

Tesis Doctoral

Aprendizaje olfativo pre-imaginal en la abeja *Apis mellifera*: sus efectos luego de la metamorfosis

Ramírez, Gabriela P.

2014-07-11

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

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

Cita tipo APA:

Ramírez, Gabriela P.. (2014-07-11). Aprendizaje olfativo pre-imaginal en la abeja *Apis mellifera*: sus efectos luego de la metamorfosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ramírez, Gabriela P.. "Aprendizaje olfativo pre-imaginal en la abeja *Apis mellifera*: sus efectos luego de la metamorfosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-07-11.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Aprendizaje olfativo pre-imaginal en la abeja *Apis mellifera*: sus efectos luego de la metamorfosis

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

Licenciada Gabriela P. Ramirez

Director de Tesis: Profesor Dr. Walter M. Farina

Consejero de Estudios: Profesor Dr. Walter M. Farina

Lugar de trabajo: Grupo de Estudio de Insectos Sociales. IFIBYNE, CONICET – FCEN, UBA

Buenos Aires, 2014

Fecha de Defensa: 11/7/2014

Aprendizaje olfativo pre-imaginal en la abeja *Apis mellifera*: sus efectos luego de la metamorfosis

Resumen

Dentro de las colmenas de abejas *Apis mellifera* la información relativa a un recurso floral se distribuye rápidamente entre individuos de todas las edades mediante contactos boca a boca (trofalaxia). Estas interacciones sociales permiten establecer memorias asociativas estables y de largo término en individuos adultos. Sin embargo, hasta el presente se desconoce si la adquisición de esta información alcanza a individuos en desarrollo (pre-imaginales). Mediante eventos trofalácticos las larvas pueden recibir el recurso ingresado a la colmena, siendo factible que aquellos individuos en desarrollo puedan establecer memorias asociativas, y que incluso las mismas sean funcionales en estadios avanzados. Se plantea si las experiencias olfativas de naturaleza apetitiva adquiridas en estadios larvales pueden ser retenidas luego de la metamorfosis y afectar la conducta del adulto. Para ello, se ofreció una solución azucarada aromatizada en el interior de colmenas experimentales con el fin de circular alimento aromatizado que pueda ser potencialmente ingerido por individuos en desarrollo. Por un lado, se cuantificó la adquisición y la retención de memorias olfativas bajo el paradigma de respuesta de extensión de probóscide (REP) en adultos, tanto hacia los olores pre-expuestos como hacia olores novedosos. Sólo las abejas más jóvenes (3-5 días de edad) mostraron un mayor nivel de REP espontánea hacia el olor pre-expuesto al compararlo con el grupo control, sugiriendo que el adulto puede retener información adquirida antes de emerger. Curiosamente se obtuvieron altos niveles de REP hacia nuevos olores en concordancia con la similitud perceptual entre éstos y el olor pre-expuesto. Esto sugiere un fenómeno de generalización a largo término que persiste luego de la metamorfosis. Se demostró también que incluso aquellas abejas que no respondieron espontáneamente al olor pre-expuesto poseen una mayor capacidad de aprendizaje en un condicionamiento olfativo clásico que abejas sin experiencias. Se evaluaron además posibles cambios en el sistema sensorial periférico del adulto producto de esas experiencias, realizándose registros electrofisiológicos en antenas (EAG) de abejas adultas jóvenes. Se observó una sensibilidad diferencial de los receptores olfativos dependiendo de las experiencias olfativas tempranas. Para estudiar el comportamiento motor de las larvas se realizaron bioensayos de laboratorio que indicaron que la experiencia previa hacia un olor elimina la preferencia innata hacia un olor novedoso. Para establecer correlatos entre experiencias tempranas y aspectos neurobiológicos, se cuantificaron los volúmenes de determinadas estructuras cerebrales de abejas adultas jóvenes involucradas en el procesamiento de información olfativa. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias al comparar cerebros de abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales así como tampoco en la expresión de genes asociados a procesos sinápticos involucrados en eventos de aprendizaje. Concluimos que las experiencias olfativas pre-imaginales condujeron a cambios comportamentales y fisiológicos en las abejas recientemente emergidas. Estos resultados indican que las abejas pueden acceder muy tempranamente a la información relacionada con el alimento que ingresa a la colonia, situación que podría afectar a aquellas conductas mediadas por claves olfativas, como es el caso de la recolección de recursos.

Palabras clave: *Apis mellifera*, experiencias olfativas pre-imaginales, aprendizaje asociativo, comportamiento, sensibilidad quimiosensorial, neurobiología.

Pre-imaginal olfactory learning in the honeybee *Apis mellifera*: the effects after metamorphosis

Abstract

Inside the *Apis mellifera* hive, incoming information from a floral source is quickly propagated between nestmates of different ages through mouth to mouth contacts (trophallaxis). These interactions allow establishing long term and stable odor-rewarded memories. However, until now it is unknown whether acquisition of this information achieves developing individuals (pre-imaginal stages). Given that larvae could receive the incoming resources through trophallaxis, it is probably that they could establish olfactory memories that might be useful in later stages. Specifically, we wonder if olfactory appetitive experiences acquired during larval stages can be retained after metamorphosis and if they can induce behavioral changes in the adult stage, inquiring into the underlying cognitive and sensory processes. To address these aims, scented sucrose solution was offered inside the experimental hives in order to allow that circulating scented-food can be ingested by larvae. On one hand, acquisition and retention of olfactory memories were quantified in adults under the proboscis extension response (PER) protocol, by presenting the pre-exposed odor as well as novel ones. Only young bees (3-5 days old) showed a higher spontaneous PER level towards the pre-exposed odor, suggesting that the adult can retain information acquired before emergence. Curiously, high PER levels were obtained towards odors according to their perceptual similarity between these and the pre-exposed odor. This suggests the existence of a long-term generalization phenomenon that persists after metamorphosis. Bees that failed to respond to the pre-exposed odor were able to learn it more efficiently in a classical olfactory conditioning than naïve bees. On another hand, we also studied possible changes in the adult's periferic sensory system due to these experiences performing electro-physiological records in the antenna (EAG) of young bees. These recordings showed differential sensitivity of olfactory receptors, depending on the bee's previous experience. Moreover, laboratory assays performed with larvae showed that pre-exposure to an odor eliminates innate preference towards another novel odor. Finally, to correlate early experiences and neurobiological issues, volumes of certain brain structures involved in olfactory information processing were quantified in young adult bees. Pre-exposure to an odor at a larval stage had no effect on the size of certain adult brain structures or on the amount of expression of genes associated with synaptic processes involved in learning events. We conclude that pre-imaginal olfactory experiences led to both behavioral and physiological changes in newly emerged bees. These results show that honeybee can prematurely access information associated with incoming food gathered by its mates, this situation could affect odor-mediated behaviors like foraging.

Keywords: *Apis mellifera*, pre-imaginal olfactory experiences, associative learning, behavior, chemosensory responsiveness, neurobiology.

Agradecimientos

Y me encuentro escribiendo los agradecimientos como último paso antes de imprimir la versión final de esta tesis...reflexiono...debería haber agradecido antes de siquiera escribir la primera letra, porque gracias a todos los que me acompañaron, apoyaron y guiaron durante estos años de doctorado, ahora puedo estar poniéndole un punto final a esta etapa. ¡¡Gracias infinitas!!

En primer lugar, gracias a mi director Walter, por las ideas, el espacio, la confianza, la perseverancia, la guía, las críticas constructivas y la pasión por la ciencia... ¡y las abejas!

A todos los INSSOC, los que están, los que siguen, los que fueron, los que volverán (Roxy, Fran, Ali, Caro, JuanPe, Gonza, Diego, Cinthia, Sol, Gigita, Anita, Andres, Vane, Pau, Sofi, Agus, Agus Jr., Yai, Luis y Tito). Indiscutidamente tantas horas de trabajo con frustraciones, logros, discusiones, opiniones, no hubieran sido lo mismo sin Uds. ¡¡GRACIAS!! Por hacer que los grupos humanos valgan la pena tanto dentro como fuera del laboratorio. Especiales gracias a Andresuti, por su apoyo y colaboración en este proyecto, y sobre todo por tu amistad. Gracias también a Héctor, nuestro apoyo técnico de lujo, ¡por tanta sabiduría!

Gracias a quienes colaboraron en este proyecto fuera del laboratorio, por abrirme sus puertas y enseñarme otros caminos de la ciencia, gracias al Dr. Pablo Argibay y la Lic. Carol Fagundez del ICBME en el Hospital Italiano. Gracias al Dr. Wulfila Gronenberg y los chicos del laboratorio del “Department of Neuroscience” en la Universidad de Arizona, Tucson, EE.UU.

Gracias a “Las Chichis”, porque el trabajo me dejó este grupo de hermosas mujeres, amigas más allá de las distancias y las circunstancias...Vane, Agus, Solchi, Sofi, Pau, Gigita ¡¡Las quiero!!

Gracias a mis disparatados amigos de mbututu (Lau, Fede, Guido, Petry, Boris, Lavita, Nico, Santi, Bele, Juan, Leti), grupo de desequilibrados si los hay pero que sin su aporte no hubiera llegado al equilibrio emocional necesario para atravesar estos años. ¡Los quiero a montones!

Gracias a terapia y al grupo de loquitos por el espacio para encontrarme y por la amistad (Caio, Martin, Lucas, Nadia, Naty, Vero, Vani, Ana). Gracias a la danza, a mi maestra y amigas (Nahir, Ale, Magui)... otro espacio de sanación y desenchufe de la rutina científica.

Gracias a mis amigas (Sandri, Guada, Pau, Vir) y todas mis compañeras de la facu, esta carrera es más linda cuando se comparten las alegrías y penares entre amigas/colegas.

Gracias a mis amigotas de toda la vida, gracias Mari (y Amira), Susi (y Valen), Pato... por ser un apoyo incondicional, por alentarme siempre en lo que hago, ¡las adoro! ¡Gracias a todos mis amigotes (Samir, Moro, Cristian, Tom, Esteban, Victor..y sus familias)!

Gracias a mis tíos, primos, madrina, abuelas...a los que ya no están, a los que están lejos y a los que están cerca, ¡soy feliz por tenerlos! Los llevo en mi corazón siempre.

Gracias a mis hermanas, Caro y Silvi, son parte de los pilares más importantes en mi vida, las amo y estoy agradecida por tenerlas siempre a mi lado. Gracias Caro y Pablo por hacerme la madrina más enamorada de su ahijado, ¡gracias Dante por existir! Otro “gracias” grandote a mis cuñados, los Pablitos, por ser parte de esta familia.

¡Gracias vieja! Me emociona y me llena de amor tenerte. Sos incondicional, me trasmitís toda la energía (y el ejemplo) para nunca bajar los brazos. Gracias por bancarme en todas... ¡este logro es para vos!

A mi papá, gracias porque a pesar de no tenerte hace años, tu legado y tu amor siempre me acompañan.

Y gracias a vos, Amor, apareciste en la recta final de este doctorado, la más difícil... ¡y te la bancaste! Tu amor me fortalece, me hace feliz. Me ayudas a seguir siempre hacia adelante, por todo y más. Te amo hasta el infinito, ida y vuelta, infinitas veces.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCION	1
1.1 APRENDIZAJE	1
1.1.1 APRENDIZAJE ASOCIATIVO	1
CONDICIONAMIENTO OLFATIVO EN LA ABEJA APIS MELLIFERA	6
1.1.2 APRENDIZAJE NO ASOCIATIVO	10
1.2 EL OLFATO DE LOS INSECTOS	11
1.2.1 MADURACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO OLFATIVO EN INSECTOS	15
1.3 LA ABEJA MELÍFERA COMO MODELO EXPERIMENTAL	19
1.3.1 ORGANIZACIÓN DE LA COLONIA	21
1.3.2 LA RECOLECCIÓN DE RECURSOS EN LA ABEJA MELÍFERA	25
1.3.3 EL PROCESO DE DESARROLLO EN APIS MELLÍFERA	29
1.4 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	34
2. EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA DURANTE ESTADIOS PRE-IMAGINALES: EFECTO SOBRE LA CONDUCTA DEL ADULTO.	36
2.1 INTRODUCCIÓN	36
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.2.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	39
2.2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	40
2.2.3 SENSIBILIDAD GUSTATIVA	41
2.2.4 RESPUESTA ESPONTÁNEA DE EXTENSIÓN DE PROBÓSCIDE	43
2.2.5 CONDICIONAMIENTO DIFERENCIAL	46
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
2.4 RESULTADOS	50
2.4.1 SENSIBILIDAD GUSTATIVA EN ABEJAS ADULTAS LUEGO DE LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE-IMAGINALES.	50
2.4.2 EFECTO DE LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE-IMAGINALES SOBRE LAS RESPUESTAS APETITIVAS AL OLOR PRE-EXPUESTO	52

2.4.3 EFECTO DE LAS EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA EN LOS ESTADIOS PRE-IMAGINALES SOBRE LA DISCRIMINACIÓN DE OLORES EN ABEJAS ADULTAS	53
2.4.4 LOS OLORES QUE SE PRESENTAN EN EL ENTORNO DE LA CRÍA Y SU INFLUENCIA SOBRE LAS RESPUESTAS APETITIVAS HACIA EL OLOR PRE-EXPUESTO.	57
2.5 DISCUSIÓN	59
3. LAS EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA EN LOS ESTADIOS PRE-IMAGINALES: EVALUACIÓN DE LA GENERALIZACIÓN OLFATIVA Y LAS CAPACIDADES COGNITIVAS EN EL ADULTO	63
3.1 INTRODUCCIÓN	63
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.2.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	67
3.2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	68
3.2.2 RESPUESTA EXTENSIÓN DE PROBÓSCIDE (REP)	68
3.2.3 CONDICIONAMIENTO OLFATIVO ABSOLUTO	70
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
3.4 RESULTADOS	73
3.4.1 LA RESPUESTA DE GENERALIZACIÓN EN ABEJAS ADULTAS LUEGO DE UNA EXPERIENCIA OLFATIVA PRE-IMAGINAL.	73
3.4.2 APRENDIZAJE OLFATIVO EN ABEJAS ADULTAS CON O SIN EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA DURANTE ESTADIOS PRE-IMAGINALES.	77
3.5 DISCUSIÓN	80
4. LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE-IMAGINALES Y SUS CORRELATOS NEUROBIOLÓGICOS: ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA Y ELECTROFISIOLOGÍA DE LA ANTENA	83
4.1 INTRODUCCIÓN	83
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	87
4.2.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	87
4.2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	88
4.2.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS ÓRGANOS OLFATIVOS SENSORIALES EN LAS ANTENAS	89
4.2.4 REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS (ELECTROANTENOGRAMA)	91

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94
4.4 RESULTADOS	95
4.4.1 ¿MODIFICAN ESTAS EXPERIENCIAS PRE-IMAGINALES A LA MORFOLOGÍA DE LA ANTENA?	95
4.4.2 LA INFLUENCIA DE LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE-IMAGINALES SOBRE LAS RESPUESTAS ELECTROFISIOLÓGICAS (EAGS) EN LAS ANTENAS DE LAS ABEJAS ADULTAS	97
4.5 DISCUSIÓN	99
5. LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE-IMAGINALES Y SUS CORRELATOS NEUROBIOLÓGICOS: EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS CON PLASTICIDAD SINÁPTICA.	103
5.1 INTRODUCCIÓN	103
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	107
5.2.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	107
5.2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	108
5.2.3 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES VINCULADOS CON PLASTICIDAD SINÁPTICA	109
5.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	112
5.3 RESULTADOS	113
5.3.2 LA INFLUENCIA DE LAS EXPERIENCIAS PRE-IMAGINALES SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN ABEJAS MELÍFERAS ADULTAS.	113
5.4 DISCUSIÓN	115
6. EFECTO DE LAS EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS LARVAS DE ABEJAS.	117
6.1 INTRODUCCIÓN	117
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	120
6.2.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	120
6.2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	120
6.2.3 BIOENSAYO DE CONDUCTA: PROTOCOLO DE ELECCIÓN	122
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	123

6.4 RESULTADOS	124
6.4.1 LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN LARVAS DE ABEJA Y SU MODULACIÓN PRODUCTO DE UNA EXPERIENCIA OLFATIVA.	124
6.4.2 EL EFECTO DE UNA EXPERIENCIA OLFATIVA SOBRE LA ELECCIÓN DE OLORES CONOCIDOS Y NOVEDOSOS EN LARVAS DE ABEJA.	125
6.5 DISCUSIÓN	127
7. CONCLUSIONES GENERALES	130
<u>ANEXO:</u> ANÁLISIS NEUROANATÓMICOS EN ABEJAS CON O SIN EXPERIENCIAS PRE-IMAGINALES	134
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	135
CUANTIFICACIÓN DE LOS VOLÚMENES DE DIFERENTES ESTRUCTURAS CEREBRALES	136
¿SE OBSERVAN CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL CEREBRO DE LA ABEJA ADULTA LUEGO DE LAS EXPERIENCIAS PRE-IMAGINALES?	139
8. BIBLIOGRAFIA	142

1

1. INTRODUCCION

1.1 Aprendizaje

Los animales se desarrollan en ambientes donde los estímulos sensoriales abundan y por lo tanto deben ser capaces de distinguir de su entorno los estímulos importantes para su supervivencia. Es por ello que son cruciales las experiencias previas que les permitirán diferenciar aquellos estímulos relevantes de los que no lo son. En este marco, la habilidad de aprender, que se encuentra presente en una enorme diversidad de especies animales, les permite asociar las claves del ambiente, que *a priori* son neutras, con estímulos excitatorios como por ejemplo un recurso energéticamente rentable. Por lo tanto, a través del aprendizaje asociativo, los animales, pueden extraer reglas y estructuras para anticiparse a los eventos relevantes del mundo en el que viven (Pavlov 1927, Kandel et al. 1992, Carew 2000).

