóscide prevalecerá pero, al ingerir sacarosa 1 M tanto el día previo como durante el entrenamiento, se controlará la variación proveniente de estas diferencias en la ingesta. Los resultados de este experimento permitirán una re-interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo para los experimentos 1 y 2.

4.6. Conclusiones

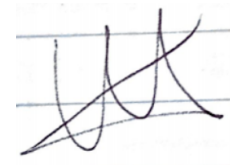
A modo de cierre, se detallan las conclusiones obtenidas de este trabajo. En primer lugar, se logró concretar los objetivos propuestos: los resultados muestran que fue posible modular la fuerza de las memorias asociativas a partir de diferencias de calidad entre recompensas esperadas y recibidas. Estos resultados, que son interpretados como la formación de una expectativa acerca de la calidad de la recompensa, pudieron realizarse además a distintas escalas temporales: los errores positivos y negativos en la predicción sobre la recompensa sucedieron tanto en intervalos temporales de segundos (el tiempo que transcurría entre el sensado de la sacarosa en las antenas y en la probóscide) como entre días. Con los resultados obtenidos, se sientan las bases para continuar el estudio de la modulación de la memoria en insectos a partir de cambios controlados en el estado interno de los mismos. Cabe destacar que estos cambios son controlados porque, justamente, todos los experimentos aquí presentados se realizaron en un ambiente de laboratorio. Esto le agrega un valor adicional a los resultados obtenidos, ya que es posible discutir y obtener conclusiones similares a los trabajos presentados en la Sección 1.3 (estudios con abejas en su ambiente natural o en vuelo libre), pero con el agregado de que a partir del protocolo de condicionamiento de extensión de la probóscide en el laboratorio podrían agregarse registros electrofisiológicos o de imágenes neuronales para acompañar las conclusiones comportamentales que se desprenden de este tipo de experimentos.



Martín Klappenbach, Director



Fernando Locatelli, Director Asistente



Milagros Azcueta, Tesista

Referencias bibliográficas

- Abou-Shaara, H. (2014). The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *Veterinárni Medicína*, 59(No. 1), 1–10. <https://doi.org/10.17221/7240-VETMED>
- Akaike, H. (1973). Maximum Likelihood Identification of Gaussian Autoregressive Moving Average Models. *Biometrika*, 60(2), 255–265. <https://doi.org/10.2307/2334537>
- Arenas, A., Lajad, R., & Farina, W. (2021). Selective recruitment for pollen and nectar sources in honeybees. *The Journal of experimental biology*, 224(16), jeb242683. <https://doi.org/10.1242/jeb.242683>
- Bertsch, A. (1983). Nectar production of *Epilobium angustifolium* L. at different air humidities; nectar sugar in individual flowers and the optimal foraging theory. *Oecologia*, 59(1), 40–48. <https://doi.org/10.1007/BF00388069>
- Bitterman, M. E. (1976). Incentive Contrast in Honey Bees. *Science*, 192(4237), 380–382. <https://doi.org/10.1126/science.1257773>
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107–119. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.97.2.107>
- Cui, J. (2007). QIC Program and Model Selection in GEE Analyses. *The Stata Journal*, 7(2), 209–220. <https://doi.org/10.1177/1536867X0700700205>
- Chen, J.-Y., Marachlian, E., Assisi, C., Huerta, R., Smith, B. H., Locatelli, F., & Bazhenov, M. (2015). Learning Modifies Odor Mixture Processing to Improve Detection of Relevant Components. *Journal of Neuroscience*, 35(1), 179–197. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2345-14.2015>
- Christian, K. M., & Thompson, R. F. (2003). Neural Substrates of Eyeblink Conditioning: Acquisition and Retention. *Learning & Memory*, 10(6), 427–455. <https://doi.org/10.1101/lm.59603>
- CORBET, S. A. (1978). Bee visits and the nectar of *Echium vulgare* L. and *Sinapis alba* L. *Ecological Entomology*, 3(1), 25–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1978.tb00900.x>
- Daw, N. D., & Shohamy, D. (2008). The Cognitive Neuroscience of Motivation and Learning. *Social Cognition*, 26(5), 593–620. <https://doi.org/10.1521/soco.2008.26.5.593>
- de Brito Sanchez, M. G., Chen, C., Li, J., Liu, F., Gauthier, M., & Giurfa, M. (2008). Behavioral studies on tarsal gustation in honeybees: sucrose responsiveness and sucrose-mediated olfactory conditioning. *Journal of Comparative Physiology A*, 194(10), 861–869. <https://doi.org/10.1007/s00359-008-0357-8>
- De Marco, R., & Farina, W. (2001). Changes in food source profitability affect the trophallactic and dance behavior of forager honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(5), 441–449. <https://doi.org/10.1007/s002650100382>
- De Marco, R. J., Gil, M., & Farina, W. M. (2005). Does an increase in reward affect the precision of the encoding of directional information in the honeybee waggle dance? *Journal of Comparative Physiology A*, 191(5), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00359-005-0602-3>
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00305-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00305-7)
- Felsenberg, J., Barnstedt, O., Cognigni, P., Lin, S., & Waddell, S. (2017). Re-evaluation of learned information in *Drosophila*. *Nature*, 544(7649), 240–244. <https://doi.org/10.1038/nature21716>
- Felsenberg, J., Gehring, K. B., Antemann, V., & Eisenhardt, D. (2011). Behavioural Pharmacology in Classical Conditioning of the Proboscis Extension Response in Honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Visualized Experiments*, (47). <https://doi.org/10.3791/2282>
- Felsenberg, J., Plath, J. A., Lorang, S., Morgenstern, L., & Eisenhardt, D. (2014). Short- and long-term memories formed upon backward conditioning in honeybees (*Apis mellifera*). *Learning & Memory*, 21(1), 37–45. <https://doi.org/10.1101/lm.031765.113>
- Forcato, C., Fernandez, R. S., & Pedreira, M. E. (2014). Strengthening a consolidated memory: The key role of the reconsolidation process. *Journal of Physiology-Paris*, 108(4–6), 323–333. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.09.001>
- Forcato, C., Rodríguez, M. L. C., Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2010). Reconsolidation in humans opens up declarative memory to the entrance of new information. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.08.006>
- Frenkel, L., Maldonado, H., & Delorenzi, A. (2005). Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1757–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04373.x>

