



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

**Análisis comportamental para evaluar
atractividad olfativa y plasticidad en
*Drosophila melanogaster***

**Tesis de licenciatura presentada para optar por el título de
Licenciado en Ciencias Biológicas**

Matías Alemán

Director: Nicolás Pérez

Director Asistente: Fernando Locatelli

Laboratorio de Fisiología y Plasticidad Sensorial,
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular,
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias,
CONICET - UBA

Abril 2023

Índice

1. Resumen	3
2. Title and abstract	4
3. Introducción	5
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo	5
3.2. Sistema olfatorio en insectos	7
3.2.1. Circuito general del sistema olfatorio en <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3.3. Efecto de la valencia de los estímulos olfatorios	11
4. Hipótesis	13
4.1. Objetivos	13
5. Materiales y métodos	14
5.1. Mantenimiento de stocks	14
5.3. Dispositivo experimental	16
5.4. Protocolo experimental para evaluar el efecto del entorno olfativo	17
5.5. Análisis de los datos y estadística	18
6. Resultados	22
6.1. Puesta a punto del paradigma comportamental	22
6.2. Evaluación del efecto del entorno químico durante el desarrollo en la preferencia por odorantes	26
6.2.1. Evaluación de la preferencia por ácido propiónico	27
6.2.2. Evaluación de la preferencia por benzaldehído	30
6.2.3. Evaluación de la preferencia por 1-octanol	35
6.2.4. Evaluación de la preferencia por isoamil acetato	39
7. Discusión	42
7.1. Puesta a punto del paradigma comportamental	43
7.2. Evaluación del efecto del entorno químico durante el desarrollo en la preferencia por odorantes	44
7.2.1. Odorante apetitivo	44
7.2.2. Odorantes aversivos	45
7.2.3. Odorante neutro	47
7.2.4. Observaciones generales y futuras direcciones	48
8. Bibliografía	50

1. Resumen

Los insectos dependen del olfato para muchos comportamientos, como por ejemplo encontrar comida y aparearse. Se ha postulado que las señales olfativas que impulsan diferentes comportamientos han sido determinados por la evolución y, por lo tanto, puede suponerse que sus mecanismos neurobiológicos dependen de circuitos firmemente cableados. Sin embargo, está bien establecido que el aprendizaje y la memoria tienen un gran impacto en los comportamientos guiados por el olfato. El objetivo principal de este proyecto es evidenciar el efecto que tiene la exposición a estímulos olfativos, lo que llamamos el entorno olfativo, durante el desarrollo y la adultez temprana, sobre la preferencia olfativa en la edad adulta. Utilizamos un método que nos permite estimar la atractividad innata y adquirida de diferentes estímulos olfativos. Para estos experimentos usamos dos líneas salvajes de *Drosophila melanogaster*, *Berlin* y *Canton S*, y probamos odorantes de diferentes valencias innatas. Las larvas de moscas se criaron en olores aversivos, neutros o apetitivos y evaluamos su preferencia para cada odorante en adultos de entre 5 y 7 días post eclosión. Aproximadamente 30 hembras y 30 machos adultos fueron colocados en una cámara conteniendo dos viales trampa con soluciones diferentes. La atractividad se determina calculando un índice que relaciona el número de moscas atrapadas en cada vial. Los cambios en la valencia innata de los olores se analizaron comparando las moscas tratadas con los controles correspondientes. Nuestros resultados sugieren que el ambiente donde se crían los animales puede modular la respuesta conductual exploratoria durante la edad adulta pero no observamos mayores cambios en la preferencia por los odorantes.

2. Title and abstract

Behavioral assay to evaluate olfactory attractiveness and plasticity in *Drosophila melanogaster*.

Insects rely on smell for many behaviors, such as finding food and mating. The olfactory cues that drive different behaviors have been postulated to have been determined by evolution, and therefore their neurobiological mechanisms can be assumed to depend on hardwired circuitry. However, it is well established that learning and memory have a large impact on behaviors guided by olfaction. The main objective of this project is to evaluate the effect of exposure to olfactory stimuli (i.e. olfactory environment), during development and early adulthood, on the olfactory preference in adulthood. We use a method that allows us to estimate the innate and acquired attractiveness of different olfactory stimuli. For these experiments we used two wild type lines of *Drosophila melanogaster*, *Berlin* and *Canton S*, and tested odorants of different innate valence. The flies were reared on aversive, neutral, or appetitive odorants and their preference for each odorant was evaluated in adults between 5 and 7 days post hatching. Approximately 30 females and 30 males are placed in a chamber containing two vials with different odorant solutions. The attractiveness is determined by calculating an index that relates the number of flies trapped in each vial. Changes in the innate valence of odors were analyzed by comparing treated flies with corresponding controls. Our results suggest that the environment where the animals are raised can modulate the exploratory behavioral response during adulthood, but we did not observe major changes in preference for odorants.

3. Introducción

3.1. *Drosophila melanogaster* como modelo

Los estudios que utilizan a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico se remontan a hace más de un siglo. El modelo ganó gran notoriedad cuando facilitó el entendimiento de la heredabilidad de los caracteres. En una práctica científica icónica T. Morgan observó que la heredabilidad de los caracteres a través de las generaciones estaba asociada a los cromosomas¹. Fue así como con sus experimentos terminó de consolidar la teoría cromosómica de Sutton y Boveri. Desde entonces la utilización de *Drosophila melanogaster* como modelo biológico se ha extendido rápidamente y el campo científico se ha nutrido de un formidable progreso que ofrece a los investigadores numerosas herramientas para estudios multidisciplinarios.

En los años 60, experimentando con mutagénesis en *Drosophila melanogaster*, S. Benzer identificó moscas mutantes con defectos en su respuesta locomotora a la luz². En colaboración con R. Konopka lograron identificar el primer gen relojero, period (*per*)^{2,3}. Así establecieron, como premisa de la genética del comportamiento, que comportamientos complejos, tales como aprendizaje y memoria, cortejo sexual y ritmos biológicos se encuentran bajo control genético.

Trabajar con *Drosophila melanogaster* otorga múltiples ventajas a los investigadores. Entre sus principales ventajas podemos mencionar que se trata de un modelo biológico económico y sencillo para mantener en el laboratorio. Presenta un ciclo de vida corto, de aproximadamente 10 días a 25°C⁴ (ver Figura 1). Esto habilita al investigador a experimentar rápidamente con individuos en distintas fases del ciclo de vida. Una hembra adulta es capaz de oviponer aproximadamente 100 huevos por día hasta por 20 días. Los huevos son depositados por las hembras en el sustrato,

al eclosionar los individuos pasan por tres estadios larvales (ver Figura 1), en los cuales se alimentan del sustrato. A los tres días post eclosión las larvas del tercer estadio se alejan del sustrato y pupan. Durante este periodo se da la metamorfosis y se dan importantes reestructuraciones del sistema nervioso. Una vez finalizada la metamorfosis las moscas adultas emergen del pupario y un día después alcanzan la madurez sexual. Durante todo el ciclo de vida del animal e incluso en la primera etapa de la adultez temprana, el sistema nervioso se encuentra en desarrollo. El gran número de individuos que se obtiene en poco tiempo es una condición ideal para experimentos comportamentales, pues se trata de experimentos en los que se realizan múltiples réplicas para tener en cuenta la importante variabilidad que pueden presentar los diferentes individuos.

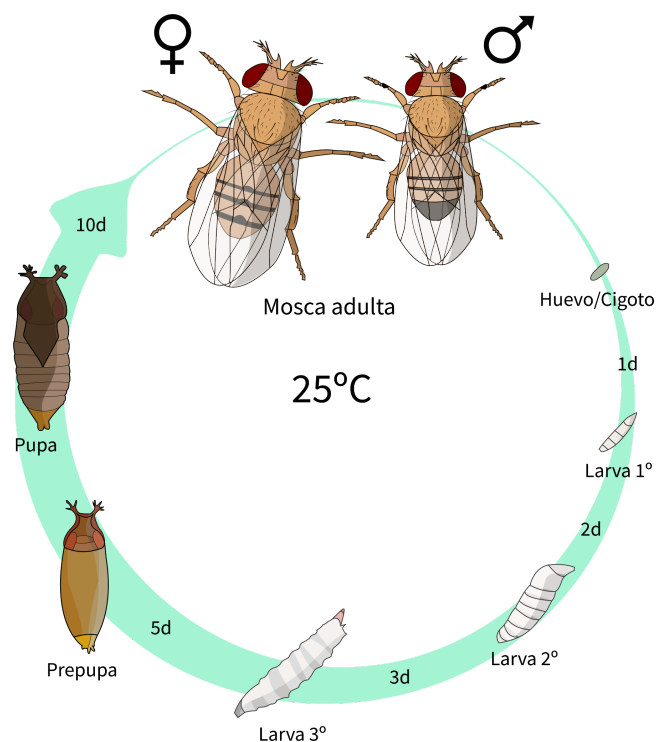


Figura 1: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, de una duración de 10 días a 25°C (diseño de Ezequiel Alba Posse).

Otra ventaja importante es que su genoma, ordenado en 4 cromosomas, el cual se estima que codifica aproximadamente 14.000 genes⁵, se encuentra completamente secuenciado, lo que permite el uso de una gran cantidad de herramientas genéticas. Estas permiten la manipulación de diferentes genes de forma temporal y espacial, además a las moscas se les insertan

cromosomas balanceadores que ayudan a mantener las inserciones. La vasta variedad de cepas con mutaciones e inserciones genéticas se encuentran descritas en Flybase⁶ y muchas de estas pueden ser solicitadas a centros repositorios tales como Bloomington Drosophila Stock Center y Kyoto Stock Center, entre otros. Otra razón por la que este animal es un modelo muy utilizado en la investigación biomédica, es porque se ha observado que aproximadamente el 75% de los genes humanos relacionados a enfermedades poseen un homólogo en el genoma de *Drosophila*⁷.

A estas virtudes del modelo, se le suma que existen numerosos paradigmas comportamentales que permiten estudiar el sistema olfatorio y contribuyen al entendimiento de los mecanismos de codificación y plasticidad de estímulos sensoriales. Se han publicado muchas variantes de ensayos de trampa adaptadas para *Drosophila* ya que se trabaja con este tipo de ensayos desde hace más de tres décadas^{8,9,10,11,12,13}. Otro tipo de ensayo comportamental altamente difundido en la comunidad científica es el ensayo de laberinto y su variante el destacado laberinto en T publicado por T. Tully en 1998¹⁴. Estos ensayos permiten categorizar a los estímulos por su valencia, positiva, negativa o neutra, que se correlaciona con la preferencia del animal por determinado estímulo. Cuando los animales se ven atraídos por un estímulo se dice que dicho estímulo es de valencia positiva, cuando son repelidos el estímulo es de valencia negativa y cuando su comportamiento es indefinido al estímulo es de valencia neutra.

3.2. Sistema olfatorio en insectos

En cuanto a percepción del entorno y reacción al mismo, el sistema olfatorio es un sistema clave en insectos. Estos dependen de él para hallar alimento, pareja o detectar situaciones adversas. Los comportamientos evocados por la activación del sistema olfatorio son de vital importancia para la preservación del individuo y de la especie. Por lo tanto, se esperaría que la

codificación de las señales olfativas que impulsan diferentes comportamientos, se encuentre determinada por la evolución, se podría asumir que los mecanismos neurobiológicos involucrados dependen de circuitos rígidos e innatos, establecidos durante el desarrollo. Sin embargo, se ha comprobado que el aprendizaje y la memoria tienen un gran impacto en el ajuste de las conductas guiadas por el olfato. Se ha observado que la capacidad para detectar y discriminar estímulos está determinada tanto por factores genéticos como por la experiencia de vida de un individuo¹⁵.

El sistema olfatorio resulta sumamente interesante para estudiar ya que muchos de sus principios anatómicos y computacionales se encuentran conservados en especies evolutivamente alejadas, como lo son insectos y mamíferos^{16,17}. Además, los circuitos neuronales que componen el sistema olfatorio son menos complejos que los que se observan en otros sistemas sensoriales¹⁸. Esto permite realizar inferencias básicas acerca del potencial funcionamiento de otros sistemas más complejos.

Una de las preguntas más relevantes y que ha sido poco estudiada se relaciona con el efecto del entorno al que los animales son expuestos durante su desarrollo, y cómo esto modula la valencia de los estímulos en la vida adulta de los animales^{19,20}. Tully y colaboradores demostraron mediante un condicionamiento aversivo Pavloviano que larvas del tercer estadio de *Drosophila melanogaster* son capaces de formar una memoria de largo término que sobrevive a la metamorfosis y puede ser evocada en adultos²¹. En trabajos más recientes, utilizando abejas *Apis mellifera* como modelo experimental, Arenas y Farina demostraron que la exposición al polen en edades adultas tempranas, mediante el agregado de polen al alimento, afecta el comportamiento de los animales más adelante en su vida²². Este trabajo demostró que abejas que tuvieron contacto temprano con el polen se ven más atraídas por odorantes presentes en el polen e incluso se ha visto que su capacidad de adquirir, consolidar y evocar estas memorias en edades de forrajeo está fuertemente influenciada por la identidad del polen²². Además han observado que experiencias

olfatorias tempranas no solo modifican la actividad neuronal y la cantidad de glomérulos que se activan ante un estímulo aprendido sino que también puede cambiar la representación espacial del mismo en el lóbulo antenal y de odorantes perceptualmente similares²³. A su vez, se ha observado que experiencias durante el estadio larval de la abeja pueden tener efectos en el comportamiento del individuo adulto²⁴. Larvas que son criadas en alimento con agregado de un odorante, muestran durante sus primeros días de adultez un aumento significativo en la respuesta de extensión de probóscide cuando se les presenta el odorante aprendido. Estos resultados muestran que se generan memorias durante el estadio larval que persisten a la metamorfosis²⁴.

Trabajos como estos apoyan la idea que la exposición temprana a ciertos estímulos olfativos tiene efectos de larga duración y pueden desempeñar un rol importante en determinar comportamientos guiados por olores en individuos adultos.

3.2.1. Circuito general del sistema olfatorio en *Drosophila melanogaster*

Los odorantes interactúan con proteínas receptoras que se encuentran en sensilias ubicadas en los palpos maxilares y en las antenas de las moscas (ver Figura 2). Específicamente, las proteínas receptoras se ubican en la membrana de células nerviosas llamadas neuronas receptoras olfativas (ORNs, por sus siglas en inglés)²⁵. Existen 62 tipos de ORNs en moscas y cada una de ellas expresa un sólo tipo de proteína receptora^{26,27,28}. Los receptores se pueden categorizar según su afinidad por las moléculas volátiles. Por un lado se encuentran los receptores generalistas que pueden interactuar con múltiples ligandos, y por el otro lado los receptores especialistas, que se unen a un único ligando, los cuales están relacionados con comportamientos estereotipados, como por ejemplo receptores que unen a feromonas y suscitan comportamientos de cortejo. El hecho de que diferentes proteínas receptoras pueden interactuar con diversas moléculas odorantes y que diferentes odorantes pueden interactuar con múltiples receptores, genera un

sistema combinatorio y altamente específico de detección y codificación de odorantes. La combinatoria debida a la activación diferencial de los receptores es tan grande, que el número de odorantes que puede detectar un animal es mucho mayor que el número de odorantes que probablemente enfrente en toda su vida.