1.1.1 Aprendizaje asociativo

El aprendizaje asociativo consiste en establecer una relación predictiva entre al menos dos eventos contingentes que ocurren en el ambiente. Si bien los animales deben integrar diferentes modalidades sensoriales para formar memorias que les permitan predecir eventos

relevantes en ambientes naturales (Mackintosh 1994), los mismos pueden ser condicionados, bajo condiciones experimentales, a responder ante una estimulación mucho más reducida y controlada. En un condicionamiento simple un individuo logra aprender la contingencia entre un estímulo neutro o condicionado (EC) sin ningún significado previo y un estímulo incondicionado (EI) de relevancia biológica para el animal. El EI conlleva una respuesta incondicionada (RI), una respuesta refleja, innata y conspicua. A su vez permite que se establezca un vínculo entre EC y RI que pasará a ser una respuesta condicionada (RC). Una vez establecido el condicionamiento, el animal produce la respuesta conspicua con la sola presencia del estímulo *a priori* neutro. Para que esto ocurra, el EC debe ser presentado previo al EI y con una cierta proximidad temporal. Existen dos tipos de aprendizaje asociativo usualmente reconocidos: el *condicionamiento clásico* y el *condicionamiento operante*. Ivan Pavlov en 1927 fue el primero en determinar las propiedades del condicionamiento clásico. Para ello utilizando al perro como sujeto experimental, determinó que si al sonido de una campana se lo presentaba con anterioridad y cierta proximidad temporal al alimento durante repetidas veces, el perro era capaz de desencadenar por sí solo la misma respuesta de salivación aún en ausencia de alimento (ver figura 1.1). Sin embargo, Pavlov no fue el único en observar este tipo de aprendizaje asociativo. El zoólogo austríaco Karl von Frisch (1914,1915) ya había observado que tanto los peces como las abejas melíferas podían discriminar estímulos visuales recompensados de no recompensados en un contexto donde el animal experimental debía desencadenar una acción para obtener la recompensa (ver figura 1.2). Cabe destacar que existen dos clases de EI, el EI apetitivo y el EI del tipo aversivo (Hall y Halliday 1998). Mientras que el primero

representa un estímulo positivo para el individuo y por ende genera una respuesta de aceptación como por ejemplo la comida, el segundo representa un estímulo negativo y por lo tanto genera un rechazo o evitación por parte del individuo. Ambos son estímulos del tipo excitatorio, sensibilizando al animal de modo tal que aún en ausencia del estímulo excitador, el individuo responde a otro estímulo que previamente estuvo asociado al EI (Mackintosh 1994). En el condicionamiento existe la regla de la contingencia, producto de la contigüidad temporal entre los eventos involucrados en el aprendizaje asociativo. Esta regla indica que el primer evento (EC) debe preceder al segundo evento (EI) distanciados mediante un breve intervalo de tiempo. Mediante la misma el individuo aprende que el EC predice la ocurrencia del EI. Esto permite a los animales reconocer las relaciones predictivas entre eventos que ocurren dentro de su ambiente (Pavlov 1927). Una característica a tener en cuenta es entonces el intervalo entre estímulos (EC-EI). Es sabido que si se utilizan diferentes intervalos de tiempo entre EC-EI en diferentes grupos de individuos desde invertebrados como *Drosophila* y *Aplysia* hasta vertebrados como conejos, roedores e incluso humanos, el condicionamiento se favorece en aquellos grupos donde el EC precede al EI (Carew 2000). Por el contrario, si el EI antecede al EC no será posible condicionar al individuo experimental. El condicionamiento clásico tiene como finalidad entonces, formar conexiones entre eventos del entorno que se encuentran correlacionados secuencial y temporalmente. De manera tal que la asociación entre dichos eventos sea de utilidad para los individuos (Squirre y Kandel 1999). En lo que respecta al valor predictivo del EC este estímulo evoca la representación del EI. Por lo tanto, y consistentemente con este hecho, la RC es producto de la asociación establecida sobre la

relación temporal EC-EI, así como también producto de la evaluación del EI (Bouton y Moody 2004).

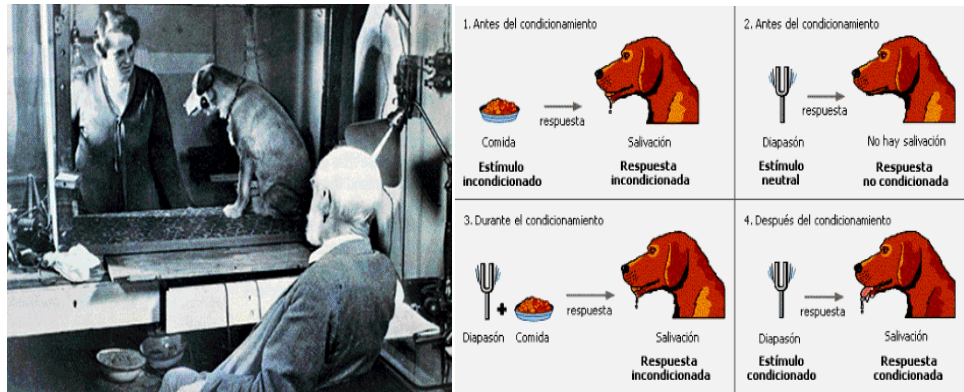


Figura 1.1: Condicionamiento clásico. A la izquierda, Ivan Pavlov con uno de sus colaboradores junto al dispositivo utilizado para estudiar las propiedades del condicionamiento clásico sobre un individuo experimental (perro). A la derecha, detalle del protocolo experimental utilizado para lograr el condicionamiento.

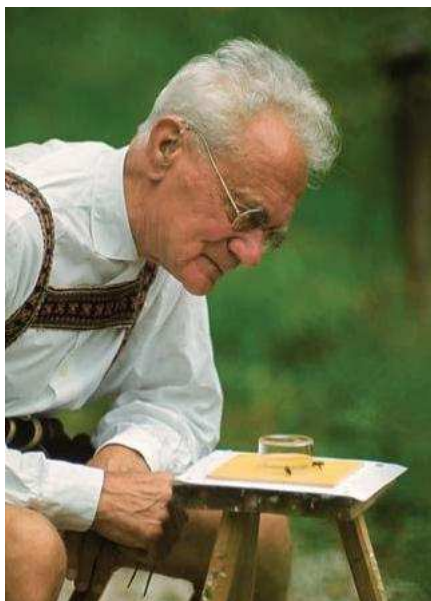


Figura 1.2: Karl von Frisch (1886-1982), premio Nobel de Fisiología–Medicina 1973. En la fotografía se lo puede observar en uno de sus experimentos, entrenando abejas a un alimentador artificial.

El condicionamiento operante como se mencionó anteriormente, es también una forma de aprendizaje asociativo. En este caso los individuos aprenden a asociar sus propias acciones (comportamiento) con una recompensa (Skinner 1938). Por ejemplo, el animal aprenderá a asociar que presionando un pulsador o llave obtendrá alimento. Por lo que el individuo espera recibir una recompensa al presionar la llave (ver figura 1.3).

Tanto el aprendizaje del tipo clásico como el operante permiten entonces generar una predicción, el individuo ejecuta una acción que permitirá obtener un refuerzo. Estos aprendizajes podrían admitir diferentes niveles de complejidad (Giurfa 2003).



Figura 1.3: Condicionamiento operante. En la fotografía se puede ver a Burrhus Frederic Skinner (1904-1990) junto a su dispositivo experimental.

Podemos hablar del condicionamiento olfativo como un tipo de condicionamiento simple, en el cual un olor actúa como el estímulo neutro o condicionado. En el condicionamiento olfativo clásico o Pavloviano específicamente, el individuo percibe en primera instancia un olor determinado (EC) y luego, una recompensa o un castigo (alimento o descarga eléctrica, EI) que desencadena en él una respuesta innata, incondicionada (RI). Luego, la sola exposición al olor dispara en el individuo la RC. Dentro de este contexto, como se mencionó anteriormente, los insectos son capaces de asociar un EC, como un olor, con un EI apetitivo o aversivo. Este tipo de aprendizaje ha sido extensamente estudiado en la abeja *Apis mellifera*, basándose en su respuesta refleja de extensión de probóscide (REP). La REP se desencadena cuando las antenas de estos animales entran en contacto con una solución azucarada (ver figura 1.4) (Frings 1944). Trabajos pioneros como el de Kuwabara en 1957 demostraron que las abejas pueden ser condicionadas bajo el paradigma de REP a asociar estímulos visuales con una recompensa, como así también son capaces de asociar estímulos olfativos (Takeda 1961). Existen por otro lado, evidencias de aprendizaje asociativo bajo el paradigma del REP en distintas especies de insectos. Por ejemplo, se ha realizado condicionamiento olfativo en cucarachas *Periplaneta americana* (Watanabe et al. 2003, Watanabe y Mitsunami 2007), en el grillo *Gryllus bimaculatus* (Matsumoto y Mizunami 2000), en el mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Tomberlin et al. 2006) y en la abeja sin aguijón *Melipona quadrfasciata* (Mc Cabe et al. 2007)

Condicionamiento olfativo en la abeja Apis mellifera

Para obtener alimento proveniente de las flores, los insectos recolectores de néctar

aprenden la asociación entre el recurso, el cual actúa como un refuerzo positivo, y varias claves florales como el olor de la flor (Menzel 1999). Aprender el olor de una fuente de alimento durante las tareas de recolección facilita el regreso hacia un recurso floral abundante (von Frisch 1919). Como se mencionó anteriormente, una abeja hambrienta extiende su probóscide como respuesta refleja (REP) cuando los receptores de sacarosa de sus antenas (Frings 1944) o de sus piezas bucales son estimulados con un estímulo gustativo del tipo apetitivo como el azúcar (figura 1.4).



Figura 1.4: La abeja extiende su probóscide una vez que sus antenas son estimuladas con solución azucarada.

Si un estímulo olfativo precede a la estimulación con sacarosa, la abeja asociará el estímulo olfativo (EC) con sacarosa (EI) y luego extenderá la probóscide de manera condicionada cuando el estímulo olfativo se presente solo (Takeda 1961). Por lo tanto, la REP es la respuesta incondicionada ante la recompensa, la cual va a ser condicionada mediante la estimulación con un determinado olor (Takeda 1961, Bitterman et al. 1983). Después de un

ensayo de entrenamiento (una sola presentación de los estímulos EC-EI apareados) la retención de la memoria se puede evaluar a lo largo del tiempo, relacionando el porcentaje de REP con los minutos transcurridos desde la asociación del EC y el EI. Así, se obtiene para abejas melíferas una curva de retención de tipo bifásica (Menzel 1993). Inicialmente la curva muestra un alto nivel de respuesta dominado por un componente no asociativo, la sensibilización producto de la presentación del EI. Una única presentación del EI excita al animal por un breve período, llevando a que se incrementen transitoriamente respuestas relacionadas con la alimentación como la extensión de la probóscide ante varios estímulos incluyendo al EC (Takeda 1961, Bitterman et al. 1983, Menzel y Müller 1996, Hammer 1997, Menzel 1999). La consolidación de los componentes asociativos de esta memoria tiene lugar aproximadamente entre unos 5 a 7 minutos luego del ensayo de entrenamiento (Menzel 1990, Hammer y Menzel 1995). Por lo expuesto anteriormente, la estimulación con sacarosa en un condicionamiento olfativo sensibiliza al animal aumentando las REP ante estímulos olfativos o táctiles que se presenten *a posteriori* de dicha estimulación (Hammer 1997). En lo que respecta al vínculo generado durante un aprendizaje apetitivo entre el EC y EI, se observó que este vínculo se ve reforzado al aumentar la calidad de la recompensa ofrecida (Bitterman et al. 1983, Scheiner et al. 1999). Esto sugiere que altos niveles de recompensa aumentarán los niveles de atención permitiendo acelerar en el corto plazo la adquisición de información (Hammer 1997).

Por otro lado, se ha demostrado mediante estudios realizados en mamíferos, que el EC durante el condicionamiento adquiere características relacionadas con el EI. Similarmente, en el condicionamiento olfativo clásico en abejas que involucra a la REP, el olor adquiere

un valor apetitivo (Hammer 1997). Después del condicionamiento, el olor no sólo desencadena respuestas apetitivas, sino que también gana propiedades de recompensa ya que actúa como un EI e induce a una excitación del individuo en un contexto apetitivo (Hammer 1997).

Los umbrales de respuesta al azúcar (URA) y su influencia en el condicionamiento olfativo en abejas

Dado que existen protocolos de condicionamiento clásico que pueden llevarse a cabo bajo condiciones de laboratorio, cabe preguntarse si el sujeto experimental responde luego del entrenamiento al olor aprendido, o bien a la expectativa (activación de una representación interna de la recompensa en ausencia de refuerzo. Logan 1960) que provoca dicho olor. Se ha demostrado que las larvas de *Drosophila* se desplazan hacia una fuente de olor sólo si los individuos esperan un resultado positivo al realizar dichos comportamientos (Gerber y Handel 2006). En ese sentido, existen protocolos, como el de los umbrales de respuesta al azúcar (URA) basados en el paradigma de REP (Page et al. 1998), que podría cuantificar la sensibilidad gustativa producto del aprendizaje apetitivo previo, en abejas que se encuentran amarradas. En este protocolo se asume que una solución de sacarosa de 30% p/p de concentración utilizada como recompensa, tiene el mismo valor para todas las abejas que responden extendiendo sus probóscides cuando sus antenas son tocadas con esta solución (Scheiner et al. 2005). Sin embargo, algunos estudios acerca de las memorias de estos individuos han revelado que existen diferentes niveles de adquisición entre individuos a pesar de utilizar una solución de sacarosa de alta concentración (30% p/p) (Scheiner et al.