- Friedrich A, Thomas U, Müller U. Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J Neurosci*. 2004 May 5;24(18):4460-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0669-04.2004. PMID: 15128860; PMCID: PMC6729435.
- Frings, H. (1944). The loci of olfactory end-organs in the honey-bee, *Apis mellifera* Linn. *Journal of Experimental Zoology*, 97(2), 123–134. <https://doi.org/10.1002/jez.1400970203>
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4(1), 123–124. <https://doi.org/10.3758/BF03342209>
- Gil, M., & De Marco, R. J. (2009). Honeybees learn the sign and magnitude of reward variations. *Journal of Experimental Biology*, 212(17), 2830–2834. <https://doi.org/10.1242/jeb.032623>
- Gil, Mariana, De Marco, R. J., & Menzel, R. (2007). Learning reward expectations in honeybees. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(7), 491–496. <https://doi.org/10.1101/lm.618907>
- Gil, Mariana, Menzel, R., & De Marco, R. J. (2008). Does an Insect's Unconditioned Response to Sucrose Reveal Expectations of Reward? *PLoS ONE*, 3(7), e2810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002810>
- Giurfa, M., Eichmann, B., & Menzel, R. (1996). Symmetry perception in an insect. *Nature*, 382(6590), 458–461. <https://doi.org/10.1038/382458a0>
- Giurfa, M., & Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory*, 19(2), 54–66. <https://doi.org/10.1101/lm.024711.111>
- Giurfa, M., Zhang, S., Jenett, A., Menzel, R., & Srinivasan, M. V. (2001). The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature*, 410(6831), 930–933. <https://doi.org/10.1038/35073582>
- Göbel, W., & Helmchen, F. (2007). In Vivo Calcium Imaging of Neural Network Function. *Physiology*, 22(6), 358–365. <https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2007>
- Grant, V. The flower constancy of bees. *Bot. Rev* 16, 379–398 (1950). <https://doi.org/10.1007/BF02869992>
- Greggers, U., & Menzel, R. (1993). Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32(1). <https://doi.org/10.1007/BF00172219>
- Grünbaum L, Müller U. Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci*. 1998 Jun 1;18(11):4384-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-11-04384.1998. PMID: 9592115; PMCID: PMC6792810.
- Hammer, M., & Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *The Journal of Neuroscience*, 15(3), 1617–1630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01617.1995>
- Hammer, Martin. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 366(6450), 59–63. <https://doi.org/10.1038/366059a0>
- Harlow, H. F. (1950). Analysis of discrimination learning by monkeys. *Journal of Experimental Psychology*, 40(1), 26–39. <https://doi.org/10.1037/h0062040>
- Hodges, C. M. (1981). Optimal foraging in bumblebees: Hunting by expectation. *Animal Behaviour*, 29(4), 1166–1171. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(81\)80068-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(81)80068-1)
- Hollerman, J. R., Tremblay, L., & Schultz, W. (1998). Influence of Reward Expectation on Behavior-Related Neuronal Activity in Primate Striatum. *Journal of Neurophysiology*, 80(2), 947–963. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.2.947>
- HOTTA, Y., & BENZER, S. (1972). Mapping of Behaviour in Drosophila Mosaics. *Nature*, 240(5383), 527–535. <https://doi.org/10.1038/240527a0>
- Hussaini, S. A., Komischke, B., Menzel, R., & Lachnit, H. (2007). Forward and backward second-order Pavlovian conditioning in honeybees. *Learning & Memory*, 14(10), 678–683. <https://doi.org/10.1101/lm.471307>
- Izquierdo, I. (1989). Different forms of post-training memory processing. *Behavioral and Neural Biology*, 51(2), 171–202. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(89\)90812-1](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(89)90812-1)
- Jones, L., Brennan, G. L., Lowe, A., Creer, S., Ford, C. R., & de Vere, N. (2021). Shifts in honeybee foraging reveal historical changes in floral resources. *Communications Biology*, 4(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01562-4>
- Krawczyk, M. C., Fernández, R. S., Pedreira, M. E., & Boccia, M. M. (2017). Toward a better understanding on the role of prediction error on memory processes: From bench to clinic. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.011>
- Lai, Y., Despouy, E., Sandoz, J.-C., Su, S., de Brito Sanchez, M. G., & Giurfa, M. (2020). Degradation of an appetitive olfactory memory via devaluation of sugar reward is mediated by 5-HT signaling in the honey bee. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173, 107278. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107278>