Figura 2: Micrografía de la cabeza de *Drosophila melanogaster* tomada con microscopio electrónico de barrido. La punta de flecha indica la ubicación de las antenas y la flecha indica la ubicación de los palpos maxilares. La barra de escala se corresponde con una distancia de 100 μm ²⁹.

Las ORNs proyectan sus axones a los lóbulos antenales, considerados el primer centro de procesamiento olfatorio en el sistema nervioso central. En dicha estructura todas las ORNs que expresan el mismo receptor convergen en zonas específicas del lóbulo antenal formando neuropilos llamados glomérulos¹⁷. Existe por lo tanto un glomérulo por cada tipo de ORN, 62 glomérulos por lóbulo antenal. En los glomérulos, las ORNs hacen sinapsis con neuronas de segundo orden llamadas neuronas de proyección (PNs). Las PNs son la salida del lóbulo antenal, y proyectan hacia los cuerpos pedunculados y el cuerno lateral, determinando un siguiente paso de procesamiento de la información olfatoria e integración con otras modalidades sensoriales.

Además de las ORNs y las PNs, el circuito glomerular incluye un importante número de interneuronas llamadas neuronas locales (LNs) (ver Figura 3). Las LNs son activadas directamente por las ORNs, la mayoría son GABAérgicas y en consecuencia, son la fuente principal de inhibición en el circuito glomerular. Se considera que las LNs contribuyen a modular la representación de los estímulos olfatorios en el lóbulo antenal³⁰.

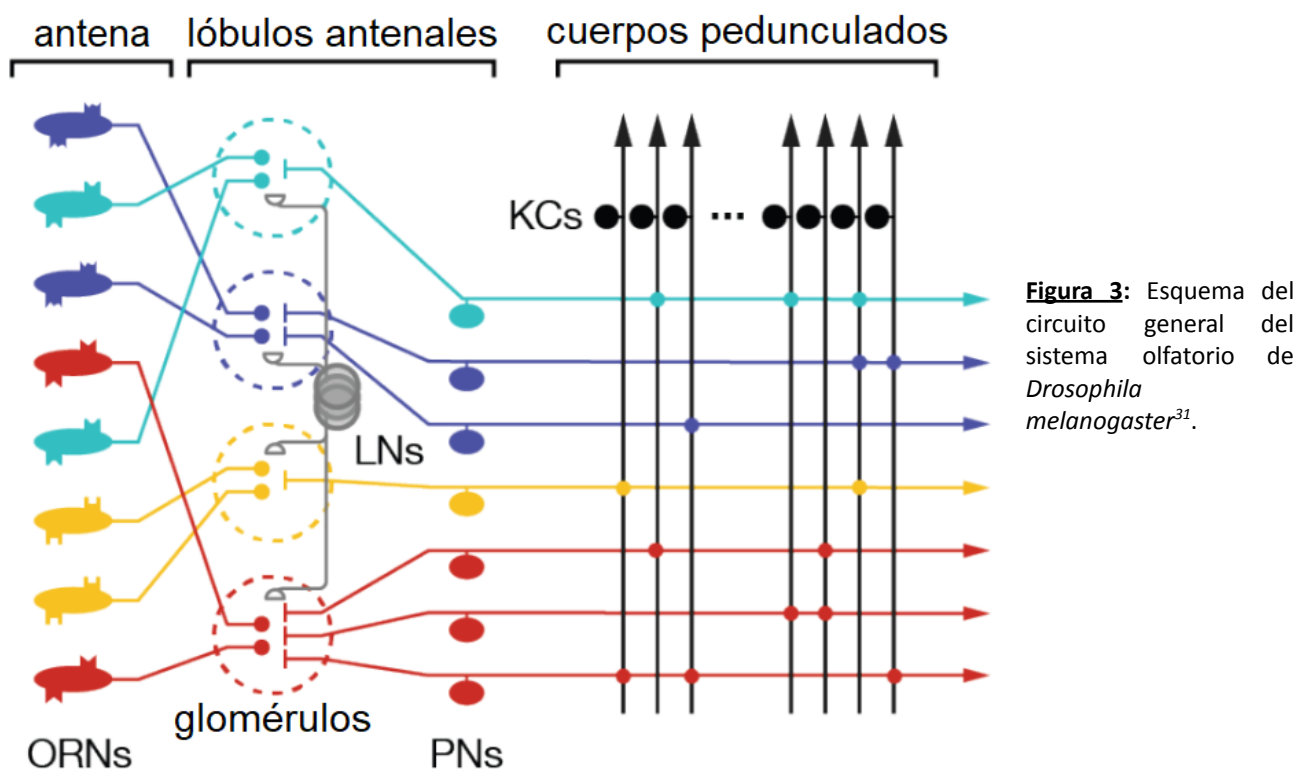


Figura 3: Esquema del circuito general del sistema olfatorio de *Drosophila melanogaster*³¹.

Se sabe que los cuerpos pedunculados tienen un importante rol en el aprendizaje asociativo olfativo y están involucrados en la consolidación de la memoria. Se ha observado en hormigas y abejas que los cuerpos pedunculares actúan como detectores de coincidencias, integrando inputs multisensoriales³² y creando así asociaciones novedosas, lo que reafirma su papel en el aprendizaje y la memoria³³. Trabajos recientes también muestran evidencia de la participación de los cuerpos pedunculados en comportamientos olfativos innatos por medio de de interacciones

con el cuerno lateral^{34,35}.

3.3. Efecto de la valencia de los estímulos olfatorios

Los estímulos olfatorios que activan el sistema son los portadores de la información para la cual el sistema olfatorio evolucionó, para detectar y otorgarle significado. En esencia se trata de moléculas simples o complejas, singulares o mezclas, cuyo poder informante reside en su identidad química, es decir, en qué átomos las componen, cuántos son y qué organización espacial presentan. Los estímulos olfatorios u odorantes se caracterizan por ser moléculas volátiles. Varios factores del medio ambiente pueden modificar la volatilidad de un compuesto y cómo este interactúa con el medio, como la temperatura, la humedad, la presión o las corrientes de aire³⁶. Los odorantes se propagan por el aire formando plumas de olor. La dinámica de las mismas está determinada por un componente de difusión por gradiente, por el cual los odorantes se trasladan de una región de mayor concentración a una de menor concentración, y por un componente estocástico, turbulento, generado por los movimientos del aire³⁷.

En entornos naturales, una fuente de alimento como puede ser una fruta, emite múltiples compuestos volátiles. En su mayoría, en la naturaleza los estímulos se encuentran presentes como mezclas complejas de múltiples componentes. Trabajos clásicos han demostrado que los compuestos químicos volátiles asociados con la fermentación, como etanol, ácido acético, etil acetato y acetaldehídos, tanto de manera individual como en mezclas son atractivos para múltiples especies de moscas *Drosophila*^{38,39,40}. Trabajos más recientes han identificado diferentes compuestos asociados al mango como fuente de atracción⁴¹ y especialmente a los llamados odorantes clave como la fuente de información más relevante de las mezclas emitidas por las fuentes de comida.

La valencia de los odorantes es de vital importancia para los animales ya que estos van a guiar su comportamiento y en consecuencia van a impactar directamente en sus posibilidades de supervivencia y en sus posibilidades de dejar descendencia. En moscas se ha observado que el procesamiento de la información multisensorial en los cuerpos pedunculados y el cuerno lateral es clave para determinar la valencia de los estímulos y en determinar el comportamiento frente a esos estímulos. Según cómo sea el procesamiento las moscas se verán atraídas, repelidas o serán indiferentes a los diversos estímulos y sus combinaciones. Es importante estudiar la valencia a nivel comportamental de los distintos estímulos, no solo para identificar los odorantes que tienen mayor relevancia en guiar el comportamiento de las moscas, sino también para entender la codificación de las valencias en los centros de procesamiento más profundos del sistema olfatorio. Asimismo comprender el nivel de plasticidad de estos centros de procesamiento y la consolidación de memorias en los mismos a través del aprendizaje puede resultar sumamente interesante. En esta tesis nos proponemos estudiar potenciales cambios en la valencia de odorantes mono-moleculares en moscas adultas cuando estas son criadas durante todo su desarrollo en alimento suplementado con odorantes de valencias diferentes.

4. Hipótesis

El entorno olfativo al cual los animales son expuestos durante el desarrollo modula la respuesta innata en individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.

4.1. Objetivos

- 1) Poner a punto un protocolo y un dispositivo experimental para el estudio de la atracción olfativa de individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.
- 2) Evaluar si la exposición a un odorante durante el desarrollo altera la valencia innata asociada a dicho estímulo. Las moscas fueron criadas en comida con y sin odorantes agregados y se evaluó si la valencia asociada a los componentes individuales se vio alterada.

5. Materiales y métodos

5.1. Mantenimiento de stocks

En este trabajo se utilizaron dos líneas salvajes de moscas *Drosophila melanogaster*, *Berlin* y *Canton S*, que tenemos en el stock del laboratorio. Todas las moscas utilizadas en este trabajo fueron criadas en condiciones controladas de luz:oscuridad (12:12 hs), temperatura (25°C) y humedad. Los animales fueron mantenidos en viales y botellas y alimentados con comida estándar a base de polenta, agar, azúcar y levadura. En todos los experimentos utilizamos animales adultos, machos y hembras, que tuvieran entre 3 a 10 días de edad, excepto en una serie de experimentos realizados para poner a punto el paradigma comportamental donde se utilizaron animales de edades menores. Se utilizaron animales adultos de este rango de edad con el objetivo de asegurarnos el correcto desarrollo de sus sistemas fisiológicos post eclosión. Se realizaron recolecciones diarias de los stocks utilizados, tanto para los experimentos de evaluación de preferencia como para mantenimiento de los stocks. Esta práctica nos permitió controlar de manera precisa la edad de los distintos animales utilizados.

Para los experimentos de puesta a punto del paradigma comportamental se utilizó la línea *WT Berlin*. Posteriormente, para evaluar el efecto del entorno químico asociado al medio de cría en la preferencia por los odorantes se optó por trabajar con moscas *WT Canton S*. Se decidió cambiar de línea porque *Canton S* es más utilizada que *Berlin* históricamente en experimentos de etología, por lo tanto se cuenta con más bibliografía al respecto.

5.2. Estímulos olfativos

En todos los experimentos se utilizaron odorantes mono moleculares. Un punto muy importante de estos experimentos es la valencia innata asociada a cada odorante, por lo tanto en estos experimentos fueron utilizados odorantes que en moscas se corresponden con distintas valencias asociadas a los diferentes estímulos. Para elegir los estímulos y las concentraciones a evaluar, utilizamos como guía las valencias innatas ya publicadas de diferentes odorantes por Knaden et al. en 2012¹¹. En dicho trabajo, evaluaron la preferencia innata de *Drosophila melanogaster* a un gran número de odorantes presentados en una dilución 1/100 en agua destilada. Los odorantes utilizados en esta tesis fueron ácido propiónico (valencia apetitiva), isoamil acetato (valencia neutra) y benzaldehído y 1-octanol (valencia aversiva). Todos los odorantes utilizados fueron adquiridos de la empresa *Euma* (Buenos Aires, Argentina).

Dado que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del entorno olfativo durante el desarrollo, se agregó el odorante al alimento estándar de polenta en distintas concentraciones durante la preparación del mismo, cuando el alimento aún permanecía en estado líquido por la temperatura de la cocción. Esto permitió que el odorante se incorpore a la comida donde eran criados los animales (ver Tabla 1). Las moscas fueron expuestas a uno de los distintos odorantes durante todo su desarrollo, desde el estadio de huevo hasta la fase de evaluación del experimento entre 3 y 10 días luego de la eclosión del adulto.

Odorante	Concentración en medio de cría	Viabilidad	Concentración en evaluación
Ácido propiónico	4/1000	✓	1/100
Benzaldehído	4/1000	✗	-
	2/1000	✗	-
	1/1000	✓	1/100
			1/1000
1/10000	✓	-	
1-octanol	4/1000	✗	-
	2/1000	✗	-
	1/1000	✓	1/1000
	1/10000	✓	-
Isoamil acetato	1/1000	✓	1/1000

Tabla 1: Resumen de distintos odorantes agregados al medio de cría y utilizados durante la fase de evaluación. Se probaron distintas concentraciones y se evaluó la viabilidad de los animales en dichos medios. El símbolo ✓ denota que las moscas pudieron ser criadas en ese medio sin causar mortalidad. Por otro lado, el símbolo ✗ denota que las moscas no prosperaron en el medio debido a la alta mortalidad, y esas concentraciones no fueron utilizadas en los experimentos.

5.3. Dispositivo experimental

Con el objetivo de evaluar el efecto que tiene el entorno olfativo durante el desarrollo sobre la valencia de un olor en el adulto, realizamos experimentos comportamentales utilizando un dispositivo que nos permitió evaluar la preferencia de los animales frente a los diferentes estímulos olfatorios. En cada grupo de experimentos evaluamos el efecto de criar a las moscas en presencia (condición experimental) o ausencia de los diferentes odorantes (condición control).

Como dispositivo experimental, utilizamos una cámara de evaluación, modificada a partir de Knaden et al.¹¹, que fue realizada en acrílico y con las siguientes dimensiones, 14 cm de largo, 6 cm de ancho y 9 cm de alto, dando un volumen interno aproximado de 750 ml (ver Figura 4). Utilizamos este material debido a su transparencia y facilidad de lavado, asegurándonos que luego de cada experimento los odorantes presentes en la cámara fueran eliminados. La cámara no era hermética, contaba con una abertura en la tapa por donde se podían introducir las moscas. Para cerrar la abertura se utilizaron tapones de goma espuma que permitieron el intercambio gaseoso con el medio. Dentro de la cámara de evaluación se colocaron dos pequeños frascos de vidrio (volumen 30 ml) que funcionaron como trampas. En la tapa de estos pequeños frascos se insertó un tip de pipeta amarillo con la punta recortada a un diámetro aproximado de 2 mm. Estas dimensiones y forma facilitó la entrada de las moscas a la trampa pero dificultó su salida (ver Figura 4).

En cada una de las trampas se colocaron 200 μ l de una solución de agua destilada con 0,2 μ l de Triton X-100 (concentración final de 1/1000). Una de las trampas, la control, contenía únicamente esta solución. La trampa experimental incluía en la solución el odorante a evaluar, en diferentes concentraciones dependiendo del experimento.



Figura 4: Imagen de una cámara de evaluación. Se puede observar dentro de la cámara los dos frascos-trampa de vidrio con un tip de entrada. En la tapa de la cámara se observa la abertura con el tapón de goma espuma.