1999; 2001a, b, c; 2003). Estas diferencias en el aprendizaje pueden deberse a diferencias individuales en lo que respecta a la percepción y evaluación del EI, en este caso la sacarosa. Se sugiere entonces que las respuestas ante estímulos gustativos como la sacarosa dentro del paradigma REP, indican el valor que tiene el azúcar para cada individuo (Scheiner et al. 2005). La respuesta ante la estimulación gustativa en las antenas de las abejas es un indicador de la sensibilidad sensorial para diferentes modalidades, como lo demuestran otros estudios donde la respuesta gustativa está positivamente correlacionada con la sensibilidad a olores, estímulos lumínicos y táctiles (Scheiner et al. 2004).

1.1.2 Aprendizaje no asociativo

A diferencia de los procesos cognitivos mencionados anteriormente, existen otros del tipo no asociativos los cuales influyen a la hora de condicionar a un individuo. En este tipo de aprendizaje, el individuo aprende acerca de las propiedades de un único estímulo al que ha sido expuesto repetidas veces (Squire y Kandel 1999). Estos aprendizajes provocan cambios en el comportamiento del animal como producto de la experiencia con cierto tipo de estímulos (Carew 2000). Por el contrario, este tipo de cambios provocados en el comportamiento no es debido al aprendizaje de una conjunción temporal entre dos o más eventos (Moore 2001), como en el caso del aprendizaje asociativo. Son ejemplos de aprendizaje no asociativo, la habituación y la sensibilización. Se entiende como habituación a la desaparición de la respuesta ante un estímulo cuando el mismo es presentado repetidas veces; mientras que la sensibilización se refiere al aumento de la respuesta luego de la

presentación de un estímulo novedoso para el individuo (Carew 2000). Es debido a estos componentes no asociativos que la respuesta ante el EC en un condicionamiento del tipo clásico no puede basarse solamente en la presentación sucesiva de los EC-EI.

1.2 El olfato de los insectos

Los sentidos permiten la interacción de los animales con su entorno permitiéndoles obtener información acerca del medio circundante en el que viven. En particular y referente al sentido del olfato, los receptores olfativos responden a la estimulación de partículas volátiles odoríferas una vez que entran en contacto con los mismos. En los insectos los olores desempeñan un papel fundamental en muchas actividades de su vida. Muchos de estos animales utilizan las claves olfativas para explorar los recursos que ofrece el medio ambiente y también para elegir fuentes de alimentos o bien localizar sitios de puesta de huevos. Dada la relevancia de los olores para este grupo, el sistema olfativo de los insectos está muy desarrollado y presenta una complejidad semejante a la que se observa en los mamíferos (Hildebrand y Shepherd 1997).

Los receptores olfativos en los insectos se encuentran dentro de cavidades o pelos sensoriales: las sensilias olfativas (Goodman 2003). Estas sensilias se encuentran en las antenas aunque también pueden estar en distintas partes de la boca o las patas (Snodgrass 1984, Chapman 1998). Entre las sensilias antenales vinculadas con el sentido del olfato se puede mencionar a las placoideas, las chaeticas, las basicónicas y las tricoideas, entre otras. En todos los casos estas sensilias alojan a las neuronas receptoras olfativas (NRO) que se

encuentran inmersas en un baño de hemolinfa y cuyas dendritas están protegidas por los mucopolisacáridos secretados por las células accesorias (Snodgrass 1984, Chapman 1989). Generalmente, las sensilias presentan poros que interrumpen la continuidad de la cutícula y permiten el paso de las moléculas a través de ella. Cada tipo de sensilia sin embargo, presenta características particulares e incluso varían entre especies, como por ejemplo, en las sensilias basicónicas el número de neuronas puede ir desde una única neurona como en *Necrophorus sp.* hasta 35 como en *Locusta sp.* (Kaissling 1974).

La estimulación de los receptores olfativos en los insectos, presenta respuestas moduladas por la afinidad que presenta con la molécula odorífera. La afinidad de la unión molécula-receptor depende de su complementariedad, pudiendo diferenciarse receptores especialistas (aquellos que muestran una alta complementariedad con la molécula estimulante) de los generalistas que muestran menor afinidad pero son capaces de ser activados por un rango más amplio de estímulos (Schneider y Steinbrecht 1968).

En todos los sistemas olfativos existe un proceso de transducción que convierte la señal de un olor en actividad eléctrica. Hay muchas pruebas que sugieren que cuando la molécula odorífera pasa a través de los poros de las sensilias (por ej. en una sensilia tricoidea) es capturada por una proteína de unión (del inglés, olfactory binding protein) la cual se reduce y transporta la molécula estimulante hasta los receptores ubicados en la membrana de la dendrita (Lerner et al. 1990, van den Berg y Ziegelberger 1991). Esto causa la excitación de la NRO y la oxidación de la proteína. Finalmente la molécula liberada a la linfa es degradada por enzimas esterazas (Ziegelberger 1995). La estimulación del receptor olfativo transmembrana, resulta a la vez en la activación de una proteína G y en la generación de

segundos mensajeros que por la acción de la enzima adenilato ciclasa, activan canales iónicos generando una señal eléctrica (Hildebrand y Shepherd 1997). Este esquema general parece estar ampliamente conservado entre los animales. En los insectos, los impulsos nerviosos así generados son conducidos a través del nervio antenal hasta el lóbulo antenal (LA, ver figura 1.5), que es el análogo del bulbo olfativo en mamíferos. Tanto el bulbo olfativo como el lóbulo antenal son centros de integración olfativa y están organizados en subunidades funcionales llamadas glomérulos, los mismos resultan de la convergencia de NRO y de otros tipos de neuronas como ser, las neuronas de proyección o interneuronas (Hildebrand y Shepherd 1997). Dependiendo del número de neuronas aferentes (NRO), interneuronas y neuronas de proyección, podemos encontrar un número de glomérulos variable en distintas especies de insectos (en *Periplaneta americana*: 125 glomérulos; en *Manduca sexta*: 60 glomérulos; en *Drosophila*: 40 y en *Locusta migratoria*: 1000 glomérulos). En particular la abeja melífera presenta un total de 160 glomérulos que reciben señales de aproximadamente 60000 axones quimio-sensoriales, los que se conectan aproximadamente con unas 4000 interneuronas responsables de relacionar a los glomérulos entre sí. La presentación de un olor evoca patrones de actividad glomerular específicos a través de los cuales los animales codifican la información olfativa de su entorno (Joerges et al. 1997, Friedrich y Korsching, 1997, Galizia et al. 1998; 1999a, Sachse et al. 1999, Rubin y Katz 1999, Uchida et al. 2000, Carlsson et al. 2002, Sachse y Galizia 2002). Para ello las neuronas de proyección de los LA (aproximadamente 800 neuronas) conducen la información hacia centros de procesamiento superior: los cuerpos pedunculados o el protocerebro lateral. Estas estructuras reciben información sensorial ya procesada desde

regiones olfativas y visuales del cerebro, como así también recibe entradas mecanosensoriales desde la cabeza y las antenas. La información es recibida en una región de dendritas denominada “cáliz”. A través de experimentos en los que se realizaron ablaciones o lesiones en estas estructuras cerebrales (Erber et al. 1980, Mizunami et al. 1993, De Belle y Heisenberg 1994, Hammer y Menzel 1995), se han vinculado a los cuerpos pedunculados con el aprendizaje olfativo y con la formación de memorias olfativas (Davis 1993, Davis et al. 1995).

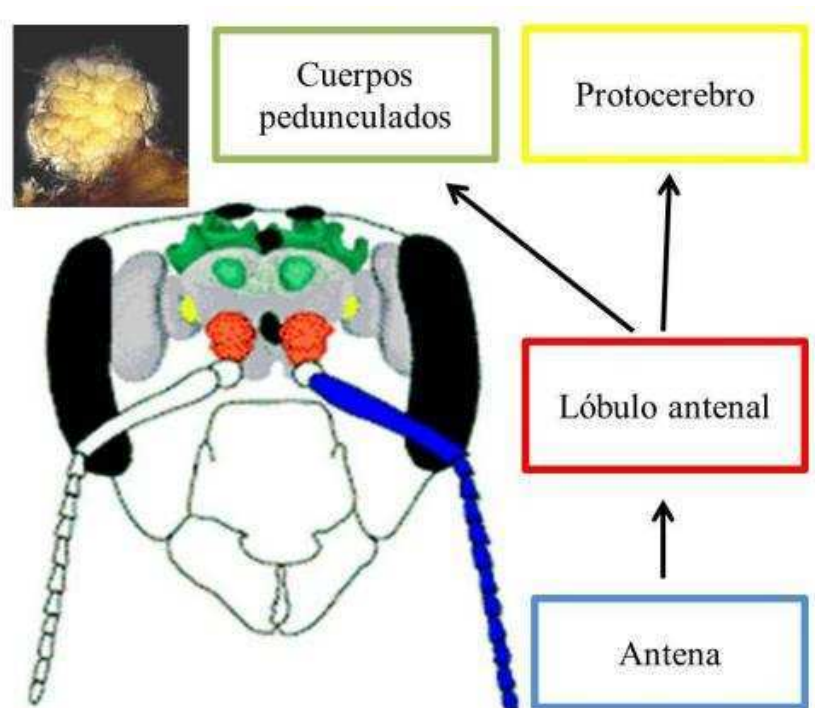


Figura 1.5: Esquema del cerebro de la abeja. Antenas (azul), lóbulo antenal (rojo), protocerebro (amarillo) y cuerpos pedunculados (verde). En la esquina superior izquierda se puede observar una fotografía tomada bajo un microscopio confocal de un lóbulo antenal con los glomérulos dorsales.

1.2.1 Maduración del sistema nervioso olfativo en insectos

En el sistema nervioso olfativo de vertebrados, incluidos los mamíferos, ocurren divisiones celulares o neurogénesis a lo largo de la vida de estos animales (Farbman 1994). Si bien es esperable, este hecho no se ha comprobado aun en insectos adultos. En los insectos

holometábolos, la transición de larva a adulto ocurre a través de un estadio pupal intermedio de aparente quiescencia. En esta etapa sí existen evidencias de neurogénesis, lo que conlleva a profundos cambios morfológicos y funcionales del individuo en desarrollo. En lo que respecta al sistema nervioso tanto de *Drosophila melanogaster* como de *Apis mellifera*, la neurogénesis continúa activamente incluso después del estado embrionario, tanto en la larva como en la pupa, permitiendo la formación de las estructuras sensoriales del adulto. El cerebro de las larvas de estos animales está compuesto por un cordón nervioso ventral de 11 ganglios que en el adulto se reduce a 7 ganglios debido a la fusión de 4 ganglios en el tórax y 2 en el abdomen. Para el caso de la abeja adulta, su sistema nervioso central (SNC) deriva directamente del de la larva, y la estructura general de ambos es esencialmente la misma, salvo algunas modificaciones que se llevan a cabo durante el estadio pupal. El cerebro se desarrolla más durante el imago por la presencia de los ojos (simples y compuestos) y las antenas funcionales así como los neuropilos asociados (Masson y Arnold 1984, Masson y Mustaparta 1990, Gascuel y Masson 1991, Devaud y Masson 1999). Durante el estadio pupal, las neuronas olfativas de las antenas comienzan a diferenciarse elaborando dendritas en las sensilias inmaduras mientras sus axones comienzan a conectarse con neuronas ipsilaterales del LA. Si bien en los primeros estadios los lóbulos antenales se presentan homogéneos, las primeras estructuras esféricas que los conforman, los preglomérulos, se comienzan a observar en el estadio pupal III (Masson y Arnold 1984). Estas subunidades van aumentando progresivamente en número conforme avanzan los estadios (Gascuel y Masson 1991), alcanzando la apariencia del adulto en el estadio pupal 7 (Gascuel y Masson 1991). Curiosamente, en aquellos experimentos en

donde se ablacionaron las antenas durante el primer estadio pupal se observó que el LA permanece aglomerular (sin compartimentación) durante el resto del desarrollo e incluso en la abeja adulta (Malun et al. 1994). Mientras que en algunos grupos de insectos las antenas se desarrollan durante el periodo larval, en muchos otros lo hacen durante la metamorfosis (Snodgrass 1956). En todos los casos se desarrollan a partir de los discos imaginales. Los registros electrofisiológicos intracelulares realizados en la abeja pusieron de manifiesto que ni las NRO ni las neuronas de proyección presentan actividad eléctrica hasta los estadios pupales 6 ó 7 (Masson y Mustaparta 1990, Devaud y Masson 1999, Schröter y Malun 2000). A pesar de que las antenas son funcionalmente inactivas durante la pupa, juegan un rol central en la organización del LA. En la polilla (*Manduca sexta*) la influencia de las antenas quedó bien ejemplificada al observar que la antena de un macho en desarrollo trasplantada en una hembra huésped indujo a la formación de los complejos macroglomerulares exclusivos de los machos (Rössler et al. 1999). Si bien los circuitos neuronales de los insectos adultos se establecen durante la metamorfosis, existe evidencia de que podrían seguir siendo modificados incluso después de la eclosión del imago (Strambi et al. 1999). Cuando las antenas de una abeja adulta fueron evaluadas en un electro-antenograma (EAG), estas no alcanzaron los niveles de respuesta máximos sino hasta los 4 días de vida adulta (Arnold y Masson 1987). Esta idea también está avalada por el descubrimiento de que incluso en abejas muy jóvenes (1 ó 2 días de edad) se pueden evocar patrones de actividad glomerular, que aunque con intensidad menor y un número más bajo de glomérulos reclutados son específicos para cada olor (Wang et al. 2005).

Más aun, es altamente probable que también se lleven a cabo durante la metamorfosis,

extensas reconstrucciones en las estructuras internas de los centros nerviosos (Snodgrass 1984). Muchas neuronas de la larva degeneran y son reemplazadas en el adulto por otras que se desarrollan de los neuroblastos presentes en el SNC de la larva (Roat y Landim 2008). Las interneuronas de las abejas adultas se forman durante la metamorfosis. Ciertas neuronas de la larva son remodeladas en el adulto para cumplir con determinadas tareas (Tissot y Stocker 2000) como así también para formar parte de la conformación de memorias (Zars et al. 2000, Pascual y Préat 2001). Así, otras regiones del cerebro como los cuerpos pedunculados también atraviesan cambios morfológicos drásticos durante el desarrollo de la abeja (Menzel et al. 1994). Roat y Landim (2008) evidenciaron que uno de los tipos celulares del SNC, las células Kenyon, presentes en los cuerpos pedunculados, se diferencian a partir de neuroblastos (células nerviosas inmaduras y aún indiferenciadas) durante la metamorfosis. Finalmente es sabido que en la abeja melífera, la maduración del sistema olfativo nervioso continúa durante los primeros días de vida de adulto y está relacionado con las experiencias que estos animales atraviesan una vez que dejan el imago (Arnold y Masson 1987). Por otro lado, se evidenció en insectos sociales como la abeja *Apis mellifera* o la hormiga carpintera *Camponotus floridanus*, una correlación entre los cambios en el volumen del cerebro con las variaciones en los comportamientos asociados a la edad (Brandon y Coss 1982, Withers et al. 1993; 1995, Durst et al. 1994, Winnington et al. 1996, Fahrbach et al. 1998, Farris et al. 2001, Sigg et al. 1997, Brown et al. 2004, Gronenberg et al. 1996). En este sentido, varios autores postulan que el desarrollo de las habilidades para recolectar como lo son la navegación, la localización de una fuente en el espacio y posterior comunicación de esta información a otros miembros de la colonia,

necesitan de un rango variable de entradas sensoriales que permitan la correcta maduración del sistema olfativo (Winnington et al. 1996, Maleszka et al. 2009, Farris et al. 2001). Sin embargo, aún se desconoce si las modificaciones en los circuitos nerviosos del adulto están relacionadas con las primeras experiencias del animal. Más aun, en la mayoría de los casos no se ha determinado cómo y cuándo se adquieren las habilidades de aprender y retener memorias.

1.3 La abeja melífera como modelo experimental

La abeja melífera puede adaptarse a casi todos los ambientes del planeta dado que presenta la habilidad de regular sus actividades en función de los eventos que ocurren dentro o fuera del nido (Michener 2007). Dentro del nido, existe una gran variedad de tareas e interacciones entre sus miembros ofreciendo la posibilidad de estudiar sus comportamientos. Además, su rol como productor de miel, polen, propóleos y ceras, sumado a su importante valor como agente polinizador, la convierte en un modelo con relevancia económica.