- Lewis, D. J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological Bulletin*, 86(5), 1054–1083. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.86.5.1054>
- MARSHALL, J. (1935). On the Sensitivity of the Chemoreceptors on the Antenna and Fore-tarsus of the Honey-Bee, *Apis mellifica* L. *Journal of Experimental Biology*, 12(1), 17–26. <https://doi.org/10.1242/jeb.12.1.17>
- Matsumoto, Y., Sandoz, J.-C., Devaud, J.-M., Lormant, F., Mizunami, M., & Giurfa, M. (2014). Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee. *Learning & Memory*, 21(5), 272–286. <https://doi.org/10.1101/lm.032037.113>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a Century of Consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Menzel, R. (1968). Das Gedächtnis der Honigbiene für Spektralfarben. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 60(1), 82–102. <https://doi.org/10.1007/BF00737097>
- Menzel, R. (1987) Memory Traces in Honeybees. In: Menzel R., Mercer A. (eds) *Neurobiology and Behavior of Honeybees*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71496-2_25
- Menzel, R., & Erber, J. (1978). Learning and memory in bees. *Scientific American*, 239(1), 102–110. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0778-102>
- Menzel, R., & Greggers, U. (2015). The memory structure of navigation in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 201(6), 547–561. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-0987-6>
- Menzel, R., Manz, G., & Greggers, U. (2001). Massed and Spaced Learning in Honeybees: The Role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. *Learning & Memory*, 8(4), 198–208. <https://doi.org/10.1101/lm.40001>
- Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally Graded Requirement for Protein Synthesis following Memory Reactivation. *Neuron*, 36(3), 521–525. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00976-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00976-5)
- Moncada, D., Ballarini, F., & Viola, H. (2015). Behavioral Tagging: A Translation of the Synaptic Tagging and Capture Hypothesis. *Neural Plasticity*, 2015, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2015/650780>
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
- Mosberger, A. C., de Clauser, L., Kasper, H., & Schwab, M. E. (2016). Motivational state, reward value, and Pavlovian cues differentially affect skilled forelimb grasping in rats. *Learning & Memory*, 23(6), 289–302. <https://doi.org/10.1101/lm.039537.115>
- Musso, P.-Y., Lampin-Saint-Amaux, A., Tchenio, P., & Preat, T. (2017). Ingestion of artificial sweeteners leads to caloric frustration memory in *Drosophila*. *Nature Communications*, 8(1), 1803. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01989-0>
- Musso, P.-Y., Tchenio, P., & Preat, T. (2015). Delayed Dopamine Signaling of Energy Level Builds Appetitive Long-Term Memory in *Drosophila*. *Cell Reports*, 10(7), 1023–1031. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.036>
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford Univ. Press.
- Pedreira, María Eugenia, Pérez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2004). Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 579–585. <https://doi.org/10.1101/lm.76904>
- Pedreira, María Eugenia, & Maldonado, H. (2003). Protein Synthesis Subverts Reconsolidation or Extinction Depending on Reminder Duration. *Neuron*, 38(6), 863–869. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00352-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00352-0)
- Pedreira, María Eugenia, Pérez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2002). Reactivation and Reconsolidation of Long-Term Memory in the Crab *Chasmagnathus*: Protein Synthesis Requirement and Mediation by NMDA-Type Glutamatergic Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 22(18), 8305–8311. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-08305.2002>
- Peterson, G. B., Wheeler, R. L., & Armstrong, G. D. (1978). Expectancies as mediators in the differential-reward conditional discrimination performance of pigeons. *Animal Learning & Behavior*, 6(3), 279–285. <https://doi.org/10.3758/BF03209614>

- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., ... Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>
- Rescorla, R., & Wagner, A. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Rogers, L. J., Rigosi, E., Frasnelli, E., & Vallortigara, G. (2013). A right antenna for social behaviour in honeybees. *Scientific Reports*, 3(1), 2045. <https://doi.org/10.1038/srep02045>
- Sammataro, D., & Avitabile, A. (1998). *The Beekeeper's Handbook*. Cornell University Press.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learning & Memory*, 7(2), 73–84. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.73>
- Schultz, W. (2017). Reward prediction error. *Current Biology*, 27(10), R369–R371. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.064>
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*, 275(5306), 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Seeley, T., Camazine, S., & Sneyd, J. (1991). Collective decision-making in honey bees: how colonies choose among nectar sources. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 28(4). <https://doi.org/10.1007/BF00175101>
- Skinner, B. F. (1948). "Superstition" in the pigeon. *Journal of Experimental Psychology*, 38(2), 168–172. <https://doi.org/10.1037/h0055873>
- Smith, A., Li, M., Becker, S., & Kapur, S. (2006). Dopamine, prediction error and associative learning: A model-based account. *Network: Computation in Neural Systems*, 17(1), 61–84. <https://doi.org/10.1080/09548980500361624>
- Southwick, E. E., Loper, G. M., & Sadwick, S. E. (1981). NECTAR PRODUCTION, COMPOSITION, ENERGETICS AND POLLINATOR ATTRACTIVENESS IN SPRING FLOWERS OF WESTERN NEW YORK. *American Journal of Botany*, 68(7), 994–1002. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1981.tb07816.x>
- Stabentheiner, A., & Kovac, H. (2016). Honeybee economics: optimisation of foraging in a variable world. *Scientific Reports*, 6(1), 28339. <https://doi.org/10.1038/srep28339>
- Stollhoff, N. (2005). Spontaneous Recovery from Extinction Depends on the Reconsolidation of the Acquisition Memory in an Appetitive Learning Paradigm in the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Neuroscience*, 25(18), 4485–4492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0117-05.2005>
- Stollhoff, Nicola, Menzel, R., & Eisenhardt, D. (2008). One retrieval trial induces reconsolidation in an appetitive learning paradigm in honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.003>
- Suzuki, A. (2004). Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3), 168–179. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(61\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(61)90060-9)
- Terao, K., Matsumoto, Y., & Mizunami, M. (2015). Critical evidence for the prediction error theory in associative learning. *Scientific Reports*, 5(1), 8929. <https://doi.org/10.1038/srep08929>
- Terao, K., & Mizunami, M. (2017). Roles of dopamine neurons in mediating the prediction error in aversive learning in insects. *Scientific Reports*, 7(1), 14694. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14473-y>
- Thorndike, E. (1898). Some Experiments on Animal Intelligence. *Science*, 7(181), 818–824. <https://doi.org/10.1126/science.7.181.818>
- Thorpe, W. H. (1956). *Learning and instinct in animals*. Harvard University Press.
- Tinklepaugh, O. L. (1928). An experimental study of representative factors in monkeys. *Journal of Comparative Psychology*, 8(3), 197–236. <https://doi.org/10.1037/h0075798>
- Trapold, M. A. (1970). Are expectancies based upon different positive reinforcing events discriminably different? *Learning and Motivation*, 1(2), 129–140. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(70\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0023-9690(70)90079-2)
- Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.-C., & Giurfa, M. (2007). Aversive Learning in Honeybees Revealed by the Olfactory Conditioning of the Sting Extension Reflex. *PLoS ONE*, 2(3), e288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000288>
- von Frisch, K. (1967). *The dance language and orientation of bees*. Harvard University Press.

- Waddington, K. D., Allen, T., & Heinrich, B. (1981). Floral preferences of bumblebees (*Bombus edwardsii*) in relation to intermittent versus continuous rewards. *Animal Behaviour*, *29*(3), 779–784. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(81\)80011-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(81)80011-5)
- Waser, N. M. (1986). Flower Constancy: Definition, Cause, and Measurement. *The American Naturalist*, *127*(5), 593–603. <http://www.jstor.org/stable/2461312>
- Watanabe, M., Cromwell, H. C., Tremblay, L., Hollerman, J. R., Hikosaka, K., & Schultz, W. (2001). Behavioral reactions reflecting differential reward expectations in monkeys. *Experimental Brain Research*, *140*(4), 511–518. <https://doi.org/10.1007/s002210100856>
- Wendt, S., Strunk, K. S., Heinze, J., Roeder, A., & Czaczkes, T. J. (2019). Positive and negative incentive contrasts lead to relative value perception in ants. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.45450>
- Wood, E. R., Dudchenko, P. A., Robitsek, R. J., & Eichenbaum, H. (2000). Hippocampal Neurons Encode Information about Different Types of Memory Episodes Occurring in the Same Location. *Neuron*, *27*(3), 623–633. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00071-4)
- Wright, G. A., Carlton, M., & Smith, B. H. (2009). A honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration. *Behavioral Neuroscience*, *123*(1), 36–43. <https://doi.org/10.1037/a0014040>
- Wright, G. A., Mustard, J. A., Kottcamp, S. M., & Smith, B. H. (2007). Olfactory memory formation and the influence of reward pathway during appetitive learning by honey bees. *Journal of Experimental Biology*, *210*(22), 4024–4033. <https://doi.org/10.1242/jeb.006585>
- Yarali, A., Niewalda, T., Chen, Y., Tanimoto, H., Duernagel, S., & Gerber, B. (2008). 'Pain relief' learning in fruit flies. *Animal Behaviour*, *76*(4), 1173–1185. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.05.025>
- Yin, Y., Chen, N., Zhang, S., & Guo, A. (2009). Choice strategies in *Drosophila* are based on competition between olfactory memories. *European Journal of Neuroscience*, *30*(2), 279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06821.x>
- Zhang, S., Bock, F., Si, A., Tautz, J., & Srinivasan, M. V. (2005). Visual working memory in decision making by honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(14), 5250–5255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501440102>
- Zhang, Shaowu, Schwarz, S., Pahl, M., Zhu, H., & Tautz, J. (2006). Honeybee memory: a honeybee knows what to do and when. *Journal of Experimental Biology*, *209*(22), 4420–4428. <https://doi.org/10.1242/jeb.02522>

Anexo estadístico

Experimento 1: contraste intraensayo

Estadística descriptiva. Promedio de abejas que extendieron la probóscide frente al odorante para cada tratamiento, en cada ensayo o tiempo de evaluación:

Tratamiento	N	Ensayo de entrenamiento				Tiempo de evaluación		
		E1	E2	E3	E4	3 hs	24 hs	48 hs
Constante alto	31	0	0.48	0.65	0.48	0.45	0.45	0.52
Constante bajo	31	0	0.61	0.61	0.55	0.61	0.48	0.39
Contraste negativo	33	0	0.48	0.52	0.67	0.70	0.42	0.18
Contraste positivo	37	0	0.62	0.68	0.57	0.51	0.70	0.70