5.4. Protocolo experimental para evaluar el efecto del entorno olfativo

Se comenzó criando de manera diferencial a dos grupos de moscas *Drosophila melanogaster*. Un grupo fue criado en alimento estándar de polenta sin agregado de odorante (control) y otro grupo fue criado en el mismo alimento pero con agregado de odorante (tratamiento) (ver Figura 5). Una vez que las botellas de cría presentaron pupas se vaciaron de individuos adultos. Se recolectaron hembras y machos adultos de entre 0 y 2 días post emergencia. Las moscas recolectadas fueron mantenidas, en grupos de 30 machos y 30 hembras separadamente, en el mismo medio de cultivo en el que fueron criadas (ver Figura 5), por lo tanto, la exposición (o no exposición) al odorante tuvo lugar durante todo su desarrollo embrionario y durante los primeros cinco a siete días de adulto. Dado que para la recolección los animales fueron anestesiados con CO₂, los 5 días post recolección fueron más que suficientes para recuperarse de la anestesia. Este paso fue importante ya que en casos donde no hubo suficiente recuperación se observó elevada mortalidad durante el experimento. Para dar inicio a un experimento, un total de aproximadamente 60 moscas adultas (30 machos y 30 hembras) fueron introducidas en una cámara de evaluación (ver Figura 5). En cada experimento se utilizaron cuatro cámaras

simultáneamente. Las cámaras experimentales fueron trasladadas a una incubadora y mantenidas durante 24 hs. La ubicación y direccionalidad de las cámaras de evaluación y en consecuencia la de los frascos-trampa se varió aleatoriamente dentro de la incubadora. Con el objetivo de maximizar la relevancia del sistema sensorial olfativo los experimentos fueron realizados en oscuridad constante. Para un mejor control de la humedad y para evitar contaminación de la incubadora con los odorantes, se introdujeron las cámaras dentro de recipientes plásticos (*tuppers*) grandes, transparentes y con contenedores con agua en el interior para aportar humedad. Al finalizar las 24 hs en la incubadora se dio por finalizado el experimento y se retiraron las cámaras para contabilizar el número de animales en cada cámara y en los frascos-trampa. Primero se contó el número de moscas muertas fuera de los frascos-trampa. Estas fueron descontadas del número total de moscas para los análisis ya que no pudimos determinar en qué momento del experimento murieron. Las cámaras fueron llevadas luego a un freezer para anestesiar a las moscas. Una vez anestesiadas se contabilizó la cantidad de moscas dentro de cada frasco trampa y aquellas que no ingresaron a ninguna de las trampas. También se registró el sexo de las mismas.

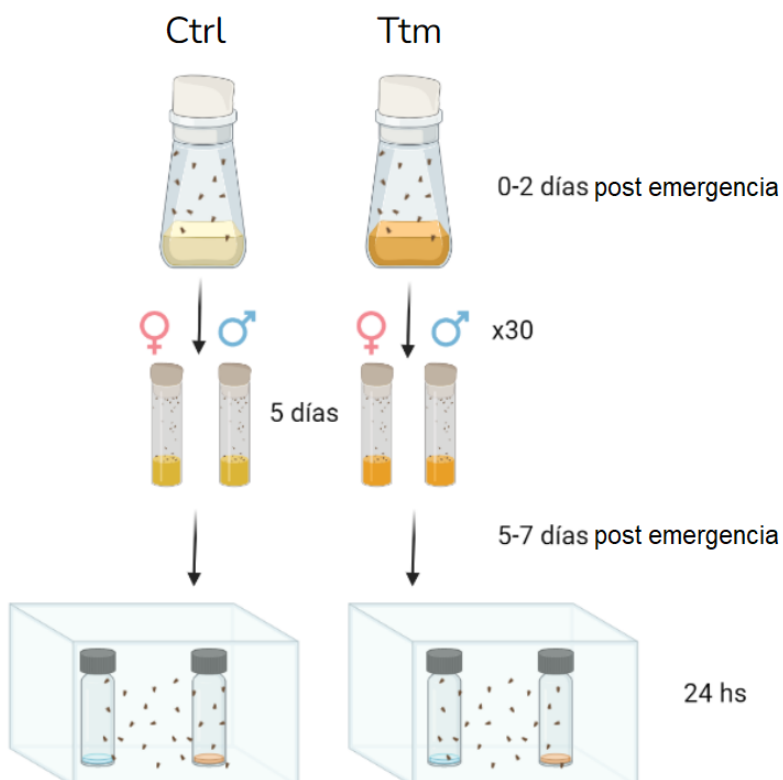


Figura 5: Esquema del protocolo. Se comienza con la cría diferencial, se crían dos grupos experimentales, el control (*Ctrl*) sin agregado de odorante y el tratamiento (*Ttm*) con agregado de odorante. Se hace una recolección de individuos adultos de entre 0-2 días post-emergencia. Se los lleva a un medio igual al que fueron criados. Cuando los individuos tienen entre 5-7 días post-emergencia son evaluados en las cámaras durante 24 hs. Las cámaras contienen dos frascos-trampa, uno con solución vehículo y otro con agregado de odorante.

5.5. Análisis de los datos y estadística

Debido al tipo de experimentos realizados, de cada experimento obtenemos un número de moscas en cada una de las dos trampas y también cuántas quedaron fuera de ellas. A partir de estos datos se calcularon cuatro índices diferentes de apetitividad (IA_n), los cuales permiten cuantificar la preferencia que presentaron las moscas por los odorantes utilizados. Los índices utilizados fueron los siguientes:

$$IA1 = \frac{\# \text{moscas } ttm - \# \text{moscas } ctrl}{\# \text{moscas } ttm + \# \text{moscas } ctrl} \quad IA2 = \frac{\# \text{moscas } ttm - \# \text{moscas } ctrl}{\# \text{moscas } vivas \text{ totales}}$$
$$IA3 = \frac{\# \text{moscas } ttm}{\# \text{moscas } vivas \text{ totales}} \quad IA4 = \frac{\# \text{moscas } ttm + \# \text{moscas } ctrl}{\# \text{moscas } vivas \text{ totales}}$$

Donde *#moscas ttm* corresponde al número de moscas que entraron al frasco conteniendo el odorante en el cual fueron criadas (tratamiento), *#moscas ctrl* corresponde al número de moscas que entraron al frasco conteniendo sólo la solución vehículo (control) y *#moscas vivas totales* representa la suma de las moscas que entraron a las dos trampas (*#moscas ttm* y *#moscas ctrl*) más el número de moscas que no ingresó a ningún frasco y que se encontraban vivas a tiempo final del experimento, es decir el número total de moscas evaluadas en el experimento. Los índices 1 y 2 oscilan entre 1 y -1, siendo 1 la representación del valor máximo de apetitividad, -1 el valor máximo de aversividad y 0 el valor de preferencia neutra. El índice 3 oscila entre 1 y 0, siendo 1 la representación del valor máximo de apetitividad y 0 el valor máximo de aversividad. Sin embargo, debido a cómo es calculado, el índice 3 no es útil para observar valencias neutras. Por último, el índice 4, como el 3, oscila en 1 y 0, dando 1 cuando todas las moscas ingresaron a los viales y 0 cuando ninguna mosca ingresó a un vial.

De los cuatro índices, para el análisis de los datos, los índices de apetitividad 2 y 4 fueron considerados los más relevantes, ya que recogen de manera más precisa la variabilidad de la información recolectada en este tipo de experimentos. El índice 2 se diferencia del índice 1, pues incluye en su cálculo el número de moscas que no ingresaron a ninguna de las trampas, y del índice 3, pues le da más peso al número de moscas que ingresaron al frasco conteniendo sólo la solución vehículo, dando una mejor perspectiva de la potencial valencia aversiva de los odorantes utilizados.

Para el ordenamiento y almacenamiento de los datos se utilizó Google Sheets y Excel. Todos los gráficos confeccionados para esta tesis y las pruebas estadísticas correspondientes fueron efectuadas utilizando el software de estadística GraphPad Prism 8. Los gráficos presentados son boxplots indicando la mediana, primer y tercer cuartil, mínima y máxima, a no ser que se indique lo contrario. En todos los casos se consideró un *p valor* < 0,05 como diferencias significativas. Para todas las pruebas estadísticas se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los datos se muestran como media \pm error estándar de la media, a menos que se indique lo contrario.

Para el análisis comparativo de los índices de apetitividad, si se cumplió normalidad y homocedacia, se efectuó una prueba t de Student. Si no cumplió normalidad se optó por una prueba no paramétrica, la prueba de Mann-Whitney. Y si cumplió normalidad pero no homocedacia se hizo una prueba t de Student con corrección de Welch. Para el análisis de los índices de apetitividad según el sexo se efectuó un ANOVA de dos factores con comparaciones *a posteriori* de Tukey, donde el sexo fue un factor y el tratamiento otro. Estas pruebas fueron útiles para observar diferencias entre tratamientos. Además, para todos los casos donde se analizó el

índice de apetitividad 2, se hicieron pruebas de t de una muestra (caso paramétrico) comparando la media de los datos contra una media hipotética de 0 o pruebas de Wilcoxon (caso no paramétrico) comparando la mediana de los datos contra una mediana hipotética de 0. De esta manera pudimos observar si las valencias de los odorantes se diferenciaban significativamente del valor esperado para una valencia neutra.

6. Resultados

6.1. Puesta a punto del paradigma comportamental

Para la puesta a punto se crió a las moscas durante todo su desarrollo en medio estándar de polenta con agregado de ácido propiónico en concentración de 4/1000, la cual es la concentración estándar en el medio de cría que se utiliza en nuestro laboratorio. La concentración de ácido propiónico como odorante en el frasco-trampa fue 1/100.

En los primeros experimentos las moscas fueron evaluadas el mismo día en que habían sido recolectadas y anestesiadas. Resultó evidente que las moscas no debían ser sometidas al paradigma sin un tiempo para adecuada recuperación de la anestesia de CO₂, pues en dicho caso observamos un elevado porcentaje de mortalidad ($28,48 \pm 5,91$, n=3) que se redujo significativamente cuando se dejó a los animales recuperarse por al menos dos días ($6,96 \pm 1,92$, n=24).

Inicialmente no se contaba con acceso a una incubadora que permitiera controlar la luz, y por lo tanto los experimentos se hicieron en condición de “luz:oscuridad no controlada”, en la cual las cámaras de evaluación fueron dejadas durante 24 hs sobre la mesada del laboratorio con luz natural. A partir de que tuvimos acceso a una incubadora se pudo experimentar en condiciones de “luz:oscuridad controlada”. Las cámaras fueron dejadas durante 24 hs dentro de la incubadora con un ciclo luz:oscuridad de 12:12 sincronizado con el de las incubadoras donde eran criadas las moscas. Por último, también experimentamos en condición de “oscuridad constante”, en la cual las cámaras fueron dejadas por 24 hs en oscuridad constante dentro de la incubadora. Para todos estos experimentos se utilizaron moscas con al menos 2 días de recuperación de la anestesia

(promedio de 4,5 días de recuperación) y de entre 3 y 10 días de edad como mosca adulta. Se evaluó la preferencia de las moscas por el odorante ácido propiónico en una concentración de 1/100 en las distintas condiciones lumínicas (ver Figura 6).

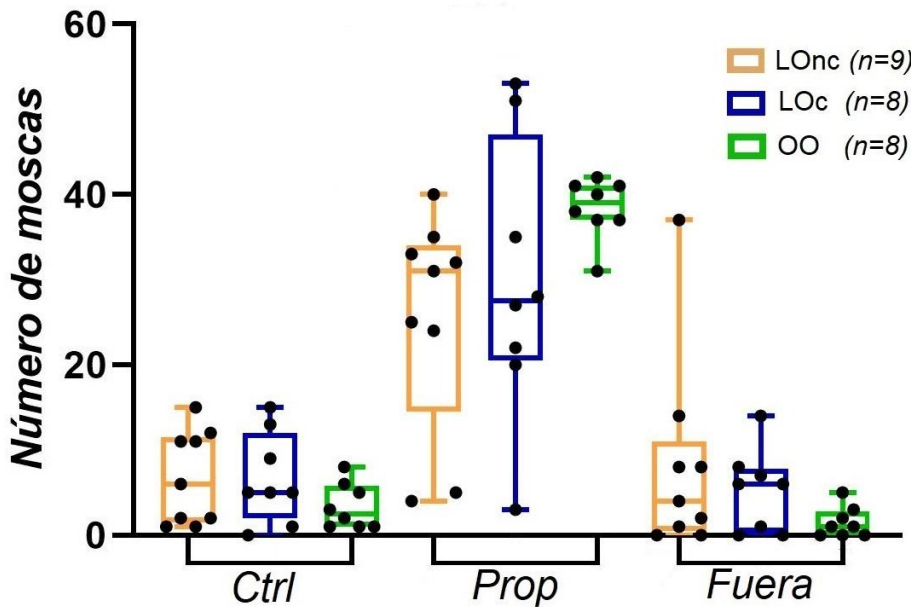


Figura 6: Número de moscas que ingresaron en cada frasco trampa para las distintas condiciones lumínicas. *LONc* corresponde a la condición de luz:oscuridad no controlada. *LOc* corresponde a la condición de luz:oscuridad controlada. *OO* corresponde a la condición de oscuridad constante. *Ctrl* corresponde al frasco control, *Prop* al frasco conteniendo ácido propiónico 1/100 y *Fuera* al número de moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos. Promedio de número de moscas totales a tiempo final = $42 \pm 1,41$.

Como se observa en la Figura 6, en las tres condiciones lumínicas las moscas *WT Berlin* ingresan más al frasco conteniendo ácido propiónico que al frasco conteniendo la solución vehículo. La preferencia innata se mantiene sin importar la condición lumínica. Se observa además un efecto de la condición lumínica, en oscuridad constante las moscas se comportan de manera más consistente, lo que se refleja en una menor dispersión de los datos. Las moscas entran más al frasco *tratamiento* en relación a las otras dos condiciones de luz.

Para analizar los resultados que se obtienen de estos experimentos calculamos diferentes índices de apetitividad. Se evaluaron tres índices (IA1 / IA2 / IA3) para determinar cuál resulta mejor descriptor del comportamiento y que nos permitiera detectar preferencias por olores. Se calcularon y graficaron tres IA para cada una de las condiciones lumínicas.

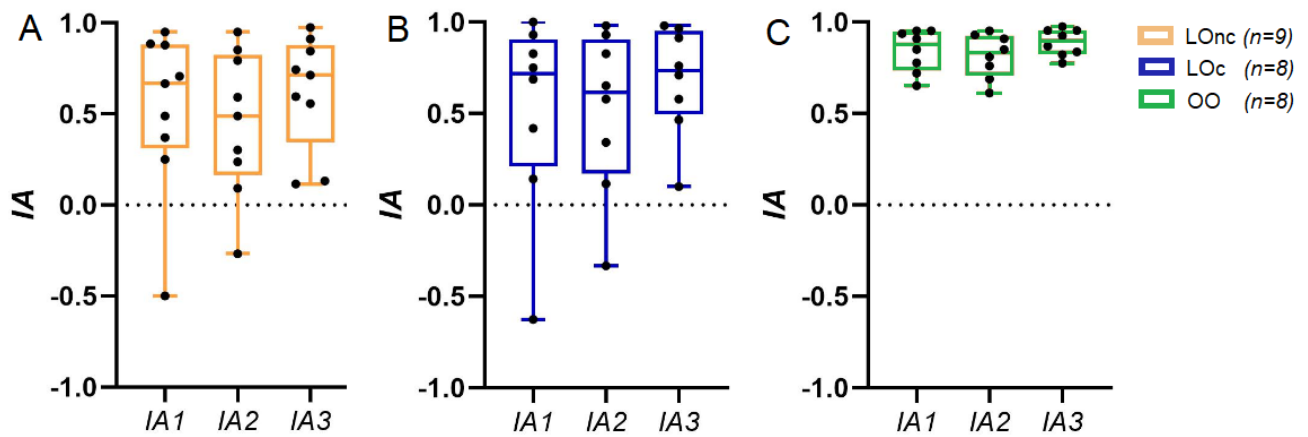


Figura 7: Tres índices propuestos para los diferentes tratamientos lumínicos. (A) Para la condición de luz:oscuridad no controlada (LOnc). (B) Para la condición de luz:oscuridad controlada (LOc). (C) Para la condición de oscuridad constante (OO).