La abeja *Apis mellifera* es una de las especies con mayor distribución en el mundo (Michener 1974), perteneciente al grupo de los insectos que exhiben un alto grado de sociabilidad (eusocialidad). Es decir, presentan división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de cría y solapamiento de generaciones capaces de contribuir en la labor social. Dentro de los nidos de estos insectos, se realizan actividades con un alto grado de coordinación que involucran a un gran número de individuos. Así, el éxito en las

tareas realizadas en estas sociedades animales, dependerá no sólo de la eficacia individual sino también de la tarea coordinada de todos los individuos involucrados (Wilson 1971, Núñez 1982). Para lograr esta coordinación, es imprescindible que haya una precisa transferencia de información entre individuos. En este sentido, las abejas melíferas cuentan con sofisticados sistemas de comunicación en donde se evidencia la transmisión simultánea de señales acústico-vibratorias y olfativas, como es el caso de la bien conocida y estudiada Danza de las Abejas (von Frisch 1967, Seeley 1995, Thom *et al.* 2007, Grüter y Farina 2009a). Además, dentro del nido, estos insectos establecen una enorme cantidad de interacciones interindividuales como ser contactos corporales, antenales y boca a boca (trofalaxia, ver figura 1.6), los cuales les permiten intercambiar información fundamentalmente relacionada con los recursos obtenidos en el exterior (von Frisch 1967, Farina y Grüter 2009). Las interacciones trofalácticas ocurren permanentemente entre los individuos, las primeras se llevan a cabo durante el desarrollo larval de la abeja. En este estadio, las larvas crecen sin libertad de movimiento en el interior de una celdilla individual y deben ser alimentadas por individuos adultos de escasa edad (nodrizas) mediante trofalaxia (Crailsheim 1998). En estas primeras interacciones sociales se lleva a cabo la recepción de nutrientes y feromonas (Park 1925, DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000).



Figura 1.6: Abejas obreras transfiriendo alimento mediante contactos boca a boca (trofalaxia). Crédito fotográfico: Alex Wild

1.3.1 Organización de la colonia

Como se mencionó previamente, las abejas *Apis mellifera* son insectos eusociales, es decir, presentan una división reproductiva del trabajo: dentro de la colonia existen castas reproductivas (individuos con el aparato reproductor desarrollado y capaces de dejar descendencia fértil: la reina y los zánganos) e individuos adultos de la casta no reproductiva (las obreras) que cooperan en el cuidado de cría. Por otro lado, las distintas generaciones se solapan contribuyendo en la labor social (Wilson 1971).

Una típica colonia de abejas melíferas está constituida por 10 a 40 mil abejas obreras, todas ellas hembras; desde ninguno a varios cientos de machos (zánganos), dependiendo la época del año; y una única reina, o hembra fértil (Winston 1987) (Figura 1.7).

La reina es el único individuo de la colonia capaz de poner huevos fecundados y es la principal responsable de mantener la cohesión de la estructura colectiva a través de sus feromonas (Winston 1987). Los zánganos representan al otro grupo reproductivo, cuyo rol consiste en aparearse con reinas vírgenes de otras colonias, después de lo cual mueren. El tercer grupo, la casta de hembras estériles, está representado por las obreras. Esta casta muestra un alto grado de coordinación y, a su vez, de descentralización en la realización de tareas dentro y fuera del nido (Lindauer 1952, Winston 1987, Seeley 1995).

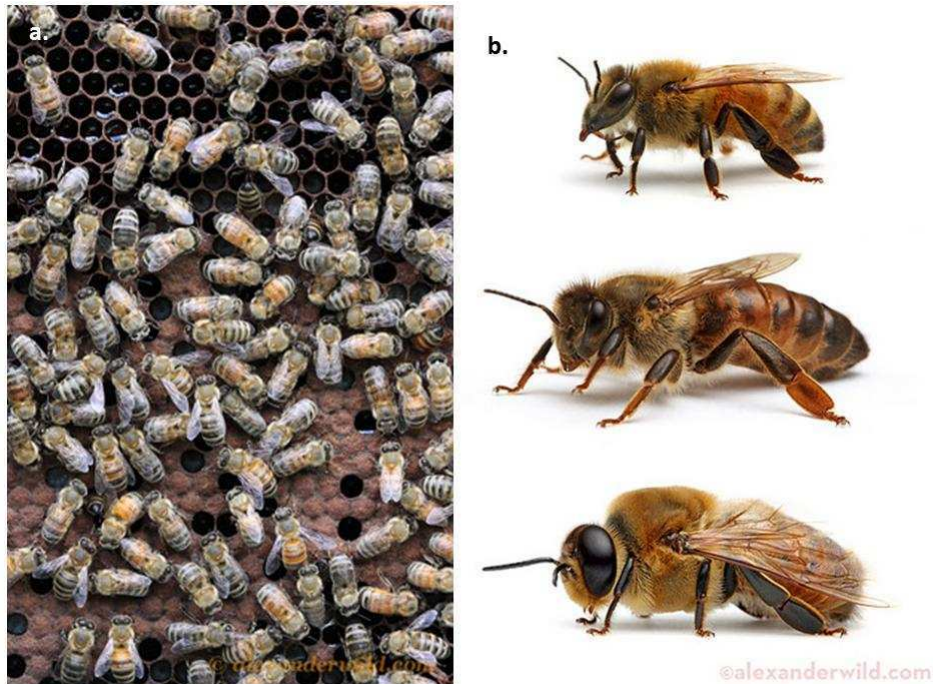


Figura 1.7: a) Abejas obreras (la casta más numerosa) b) Las diferentes castas: abeja obrera, reina y zángano (de arriba hacia abajo). Crédito fotográfico: Alex Wild

Durante los primeros días de vida adulta, la abeja obrera desempeña actividades en el interior del nido tales como *limpiar celdas*, tarea que consiste en limpiar y pulir celdas de cría recientemente liberadas. Cuando alcanza los 3 días de edad, puede comenzar a realizar actividades como *nodriza*, alimentando a la cría con las reservas de néctar y polen recolectados y almacenados por sus compañeras de nido. También realizan otras tareas

como atender a la reina, sellar celdas y acicalar y alimentar a compañeras de nido. Este patrón de comportamiento continúa por los siguientes 10 días. En este punto, la obrera deja el centro del nido (donde está la cría) para trabajar en la periferia, o sea en la región de almacenamiento de alimento para la colonia. Aquí, ella comienza a *procesar el alimento*, moviéndose desde la entrada de la colmena hasta las celdas superiores, una vez que recibe el néctar de las abejas recolectoras que regresan a la colmena, lo convierte en miel y la deposita en las celdas de reserva de alimento. Además, coloca el polen en celdas, ventila la colmena agitando las alas, colabora con las guardianas en la entrada del nido o colmena y continúa acicalando y alimentando a sus compañeras. Finalmente, a partir de los 20 días de edad y hasta el final de su vida, la obrera se dedica a la recolección, colectando néctar, polen, agua o alguna combinación de esas sustancias (Park 1925, Lindauer 1952, Seeley 1982) (Figura 1.8).

Es importante subrayar que las actividades de las obreras se ajustan de acuerdo a las necesidades de la colonia y estas necesidades pueden variar enormemente dependiendo de las condiciones tanto dentro como fuera de la colmena (Seeley 1995, Robinson 1992). Es relevante en este punto, considerar el rol de la cría dentro de la organización social de una colonia de abejas. Se ha demostrado que la presencia de larvas en la colonia regula la división del trabajo de las abejas obreras (Pankiw et al. 1998, LeConte et al. 2001, Pankiw y Page 2001) siendo la feromona de cría, la responsable de esta regulación. Sus componentes son esteres de ácidos grasos que se encuentran presentes en la cutícula de la larva, determinando la presencia y la cantidad de cría en la colonia. Por lo tanto, la

presencia de las abejas en desarrollo (cría) es de suma importancia para regular el comportamiento de las abejas adultas, como por ejemplo, el comportamiento recolector.

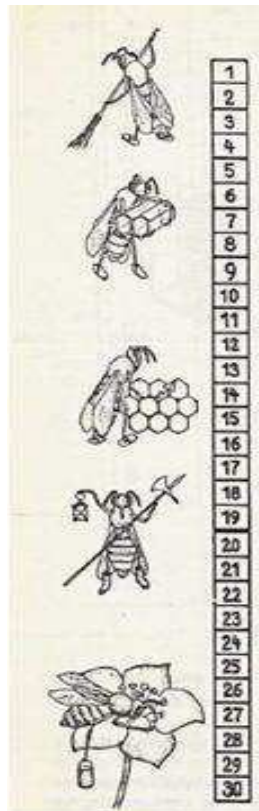


Figura 1.8: División de tareas en la abeja obrera según Lindauer (1952).

1.3.2 La recolección de recursos en la abeja melífera

La recolección de recursos es una de las tareas que las abejas obreras realizan de manera coordinada y eficiente. El alimento líquido, el néctar, y el polen obtenidos de las flores son

sus principales fuentes de energía. Mientras que el néctar provee hidratos de carbono, el polen es un recurso rico en proteínas, lípidos, vitaminas, minerales e, incluso, puede ofrecer azúcares (Baker 1975, Kears y Inouye 1993). Estos recursos son almacenados en el interior de la colmena para luego ser consumidos durante el otoño e invierno, cuando las flores ya no están disponibles o lo están en una proporción muy baja.

El polen, como se mencionó anteriormente, se reserva fundamentalmente para alimentar a las crías. Las abejas jóvenes (las nodrizas) se alimentan del polen almacenado en las celdas. El mismo le brinda las proteínas necesarias para producir secreciones glandulares proteicas que utilizarán luego para alimentar a las larvas (Crailsheim et al. 1992). Dentro de los componentes de la feromona de cría, los esteres Metil-Palmítico y Etil-Olítico son los responsables, según estudios experimentales, en incrementar la actividad de las glándulas hipofaríngeas productoras del material proteico, alimento para las crías (Mohammedi et al. 1996, Le Conte et al. 2001). Por otro lado, como se expresó anteriormente, la presencia de larvas dentro del nido influye en la actividad recolectora afectando la proporción de recolectoras de polen. Si la cantidad de larvas aumenta también se incrementa la recolección de este recurso (Free 1967; 1979). Las colonias con gran cantidad de cría presentan una mayor proporción de abejas recolectoras de polen, las cuales regresan con cargas de polen más pesadas y realizan mayor cantidad de viajes de recolección por unidad de tiempo, a la vez que la edad del primer viaje de recolección es significativamente menor (Pankiw 2004 a, b, Pankiw et al. 2004, Pankiw 2007, Pankiw et al. 2008). Es sabido que la feromona de cría es la responsable en regular la recolección de polen (Free 1967). Partiendo de esta evidencia Pankiw y colaboradores determinaron que incorporando

artificialmente feromona de cría, la misma tiene afectos directos sobre el comportamiento de las recolectoras de polen, al igual que induce a la recolección de ese recurso aun en colonias con ausencia de cría (Pankiw et al. 1998).

Por otro lado, el néctar es transportado por las abejas recolectoras dentro de su buche hasta la colmena, donde es transferido a otras obreras (von Frisch 1967) e incluso a la cría (Nixon y Ribbands 1952). Dentro de la colonia, se distribuye rápidamente y se inicia su procesamiento a miel. Estas tareas poseen distintos niveles de coordinación grupal, los cuales son modulados por factores individuales como los umbrales de respuesta (Lindauer 1952) y las habilidades cognitivas de las abejas involucradas en la transferencia de néctar (Ribbands 1955). Todas estas tareas ocurren en la colmena donde cohabitan miles de individuos (von Frisch 1967). El ambiente de la colmena podría caracterizarse como un ambiente reducido, parcialmente aislado, en donde los individuos se encuentran confinados durante un periodo prolongado de sus vidas adultas y la totalidad de sus estadios juveniles. A pesar del confinamiento, los individuos que no entran en contacto directo con el exterior pueden intercambiar recursos e información con los que sí tienen acceso. Por ejemplo, el caso de las obreras que reciben el néctar que traen las recolectoras. Como así también para el caso de las larvas, Nixon y Ribbands determinaron mediante la utilización de solución azucarada marcada radioactivamente, que la misma se distribuye entre todas las obreras e incluso es utilizada para alimentar a la cría (Nixon y Ribbands 1952). En consecuencia las experiencias vividas por las abejas en este ambiente podrían modular las tareas que realicen dentro y fuera del mismo.

La búsqueda y recolección de alimento en una colonia de abejas requiere la transferencia de

información entre sus miembros para que resulte eficiente. En este sentido, las claves olfativas juegan un rol muy importante durante la recolección de recursos como el néctar. Durante los vuelos de recolección, las abejas aprenden las claves olfativas de las flores que visitan lo que les permite orientarse y encontrar el recurso en los sucesivos ciclos de recolección. Sin embargo, esta información no es utilizada exclusivamente por las recolectoras que conocen la floración sino también por sus compañeras de nido que pueden percibir esos olores dentro de la colmena. Cuando las recolectoras regresan a la colonia y descargan el alimento recolectado, sus compañeras de nido pueden aprender el olor presente en el néctar que se transfieren por trofalaxia (Farina et al. 2005).

Por otro lado, si las recolectoras regresan de una fuente de alimento rica en néctar o polen, suelen desplegar entre sus compañeras un comportamiento estereotipado: “la danza de reclutamiento”. La danza es una señal multimodal que: (i) atrae abejas del entorno que puedan recibir otros tipos de información, (ii) informa sobre la presencia de fuentes de alimento abundantes; (iii) activa memorias espaciales en seguidoras de danza, (iv) facilita la adquisición de información sobre olores florales; e (v) indica la localización de la fuente de alimento en términos de dirección relativa al sol y distancia desde la colmena (Grüter y Farina 2009).

Es así que la colmena se comporta como un centro de información en donde los individuos comparten y comparan las características de las distintas fuentes de alimento que están siendo explotadas en un determinado momento. A partir de esto, las recolectoras desempleadas pueden ser reclutadas a nuevas fuentes de alimento o las recolectoras activas pueden ser estimuladas a cambiar hacia otras fuentes más productivas. A pesar de que una

obrero podría recolectar alimento de un mismo lugar y desde una única fuente durante toda su vida, en la mayoría de los casos cada abeja visita diferentes lugares y aprende diversas claves florales según se modifica la información dentro de la colmena.

A escala social, cuando el néctar aromatizado se distribuye en la colmena, los olores que están diluidos en él pueden ser aprendidos no solo por abejas maduras sino también por abejas jóvenes que, aun envueltas en otras tareas, reciben el néctar aromatizado (Grüter et al. 2006). Estas memorias que se establecerían de forma asociativa, podrían modificar las preferencias recolectoras de abejas jóvenes cuando comiencen a realizar tareas en el exterior.

Por lo expuesto anteriormente, se evidencia el rol de las interacciones que ocurren dentro del nido y sus consecuencias a escala individual y social. Lo que distingue a estos insectos sociales de aquellos más solitarios son las interacciones que ocurren entre los adultos y las crías, siendo estas relaciones las que expresan los aspectos característicos de las abejas. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la abeja durante su desarrollo recibe el recurso que está siendo explotado por las abejas recolectoras, cabe destacar que no ha sido reportado hasta el momento si durante estos primeros contactos con el alimento, se estarían llevando a cabo los primeros eventos de aprendizaje que modularían el comportamiento recolector de la abeja adulta.