ANOVA del modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1, modelo lineal generalizado marginal):

```
Analysis of 'wald statistic' Table
Model: binomial, link: logit
Response: rta
Terms added sequentially (first to last)

          Df      X2  P(>|Chi|)
TRATAMIENTO      3  1.756   0.6245
tiempo_entr      2  1.082   0.5821
SEMANA           6 43.274  1.03e-07 ***
TRATAMIENTO:tiempo_entr  6  5.304   0.5054
```

La prueba de ANOVA muestra que la interacción tratamiento*ensayo durante el entrenamiento resultó no significativa ($p=0,50$), por ende se pueden evaluar los p valores correspondientes a cada variable explicatoria por separado. Los efectos del tratamiento y el ensayo de entrenamiento también resultaron no significativos ($p=0,62$ y $p=0,58$ respectivamente). Por otro lado, la semana de trabajo resultó significativa para el modelo de entrenamiento ($p<0,0001$), efecto que puede explicarse a partir de la variación entre los resultados obtenidos entre las distintas semanas que se llevó adelante el experimento. Por este motivo, se considera que resultó una buena decisión añadir la semana de trabajo como covariable para absorber variabilidad no explicada.

ANOVA del modelo de evaluación (Ecuación 2.2, modelo lineal generalizado mixto):

Analysis of Deviance Table (Type II Wald chisquare tests)

Response: rta

	Chisq	Df	Pr(>Chisq)
TRATAMIENTO	3.3627	3	0.3390115
tiempo_testeo	2.0484	2	0.3590747
SEMANA	24.8214	6	0.0003684 ***
TRATAMIENTO:tiempo_testeo	26.5204	6	0.0001780 ***

En la prueba de ANOVA para la etapa de evaluación del Experimento 1 se observa que la interacción tratamiento*tiempo de evaluación resultó significativa ($p < 0,001$). Por lo tanto, se realizaron contrastes ortogonales: para cada tiempo de evaluación (3, 24 y 48 hs) se compararon de a pares los grupos CONSTANTE ALTO vs CONTRASTE POSITIVO y CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO.

Contrastes ortogonales (test de Tukey) tratamiento*tiempo de evaluación:

```

$contrasts
contrast      odds.ratio      SE      df lower.CL upper.CL null t.ratio p.value
3hs_alto_pos   0.676 0.545 377   0.1387   3.297   1  -0.485 0.6277
3hs_bajo_neg   0.889 0.767 377   0.1631   4.845   1  -0.137 0.8914
24hs_alto_pos  0.158 0.134 377   0.0296   0.842   1  -2.168 0.0308
24hs_bajo_neg  2.367 1.980 377   0.4566  12.266   1   1.029 0.3039
48hs_alto_pos  0.252 0.213 377   0.0481   1.324   1  -1.634 0.1031
48hs_bajo_neg  7.832 7.238 377   1.2726  48.202   1   2.227 0.0265

```

Results are averaged over the levels of: SEMANA

Confidence level used: 0.95

Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale

Tests are performed on the log odds ratio scale

La comparación CONSTANTE ALTO vs CONTRASTE POSITIVO a 24 hs resultó significativa ($p < 0,05$). Se estima que la chance de extensión de probóscide en la evaluación a 24 hs para el grupo CONTRASTE POSITIVO aumenta entre 0,19 y 32,78 veces más respecto al grupo CONSTANTE ALTO, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. La comparación CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO a 48 hs resultó significativa ($p < 0,05$). Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE NEGATIVO en la evaluación a 48 hs disminuye entre 0,21 y 0,98 veces menos respecto al grupo CONSTANTE BAJO, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. El resto de los contrastes ortogonales resultaron no significativos ($p > 0,05$).

Experimento 2: contraste interensayo (0,5-1-1,5 M)

Estadística descriptiva. Promedio de abejas que extendieron la probóscide frente al odorante para cada tratamiento, en cada ensayo o tiempo de evaluación:

Tratamiento	N	Ensayo de entrenamiento			Tiempo de evaluación		
		E1	E2	E3	3 hs	24 hs	48 hs
Constante	26	0	0.50	0.62	0.88	0.58	0.62
Descendente	26	0	0.38	0.58	0.69	0.23	0.19
Ascendente	27	0	0.37	0.67	0.74	0.63	0.74

ANOVA del modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1, modelo lineal generalizado marginal):

```

Analysis of 'wald statistic' Table
Model: binomial, link: logit
Response: rta
Terms added sequentially (first to last)

                Df    X2 P(>|Chi|)
TRATAMIENTO      2  0.6151  0.73524
tiempo_entr      1  6.4193  0.01129 *
SEMANA           4  5.5804  0.23275
TRATAMIENTO:tiempo_entr  2  0.9281  0.62874
  
```

La salida de ANOVA para el modelo de entrenamiento el Experimento 2 (protocolo 0,5-1-1,5 M) muestra que el único efecto significativo es el del número de ensayo (tiempo_entr, $p < 0,05$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales promediando el efecto de todos los tratamientos para comparar únicamente la chance de PER entre ensayos.