No se observan diferencias significativas entre índices dentro de cada tratamiento (ANOVA de una vía). Además no se observaron diferencias significativas entre los desvíos estándar (ver Figura 7). Luego de analizar los valores de los distintos índices y evaluar lo que cada índice representa, decidimos trabajar en adelante con el índice 2, ya que este índice utiliza todos los datos crudos que se obtienen de los experimentos y por lo tanto describe mejor el comportamiento de las moscas, además de que es el índice más utilizado por la comunidad de neuroetología^{9,10,11}.

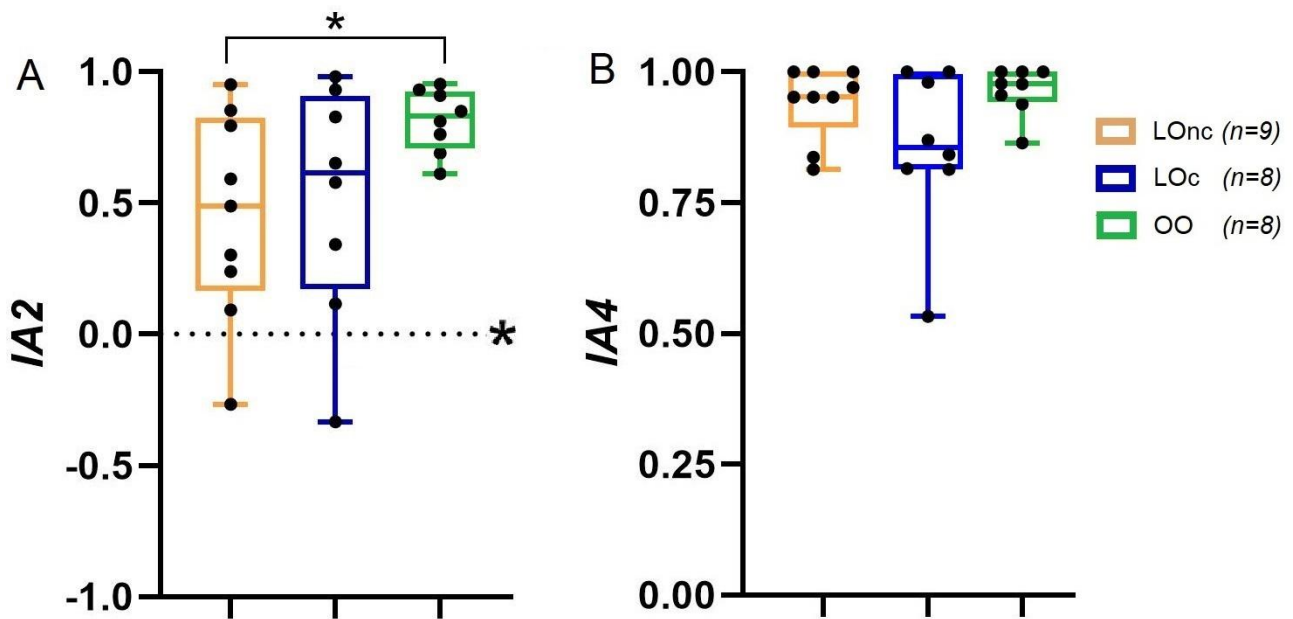


Figura 8: Índices de apetitividad 2 y 4 para las tres condiciones lumínicas. *LOnc* corresponde a la condición de luz:oscuridad no controlada, *LOc* corresponde a la condición de luz:oscuridad controlada y *OO* corresponde a la condición de oscuridad constante. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos *LOnc* y *OO* (p valor = 0,0263). El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas con una media hipotética de 0, esto se observó para las tres condiciones (Prueba de t de una muestra, p valor < 0,05).

El IA2 promedio en la condición *luz:oscuridad no controlada* fue de 0,45; el promedio en condición de *luz:oscuridad controlada* fue de 0,51 y el promedio en condición de *oscuridad constante* fue de 0,81. Además se observó una disminución en la varianza para las determinaciones realizadas en oscuridad constante. Para la Figura 8A se hizo una prueba ANOVA de Brown-Forsythe y Welch y se vió que al menos una condición de luz difería del resto de manera significativa (p valor = 0,0360). La comparación múltiple *a posteriori* de Tamhane's T2 aportó que la diferencia significativa residía entre los tratamientos de *luz:oscuridad no controlada* y *oscuridad constante* (p valor = 0,0263). Al comparar el IA2 medio de cada tratamiento con una media hipotética de 0 se observó diferencias significativas en todos los casos (Prueba de t de una muestra, p valor < 0,05), por lo tanto, sin importar la condición lumínica hay una clara preferencia por el frasco-trampa conteniendo ácido propiónico.

No nos pareció correcto comparar el IA4 con los otros índices en la Figura 7 ya que este da

igual peso al número de moscas que ingresan al frasco con odorante y a las que ingresan al frasco control, y por lo tanto no nos habla de una preferencia por el odorante como si lo hacen los otros índices. Sin embargo, nos pareció interesante agregarlo al análisis ya que permite observar la propensión de las moscas a explorar los frascos. El IA4 mostró que en la condición de oscuridad constante casi todas las moscas ingresaron a uno u otro frasco, pocas moscas quedan fuera de las trampas (ver Figura 8B).

Los resultados observados hasta aquí validan el paradigma comportamental y el análisis propuesto ya que los mismos son consistentes con la literatura previa que indica al ácido propiónico como olor atractante. En adelante decidimos utilizar la condición de oscuridad constante para los experimentos con el objetivo de priorizar la modalidad sensorial olfativa. Además, quedamos conformes con la decisión de utilizar los índices de apetitividad 2 y 4, con los que se continuará evaluando el comportamiento de atracción hacia olores, y la modulación del mismo mediante tratamientos durante la cría.

6.2. Evaluación del efecto del entorno químico durante el desarrollo en la preferencia por odorantes

Una vez finalizada la puesta a punto del paradigma comportamental, avanzamos con los experimentos que nos permitieran poner a prueba nuestra hipótesis de trabajo. Nos preguntamos si diferencias en el entorno químico durante el desarrollo pueden modular la preferencia de individuos adultos por distintos odorantes.

6.2.1. Evaluación de la preferencia por ácido propiónico

Comenzamos evaluando la preferencia de las moscas por un odorante reconocidamente apetitivo, ácido propiónico. A un grupo de moscas se lo crió en medio con agregado de ácido propiónico en concentración 4/1000 y al otro grupo en el mismo medio pero sin el agregado de ácido propiónico. Se optó por la concentración de 4/1000, que es la concentración normalmente utilizada en la cría de moscas para estimular la oviposición. Se evaluó, mediante el paradigma comportamental, si la preferencia por ácido propiónico en concentración 1/100 fue diferente entre los tratamientos.

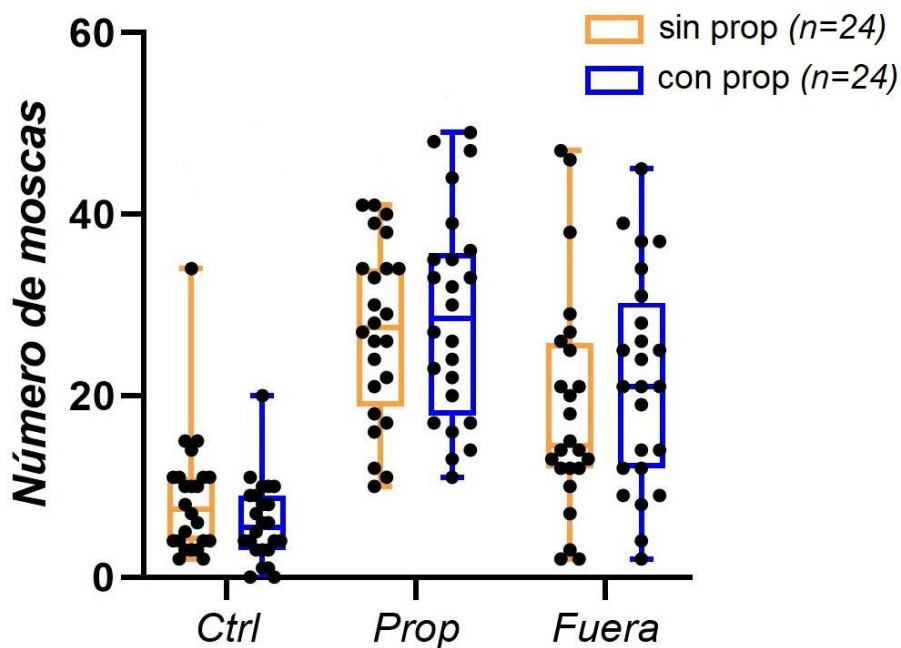


Figura 9: Número de moscas que ingresaron en cada frasco-trampa para las distintas condiciones de cría. *Ctrl* corresponde al frasco control, *Prop* al frasco conteniendo ácido propiónico 1/100 y *Fuera* al número de moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos. Promedio de número de moscas totales a tiempo final = $56 \pm 1,53$.

Al contabilizar el número de moscas que ingresaron a cada uno de los frascos-trampa se observó una clara preferencia de las moscas por el frasco conteniendo el odorante ácido propiónico por sobre el frasco control (ver Figura 9). Esto se observó para ambas condiciones de cría. El haber criado a las moscas en comida con ácido propiónico no parece modificar la valencia positiva que tiene este odorante para estos animales, es decir que la observada atracción hacia el ácido propiónico no es debido a la exposición durante el desarrollo.

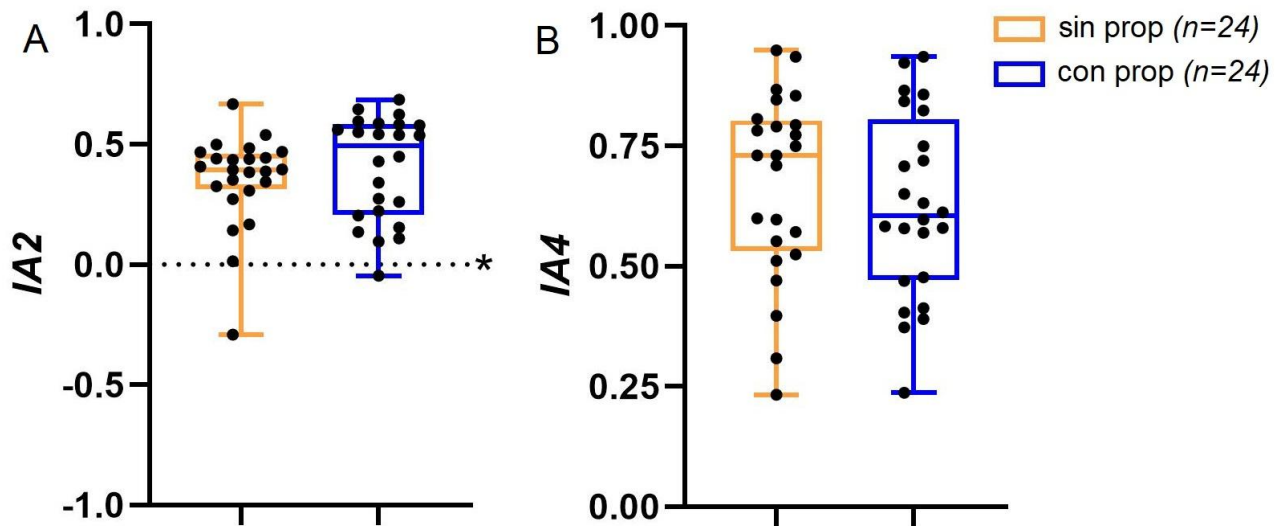


Figura 10: Índices de apetitividad 2 y 4 del ácido propiónico para las dos condiciones de cría, evaluando la preferencia por ácido propiónico 1/100. El asterisco adyacente a la línea punteada en el gráfico A denota diferencias significativas respecto a una mediana hipotética de 0 (Prueba de Wilcoxon de una muestra, *p* valor < 0,05). Promedios: $IA2 (sin) = 0,35 \pm 0,04$; $IA2 (con) = 0,40 \pm 0,04$; $IA4 (sin) = 0,67 \pm 0,04$; $IA4 (con) = 0,62 \pm 0,04$.

Al calcular los IA2 se obtuvieron valores de valencia apetitiva (ver Figura 10A). Al comparar las medianas de los IA2 de cada tratamiento con una mediana hipotética de 0, para corroborar que el valor medio daba significativamente distinto a un valor de valencia neutra, se observó que en ambos casos dio diferencias significativas, indicando que el odorante resultó apetitivo para las moscas de ambos tratamientos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, *p* valor < 0,05). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el IA2 ni para el IA4. Es decir que a pesar del tratamiento las moscas tuvieron un comportamiento similar en cuanto a su preferencia por el odorante y su propensión a ingresar a los frascos-trampa (ver Figura 10B).

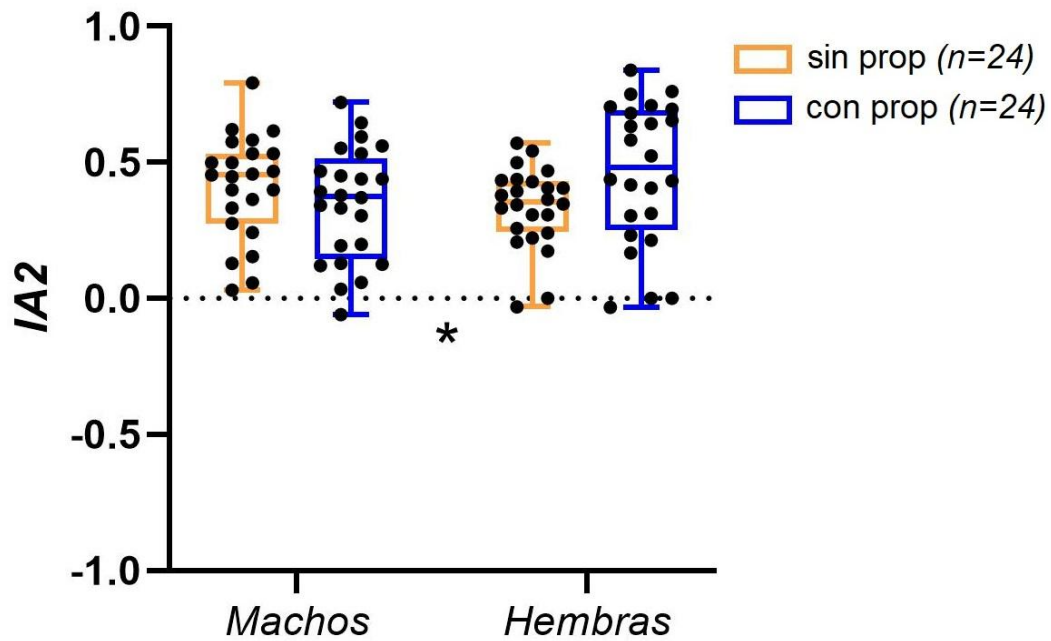


Figura 11: Índice de apetitividad 2 para las dos condiciones de cría según el sexo, evaluando la preferencia por ácido propiónico 1/100. El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas respecto a una mediana hipotética de 0 para ambos sexos en los dos tratamientos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, p valor < 0,05).