1.3.3 El proceso de desarrollo en *Apis mellífera*

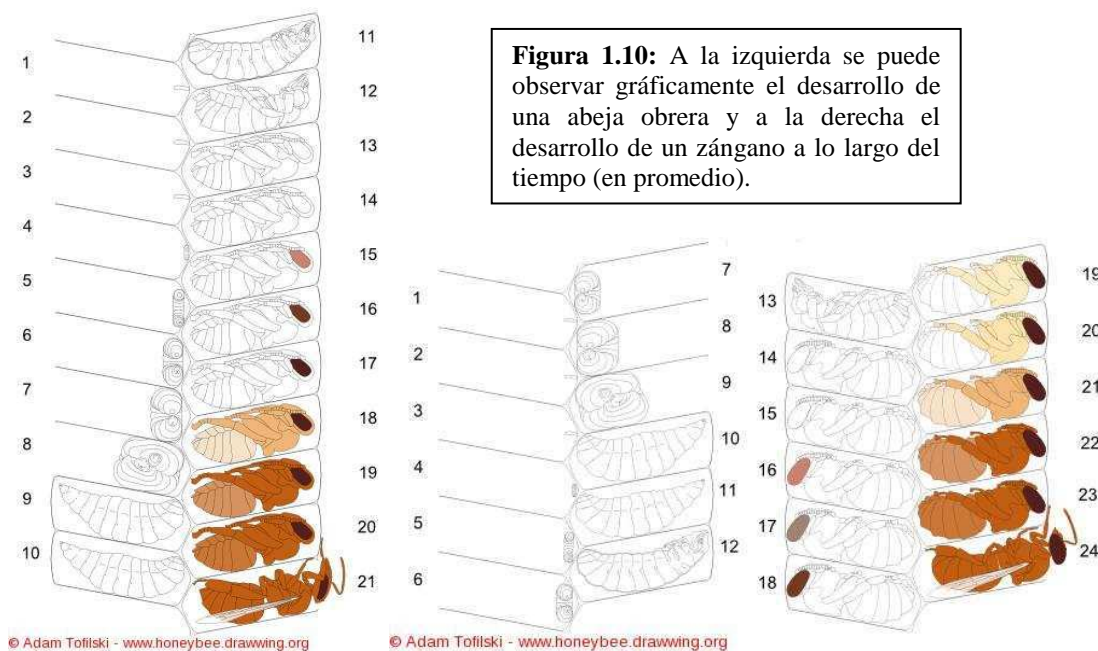
Durante el desarrollo de las abejas melíferas, las tres castas atraviesan cuatro estadios: huevo, larva, pupa y finalmente, el estadio adulto. La reina deposita los huevos en las

celdas de las futuras obreras o de los zánganos. De los huevos fertilizados se desarrollan las obreras o reinas mientras que de los no fertilizados se desarrollan los zánganos. El embrión crece dentro del huevo por un período de 3 días consumiendo las proteínas del mismo. Luego eclosiona la larva que durante el período larval se alimenta aumentando considerablemente de tamaño y peso, atravesando cuatro mudas. Como se mencionó anteriormente, las encargadas de alimentar a las larvas con una mezcla de miel, polen y compuestos de las glándulas hipofaríngeas, son las abejas nodrizas. Esto ocurre dentro de las celdas que se encuentran descubiertas (ver figura 1.9). Hacia el quinto estadio larval, la larva deja de consumir alimento al mismo tiempo que las abejas obreras adultas sellan las celdas con una mezcla de cera. Las larvas generan un capullo de seda dentro de la celda y se orientan hacia el exterior. Luego de una última muda se comienza a desarrollar la pupa. Durante el estadio pupal se lleva a cabo la metamorfosis. A través de este proceso, las abejas sufren grandes cambios a nivel estructural y fisiológico. No solo hay cambios a nivel de tamaño sino que hay variaciones en cuanto a la diferenciación celular, se dispara la rápida división de un grupo de células inactivas e indiferenciadas en la larva, conocidas como células imaginales. Este grupo de células activas formarán los tejidos del adulto o imago, que reemplazarán los tejidos de la larva. La reorganización de los tejidos y órganos tiene lugar por medio de la acción de enzimas digestivas que destruyen la mayor parte de las células, lo cual recibe el nombre de histólisis. Los nutrientes derivados de este proceso son usados para construir los nuevos tejidos del adulto en el proceso de histogénesis. De esta manera, la pupa se asemeja al adulto que al finalizar su desarrollo, rompe la cubierta de la celda con su mandíbula emergiendo como una abeja joven.



Figura 1.9: Larvas de abejas melíferas desarrollándose en el interior de las celdas abiertas, recibiendo alimento por parte de las nodrizas. Crédito fotográfico: Alex Wild

El proceso de desarrollo desde el huevo hasta el adulto varía entre castas, siendo de 16 días para la reina, 21 días para las obreras y 24 días para los zánganos (ver figura 1.10). El tiempo de desarrollo varía dependiendo de la temperatura, la nutrición y la raza de abejas.



Con respecto al SNC durante el desarrollo de las abejas, se mencionó anteriormente en esta introducción que atraviesa algunas modificaciones y reconstrucciones. Sin embargo la estructura general se mantiene a través todos los estadios. Es interesante en este punto considerar las diferencias respecto al desarrollo del SNC producto de las diferencias en el desarrollo de las distintas castas. Por ejemplo, Roat y Landim (2008), concluyeron que los distintos tipos de alimentación en las larvas de reina y obreras causan diferencias en la expresión de algunos genes, lo cual se correlaciona con un crecimiento diferencial de las estructuras cerebrales (Roat y Landim 2008). Esto va de la mano con el trabajo de Groh y

Rössler (2008) sobre el desarrollo diferencial entre abejas reinas y obreras, cuya principal variación radica en el tipo de alimentación que reciben durante el desarrollo larval. Los investigadores evidenciaron cambios en el desarrollo de los centros olfativos primarios (lóbulos antenales) y secundarios (cuerpos pedunculados) del cerebro. Estos cambios no fueron sólo estructurales sino que los complejos sinápticos (microglomérulos) en las regiones de entradas sensoriales de los cuerpos pedunculados, se establecieron más tempranamente en las reinas generando así una menor cantidad de sinapsis durante el desarrollo. Los autores propusieron entonces que estos resultados son la explicación al bajo rendimiento en un aprendizaje olfativo de las reinas comparado con las abejas obreras (Groh y Rössler 2008).

Otro trabajo del mismo grupo reveló que al variar la temperatura durante el desarrollo de la abeja reina, los microglomérulos sinápticos de los cuerpos pedunculados se ven afectados en cuanto a la cantidad establecida. A la vez que evidencian diferencias en cuanto a la cantidad y densidad de estos complejos entre la reina y las obreras adultas. Este estudio reveló una gran plasticidad en la organización sináptica dentro de las regiones de entradas sensoriales en los cuerpos pedunculados del cerebro de las abejas (Groh et al. 2006).

Dadas estas evidencias, es plausible plantear que un medio de cría diferencial en cuanto a la dieta de las abejas obreras durante su desarrollo, puede tener efectos a nivel de SNC, modificando las estructuras relacionadas con la capacidad del aprendizaje y por ende con el establecimiento de memorias, eventos que pueden subyacer a las variaciones en el comportamiento del adulto.

1.4 Objetivos e Hipótesis

El objetivo general de esta tesis es evaluar el rol de las experiencias olfativas adquiridas en un contexto apetitivo durante estadios pre-imaginales y sus posibles afectos en el comportamiento de las abejas adultas.

Los objetivos e hipótesis particulares son:

1. Dado que ya se ha demostrado que la larva de un insecto holometábolo como *Drosophila*, establece asociaciones entre estímulos (Gerber y Stocker 2007), es probable que también en *Apis mellifera* se generen eventos de aprendizaje durante estadios larvales mediante la asociación entre un olor y el alimento ofrecido. Esta presunción se debe a que en la circulación de alimento se transfiere información a todas las compañeras del nido y se generan así eventos de aprendizaje que conllevan a la formación de memorias estables y duraderas aun en individuos que no están involucrados en tareas de recolección. Sumado a que los primeros eventos de aprendizaje podrían resultar durante la interacción adulto-cría, el objetivo de este capítulo es evaluar el establecimiento de memorias estables y de largo término que persistan luego de la metamorfosis. Proponemos que las abejas en desarrollo pueden generar este tipo de memorias olfativas que se evidencien incluso en el individuo adulto.

2. Debido a que la estimulación olfativa temprana en adultos modifica la respuesta comportamental y neural hacia el olor pre-expuesto así como también hacia los olores perceptualmente similares, se pretende evaluar los efectos de las experiencias pre-imaginales sobre las preferencias olfativas específicamente en lo que respecta al fenómeno de generalización. Se propone que una estimulación olfativa pre-imaginal incrementa los

niveles de generalización de los individuos así como también mejora sus habilidades cognitivas en cuanto a la capacidad de asociar el olor pre-expuesto con una recompensa.

3. Correlacionar las experiencias olfativas pre-imaginales con modificaciones fisiológicas y morfológicas del sistema olfativo de la abeja adulta, como ser los órganos sensoriales y los receptores olfativos. Dada las evidencias sobre la modulación de la respuesta fisiológica de los receptores olfativos y la plasticidad de los órganos sensoriales en abejas adultas con distintas experiencias a lo largo de su vida, proponemos que estas modulaciones se evidencien tempranamente en abejas adultas jóvenes que hayan sido sujetas a experiencias olfativas pre-imaginales.

4. Correlacionar los comportamientos registrados con modificaciones a nivel del sistema nervioso central, evaluando la expresión de genes involucrados en procesos de formaciones sinápticas entre abejas adultas con o sin experiencias pre-imaginales. Proponemos que los comportamientos específicos de cada grupo experimental de abejas presenta un correlato a nivel central, que podrían expresarse diferencialmente por ejemplo a través de la expresión de genes vinculados a conectividad neural.

5. Evaluar el comportamiento de las larvas que han sido sujetas a experiencias olfativas durante su desarrollo, bajo condiciones controladas de laboratorio, en cuanto a su actividad locomotora y elección olfativa. Para lograr este objetivo se pretende desarrollar protocolos acordes para las evaluaciones comportamentales en las larvas de la abeja melífera. Utilizando protocolos de cría estandarizados y controlando la alimentación de la larva, proponemos que las mismas son capaces de formar memorias olfativas modificando así sus comportamientos.

2

2. EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA DURANTE ESTADIOS PRE-IMAGINALES: EFECTO SOBRE LA CONDUCTA DEL ADULTO.

2.1 Introducción

Las respuestas comportamentales de los animales pueden ser moduladas por los estímulos sensoriales que se encuentran en el ambiente y que pueden variar de un momento a otro. Sin embargo, estas modificaciones del ambiente que generan distintas experiencias en los individuos, tienen un efecto más drástico si ocurren durante los primeros estadios de vida, ya que pueden moldear los comportamientos durante largos períodos de tiempo incluso a veces de una manera irreversible (Lorenz 1935). Desde el ejemplo que describe la impronta de la conducta de apego en los gansos poco después de salir del huevo, han sido descriptas una gran variedad de experiencias cognitivas y sensoriales que modifican los comportamientos de los adultos en muchos grupos incluyendo a los humanos (Neal 1972, Cornwell-Jones et al. 1988, Cramer et al. 1988, Gschanes et al. 1998, Matthews y Robbins 2003, Pryce y Feldon 2003, Schäble et al. 2007). En las últimas tres décadas, la abeja *Apis*

mellifera ha sido considerada como un buen modelo de estudio dentro de los invertebrados para estudiar la plasticidad comportamental y neuronal producto de experiencias tempranas (Masson y Arnold 1984; 1987, Winnington et al. 1996, Sigg et al. 1997, Farris et al. 2001, Brown et al. 2004). Dentro de las colonias de abejas, la información olfativa y gustativa relacionada con recurso explotado se transfiere inadvertidamente entre los individuos, mediante trofalaxia. Estas interacciones sociales ocurren permanentemente entre los individuos y las primeras se llevan a cabo durante el desarrollo larval de la abeja obrera estableciéndose así las primeras experiencias sensoriales de las abejas. Las larvas de insectos holometábolos como *Drosophila*, pueden aprender de manera asociativa (Gerber y Stocker 2007). Sin embargo, no se ha revelado aun si luego de la metamorfosis, las memorias formadas en estadios pre-imaginales pueden persistir en la abeja doméstica *Apis mellifera*. Algunos resultados indican que memorias de olores aversivos adquiridos por larvas de distintas especies de mosca sí pueden evocarse durante el estadio adulto (Tully et al. 1994, Ray 1999). También claves olfativas relacionadas, como el reconocimiento de congéneres, pueden ser retenidas más allá de la metamorfosis en hormigas *Cataglyphis cursor* (Isingrini et al. 1985). Una investigación reciente determinó que el alimento aromatizado ofrecido en avispas parasitoides de la especie *Hyssopus pallidus* durante la fase huevo-larva es suficiente como para establecer memorias con retención de hasta 14 días (Gandolfi et al. 2003). Estos resultados permiten suponer que la retención de memorias del olor del alimento más allá de la metamorfosis es una hipótesis plausible a corroborar en estos insectos sociales. La ingestión de alimento, que durante el estadio larval se encuentra mediado por una interacción “social” como la trofalaxia, podría ser una situación que

facilite el establecimiento de este tipo de memorias. En este capítulo se pretende establecer si es posible que se generen memorias olfativas durante estadios pre-imaginales y que las mismas perduren aun luego de la metamorfosis. Ha sido sugerido que las memorias olfativas formadas durante la circulación del alimento entre los individuos de la colonia afectan la sensibilidad al azúcar, lo que lleva a un estado de excitación y alerta (Hammer, 1997) que termina modificando los umbrales de respuesta al azúcar (URA) (Ramirez et al. 2010). Por lo tanto se pretende también evaluar si las experiencias olfativas pre-imaginales afectan la percepción gustativa de las abejas sujetas a estas experiencias. Más aun, ahondando en las habilidades cognitivas de los individuos, trabajos recientes mostraron que este tipo de comportamientos en abejas adultas jóvenes (menos de 7 días de edad) es más plástico de lo que se creía, es decir que este grupo de abejas es capaz de generar memorias olfativas estables y de largo término (Arenas y Farina 2008, Behrends y Scheiner 2009). Apoyando este hecho se realizaron experimentos donde se evaluó el efecto del aprendizaje olfativo a edades tempranas de la abeja sobre el comportamiento en edades avanzadas (Arenas y Farina 2008). Los resultados indicaron que las memorias olfativas conformadas a edades tempranas en la abeja pueden ser recuperadas a edades recolectoras (aproximadamente 17 días de edad). Teniendo estos antecedentes en cuenta, evaluaremos si las experiencias olfativas pre-imaginales modifican el aprendizaje durante un condicionamiento diferencial hacia el olor pre-expuesto y hacia un olor novedoso en abejas adultas de temprana edad.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Sitio de estudio y animales

Los experimentos se realizaron entre octubre y abril de 2008 y 2009 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O). Se utilizaron tres colmenas comerciales de *Apis mellifera* del apiario experimental en las cuales se introdujo un alimentador artificial. Los sujetos experimentales fueron obtenidos de cuadros de cría identificados y mantenidos en el interior de la colmena hasta sus estadios pupales. Luego, los cuadros con sus celdillas de cría ya operculadas (cerradas por las abejas nodrizas) fueron colocados dentro de una incubadora en el laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (36 °C y 55% HR). Después de su emergencia como adultos (entre 0 a 1 día de edad), las abejas fueron ubicadas en grupos de 120 individuos aproximadamente dentro de cajas de madera (10 x 10 x 10cm), que presentaban en una de sus caras una malla plástica, y orificios en donde se colocaron los alimentadores (ver figura 2.1). Las abejas confinadas fueron alimentadas *ad libitum* con solución de sacarosa 50% p/p y polen, y mantenidas en incubadora bajo condiciones controladas de laboratorio (31 °C, 55% HR y oscuridad) hasta el momento de las correspondientes evaluaciones.