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre ensayos:

```

$contrasts
contrast odds.ratio   SE  df asymp.LCL asymp.UCL null z.ratio p.value
E2 / E3      0.425 0.142 Inf    0.22    0.819    1  -2.556  0.0106
  
```

```

Results are averaged over the levels of: TRATAMIENTO, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
Tests are performed on the log odds ratio scale
  
```

La comparación entre el ensayo 2 y el ensayo 3 resultó significativa ($p < 0,05$). Se estima que la chance de extensión de probóscide durante el ensayo 3 aumenta entre 0,22 y

3,54 veces más que durante el ensayo 2, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. Recordar que el ensayo 1 no se incluyó en el modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1) ya que al ser un vector con ceros únicamente añadía una complejidad adicional al modelado de los datos, que se consideró no era necesaria ya que en todos los casos se partió de animales que no respondieran espontáneamente al odorante.

ANOVA del modelo de evaluación (Ecuación 2.3, modelo lineal generalizado marginal):

```

Analysis of 'Wald statistic' Table
Model: binomial, link: logit
Response: rta
Terms added sequentially (first to last)

                Df      X2 P(>|Chi|)
TRATAMIENTO      2 21.9388 1.722e-05 ***
tiempo_testeo    2 15.3347 0.0004679 ***
SEMANA           4  3.9716 0.4098697
TRATAMIENTO:tiempo_testeo 4  7.1036 0.1305161

```

En la prueba de ANOVA para la etapa de evaluación del Experimento 2 (0,5-1-1,5 M) se observa que la interacción tratamiento*tiempo de evaluación resultó no significativa ($p=0,13$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales para los efectos que sí resultaron significativos: tratamiento ($p<0,0001$) y tiempo de evaluación ($p<0,001$).

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre tratamientos:

```

$contrasts
contrast      odds.ratio  SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  null  z.ratio  p.value
ascendente / constante      0.964 0.368 Inf    0.394     2.36    1   -0.095  0.9950
ascendente / descendente    4.755 1.801 Inf    1.957    11.55    1    4.117  0.0001
constante / descendente     4.931 1.929 Inf    1.972    12.33    1    4.080  0.0001

```

```

Results are averaged over the levels of: tiempo_testeo, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Tests are performed on the log odds ratio scale

```

La comparación entre los grupos CONSTANTE y ASCENDENTE resultó no significativa ($p=1$). La comparación entre los grupos ASCENDENTE y DESCENDENTE resultó significativa ($p<0,001$). Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo ASCENDENTE aumenta entre 0,957 y 10,55 veces más que el grupo DESCENDENTE, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. La comparación entre los grupos CONSTANTE y DESCENDENTE resultó significativa ($p<0,001$). Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo

DESCENDENTE disminuye entre 0,49 y 0,92 veces menos que el grupo CONSTANTE, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables.

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre tiempos de evaluación:

```

$contrasts
contrast      odds.ratio      SE      df asymp.LCL asymp.UCL null z.ratio p.value
3hs / 24hs      4.253 1.638 Inf      1.724      10.49      1      3.758 0.0005
3hs / 48hs      3.655 1.434 Inf      1.458       9.16      1      3.305 0.0027
24hs / 48hs      0.859 0.308 Inf      0.371       1.99      1     -0.423 0.9061

```

```

Results are averaged over the levels of: TRATAMIENTO, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Tests are performed on the log odds ratio scale

```

La comparación entre los tiempos de evaluación 3 hs y 24 hs resultó significativa ($p < 0,001$), al igual que la comparación entre 3 hs y 48 hs ($p < 0,01$). Para el primer caso, se estima que la chance de extensión de probóscide en la evaluación a las 24 hs disminuye entre 0,41 y 0,90 veces respecto a la evaluación a 3 hs, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. Para la segunda comparación, se estima que la chance de extensión de probóscide en la evaluación a las 48 hs disminuye entre 0,31 y 0,89 veces respecto a la evaluación a 3 hs, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. La comparación entre 24 hs y 48 hs resultó no significativa ($p = 0,91$).

Experimento 2: contraste interensayo (0,17-0,5-1,5 M)

Estadística descriptiva. Promedio de abejas que extendieron la probóscide frente al odorante para cada tratamiento, en cada ensayo o tiempo de evaluación:

Tratamiento	N	Ensayo de entrenamiento			Tiempo de evaluación		
		E1	E2	E3	3 hs	24 hs	48 hs
Constante	31	0	0.39	0.45	0.42	0.26	0.29
Descendente	34	0	0.32	0.44	0.41	0.35	0.21
Ascendente	31	0	0.19	0.58	0.58	0.65	0.55

ANOVA del modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1, modelo lineal generalizado marginal):

```

Analysis of 'Wald statistic' Table
Model: binomial, link: logit
Response: rta
Terms added sequentially (first to last)

          Df      X2 P(>|Chi|)
TRATAMIENTO      2  0.2148  0.898187
tiempo_entr      1  6.9671  0.008302 **
SEMANA           4 11.9540  0.017696 *
TRATAMIENTO:tiempo_entr  2  4.1457  0.125829

```

La salida de ANOVA para el modelo de entrenamiento el Experimento 2 (protocolo 0,17-0,5-1,5 M) muestra que resultaron significativos los efectos del número de ensayo (tiempo_entr, $p < 0,01$) y de la semana de trabajo ($p < 0,05$). Nuevamente, el efecto significativo de la semana de trabajo se explica a partir de la variabilidad en las chances de PER obtenidas en cada semana que se realizó el experimento. A partir de estos resultados, se realizó un análisis de efectos principales promediando el efecto de todos los tratamientos para comparar únicamente la chance de PER entre ensayos.