La Figura 11 muestra los resultados de un análisis discriminado para machos y hembras. Al realizar un ANOVA de dos vías se observó una interacción significativa entre el tratamiento y el sexo (p valor < 0,05). Sin embargo, al analizar si hubo diferencias estadísticas entre sexo dentro de un mismo tratamiento, mediante comparaciones *a posteriori* de Tukey, no se observaron diferencias significativas. Machos y hembras mostraron la misma preferencia por el odorante independientemente de la condición de cría. En todos los casos el IA2 fue positivo y distinto de cero (Prueba de Wilcoxon de una muestra, p valor < 0,05). Si bien no hay un correlato con la significancia en la estadística, las hembras mostraron una tendencia a mayor preferencia por el odorante cuando fueron criadas en él (p valor = 0,1582). Esto se refleja en los promedios observados, 0,33 para las hembras criadas en ausencia de odorante y 0,46 para hembras criadas en presencia de ácido propiónico.

6.2.2. Evaluación de la preferencia por benzaldehído

A continuación se evaluó la preferencia de las moscas por benzaldehído, el cual es un odorante descrito como de valencia aversiva a concentración de 1/100¹¹. Para ello, moscas fueron criadas en medio con agregado de benzaldehído en concentración 1/1000 o en el mismo medio pero sin agregado del odorante. En un primer grupo de experimentos se crió a las moscas en concentraciones más altas pero las mismas resultaron letales (ver Tabla 1). 1/1000 resultó ser la concentración no letal más alta. En la primera evaluación de preferencia por benzaldehído utilizamos un frasco-trampa que contenía una concentración de 1/100 del odorante versus un frasco-trampa sin odorante.

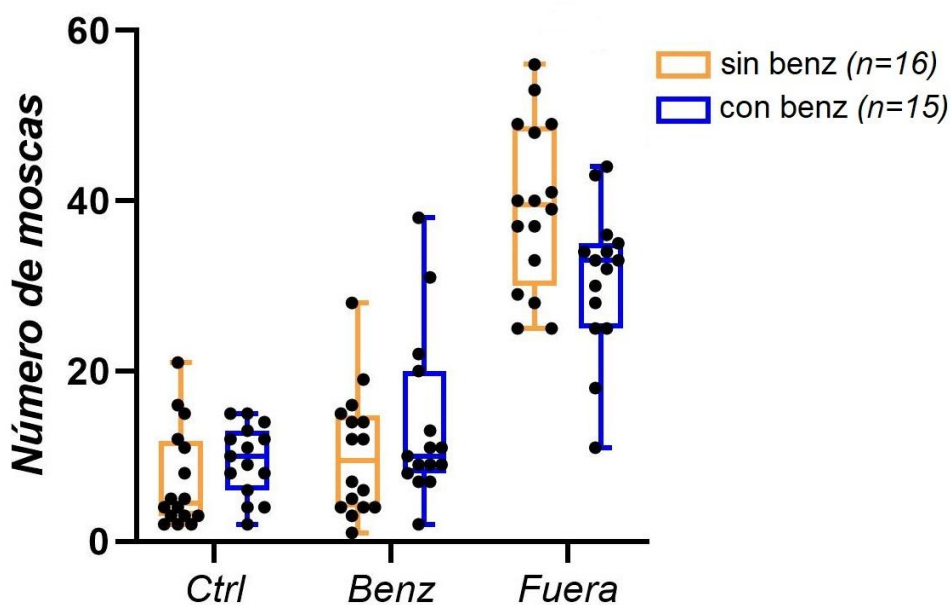


Figura 12: Número de moscas que ingresaron en cada frasco trampa para las distintas condiciones de cría. *Ctrl* corresponde al frasco control, *Benz* al frasco conteniendo benzaldehído 1/100 y *Fuera* al número de moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos. Promedio de número de moscas totales a tiempo final = $55 \pm 0,71$.

En la Figura 12 se observa que el benzaldehído en concentración de 1/100 no resultó atractivo para las moscas *Canton S* como si lo fue el ácido propiónico. Este resultado es coherente con lo reportado por Knaden (2012)¹¹, en cuyo trabajo observan que benzaldehído es aversivo a concentración 1/100. En nuestro trabajo observamos que el número de moscas que ingresaron al frasco conteniendo el odorante no fue diferente del número de moscas que ingresaron al frasco

control, lo que sugiere que, en nuestras condiciones experimentales, el odorante sería neutro para las moscas. Al ser criadas en medio con agregado del odorante, mayor cantidad de moscas ingresó a los frascos-trampa. El gran número de moscas que quedó fuera de los frascos en ambos tratamientos sugiere un patrón de comportamiento exploratorio alterado por la presencia del odorante.

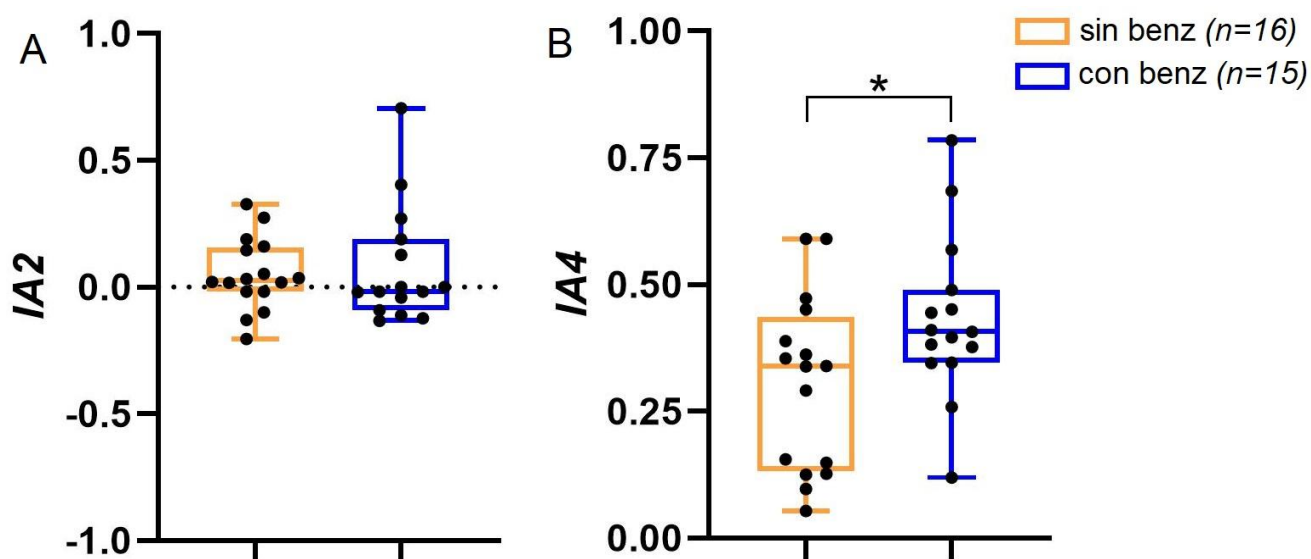


Figura 13: Índices de apetitividad 2 y 4 para las dos condiciones de cría, evaluando la preferencia por benzaldehído 1/100. Se observaron diferencias significativas en el IA4 entre los tratamientos (Prueba de t no pareada, p valor < 0,05). Promedios: IA2 (sin) = $0,05 \pm 0,04$; IA2 (con) = $0,08 \pm 0,06$; IA4 (sin) = $0,30 \pm 0,04$; IA4 (con) = $0,43 \pm 0,04$.

Los IA2 calculados dieron cercanos a 0 para ambos tratamientos por lo cual no hubo diferencias significativas respecto al valor esperado para un odorante de valencia neutra. Si bien no se obtuvieron diferencias significativas entre los IA2 de cada tratamiento, hubo algunas repeticiones del experimento en que se obtuvieron tendencias de aumento de la preferencia en moscas criadas con benzaldehído (ver Figura 13A). La Figura 13B muestra el IA4 para cada tratamiento. Las moscas criadas en el medio con benzaldehído ingresaron más a los frascos-trampa que las moscas criadas en medio sin benzaldehído (Prueba de t no pareada, p valor < 0,05), sugiriendo un cambio en el patrón exploratorio.

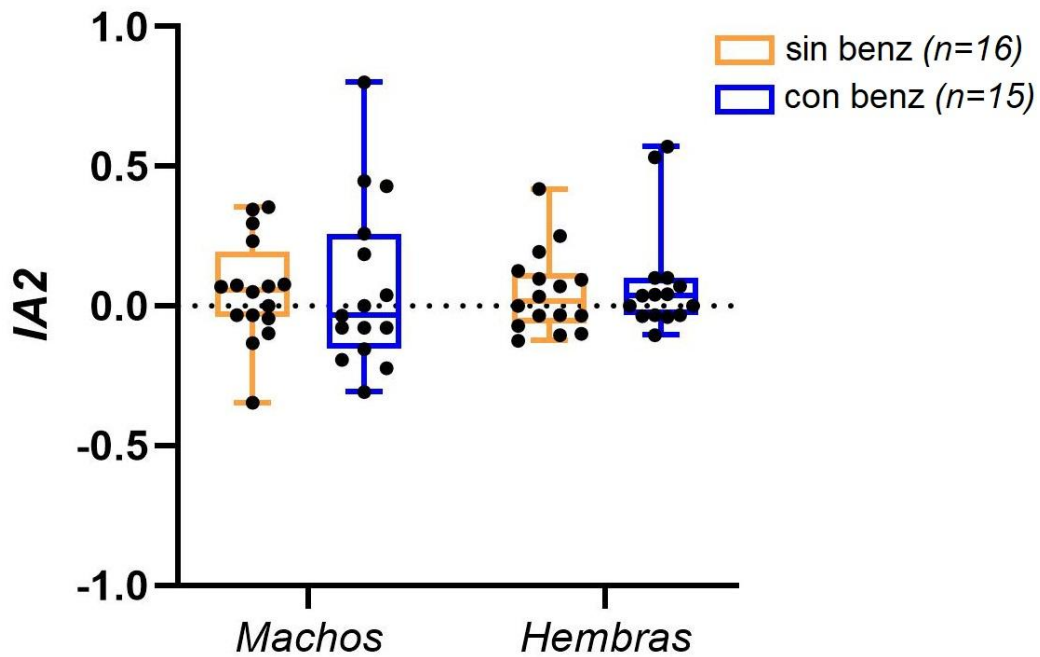


Figura 14: Índice de apetitividad 2 para las dos condiciones de cría según el sexo, evaluando la preferencia por benzaldehído 1/100. No se observaron diferencias significativas ni comparando con un valor hipotético de 0 ni entre tratamientos.

Como se observa en la Figura 14, no hay diferencias entre sexos dentro de un mismo tratamiento ni diferencias entre tratamientos para un mismo sexo.

En un segundo grupo de experimentos se mantuvo la concentración de cría con benzaldehído en 1/1000 pero la concentración de evaluación se redujo a 1/1000. Se optó por igualar las concentraciones de cría y de evaluación porque consideramos que las dos concentraciones utilizadas en la sección anterior podrían estar siendo percibidas como olores cualitativamente distintos.

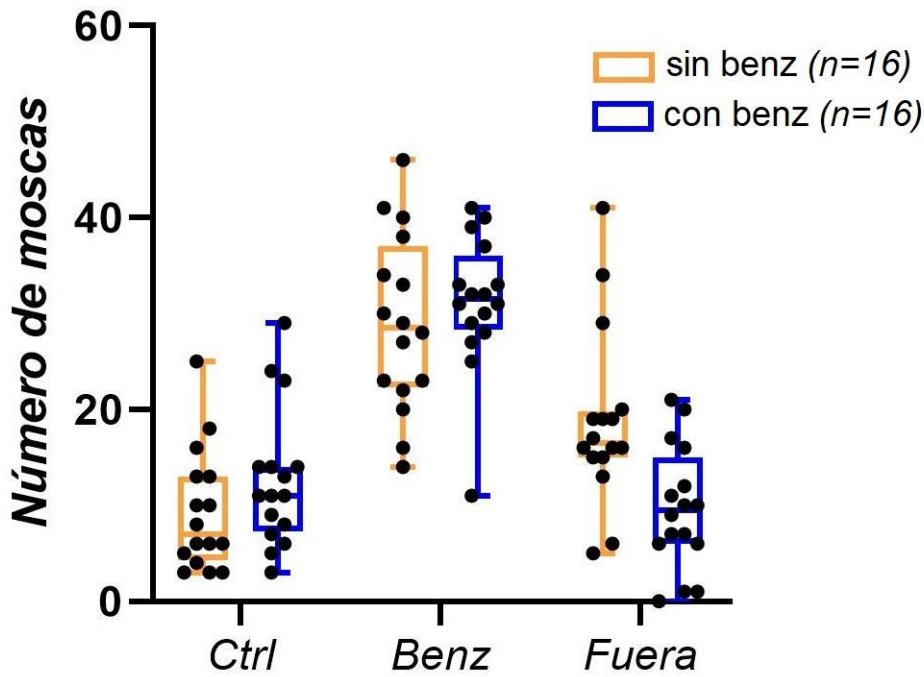


Figura 15: Número de moscas que ingresaron en cada frasco-trampa para las distintas condiciones de cría. *Ctrl* corresponde al frasco control, *Benz* al frasco conteniendo benzaldehído 1/1000 y *Fuera* al número de moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos. Promedio de número de moscas totales a tiempo final = $55 \pm 0,79$.

Al reducir la concentración de benzaldehído durante la fase de evaluación en un factor de 10 se observó un cambio en la preferencia de las moscas por el odorante respecto a lo observado en la Figura 12. Como se observa en la Figura 15, la cantidad de moscas que ingresaron a los frascos conteniendo el odorante fue superior a la cantidad de moscas que ingresaron al frasco control. Este efecto se observó para ambas condiciones de cría. Al igual que para la evaluación con benzaldehído 1/100, observamos que el número de moscas que quedó fuera de los frascos-trampa fue menor en el grupo criado con benzaldehído. Estos datos fortalecen la idea de la importancia que tiene la concentración de los odorantes en determinar su valencia.

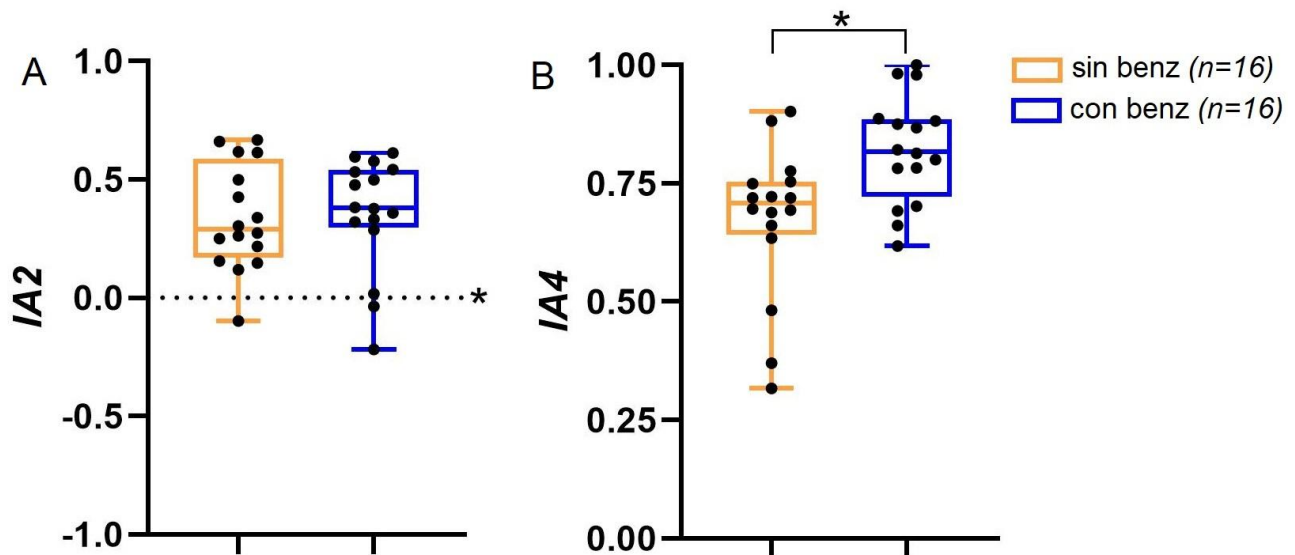


Figura 16: Índices de apetitividad 2 y 4 para las dos condiciones de cría, evaluando la preferencia por benzaldehído 1/1000. El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas con una media hipotética de 0, esto se observó para los dos tratamientos (Prueba de t de una muestra, p valor < 0,05). Se observaron diferencias significativas en el IA4 entre los tratamientos (Prueba de t no pareada, p valor < 0,05). Promedios: IA2 (sin) = $0,34 \pm 0,06$; IA2 (con) = $0,35 \pm 0,06$; IA4 (sin) = $0,67 \pm 0,04$; IA4 (con) = $0,82 \pm 0,03$.