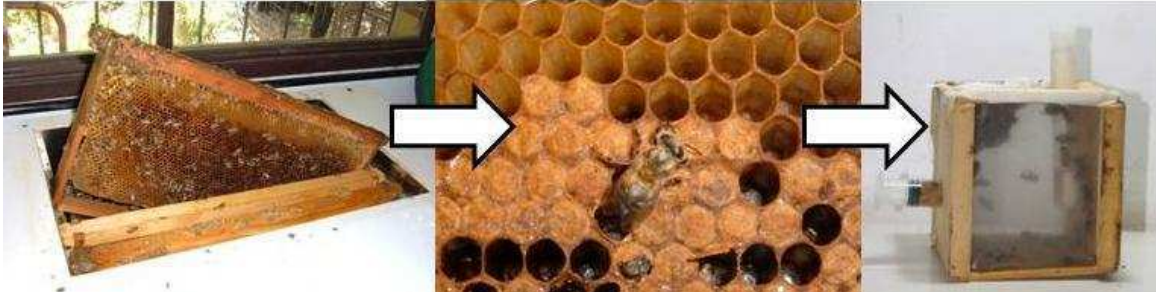


Figura 2.1: En la secuencia fotográfica, se puede observar hacia la izquierda un cuadro de cría operculada y abejas recién emergidas dentro de una incubadora. En el centro se observa en detalle una obrera emergiendo y hacia la derecha, se encuentran las abejas experimentales dentro de cajas de madera de (10x10x10) cm con alimento *ad libitum* que serán mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad hasta el momento de registro.

2.2.2 Procedimiento experimental

El objetivo de estos experimentos fue evaluar el efecto de diferentes dietas ofrecidas durante el desarrollo larval de la abeja melífera sobre su comportamiento en el estadio adulto. Para ello 3 soluciones de alimento fueron ofrecidos en 3 diferentes colmenas mediante el uso de un alimentador artificial ubicado en el interior de las mismas. Los alimentos ofrecidos fueron soluciones azucaradas (50%p/p) con distintos olores puros disueltos en dicha solución. En el caso de la Colmena 1, ningún olor fue incorporado en la solución azucarada por lo que consideramos a estas abejas como el grupo control (Sin olor). Mientras que para las Colmenas 2 y 3, una fue alimentada con solución azucarada

aromatizada con Linalool (LIO, 50µl/L) y la otra con Fenilacetaldehído (PHE, 50µl/L). Este alimento circuló dentro de las colmenas durante una semana. Luego de este periodo se incorporó en cada colmena un cuadro apícola con huevos, que fue previamente marcado para su posterior seguimiento a lo largo del desarrollo de los individuos. Durante el período de desarrollo larval, se introdujeron 1,5 litros de alimento cada dos días. Cabe destacar que bajo estas circunstancias, las larvas fueron alimentadas por las abejas nodrizas. Antes del comienzo de los estadios pupales (en el día 8 del desarrollo de la abeja según Winston 1987), los cuadros con cría que fueron alimentados con soluciones azucaradas aromatzadas fueron colocados en otras colmenas (naïve) con la finalidad de evitar continúen su desarrollo dentro de un ambiente aromatzado. Entre los días 12 y 15 del desarrollo, los cuadros blanco ya operculados fueron trasladados a las incubadoras bajo condiciones controladas (ver detalles en la sección 2.2.1) hasta la emergencia de individuos adultos. Las abejas de entre 3 y 5 días de edad como adultas fueron utilizadas para evaluar procesos sensoriales y cognitivos utilizando las metodologías que se detallan a continuación.

2.2.3 Sensibilidad Gustativa

Tanto en las abejas como en otros insectos succionadores, a la extensión de su probóscide se la puede considerar como una respuesta refleja frente al contacto de solución azucarada en sus antenas (Frings 1944) (ver figura 1.4). A partir de esta respuesta es posible realizar presentaciones sucesivas de soluciones azucaradas de concentración creciente sobre las antenas con el fin de evaluar la sensibilidad del individuo a este estímulo gustativo (Page et

al. 1998). Se interpreta a la mínima concentración de sacarosa que la abeja diferencia del agua y que provoca la extensión de su probóscide como el valor umbral de respuesta al azúcar (URA) de ese individuo (Page et al. 1998)

El protocolo de URA fue establecido y utilizado anteriormente en abejas melíferas, el mismo consiste en presentarle a los individuos experimentales, amarrados en cepos metálicos con sus piezas bucales y antenas libres (Takeda 1961, Bitterman et al. 1983), una sucesión de soluciones azucaradas (sacarosa) en orden creciente de concentración intercalando agua entre cada presentación (Page et al. 1998, Pankiw y Page 1999). Para amarrar a las abejas, previamente se las anestesió con frío (-4°C) y se las mantuvo en incubadora (32°C, 55% HR y oscuridad) por aproximadamente 3 horas para evitar el estrés producido por la manipulación. En primera instancia, a cada abeja se le presentó agua entre las sucesivas concentraciones de solución azucarada. Aquellos individuos que respondieron extendiendo su probóscide ante la presentación del agua fueron saciados con la misma para evitar que la sed interfiriera en los resultados obtenidos. La respuesta al agua evaluada antes de presentar cada concentración de sacarosa, fue determinada también como control para evitar un potencial incremento de sensibilización o habituación (Page et al. 1998). Las antenas de cada abeja fueron tocadas una vez con un palillo de madera embebido con solución de sacarosa 0.1% peso/peso (p/p), y así sucesivamente en orden creciente de concentración se presentaron las siguientes soluciones de sacarosa: 0.3%, 1%, 3%, 10%, 30% y 50% (p/p). El intervalo entre la presentación de una concentración de solución de sacarosa y la subsiguiente, tanto para el agua como para el azúcar, varió entre 2 y 4 minutos dependiendo de la cantidad de individuos evaluados en cada ensayo (de aproximadamente

30 abejas). Aquellos individuos que respondieron al menos a la solución más concentrada (sacarosa 50% p/p) fueron incluidos en el análisis. Los individuos que no extendieron sus piezas bucales a ninguna de las concentraciones presentadas, fueron excluidos del análisis dado a que no se pueden determinar las causas de la ausencia de respuesta, las cuales podrían deberse a individuos con mayor umbral, saciados, u otros factores. Se registraron los puntajes de respuesta al azúcar de cada individuo. Este puntaje es el número de concentraciones para las cuales la abeja extendió su probóscide y se correlaciona con el umbral de respuesta al azúcar a partir del cual los individuos responden a todas las concentraciones de azúcar mayores (Page y Erber 2002). Esta respuesta fue cuantificada de uno (1) a siete (7), siendo el valor uno (1) el puntaje correspondiente a la respuesta del individuo ante la solución de sacarosa 50% p/p y siete (7) el que representa el puntaje de una abeja que respondió a las siete (7) concentraciones. Cabe destacar que la mayoría de los individuos que respondieron a bajas concentraciones de sacarosa también extendieron su probóscide a las de mayor concentración. Si alguna abeja no respondió a una concentración de sacarosa, pero sí extendió su probóscide ante la concentración menor que la antecede y a la mayor que la precede durante el protocolo, el puntaje registrado se corresponde con la mínima concentración de sacarosa a la cual el individuo respondió extendiendo su probóscide.

2.2.4 Respuesta espontánea de extensión de probóscide

La respuesta de extensión de probóscide puede ser desencadenada en el caso de las abejas, por un estímulo olfativo que *a priori* resulta neutro para el individuo, pero que luego de

asociarlo con la recompensa representará el valor de la misma. Por lo tanto, una vez establecida la asociación, la sola presencia de dicho estímulo desencadena la respuesta de extensión de probóscide (REP). La misma puede ser cuantificada utilizando el protocolo de REP que consiste en presentar ante las antenas de las abejas un determinado estímulo olfativo evaluando si el individuo extiende o no su probóscide frente a un determinado olor. Si la abeja responde extendiendo su probóscide ante la presencia de un olor sobre sus antenas, esta respuesta es espontánea indicando que previamente se produjo la asociación de ese estímulo olfativo con una recompensa. Para dicho fin se utilizó un dispositivo que entregaba un flujo continuo de aire controlado y mediante el cual se liberaban los olores. Los olores presentados fueron el LIO y el PHE, olores utilizados como estímulos neutros en los tratamientos detallados dentro del procedimiento experimental. Cada olor (4 μ l de olor puro) fue impregnado sobre un papel de filtro (30 x 3 mm) y colocado dentro de una jeringa. Durante la entrega del olor, el volátil fue liberado a través de una segunda corriente de aire (2,5ml/seg) que se conecta a la corriente principal. Durante este ensayo, un flujo constante de aire de 50 ml/seg fue dirigido hacia la cabeza del individuo experimental, a través de un tubo de 1cm de diámetro ubicado a 2 cm aproximadamente de la abeja que se encontraba amarrada en un cepo metálico con libre movimiento de sus antenas y piezas bucales (Takeda 1961, Bitterman et al. 1983). Las antenas del individuo experimental ubicado frente al dispositivo descrito anteriormente, se alineaban con la dirección del flujo de aire y de olor (Figura 2.2).

La REP fue también cuantificada con la finalidad de evaluar el efecto sobre la formación de memorias olfativas del entorno del cuadro de cría donde las abejas se desarrollaron

mientras circulaba alimento aromatizado o sin aromatizar en la colmena. Para ello se colocaron porciones de cera del cuadro de cría (pertenecientes a cada grupo experimental) en un kitasato que a través de cánulas se conectaba a una bomba de aire y al dispositivo que mediante un flujo continuo de aire entregaba los olores. Se utilizaron la cera del cuadro de cría de la colmena donde circuló solución azucarada sin aromatizar y de la que circuló solución azucarada con PHE. A su vez, se presentó como olor puro, 4 μ l de PHE para comparar la REP a este olor con el de la cera. Ambos olores se entregaban alternadamente sobre las antenas de las abejas experimentales amarradas y situadas frente a la corriente de aire.

Con el fin de obtener a las abejas amarradas, previamente fueron anestesiadas con frío (-4 °C) y colocadas en los cepos metálicos. Se las mantuvieron en reposo dentro de una incubadora (32 °C, 55% HR y oscuridad) hasta el momento de la evaluación, aproximadamente 3 horas para minimizar el estrés provocado por la manipulación. Los individuos utilizados para medir la REP ante los respectivos olores, fueron aquellos que al contactarse las antenas con solución de sacarosa 50% p/p extendieron su probóscide y no presentaron respuesta al estímulo mecánico (flujo de aire). El intervalo entre la entrega de un olor y otro fue de aproximadamente entre 8 y 10 minutos variando de acuerdo a la cantidad de individuos experimentales a evaluar.

Durante la experimentación en este dispositivo, los olores liberados fueron extraídos hacia el exterior mediante un extractor para evitar contaminación.



Figura 2.2: En la fotografía se observa una abeja experimental encepada y alineada frente al dispositivo que libera estímulos olfativos (olores puros)

2.2.5 Condicionamiento Diferencial

La REP es factible de ser condicionada en el laboratorio con el fin de estudiar la dinámica del aprendizaje asociativo en *Apis mellifera*. Por un lado uno de los protocolos utilizados es el condicionamiento absoluto mientras que por otro lado se puede utilizar el protocolo de condicionamiento diferencial con el objetivo de complejizar el aprendizaje, ambos enmarcados en las bases del condicionamiento clásico o Pavloviano. Con el fin de analizar si las experiencias pre-imaginale tienen algún efecto sobre las habilidades cognitivas de las abejas, nos propusimos implementar un protocolo de condicionamiento diferencial. Para ello las abejas experimentales fueron primeramente anestesiadas con frío (-4 °C) y luego

amarradas en cepos metálicos donde solamente podían mover libremente sus mandíbulas y antenas. Luego de amarrarlas se las mantuvo en una incubadora (32 °C, 55% HR y oscuridad) por aproximadamente 3 horas con el objeto de reducir el estrés producido por la manipulación. Las abejas experimentales fueron sometidas a un protocolo de condicionamiento diferencial en donde dos olores puros fueron presentados (Bitterman et al. 1983), uno recompensado (estímulo condicionado recompensado, EC+) con solución de sacarosa 50% de peso/peso (estímulo incondicionado, EI) y el otro no recompensado (estímulo condicionado no recompensado, EC-). En éste tipo de condicionamiento el individuo, debe aprender a discriminar entre los dos estímulos y a asociar sólo uno de ellos a la recompensa (Giurfa, 2003), de esta manera ante la mera presencia del EC+ la abeja extenderá su probóscide mientras que no lo hará en presencia del EC-. Más aún la respuesta a uno de los estímulos y la no-respuesta al otro, permite descartar la presencia de fenómenos de aprendizaje no asociativo, como la sensibilización que desencadenaría un aumento indiscriminado en la respuesta a ambos estímulos (Hammer y Menzel 1995). Al igual que para la evaluación de la REP, se utilizó un dispositivo con una corriente de aire continua (50 ml/s) para entregar los olores; este flujo fue presentado directamente sobre la cabeza de cada individuo a través de un tubo (1 cm de diámetro) ubicado frente a cada abeja a 2 cm. Cada olor puro (4 µL) fue impregnado en un papel de filtro (30 x 3 mm) y colocado dentro de la jeringa. El compuesto volátil fue entregado por una corriente de aire secundaria (2,5 ml/s) inyectado en la corriente de aire principal al momento de ser presentado (ver figura 2.2). Las abejas fueron expuestas a los dos estímulos olfativos (olores puros) una determinada cantidad de veces (en forma balanceada, es decir mismo

número de veces para el estímulo recompensado como para el estímulo no recompensado). Los dos estímulos olfativos fueron presentados diez veces en total: cinco cada uno en un orden pseudo-aleatorio (EC-, EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+, EC+, EC-). Entre cada presentación de estímulos (ensayos) el intervalo temporal fue de 10-15 min. Sin embargo un intervalo de 30 min fue mantenido entre la última presentación de EC y la evaluación, que consistió en la sola presentación sucesiva de ambos olores sin asociarlos a la recompensa. En cada ensayo se cuantificó la REP durante los primeros 3 segundos de presencia del olor, es decir antes de asociarlo con la recompensa. Las abejas utilizadas en este condicionamiento fueron aquellas que extendieron su probóscide ante la presentación de solución de sacarosa (1,8M) sobre sus antenas (respuesta incondicionada) y a la vez no respondieron al estímulo de la corriente de aire (respuesta mecánica). Durante el protocolo de condicionamiento los volátiles fueron eliminados mediante un extractor de aire para evitar de esta manera, la contaminación del medio que rodea a los sujetos experimentales. Cada ensayo tuvo una duración de 40 segundos, en donde la presentación del olor (EC) fue de 6 seg. Tres segundos luego del inicio del EC+ se presentó como recompensa solución de sacarosa 1,8 M. Luego del condicionamiento se elaboró un índice de generalización (IG) con el objetivo de comparar el grado en que los distintos grupos de abejas experimentales generalizan entre los olores condicionados. El IG se basó en las REP obtenidas durante los 5 pares de ensayos del entrenamiento (Sandoz et al. 2001; Gramacho y Spivak 2003):

$$IG = 1 - \frac{(R+) - (R-)}{(R+) + (R-)}$$

Donde la $R +$ es la sumatoria de las REP para el EC+ y $R -$ la sumatoria de REP para el CS-. Para cada abeja se calculó el IG pudiendo obtener diferentes valores que rondan entre 0 y 2. El valor 0 implica que todas las abejas respondieron al EC+ mientras que el valor 1 indica que las abejas respondieron equitativamente al EC+ como al EC-. Valores mayores a 1 significan que las abejas respondieron mayoritariamente al EC-.

2.3 Análisis Estadístico

Para analizar los valores de URA se utilizó estadística no paramétrica dado que los datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza (Sokal 2000). Por lo tanto se realizaron un test de Kruskal-Wallis y las subsiguientes comparaciones de Dunn con el fin de evaluar si las medianas de los valores de URA obtenidas para cada grupo experimental diferían entre sí (Zar 1999). Los porcentajes de abejas que respondieron extendiendo su probóscide (REP) ante los olores previamente expuestos durante su desarrollo larval (LIO o PHE), fueron analizadas utilizando un análisis de proporciones (prueba de Z). Ya que los datos han sido utilizados más de una vez se realizó una corrección mediante el método de Bonferroni para reducir el riesgo de cometer error del tipo I, por lo tanto el valor de significancia se corrigió de la siguiente manera: $\alpha' = \alpha/k$ donde $\alpha = 0,05$ y $k=2$ (Sokal 2000). De esta manera en este caso, el nivel de significancia fue de $\alpha' = 0,025$.