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre ensayos:

```

$contrasts
contrast odds.ratio    SE  df asymp.LCL asymp.UCL null z.ratio p.value
E2 / E3      0.408 0.131 Inf    0.218    0.764    1  -2.800  0.0051

```

```

Results are averaged over the levels of: TRATAMIENTO, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
Tests are performed on the log odds ratio scale

```

La comparación entre el ensayo 2 y el ensayo 3 resultó significativa ($p < 0,01$). Se estima que la chance de extensión de probóscide durante el ensayo 3 aumenta entre 0,31 y 3,59 veces más que durante el ensayo 2, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables.

ANOVA del modelo de evaluación (Ecuación 2.3, modelo lineal generalizado marginal):

```

Analysis of 'wald statistic' Table
Model: binomial, link: logit
Response: rta
Terms added sequentially (first to last)

                Df      X2 P(>|Chi|)
TRATAMIENTO      2 18.1144 0.0001165 ***
tiempo_testeo    2  3.2888 0.1931326
SEMANA           4  3.5792 0.4659356
TRATAMIENTO:tiempo_testeo 4  2.9090 0.5731669
    
```

En la prueba de ANOVA para la etapa de evaluación del Experimento 2 (0,17-1-1,5) se observa que la interacción tratamiento*tiempo de evaluación resultó no significativa ($p=0,57$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales comparando entre tratamientos, dado que es el único efecto que resultó significativo ($p<0,001$).

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre tratamientos:

```

$contrasts
contrast      odds.ratio  SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  null  z.ratio  p.value
ascendente / constante      3.16 0.983 Inf    1.526     6.55    1    3.703  0.0006
ascendente / descendente    3.19 0.979 Inf    1.556     6.55    1    3.786  0.0004
constante / descendente     1.01 0.319 Inf    0.481     2.12    1    0.030  0.9995
    
```

```

Results are averaged over the levels of: tiempo_testeo, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Tests are performed on the log odds ratio scale
    
```

La comparación entre los grupos CONSTANTE y DESCENDENTE resultó no significativa ($p=1$). La comparación entre los grupos ASCENDENTE y DESCENDENTE resultó significativa ($p<0,001$). Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo ASCENDENTE aumenta entre 0,56 y 5,55 veces más que el grupo DESCENDENTE, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. La comparación entre los grupos CONSTANTE y ASCENDENTE resultó significativa ($p<0,001$). Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo ASCENDENTE aumenta entre 0,53 y 6,55 veces más que el grupo CONSTANTE, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables.

Experimento 3: contraste entre días

Estadística descriptiva. Promedio de abejas que extendieron la probóscide frente al odorante para cada tratamiento, en cada ensayo o tiempo de evaluación:

Tratamiento	N	Ensayo de entrenamiento				Tiempo de evaluación		
		E1	E2	E3	E4	3 hs	24 hs	48 hs
Constante alto	47	0	0.21	0.49	0.55	0.70	0.32	0.34
Constante bajo	36	0	0.03	0.36	0.53	0.75	0.47	0.39
Contraste negativo	40	0	0.12	0.30	0.48	0.62	0.20	0.10
Contraste positivo	40	0	0.30	0.55	0.65	0.85	0.58	0.58

ANOVA del modelo de entrenamiento (Ecuación 2.1, modelo lineal generalizado marginal):

```

Analysis of 'wald statistic' Table
Model: binomial, link: logit
Response: rta
Terms added sequentially (first to last)

          Df    X2 P(>|Chi|)
TRATAMIENTO      3 13.701  0.003342 **
tiempo_entr      2 49.845 1.501e-11 ***
SEMANA           6 17.028  0.009182 **
TRATAMIENTO:tiempo_entr  6  4.294  0.636940
  
```

La salida de ANOVA para el modelo de entrenamiento el Experimento 3 muestra que la interacción tratamiento*ensayo resultó no significativa ($p=0,64$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales para cada variable por separado ya que tanto el tratamiento como el número de ensayo resultaron significativas ($p<0,01$ y $p<0,0001$ respectivamente). Una vez más, la variabilidad entre semanas de trabajo produjo un efecto significativo de esta variable durante el entrenamiento ($p<0,01$).

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre tratamientos:

```

$contrasts
contrast      odds.ratio    SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  null  z.ratio  p.value
constante_alto / constante_bajo    2.844  1.191  Inf    0.9704    8.337    1    2.497  0.0603
constante_alto / contraste_neg    1.839  0.536  Inf    0.8700    3.886    1    2.091  0.1559
constante_alto / contraste_pos    0.736  0.201  Inf    0.3651    1.485    1   -1.122  0.6762
constante_bajo / contraste_neg    0.646  0.279  Inf    0.2130    1.963    1   -1.009  0.7441
constante_bajo / contraste_pos    0.259  0.109  Inf    0.0877    0.764    1   -3.208  0.0073
contraste_neg / contraste_pos    0.400  0.118  Inf    0.1875    0.855    1   -3.100  0.0105

```

Results are averaged over the levels of: tiempo_entr, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
Tests are performed on the log odds ratio scale

Las comparaciones entre los grupos CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE POSITIVO y CONTRASTE NEGATIVO vs CONTRASTE POSITIVO resultaron significativas ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente). Para el primer caso, se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE POSITIVO aumenta entre 0,31 y 10,40 veces más respecto al grupo CONSTANTE BAJO, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. Para la segunda comparación, se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE POSITIVO aumenta entre 0,17 y 4,33 veces más respecto al grupo CONTRASTE NEGATIVO, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables.