Los IA2 toman valores positivos y significativamente mayores a 0 lo cual indica una valencia apetitiva del compuesto a esa concentración (ver Figura 16A). Si bien no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el IA2, se pudo observar un efecto del tratamiento en el IA4 (ver Figura 16B), el cual indica que un menor número de moscas quedó fuera de los frascos (Prueba de t no pareada, p valor < 0,05). Dicho resultado es interpretado como un mayor comportamiento exploratorio en las moscas criadas con benzaldehído.

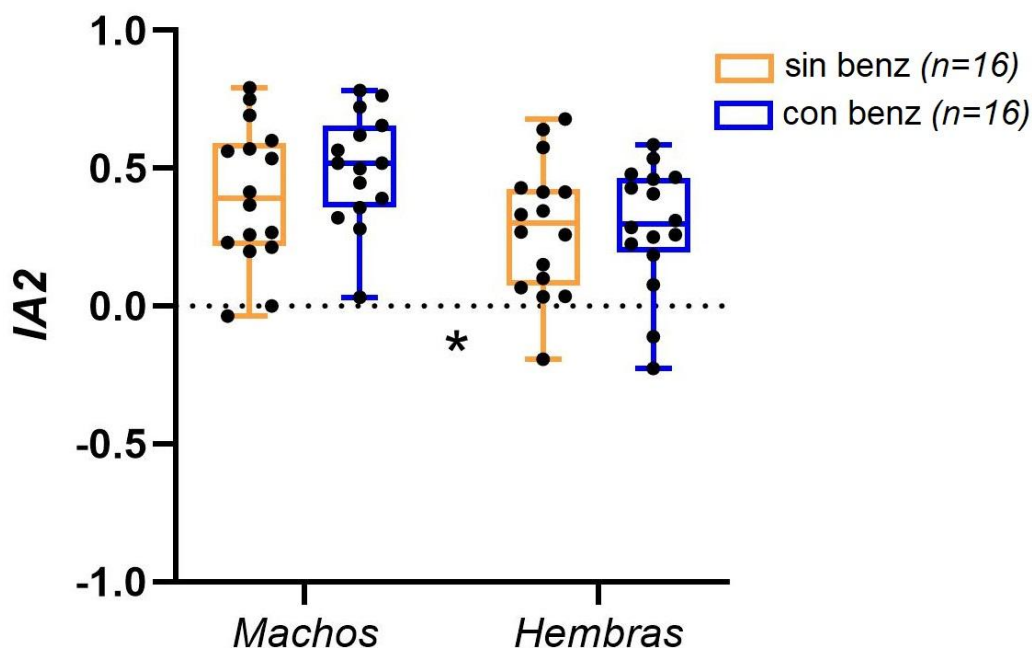


Figura 17: Índice de apetitividad 2 para las dos condiciones de cría según el sexo, evaluando la preferencia por benzaldehído 1/1000. El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas con una mediana hipotética de 0, esto se observó para los dos tratamientos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, p valor < 0,05).

La Figura 17 muestra los resultados de un análisis discriminado para machos y hembras, para el que se realizó un ANOVA de dos vías, donde se observó un efecto significativo del sexo de los animales (p valor < 0,05) pero no del tratamiento. Sin embargo, como se observa, con las comparaciones *a posteriori* no se observaron diferencias significativas en la atracción hacia benzaldehído entre sexos ni un efecto diferencial del tratamiento. Tanto para machos como para hembras las medianas de los IA2 resultaron significativamente diferentes de 0, por lo tanto el odorante resultó ser de valencia positiva (Prueba de Wilcoxon de una muestra, p valor < 0,05).

6.2.3. Evaluación de la preferencia por 1-octanol

En esta sección evaluamos si es posible modular la valencia de otro odorante que ha sido descrito como aversivo. Optamos por evaluar la preferencia por 1-octanol, odorante que a concentración 1/100 resulta aversivo según Knaden (2012)¹¹. Tal como hicimos con benzaldehído,

probamos diferentes concentraciones de 1-octanol en el medio de cría (ver Tabla 1) en búsqueda de la concentración más alta no letal, que resultó ser 1/1000. Como en los experimentos anteriores, un grupo fue criado en medio sin agregado del odorante y otro en medio con agregado del odorante 1-octanol en concentración 1/1000. Posterior a la cría, se evaluó la preferencia de las moscas adultas por 1-octanol en concentración 1/1000.

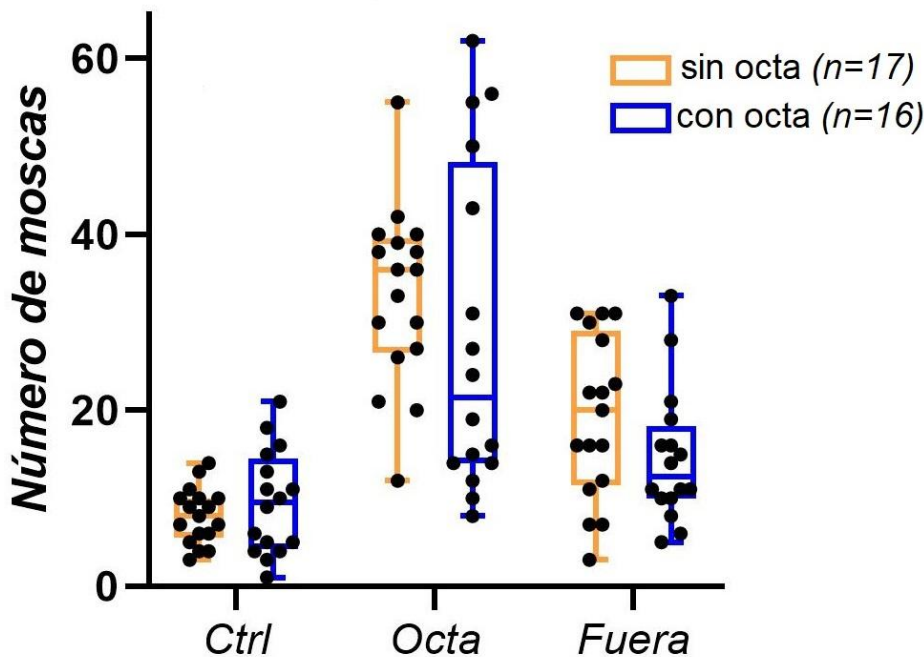


Figura 18: Se grafica el número de moscas que ingresaron en cada frasco trampa para las distintas condiciones de cría. *Ctrl* corresponde al frasco control, *Octa* al frasco conteniendo 1-octanol 1/1000 y *Fuera* al número de moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos. Promedio de número de moscas totales a tiempo final = $56 \pm 2,21$.

Se observa en la Figura 18 que 1-octanol en concentración 1/1000 generó en las moscas una propensión a dirigirse a la fuente del odorante. Tal como se observó para benzaldehído, un odorante descrito como aversivo a concentración de 1/100, resultó ser apetitivo en nuestras condiciones experimentales y a concentración 1/1000 (ver Figura 16A). Para ambas condiciones de cría, el número de moscas que ingresaron al frasco conteniendo 1-octanol fue superior al número de moscas que ingresaron en el frasco control. A diferencia de lo observado en la evaluación con benzaldehído, no hubo tanta diferencia entre tratamientos para las moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos (ver Figura 15), aunque se observa que quedan menos moscas fuera cuando son criadas con 1-octanol, esto no es más que una leve tendencia.

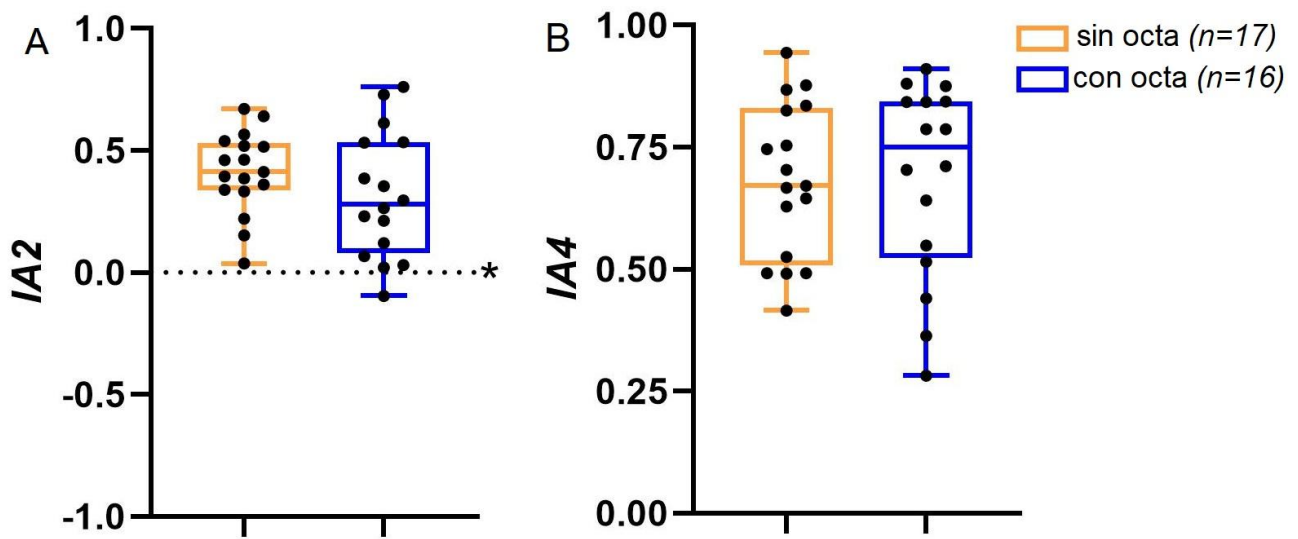


Figura 19: Índices de apetitividad 2 y 4 para las dos condiciones de cría, evaluando la preferencia por 1-octanol 1/1000. El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas con una media hipotética de 0, esto se observó para los dos tratamientos (Prueba de t de una muestra, p valor $< 0,05$). Promedios: $IA2$ (sin) = $0,41 \pm 0,04$; $IA2$ (con) = $0,32 \pm 0,07$; $IA4$ (sin) = $0,68 \pm 0,04$; $IA4$ (con) = $0,69 \pm 0,05$.

Los IA2 resultaron positivos para 1-octanol en concentración de 1/1000 para ambos tratamientos (Prueba de t de una muestra, p valor $< 0,05$), sugiriendo que en estas condiciones de cría y evaluación el odorante 1-octanol es apetitivo (ver Figura 19A). Por otro lado, según se observa en la Figura 19B, el IA4 tampoco fue distinto entre tratamientos, lo cual indica que en este caso, el hecho de criar a las moscas en el odorante no tuvo efecto sobre la actividad exploratoria.

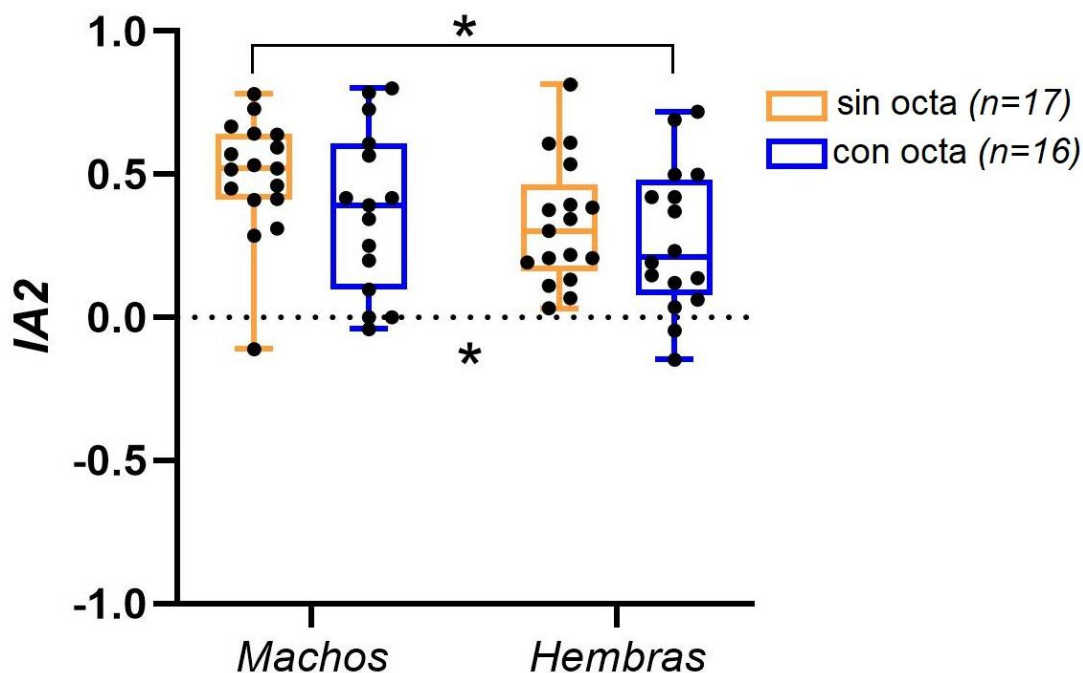


Figura 20: Índice de apetitividad 2 para las dos condiciones de cría según el sexo, evaluando la preferencia por 1-octanol 1/1000. El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas con una media hipotética de 0, esto se observó para los dos tratamientos (Prueba de t de una muestra, p valor < 0,05). Se observaron diferencias significativas entre machos criados sin 1-octanol y hembras criadas con 1-octanol (Comparaciones de Tukey, p valor < 0,05)

Para la Figura 20 se realizó un ANOVA de dos vías y se observó un efecto significativo del sexo de los animales (p valor < 0,05). El análisis de los IA2 discriminado por sexo muestra diferencias significativas entre machos criados sin odorante y hembras criadas con odorante (Comparaciones de Tukey, p valor < 0,05) lo cual denota una diferencia subyacente entre sexos.

En todos los casos las medias de los índices de apetitividad dieron significativamente superiores a una media hipotética de 0, por lo tanto categorizamos al odorante como uno de valencia positiva a concentración 1/1000 (Prueba de t de una muestra, p valor < 0,05).