Durante la etapa de entrenamiento del condicionamiento diferencial las REPs frente al olor condicionado (EC+) y al no condicionado (EC-) fueron comparadas entre los diferentes grupos experimentales de abejas, utilizando un análisis de varianza de medidas repetidas

(ANOVA-MR) utilizando un nivel de significancia del 5%. Es factible aplicar este tipo de pruebas para el análisis de datos dicotómicos cumpliendo con ciertos requisitos: que los grados de libertad del error sean mayores o iguales a 40 (Lunney 1970) y el diseño sea balanceado. Si la interacción entre los factores resultó significativa, se realizó un análisis de efectos simples; seguidos de ser necesario, por comparaciones de Tukey. Los IGs obtenidos para cada grupo experimental luego del entrenamiento en un condicionamiento diferencial, fueron comparados mediante un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (los datos no cumplieron con el requisito de homogeneidad de varianzas, Sokal 2000) seguidos de comparaciones de Dunn (Zar 1999). Finalmente, un análisis de proporciones (prueba Z) fue realizado para comparar el porcentaje de REP frente al olor de la cera de los cuadros donde las abejas se habían desarrollado y hacia el PHE, para ambas condiciones experimentales de cría: abejas alimentadas con solución azucarada aromatizada con PHE o sin aromatizar durante sus estadios larvales.

2.4 Resultados

2.4.1 Sensibilidad gustativa en abejas adultas luego de las experiencias olfativas pre-imaginales.

Con el objetivo de evaluar si las experiencias olfativas pre-imaginales modificaron los umbrales de respuesta al azúcar, los puntajes obtenidos, luego haber realizado un protocolo de URA, en abejas de 3 a 5 días de edad como adultas alimentadas en sus estadios larvales con diferentes dietas fueron comparados. No se evidenciaron diferencias significativas al comparar las medianas obtenidas en abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales

(medianas: solución azucarada sin olor= 3, solución azucarada aromatizada con LIO= 3 y solución azucarada aromatizada con PHE= 2; Kruskal-Wallis: $H= 3,07$, $p= 0,215$, $N= 172$; ver figura 2.1).

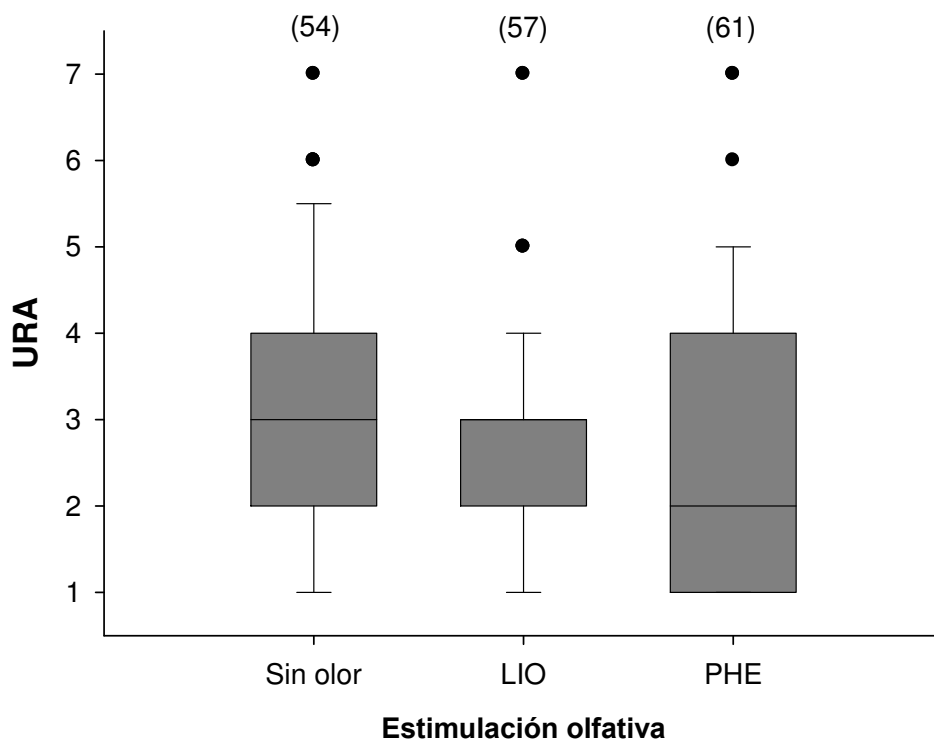


Figura 2.1: Umbrales de Respuesta al Azúcar (URA). Las abejas adultas fueron estimuladas dentro de la colmena con solución azucarada (50% p/p) aromatizada con diferentes olores (Linalool, LIO o Fenilacetaldehído, PHE) o sin aromatizar durante los estadios larvales. Las abejas luego de su emergencia como adultos fueron criadas en condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación (entre 3 a 5 días de edad). Se cuantificaron los puntajes de respuesta al azúcar para cada grupo de abejas estimuladas. No se encontraron diferencias estadísticas en una prueba de Kruskal-Wallis ($p>0,05$). Entre paréntesis se muestra el número de observaciones.

2.4.2 Efecto de las experiencias olfativas pre-imaginales sobre las respuestas apetitivas al olor pre-expuesto

La finalidad de este experimento es evaluar si una alimentación diferencial durante el desarrollo larval de la abeja influye sobre la evocación de la memoria olfativa producto de la asociación entre la solución azucarada y el olor disuelto en la misma en abejas adultas. Para ello se compararon los porcentajes de REP hacia el olor asociado al alimento (LIO o PHE) de abejas de entre 3 a 5 días de edad alimentadas con o sin solución azucarada aromatizada durante sus estadios larvales. Los resultados obtenidos mostraron niveles de REP significativamente mayores hacia los olores pre-expuestos en abejas adultas con experiencias olfativas pre-imaginales en comparación con abejas de la misma edad que fueron alimentadas durante sus estadios larvales con alimento sin aromatizar (REP hacia LIO, $Z=-2,076$, $p=0,0189$, $N=87$; REP hacia PHE, $Z=-2,092$, $p=0,0182$, $N=87$, figura 2.2 A y B). Más aun, aquellas abejas que respondieron al olor pre-expuesto (LIO o PHE) también respondieron a un olor novedoso (si LIO fue pre-expuesto, el novedoso fue PHE y viceversa), evidenciando mayores niveles de REP (ver las barras rayadas en la figura 2.2 A y B)

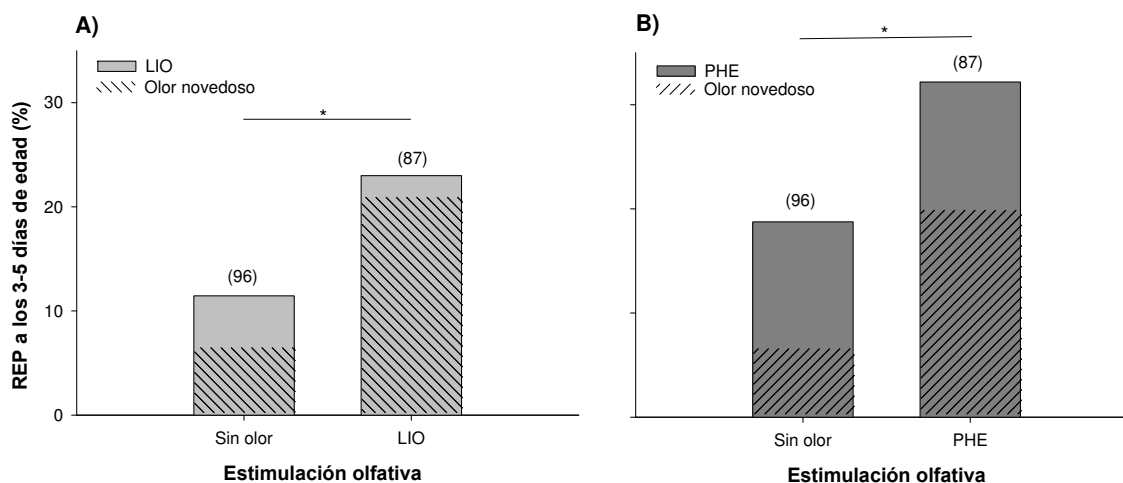


Figura 2.2: Respuesta de extensión de probóscide (REP) frente a diferentes olores puros de abejas adultas jóvenes previamente estimuladas durante la etapa pre-imaginal a un olor puro asociado a recompensa dentro de la colmena. Las abejas adultas fueron mantenidas en condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación (3-5 días de edad). Se cuantificaron los porcentajes de abejas que extendieron su probóscide (% REP) ante la primera presentación de un olor: LIO, barras gris claro (A) o PHE, barras gris oscuro (B). Luego de la evaluación al olor pre-expuesto (PHE o LIO), la REP hacia un olor novedoso también fue cuantificada, barras rayadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en un Z-test para dos proporciones (* $p < 0,025$). Entre paréntesis se muestra el número de observaciones.

2.4.3 Efecto de las experiencias olor-recompensa en los estadios pre-imaginales sobre la discriminación de olores en abejas adultas

Las abejas adultas tienen la capacidad de discriminar entre un olor asociado a recompensa y otro que no, hecho que se pone a prueba mediante un condicionamiento diferencial. El objetivo de este experimento fue evaluar si las experiencias olfativas pre-imaginales modifican esta capacidad cognitiva que presentan las abejas adultas. Para ello se compararon los desempeños a lo largo del entrenamiento entre los distintos grupos

experimentales de abejas (alimentadas con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar durante sus estadios larvales). Durante la fase de adquisición del condicionamiento diferencial se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos. Las abejas que han sido alimentadas con solución azucarada aromatizada con PHE presentan diferencias significativas en comparación con las otras abejas experimentales durante la fase de adquisición en un condicionamiento diferencial hacia LIO, ya que los niveles de REP hacia PHE (en este caso el EC-) fueron mayores en el segundo y tercer ensayo (interacción entre el ensayo y el olor pre-expuesto: $F_{8, 336} = 2,03$, $p = 0,042$, efecto simple para el segundo ensayo del EC-: $F_{2, 840} = 6,09$, $p = 0,002$; tercer ensayo del EC-: $F_{2, 840} = 4,36$, $p = 0,013$; tercer ensayo del EC+: $F_{2, 840} = 3,36$, $p = 0,035$ y comparaciones *post hoc* de Tukey: $p < 0,05$, ANOVA-MR, ver figura 2.3 A). A la vez, las abejas que han sido alimentadas con solución azucarada aromatizada con LIO, disminuyen su rendimiento (menores niveles de REP) durante el condicionamiento hacia PHE comparado con las abejas criadas con alimento aromatizado con PHE o sin aromatizar (interacción entre el estímulo condicionado y el olor pre-expuesto: $F_{2, 57} = 6,06$, $p = 0,004$, efecto simple para el EC+ entre olores pre-expuestos: $F_{2, 570} = 16,32$, $p = 1,3 \cdot 10^{-7}$ comparaciones de Tukey: $p < 0,05$ ANOVA-MR, ver figura 2.3 C). Dado a que los resultados en la sección 2.4.3 indicaron que un alto porcentaje de las abejas alimentadas con soluciones azucaradas aromatizadas que respondieron hacia el olor pre-expuesto también respondieron a un olor novedoso, se compararon los IG de abejas adultas (de 3 a 5 días de edad) luego de un condicionamiento diferencial hacia los olores pre-expuestos. Cuando el LIO actúa como el olor recompensado (EC+, en el condicionamiento diferencial), las abejas de 3-5 días de edad que fueron pre-expuestas con

PHE presentaron valores de IG más elevados que las abejas pre-expuestas a LIO o sin olor ($H = 8,04$, $p = 0,015$, $N = 124$, prueba de Kruskal-Wallis; PHE vs LIO: $Q = 2,43$, $p < 0,05$, contraste de Dunn; PHE vs sin olor: $Q = 3,12$, $p < 0,01$, contraste de Dunn; figura 2.3 B). Sin embargo, cuando PHE actuó como EC+, las abejas que han sido alimentadas siendo larvas con solución azucarada aromatizada con PHE o LIO mostraron niveles de IG más alto que las abejas previamente expuestas a una solución azucarada sin aromatizar ($H = 9,51$, $p = 0,008$, $N = 121$; prueba Kruskal-Wallis; PHE vs sin olor: $Q = 3,20$, $p < 0,05$, contraste de Dunn; LIO vs sin olor: $Q = 2,42$, $p < 0,01$, contraste de Dunn; figura 2.3 D).

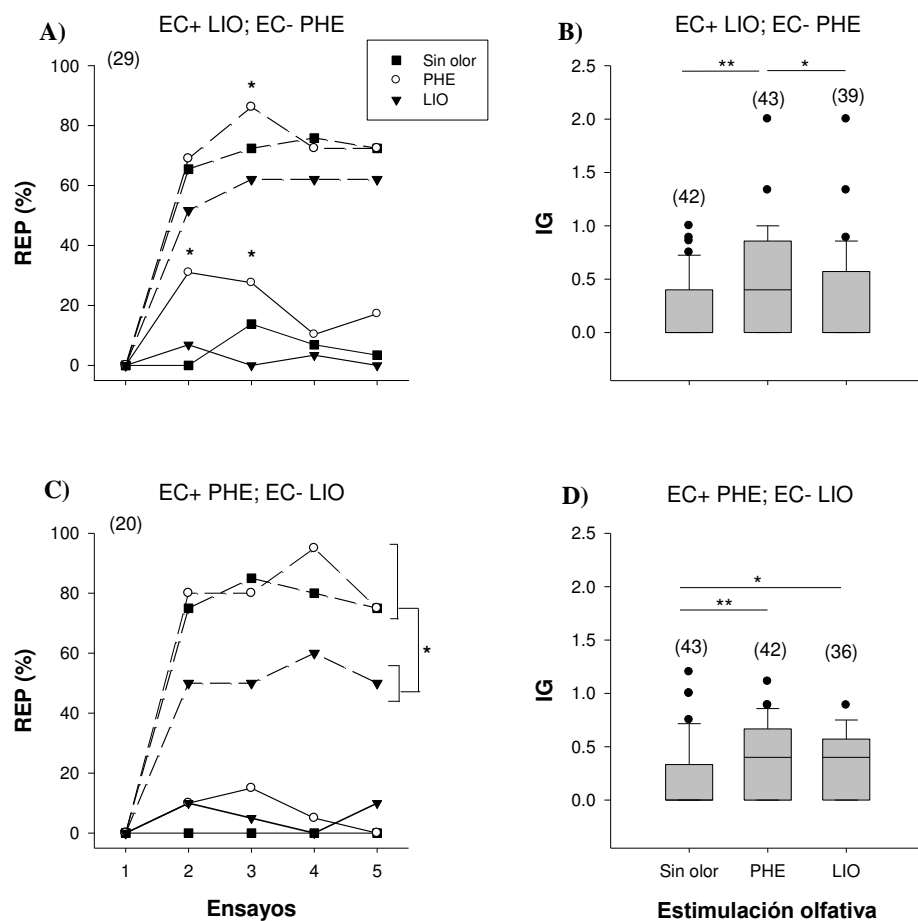


Figura 2.3: Condicionamiento olfativo clásico del tipo diferencial en abejas recientemente emergidas. Las abejas adultas fueron estimuladas dentro de la colmena con solución azucarada (50% p/p) aromatizada con diferentes olores (LIO o PHE) o sin aromatizar durante los estadios larvales. Las abejas adultas fueron mantenidas en condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación (3-5 días de edad). Se cuantificaron los porcentajes de abejas que extendieron su probóscide (% REP) al olor condicionado (LIO o PHE) en cada uno de los sucesivos ensayos (A y C). Las líneas punteadas corresponden a las respuestas ante el olor recompensado, mientras que las líneas continuas ante el olor no recompensado. Los índices de generalización (IG) fueron calculados a partir del condicionamiento diferencial (B y D). Los asteriscos indican diferencias estadísticas en un ANOVA de medidas repetidas para los condicionamientos diferenciales (* $p < 0,05$) y para los IG, diferencias estadísticas en una prueba de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Entre paréntesis se muestra el número de observaciones.