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre ensayos:

```

$contrasts
contrast odds.ratio    SE  df  asymp.LCL  asymp.UCL  null  z.ratio  p.value
E2 / E3    0.194  0.0680  Inf    0.0857    0.441    1   -4.683  <.0001
E2 / E4    0.112  0.0392  Inf    0.0495    0.254    1   -6.265  <.0001
E3 / E4    0.577  0.1336  Inf    0.3358    0.993    1   -2.374  0.0462

```

Results are averaged over the levels of: TRATAMIENTO, SEMANA
Confidence level used: 0.95
Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
Tests are performed on the log odds ratio scale

Todas las comparaciones entre ensayos promediando por los niveles del tratamiento resultaron significativas. Para la comparación E2/E3, se estima que la chance de extensión de probóscide durante el ensayo 3 aumenta entre 1,27 y 10,67 veces más que durante el ensayo 2, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. Para la comparación E2/E4, se estima que la chance de extensión de probóscide durante el ensayo 4 aumenta entre 1,27 y 10,67 veces más que durante el ensayo 2, con un 95% de confianza

y controlando por el resto de las variables. Finalmente, para la comparación E3/E4, se estima que la chance de extensión de probóscide durante el ensayo 4 aumenta entre 0,007 y 1,98 veces más que durante el ensayo 3, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables.

ANOVA del modelo de evaluación (Ecuación 2.2, modelo lineal generalizado mixto):

Analysis of Deviance Table (Type II Wald chi-square tests)

Response: rta

	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
TRATAMIENTO	15.2200	3	0.001638	**
tiempo_testeo	45.8944	2	1.082e-10	***
SEMANA	18.2941	6	0.005538	**
TRATAMIENTO:tiempo_testeo	5.5588	6	0.474384	

En la prueba de ANOVA para la etapa de evaluación del Experimento 3 se observa que la interacción tratamiento*tiempo de evaluación resultó no significativa ($p=0,47$). Por lo tanto, se realizó un análisis de efectos principales para las variables tratamiento ($p<0,01$) y tiempo de evaluación ($p<0,0001$) que resultaron significativas.

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre tratamientos:

Scontrasts	contrast	odds.ratio	SE	df	lower.CL	upper.CL	null	t.ratio	p.value
	constante_alto / constante_bajo	0.5975	0.3644	470	0.1240	2.879	1	-0.844	0.8332
	constante_alto / contraste_neg	4.1387	2.6099	470	0.8142	21.036	1	2.252	0.1109
	constante_alto / contraste_pos	0.1916	0.1188	470	0.0387	0.948	1	-2.665	0.0396
	constante_bajo / contraste_neg	6.9270	4.8076	470	1.1572	41.464	1	2.789	0.0281
	constante_bajo / contraste_pos	0.3207	0.2092	470	0.0596	1.724	1	-1.743	0.3025
	contraste_neg / contraste_pos	0.0463	0.0334	470	0.0072	0.297	1	-4.259	0.0001

Results are averaged over the levels of: tiempo_testeo, SEMANA

Confidence level used: 0.95

Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

Tests are performed on the log odds ratio scale

Promediando por los tiempos de evaluación, se observa que las comparaciones CONSTANTE ALTO vs CONTRASTE POSITIVO ($p<0,05$), CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO ($p<0,05$) y CONTRASTE NEGATIVO vs CONTRASTE POSITIVO ($p<0,001$) resultaron significativas. Para el primer caso, se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE POSITIVO aumenta entre 0,05 y 24,84 veces más respecto al grupo CONSTANTE ALTO, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. Para el segundo caso, se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE NEGATIVO disminuye entre 0,14 y 0,98 veces menos respecto al grupo CONSTANTE BAJO, con un 95% de confianza y controlando por el

resto de las variables. Finalmente, para la última comparación se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE POSITIVO aumenta entre 2,37 y 137 veces más respecto al grupo CONTRASTE NEGATIVO, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables

Análisis de efectos principales (test de Tukey) entre tiempos de evaluación:

```

$contrasts
contrast      odds.ratio      SE  df lower.CL upper.CL null t.ratio p.value
3hs / 24hs      16.49   7.26 470   5.856   46.43    1   6.365 <.0001
3hs / 48hs      26.18  12.72 470   8.350   82.09    1   6.717 <.0001
24hs / 48hs      1.59   0.55 470   0.703    3.59    1   1.334 0.3772

```

Results are averaged over the levels of: TRATAMIENTO, SEMANA

Confidence level used: 0.95

Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
 Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

Tests are performed on the log odds ratio scale

La comparación entre los tiempos de evaluación 3 hs y 24 hs resultó significativa ($p < 0,0001$), al igual que la comparación entre 3 hs y 48 hs ($p < 0,0001$). Para el primer caso, se estima que la chance de extensión de probóscide en la evaluación a las 24 hs disminuye entre 0,83 y 0,98 veces respecto a la evaluación a 3 hs, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. Para la segunda comparación, se estima que la chance de extensión de probóscide en la evaluación a las 48 hs disminuye entre 0,88 y 0,99 veces respecto a la evaluación a 3 hs, con un 95% de confianza y controlando por el resto de las variables. La comparación entre 24 hs y 48 hs resultó no significativa ($p = 0,38$).