Cuando el análisis se hizo entre tratamientos dentro de un mismo sexo no se vieron diferencias significativas. Tanto en machos como en hembras se observa una leve tendencia a una disminución en la preferencia por 1-octanol al ser criados en medio con agregado del mismo (ver

Figura 20).

6.2.4. Evaluación de la preferencia por isoamil acetato

Por último evaluamos si las condiciones de cría afectan la preferencia de las moscas por isoamil acetato, odorante descrito en la literatura como neutro a una concentración de 1/100¹¹. Nos resultó interesante analizar el efecto sobre un odorante neutro ya que *a priori* pensamos que podría ser más fácil de modular su valencia hacia la atractividad como a la aversividad. Se evaluó la preferencia de las moscas por isoamil acetato luego de criar a un grupo de moscas en medio sin agregado del odorante y a otro grupo en el mismo medio pero con agregado de isoamil acetato en concentración 1/1000. Durante la fase de evaluación se evaluó la preferencia por isoamil acetato en concentración 1/1000.

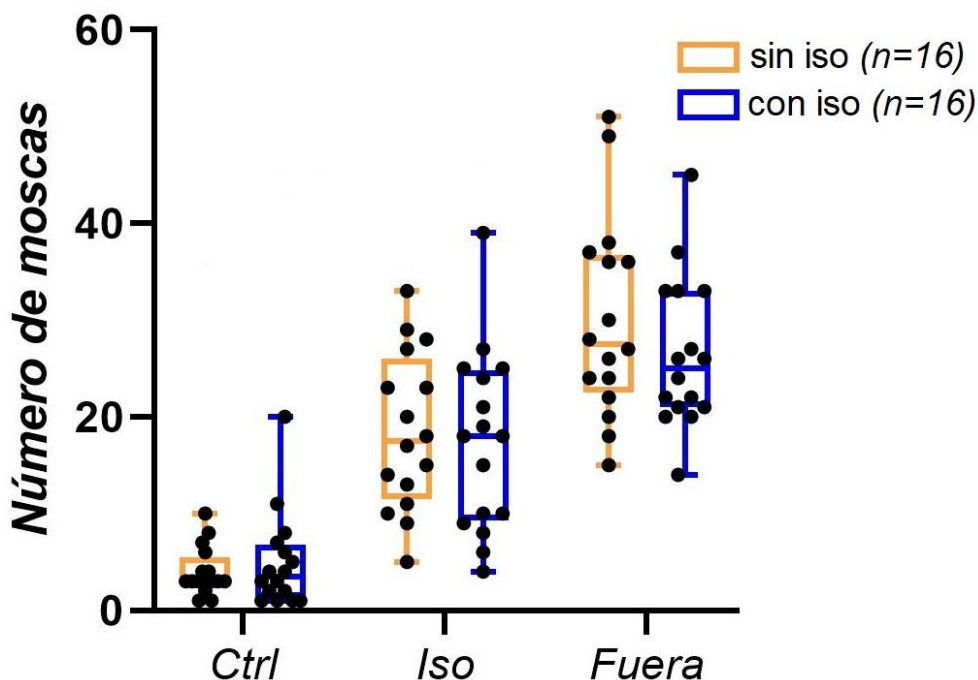


Figura 21: Número de moscas que ingresaron en cada frasco trampa para las distintas condiciones de cría. *Ctrl* corresponde al frasco control, *Iso* al frasco conteniendo isoamil acetato 1/1000 y *Fuera* al número de moscas que no ingresaron a ninguno de los frascos. Promedio de número de moscas totales a tiempo final = $51 \pm 1,21$.

En la Figura 21 se observa que a concentración de 1/1000 el isoamil acetato resultó apetitivo para las moscas. Tanto para las moscas que fueron criadas en ausencia del odorante como en

presencia del mismo, se vieron diferencias en el número de moscas que ingresaron al frasco control respecto a las que ingresaron al frasco con el odorante. A diferencia de los odorantes previamente evaluados, el número de moscas que quedó fuera de los frascos fue en muchos casos superior al número de moscas que ingresaron a uno u otro frasco. No parece haber diferencias entre los tratamientos.

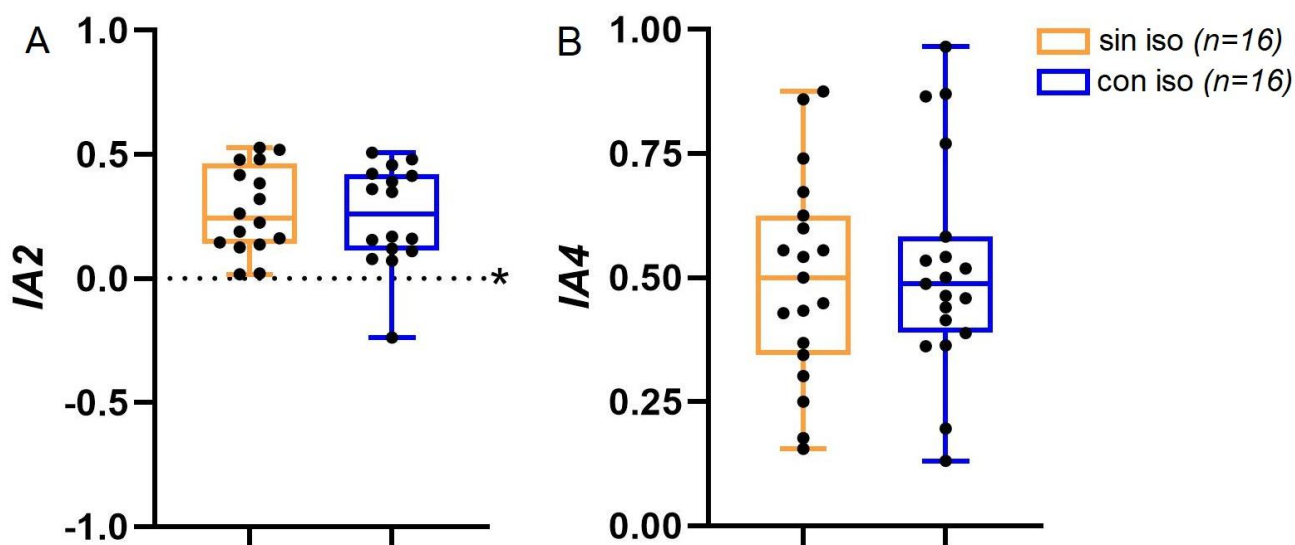


Figura 22: Índices de apetitividad 2 y 4 para las dos condiciones de cría, evaluando la preferencia por isoamil acetato 1/1000. El asterisco adyacente a la línea punteada denota diferencias significativas con una mediana hipotética de 0, esto se observó para los dos tratamientos (Prueba de Wilcoxon de una muestra, p valor < 0,05). Promedios: $IA2$ (sin) = $0,29 \pm 0,04$; $IA2$ (con) = $0,29 \pm 0,05$; $IA4$ (sin) = $0,50 \pm 0,05$; $IA4$ (con) = $0,52 \pm 0,05$.

Los IA 2 revelan para ambos tratamientos que isoamil acetato en concentración 1/1000 resultó apetitivo para las moscas (ver Figura 22A). Para ambos tratamientos se obtuvieron diferencias significativas respecto a una mediana hipotética de 0 (Prueba de Wilcoxon de una muestra, p valor < 0,05). Por otro lado, los valores del IA4 resultaron bajos para lo que se venía observando en los odorantes previamente evaluados. Para ambos tratamientos, en promedio, solo el 50% de las moscas entró a los frascos (ver Figura 22B), sugiriendo una menor actividad exploratoria de los frascos-trampa. El isoamil acetato fue el odorante que generó menor atraktividad de todos los que resultaron apetitivos.

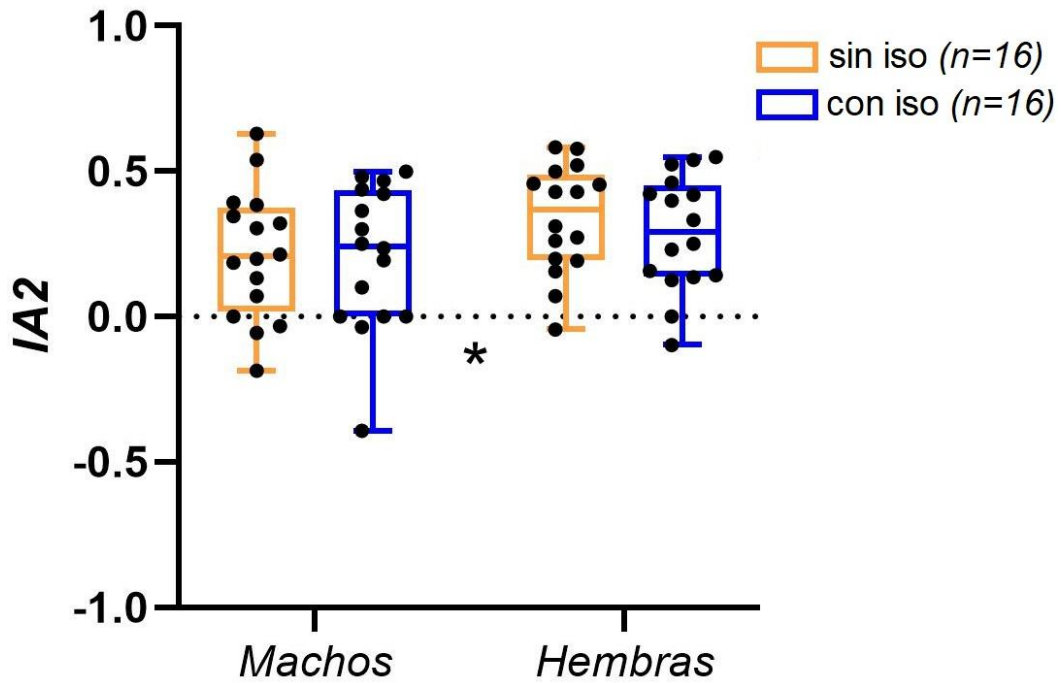


Figura 23: Índice de apetitividad 2 para las dos condiciones de cría según el sexo, evaluando la preferencia por isoamil acetato 1/1000. El asterisco adyacente a la línea punteada denota que hubo diferencias significativas con una media hipotética de 0, esto se observó para los dos tratamientos (Prueba de t de una muestra, p valor < 0,05).

Para la Figura 23 se realizó un ANOVA de dos vías, el análisis de los resultados discriminado por sexo tampoco mostró diferencias significativas ni entre sexos, ni en el efecto del tratamiento.

7. Discusión

Puesta a punto mediante, con el uso de las cámaras de evaluación, pudimos evaluar con éxito la preferencia de *Drosophila melanogaster* por odorantes de diferentes valencias y tener la suficiente resolución para discernir diferencias entre sexos. Pudimos demostrar que el entorno olfativo al cual los animales son expuestos durante el desarrollo es capaz de modular la respuesta innata en individuos adultos, principalmente evidenciamos el efecto del tratamiento en un aumento en el comportamiento exploratorio de los animales. No se observaron efectos del tratamiento en cuanto a la preferencia propiamente dicha de las moscas por los diferentes odorantes, demostrando la robustez de la valencia al tratamiento. Esto no era lo que esperábamos, creíamos que el tratamiento tendería a aumentar la preferencia por el odorante, ya que durante la etapa de desarrollo larval y vida adulta temprana de las moscas, el odorante se presentaba estrechamente asociado al substrato del cual las moscas se alimentan. Creíamos que el modelo biológico con el cual trabajamos se comportaría de manera similar a lo observado con otros modelos, como *Apis mellifera*^{22,23,24}, pero no fue así, las moscas parecen tener menor plasticidad ante este tipo de aprendizajes. Si bien los experimentos realizados por Tully en 1994²¹ demuestran que larvas de tercer estadio de *Drosophila* pueden formar memorias ante un condicionamiento aversivo clásico, nuestro condicionamiento apetitivo no tuvo el mismo efecto en cuanto a preferencias por odorantes, lo que sugiere que podrían ser más efectivos tratamientos que modulen una valencia hacia la aversividad que unos que modulen hacia la apetitividad. Creemos que, como *Drosophila melanogaster* es un animal generalista, es decir que es una especie que puede desarrollarse en diversos ambientes utilizando una amplia variedad de recursos, tiene sentido biológico y ecológico que las valencias por los odorantes sean robustas y difíciles de modular hacia la apetitividad, ya que de esta manera evitan la especialización a unos pocos nichos.

7.1. Puesta a punto del paradigma comportamental

Al enfrentarnos con la puesta a punto del paradigma hubo algunas variables que requirieron mayor atención que otras. Una de ellas fue el tiempo de anestesia por medio de CO₂ y la recuperación del mismo. Se observó que una breve exposición al CO₂, no mayor a 15 minutos, y una adecuada recuperación de la anestesia, de al menos 24 hs, es importante para evitar una alta tasa de mortalidad durante el ensayo de preferencia. En los casos que esto no se cumplió no solo se observaron tasas de mortalidad altas durante la fase de evaluación sino que los índices de apetitividad resultaron menores a los esperados para ácido propiónico según lo observado por Knaden¹¹. Se sugiere que la anestesia por CO₂ podría estar afectando la capacidad de ingresar a los frascos-trampa, probablemente por una reducción en la motricidad, una modificación en la percepción del odorante o una modificación en la respuesta al mismo, aunque no profundizamos en este tema. Creemos que lo más probable es que los animales deben precisar alimentarse para recuperarse bien de la anestesia, la recuperación implicaría un alto desgaste metabólico.

Se pudo observar que la concentración del odorante agregado al medio de cría tenía un fuerte impacto en la tasa de mortalidad de las moscas durante la etapa de cría (ver Tabla 1). Es por esto que sugerimos explorar otras maneras de agregado del odorante al medio de cría, como por ejemplo, mediante el agregado de un papel embebido en solución con odorante, o mediante un flujo constante de aire con odorante. Quizás de esta manera se logre criar a las moscas en concentraciones mayores a las que nosotros logramos criar, ya que al agregar el odorante directamente en el alimento, las moscas lo van a estar ingiriendo y las podría estar intoxicando, generando cambios en su comportamiento habitual o llevándolas en última instancia a la muerte.

La otra variable que se exploró fue la de la condición de luz:oscuridad. Al plantear tres

condiciones de luz:oscuridad diferentes queríamos encontrar la mejor condición para nuestros experimentos. Si bien la condición de luz:oscuridad controlada en un ciclo de 12:12 era la que respetaba el ciclo circadiano, decidimos que la condición de oscuridad constante era la mejor, pues le confiere una mayor relevancia a la modalidad sensorial olfativa, que es nuestra variable de estudio y esto se vio confirmado principalmente por un desvío menor de los datos obtenidos (ver Figura 7). Creemos que en la condición de oscuridad constante estamos minimizando los estímulos visuales que puedan afectar el comportamiento de las moscas, aumentando la saliencia de los estímulos olfatorios y promoviendo que su comportamiento se vea principalmente guiado por dichos estímulos.

Durante la puesta a punto se evaluó la preferencia de las moscas *WT Berlin* por el ácido propiónico, odorante conocidamente apetitivo a concentración 1/100. Como los resultados fueron consistentes con lo observado por Knaden en 2012 y porque pudimos, al modular las variables, minimizar la mortalidad durante la fase de evaluación, se resolvió que la puesta a punto fue exitosa.

7.2. Evaluación del efecto del entorno químico durante el desarrollo en la preferencia por odorantes

7.2.1. Odorante apetitivo

Al evaluar la preferencia de las moscas *WT Canton S* por el ácido propiónico se observó que, efectivamente, a las moscas el odorante les resulta apetitivo, estas prefirieron en mayor número ingresar al frasco *tratamiento* por sobre el frasco *control*. Si bien no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, al disgregar los datos según el sexo se pudo observar una leve

tendencia en la cual las moscas hembras al ser criadas en medio con agregado del odorante parecen aumentar su preferencia por el mismo respecto a las hembras criadas en medio sin el agregado del odorante (ver Figura 11). Este posible aprendizaje diferencial podría estar relacionado a una relevancia biológica del odorante, ya que se sabe que el ácido propiónico es un estimulador de la oviposición.

Por otro lado, llamó la atención el gran número de moscas *WT Canton S* que no ingresaron a ninguno de los frascos, en muchos casos muy superior a lo observado previamente con las moscas *WT Berlin* (ver Figuras 6 y 9). Los índices de apetitividad 4 dieron menores a los calculados para *WT Berlin* reflejando la menor cantidad de moscas que optan por ingresar a los frascos-trampa (ver Figuras 8 y 10). Se decidió no efectuar análisis estadísticos para comparar el comportamiento de las moscas *WT Berlin* contra las *WT Canton S* ya que los experimentos se hicieron con muchos meses de diferencia (pandemia de por medio). Desde un principio el objetivo fue otro, no se buscaba comparar entre líneas de moscas. Sin embargo las diferencias en los IA son notorias y podrían ser atribuibles a diferencias genotípicas de las líneas *WT*.

7.2.2. Odorantes aversivos

Para los odorantes aversivos que evaluamos, el benzaldehído y el 1-octanol, pudimos observar que nuestros resultados no eran tal cual lo esperado por lo observado por Knaden (2012)¹¹ en cuanto a la preferencia por los mismos. Con la línea *WT Canton S* que trabajamos, en lugar de aversivos, los odorantes les resultaban neutros o apetitivos. Lo que se pensó es que esta diferencia con lo observado por Knaden et al. se podría deber a una diferencia en la línea *WT* utilizada, aunque no contamos con esta información ya que en su trabajo no reportan la línea que utilizan. Esta hipótesis estaría apoyada por la diferencia entre líneas *WT Berlin* y *Canton S*

observada en nuestro trabajo, donde se puede observar como varían los IA según la línea utilizada. Otras posibilidades sobre el por qué de las diferencias entre nuestras observaciones y las reportadas en Knaden et al., 2012, son, la diferente procedencia de los odorantes y los solventes de los mismos o diferencias en el diseño de la cámara de evaluación.

Al evaluar la preferencia de las moscas por el benzaldehído en dos concentraciones distintas, 1/100 y 1/1000, se destacó otro fenómeno interesante. Se observó cómo un mismo odorante puede tomar valencias distintas según la concentración. Al evaluar la preferencia por benzaldehído en concentración de 1/100 este resultó un odorante de valencia neutra para las moscas, sin embargo al reducir la concentración en un factor de 10 el odorante resultó claramente apetitivo (ver Figuras 13A y 16A). De esta manera se fortalece la idea de que cuando uno se refiere a la valencia de un odorante es importante hacer referencia a su vez a la concentración en la cual se encuentra ese odorante. Debido a estos resultados sugerimos que la manera óptima de realizar el tipo de experimentos llevados a cabo en esta tesis, de cría diferencial y evaluación de preferencia, es igualando la concentración de cría y de evaluación. Podría resultar interesante estudiar si a diferentes concentraciones ya hay diferencias en la codificación de un mismo odorante a nivel de los glomérulos en el lóbulo antenal o si las diferencias fundamentales radican a nivel de los cuerpos pedunculados o cuerno lateral.

En cuanto al efecto del tratamiento, esperábamos un cambio en la valencia de los odorantes, ya que creíamos que la asociación del odorante con la comida llevaría la valencia negativa a una positiva (o neutra), pero esto no fue lo que observamos. Un fenómeno interesante que se observó como efecto del tratamiento fue que las moscas al ser criadas en medio con agregado del odorante benzaldehído, quedan en menor número fuera de los frascos-trampa respecto a las criadas en

ausencia de odorante, es decir ingresan más a uno u otro frasco. Las moscas tienen su conducta exploratoria modificada, exploran más los frascos-trampa, lo que podría sugerir una mayor actividad de las moscas dentro de la cámara de evaluación en presencia del odorante conocido. Este fenómeno se observó evaluando la preferencia por benzaldehído, indistintamente de la concentración (ver Figuras 13B y 16B) y al evaluar 1-octanol se observó una leve tendencia (ver Figura 19B). Podría ser interesante para estos casos evaluar la actividad locomotora de las moscas mediante ensayos de actividad locomotora, como los sistemas DAM^{42,43,44} o *ethoscope*⁴⁵. *A priori* se espera que aquellas moscas que fueron criadas en medio con agregado del odorante, en presencia del mismo muestren una mayor locomoción que las moscas control.

El 1-octanol, a pesar de estar descrito como un odorante aversivo a concentración de 1/100¹¹, resultó apetitivo para las moscas en concentración de 1/1000 en nuestras condiciones experimentales. Particularmente más apetitivo para los machos que para las hembras cuando estos son criados en medio en ausencia del odorante (ver Figura 20). Al evaluar tanto benzaldehído como 1-octanol en concentración de 1/1000 se observó una leve diferencia, aunque no significativa para benzaldehído, en la preferencia de ambos sexos (ver Figuras 17 y 20). Para los dos odorantes se observó que los machos muestran medias de IA2 levemente superiores que las hembras, lo que nos llevó a preguntarnos si esta respuesta diferencial puede deberse a una relevancia biológica de los odorantes o si los machos tienen mayor tolerancia ante odorantes que a concentraciones más altas resultan aversivos.

7.2.3. Odorante neutro

El isoamil acetato ha sido categorizado como un odorante neutro para moscas en concentración de 1/100¹¹. Aún así se observó que la concentración de 1/1000 resultó apetitiva sin

importar el tratamiento (ver Figura 22A). De todos los odorantes que resultaron apetitivos en nuestras condiciones experimentales, el isoamil acetato mostró los promedios más bajos en sus índices de apetitividad 2. El índice de apetitividad 4 para isoamil acetato también fue más bajo que para otros odorantes, lo cual indica que en presencia de este odorante las moscas exploraron en menor medida los frascos-trampa (ver Figura 22B). *A priori* pensábamos que un odorante neutro tendría una valencia más fácil de modular, pero este no parece ser el caso, ya que de todos los tratamientos que realizamos con los distintos odorantes, el tratamiento de cría con isoamil acetato parece ser el menos efectivo.

7.2.4. Observaciones generales y futuras direcciones

Resulta interesante observar que todos los odorantes que evaluamos y que a concentraciones de 1/100 habían sido categorizados como odorantes aversivos o neutros, a menores concentraciones como 1/1000 mostraron tener valencia apetitiva, lo que abre preguntas acerca de si este fenómeno sucede en gran parte de los odorantes y qué relevancia o beneficio biológico podría tener. Además, a pesar de nuestros esfuerzos queda abierta la pregunta de qué odorantes serían de valencia más modulable y si existen características que estos odorantes comparten, como por ejemplo valencia o relevancia biológica. Nuestros resultados sugieren que odorantes neutros serían menos modulables que odorantes categorizados como apetitivos o aversivos a concentración de 1/100.

Respecto a nuestra línea de investigación, continuaremos evaluando mediante este paradigma comportamental un amplio espectro de odorantes a diversas concentraciones y categorizando sus valencias. Aspiramos a mejorar el agregado del odorante al medio de cría para evitar la alta mortalidad a altas concentraciones del odorante y la potencial intoxicación de los

animales, probablemente mediante un flujo de aire con odorante a concentración constante. También queremos acotar la ventana temporal en la cual las moscas son expuestas al odorante, y de esta manera identificar en qué estadio larval es posible modular el comportamiento del adulto. Además buscamos complementar estos experimentos de comportamiento con experimentos de microscopía de fluorescencia, para analizar cómo se modifica la codificación de los odorantes, por ejemplo en glomérulos, habiendo sido criadas las moscas en ausencia o en presencia del odorante. A su vez, aspiramos replicar estos experimentos con líneas como *rutabaga* y *dunce*^{46,47,48}, mutantes deficientes en aprendizaje, para observar si la modulación de las valencias depende de los mecanismos genéticos canónicos involucrados en aprendizaje y memoria.

8. Bibliografía

1. Morgan, T. H. SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science* **32**, 120–122 (1910).
2. Benzer, S. BEHAVIORAL MUTANTS OF Drosophila ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 1112–1119 (1967).
3. Konopka, R. J. & Benzer, S. Clock mutants of Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2112–2116 (1971).
4. Stocker, H. & Gallant, P. Getting started : an overview on raising and handling Drosophila. *Methods Mol. Biol.* **420**, 27–44 (2008).
5. Adams, M. D. *et al.* The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science* **287**, 2185–2195 (2000).
6. Tweedie, S. *et al.* FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.* **37**, D555–9 (2009).
7. Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. & Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res.* **11**, 1114–1125 (2001).
8. Monte, P. *et al.* Characterization of the larval olfactory response in Drosophila and its genetic basis. *Behav. Genet.* **19**, 267–283 (1989).
9. Dekker, T., Ibba, I., Siju, K. P., Stensmyr, M. C. & Hansson, B. S. Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in Drosophila melanogaster sibling, D. sechellia. *Curr. Biol.* **16**, 101–109 (2006).
10. Larsson, M. C. *et al.* Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. *Neuron* **43**, 703–714 (2004).
11. Knaden, M., Strutz, A., Ahsan, J., Sachse, S. & Hansson, B. S. Spatial representation of odorant valence in an insect brain. *Cell Rep.* **1**, 392–399 (2012).
12. Schneider, A. *et al.* Neuronal basis of innate olfactory attraction to ethanol in Drosophila. *PLoS One* **7**, e52007 (2012).
13. Giang, T., He, J., Belaidi, S. & Scholz, H. Key Odorants Regulate Food Attraction in. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, 160 (2017).
14. Connolly, J. B. & Tully, T. Behaviour, learning, and memory. *Drosophila, a*.

15. Chen, J.-Y. *et al.* Learning modifies odor mixture processing to improve detection of relevant components. *J. Neurosci.* **35**, 179–197 (2015).
16. Hildebrand, J. G. & Shepherd, G. M. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 595–631 (1997).
17. Vosshall, L. B., Wong, A. M. & Axel, R. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* **102**, 147–159 (2000).
18. Wilson, R. I. Early olfactory processing in *Drosophila*: mechanisms and principles. *Annu. Rev. Neurosci.* **36**, 217–241 (2013).
19. Badel, L., Ohta, K., Tsuchimoto, Y. & Kazama, H. Decoding of Context-Dependent Olfactory Behavior in *Drosophila*. *Neuron* **91**, 155–167 (2016).
20. Devaud, J. M., Acebes, A. & Ferrús, A. Odor exposure causes central adaptation and morphological changes in selected olfactory glomeruli in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **21**, 6274–6282 (2001).
21. Tully, T., Cambiazo, V. & Kruse, L. Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *J. Neurosci.* **14**, 68–74 (1994).
22. Arenas, A. & Farina, W. M. Bias to pollen odors is affected by early exposure and foraging experience. *Insect Physiol.* **66**, 28–36 (2014).
23. Arenas, A., Giurfa, M., Farina, W. M. & Sandoz, J. C. Early olfactory experience modifies neural activity in the antennal lobe of a social insect at the adult stage. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 1498–1508 (2009).
24. Ramírez, G. *et al.* Odor Experiences during Preimaginal Stages Cause Behavioral and Neural Plasticity in Adult Honeybees. *Front. Behav. Neurosci.* **10**, 105 (2016).
25. Hallem, E. A., Ho, M. G. & Carlson, J. R. The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* **117**, 965–979 (2004).
26. Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C. & Vosshall, L. B. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* **136**, 149–162 (2009).
27. de Bruyne, M., Clyne, P. J. & Carlson, J. R. Odor Coding in a Model Olfactory Organ: The *Drosophila* Maxillary Palp. *J. Neurosci.* **19**, 4520–4532 (1999).
28. Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J. R. & Smith, D. P. Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor

- defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J. Neurosci.* **23**, 9906–9912 (2003).
29. Carlson, J. R. Olfaction in *Drosophila*: from odor to behavior. *Trends Genet.* **12**, 175–180 (1996).
 30. Sachse, S. & Galizia, C. G. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.* **87**, 1106–1117 (2002).
 31. Yang, J.-Y. *et al.* Restructuring of olfactory representations in the fly brain around odor relationships in natural sources. *bioRxiv* (2023) doi:10.1101/2023.02.15.528627.
 32. Gronenberg, W. & López-Riquelme, G. O. Multisensory convergence in the mushroom bodies of ants and bees. *Acta Biol. Hung.* **55**, 31–37 (2004).
 33. Tully, T. & Quinn, W. G. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **157**, 263–277 (1985).
 34. Dolan, M.-J. *et al.* Neurogenetic dissection of the *Drosophila* lateral horn reveals major outputs, diverse behavioural functions, and interactions with the mushroom body. *Elife* **8**, (2019).
 35. Lewis, L. P. C. *et al.* A Higher Brain Circuit for Immediate Integration of Conflicting Sensory Information in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **25**, 2203–2214 (2015).
 36. Pannunzi, M. & Nowotny, T. Odor Stimuli: Not Just Chemical Identity. *Front. Physiol.* **10**, 1428 (2019).
 37. Murlis, J., Elkinton, J. S. & Cardé, R. T. Odor Plumes and How Insects Use Them. *Annual Review of Entomology* vol. 37 505–532 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002445> (1992).
 38. Barrows, W. M. The reactions of the Pomace fly, *Drosophila ampelophila* loew, to odorous substances. *Journal of Experimental Zoology* vol. 4 515–537 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jez.1400040403> (1907).
 39. Hunter, G. W., Hunter, G. W. & Walter, H. E. Biology; the story of living things. Preprint at <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4455> (1937).
 40. West, A. S. Chemical Attractants for Adult *Drosophila* Species 1. *Journal of Economic Entomology* vol. 54 677–681 Preprint at <https://doi.org/10.1093/jee/54.4.677> (1961).
 41. Zhu, J., Park, K.-C. & Baker, T. C. Identification of odors from overripe mango that attract vinegar flies, *Drosophila melanogaster*. *J. Chem. Ecol.* **29**, 899–909 (2003).
 42. Huber, R. *et al.* Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Sleep* **27**, 628–639 (2004).

43. Pfeiffenberger, C., Lear, B. C., Keegan, K. P. & Allada, R. Locomotor activity level monitoring using the Drosophila Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, db.prot5518 (2010).
44. Pfeiffenberger, C., Lear, B. C., Keegan, K. P. & Allada, R. Processing sleep data created with the Drosophila Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, db.prot5520 (2010).
45. Geissmann, Q. *et al.* Ethoscopes: An open platform for high-throughput ethomics. *PLoS Biol.* **15**, e2003026 (2017).
46. Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G. & Benzer, S. *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1684–1688 (1976).
47. Byers, D., Davis, R. L. & Kiger, J. A., Jr. Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the *dunce* mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **289**, 79–81 (1981).
48. Feany, M. B. Rescue of the learning defect in *dunce*, a *Drosophila* learning mutant, by an allele of *rutabaga*, a second learning mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2795–2799 (1990).