2.4.4 Los olores que se presentan en el entorno de la cría y su influencia sobre las respuestas apetitivas hacia el olor pre-expuesto.

Las abejas experimentales se han desarrollado durante sus estadios larvales en el interior de una celda del panal hecha de cera y embebida con el olor proveniente de los alimentos ofrecidos. Para determinar si los olores liberados por el entorno de cría provoca una respuesta mediada por el olor, se compararon los valores de REP hacia ambos estímulos olfativos: el olor puro ofrecido en la comida y el olor de los panales de cría. Los resultados indicaron que las abejas adultas (3-5 días de edad) que han sido alimentadas con alimento sin aromatizar siendo larvas presentan similares niveles de REP hacia el PHE como hacia los volátiles liberados por el panal de la zona de cría ($p > 0,05$; prueba de Z, ver Figura 2.4 A). Contrariamente, en las abejas adultas que han sido alimentados con alimento aromatizado con PHE durante las etapas larvales, presentaron mayores niveles de REP hacia el olor pre-expuesto (PHE) que hacia el olor de la cera del panal donde se desarrollaron ($p < 0,01$; prueba de Z, figura 2.4 B).

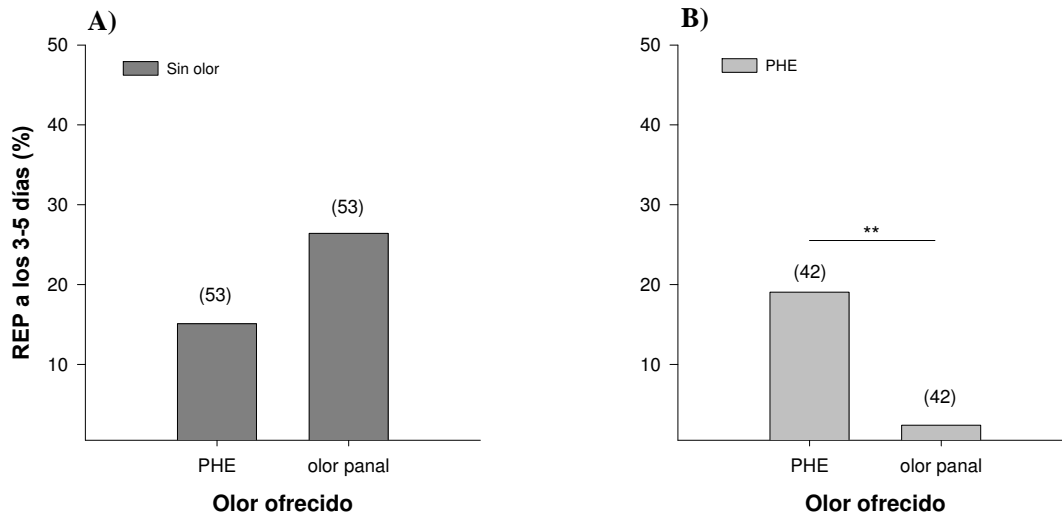


Figura 2.4: Respuestas de extensión de proboscidad (REP) en abejas recientemente emergidas frente a una primera estimulación olfativa (respuesta espontánea). Las abejas experimentales fueron estimuladas previamente durante los estadios pre-imaginales dentro de las colmenas con solución azucarada (50% p/p) aromatizada con PHE o sin aromatizar. Las abejas emergidas como adultos fueron mantenidas en condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación (3 a 5 días de edad). Se cuantificaron los porcentajes de respuesta de extensión de probóscide (% REP) ante la primera presentación, de PHE o del olor de los panales de cría en donde las abejas se han desarrollado y han sido estimuladas con solución azucarada sin olor (A) o aromatizada (B). Los asteriscos indican diferencias estadísticas en un Z-test para dos proporciones (**p < 0,01). Entre paréntesis se muestra el número de observaciones.

2.5 *Discusión*

Teniendo en cuenta que la circulación de una solución azucarada aromatizada entre los individuos de una colonia modifica la sensibilidad gustativa de los grupos de abejas de corta y mediana edad (Ramirez et al. 2010), fue factible en primera instancia poner a prueba si la sensibilidad gustativa de abejas adultas con experiencias olfativas pre-imaginales se vio modificada. En este caso, no se encontraron variaciones en adultos con o sin este tipo de experiencias. Probablemente porque estas vías gustativas no se vean afectadas, ya que las antenas funcionales se desarrollan durante el estadio pupal (Snodgrass 1984).

Por otro lado, se ha demostrado para *Apis mellifera*, que la edad de adquisición de información del tipo olfativa en el estadio adulto es crucial para la retención de una memoria asociada a la misma (Arenas y Farina 2008). Sin embargo no se sabía hasta este momento, que efecto produce la experiencia olfativa durante estadios pre-imaginales sobre la conducta de la abeja adulta y en particular sobre sus habilidades cognitivas. En primer lugar es válido resaltar que la metodología utilizada en estos experimentos se basa en una estimulación general de las colmenas y por lo tanto no es posible controlar la cantidad del alimento ofrecido que llega a las larvas, y si efectivamente todas las larvas que formaron parte de las abejas adultas experimentales estuvieron en contacto con la solución azucarada (aromatizada o sin aromatizar) ofrecida. Ahora, si consideramos que el néctar es rápidamente distribuido entre las abejas de la colmena (von Frisch 1923, Rösch 1925, Seeley 1989); que los alimentos asociados a estímulos olfativos establecen memorias estables y duraderas en individuos pertenecientes a diferentes castas (Farina et al. 2005,

Grüter et al. 2006, Ramirez et al. 2010); y que las nodrizas son las responsables de alimentar las larvas, es plausible pensar que las larvas fueron sujetas a una experiencia olfativa a través de este tipo de estimulación y que la misma influyó en el comportamiento de los individuos incluso luego de la metamorfosis. Los resultados obtenidos en el presente capítulo avalan esta hipótesis ya que las abejas experimentales con experiencias olfativas pre-imaginales presentan mayores niveles de respuesta en el paradigma de extensión de probóscide al olor pre-expuesto en comparación con las abejas sin estas experiencias. Por lo tanto, es importante resaltar que la retención de la información olfativa asociada al alimento ofrecido persiste aun después de la metamorfosis. Este hecho apoyaría la idea de que la propagación de la información olfativa relacionada con el alimento afecta los comportamientos en el paradigma de REP para abejas de todas las edades en la colmena (Grüter et al. 2006) como así también en la elección del alimento fuera de la misma (Arenas et al. 2007).

Sin embargo, un alto porcentaje de individuos responde también hacia un olor novedoso. Si nos centramos en los índices de generalización obtenidos luego de un condicionamiento diferencial tanto hacia el olor previamente expuesto durante etapas pre-imaginales (PHE) como hacia un olor novedoso (LIO), se observó que los mismos son mayores respecto a las abejas sin experiencias olfativas pre-imaginales. Esto quiere decir que las abejas alimentadas durante sus etapas larvales con una solución azucarada aromatizada con PHE, responden tanto al estímulo condicionado recompensado como al que no está recompensado en una proporción mayor a las respuestas de las abejas alimentadas con solución azucarada sin aromatizar. Sin embargo, cuando las abejas estuvieron pre-expuestas

a LIO los IG con respecto a las abejas sin experiencias olfativas pre-imaginales (control) variaron dependiendo si durante el condicionamiento diferencial el olor correspondía al estímulo condicionado recompensado o no. Siendo los IG de abejas alimentadas durante estadios larvales con solución azucarada aromatizada con LIO, mayores a los obtenidos en abejas control, cuando este olor fue no recompensado. Estas diferencias se pierden cuando el LIO actuó como estímulo condicionado recompensado. Estos resultados, por un lado, nos sugieren que la representación neural de estos olores a nivel de lóbulo antenal tiende a “confundirse” en abejas con experiencias previas, por lo que nos planteamos en el siguiente capítulo ahondar con el tema de la generalización. Por otro lado las identidades de los olores son diferencialmente salientes produciendo distintos efectos si se los utiliza como estímulos condicionados dado a que han sido o no estímulos asociados al alimento durante el desarrollo larval de los individuos. Otros estudios han descripto asimetrías en cuanto a la retención de LIO y PHE en abejas al ser evaluadas en un condicionamiento clásico (Sandoz et al. 2000) o en un contexto operante (Arenas 2010). Estas diferencias, podrían estar relacionadas con la relevancia biológica de los estímulos, es decir, por ejemplo, si los volátiles cumplen un rol comunicacional o no, como ha sido propuesto para polillas (Daly et al. 2001) y abejorros (Laloi et al. 2004).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la circulación de la información asociada al alimento estaría afectando el comportamiento de los adultos aun si la misma se llevó a cabo durante etapas larvales. Esto es posible si consideramos que luego de la metamorfosis el sistema nervioso de la abeja adulta deriva directamente del de la larva, siendo la estructura general de ambos esencialmente la misma (Snodgrass 1984). Más aun, en *Drosophila* las

neuronas que conforman los cuerpos pedunculados persisten luego de la metamorfosis al igual que las neuronas de proyección y algunas de las interneuronas presentes en la larva se integran en el individuo adulto. Estas características se suman a que la arquitectura de la vía olfativa de la larva de *Drosophila* es sorprendentemente similar a su contraparte en el adulto (Gerber y Stocker 2007). Por lo tanto, si las bases neurales de las larvas persisten en el adulto, es factible pensar que la representación neural de una memoria adquirida durante estos estadios también perdure.

Otro de los puntos para destacar está relacionado con los resultados obtenidos ante la presencia de los volátiles emitidos por los panales de la zona de cría donde los individuos se desarrollaron. Estudios previos concluyeron que la exposición a volátiles en el medio donde las abejas atraviesan los estadios pupales, no produce efectos sobre el comportamiento de orientación en un olfatómetro ni sobre el desempeño en el aprendizaje durante un condicionamiento diferencial, asegurando de esta manera que la exposición pre-imaginal no modifica el comportamiento de las abejas en estadios adultos (Sandoz et al. 2000). Sin embargo, los resultados aquí presentados indican que la exposición durante estadios pre-imaginales a un estímulo olfativo asociado al alimento, modifica los comportamientos en estadios adultos y más aun, la exposición a los volátiles del panal donde los individuos se desarrollaron no alteran las respuestas de las abejas experimentales hacia los olores pre-expuestos.

3

3. LAS EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA EN LOS ESTADIOS PRE-IMAGINALES: EVALUACIÓN DE LA GENERALIZACIÓN OLFATIVA Y LAS CAPACIDADES COGNITIVAS EN EL ADULTO

3.1 Introducción

Las abejas son insectos generalistas por lo que no se limitan a explotar una sola fuente de alimento. Sin embargo, una de las características de las abejas es la denominada “constancia floral”, es decir, una abeja explotará una determinada especie floral hasta tanto le sea rentable en términos de obtener recompensa (Menzel 1985, Chittka et al. 1999). Es necesario para esto que memorice las características de la fuente de alimento. Las abejas aprenden de las flores su forma, su color y sobretodo su olor. Este último rasgo es muy relevante ya que está asociado con la recompensa tanto de néctar como de polen (Menzel 1993). Reconocer la especie floral que está siendo explotada en ese momento es crucial para la abeja recolectora ya que implica un eficiente comportamiento de recolección. La abeja reconoce la especie floral mientras se encuentra volando y a medida que se acerca a la

misma, evalúa si lo aprendido previamente se asemeja a la información que está siendo adquirida en ese momento. El reconocimiento de la fuente de alimento implica distinguirla de otras fuentes bajo condiciones ambientales que varían entre los vuelos de recolección. Por lo tanto la abeja presenta la habilidad de discriminar en este contexto pero a la vez presenta la habilidad de generalizar la información adquirida hacia una similar. La generalización de estímulos está definida como la tendencia de los animales a responder comportamentalmente hacia estímulos que difieren de otro previamente aprendido pero que comparten característica en común (Pearce 1987). Se ha demostrado la habilidad de la abeja melífera para generalizar patrones visuales relacionados con las imágenes previamente asociadas a la recompensa (Stach y Giurfa 2001, Stach et al. 2004). Como así también para generalizar colores luego de un condicionamiento diferencial donde un color es recompensando y luego al presentarle a la abeja diferentes colores, la misma generaliza respondiendo a colores perceptualmente similares al recompensado (Martinez-Harms et al. 2014). En lo que respecta a los aromas florales, los mismos están compuestos por una mezcla de volátiles que varían entre genotipos, durante el desarrollo y según las condiciones ambientales (Pham Delègue et al. 1989). En este contexto la capacidad de generalizar es de suma importancia para la supervivencia de las abejas ya que les permite encontrar fuentes de alimentos aunque los volátiles que éstas emiten se modifiquen (Pham Delègue et al. 1992) En 1919 von Frisch entrenó abejas recolectoras de colmena hacia un alimentador artificial que contenía aceites esenciales (mezcla de olores). Utilizó 32 mezclas de olores y observó que después de aprender que una mezcla estaba asociada a solución

azucarada, las abejas tendían a preferir esa mezcla aunque a veces también preferían otras mezclas similares, según el olfato humano, a la recompensada (von Frisch 1919).

En teoría, los animales generalizan entre los estímulos debido a que éstos activan representaciones neuronales similares (Pearce 1987; Shepard 1987). Cuanto más difiere el estímulo presentado del aprendido, es decir, las representaciones neurales de los estímulos están más distantes entre sí en el espacio neuronal de los animales, se observa menor generalización (Sandoz et al. 2001). Más aun Guerrieri y colaboradores midieron utilizando enfoques comportamentales la similitud entre los olores presentados en la abeja y calcularon sus distancias perceptuales en un putativo espacio olfativo. Considerando que las distancias perceptuales se correlacionan con distancias fisiológicas medidas con la técnica de *Ca-imaging* (utilizada para evaluar la actividad neuronal de los glomérulos que se activan ante la presentación de un determinado olor en la antena de la abeja), los resultados obtenidos por Guerrieri y colaboradores avalan esta correlación indicando que los olores que son codificados como fisiológicamente similares también son percibidos como similares por las abejas (Guerrieri et al. 2005). En este trabajo se evidencia que la actividad neuronal olfativa se corresponde con la percepción olfativa definida sobre la base de dimensiones específicas en un putativo espacio olfativo, un hallazgo que es de importancia central en la estudio de la neurobiología de la percepción.

Teniendo en cuenta que el sistema nervioso olfativo de los insectos va madurando conforme la edad de la abeja (Ray y Ferneyhough 1997) y que los circuitos neuronales se van conformando durante la metamorfosis modificándose aun durante los primeras días de

vida del adulto (Masson 1993, Winnington et al. 1996, Devaud et al. 2003), es factible preguntarse si las modificaciones en los individuos adultos tienen relación alguna con las experiencias previas, incluso si éstas tienen lugar durante su desarrollo. Los resultados arrojados en el capítulo anterior indican que las abejas responden bajo el paradigma de la REP a un olor asociado al alimento ofrecido durante los estadios larvales como así también responden a un olor novedoso. Por lo tanto, se ahondara en este capítulo si las experiencias olfativas pre-imaginales inducen a cambios comportamentales en el adulto evidenciando un sistema olfativo más sensible hacia el olor pre-expuesto, efecto que puede generalizarse a otros olores.

A su vez, se ha demostrado que las abejas adultas jóvenes así como las recientemente emergidas tienen aprenden tan bien como individuos de más edad (Arenas y Farina 2008, Arenas et al. 2009a; b; 2012; Behrends y Scheiner 2009), situación que es de suma importancia para concluir el desarrollo del sistema nervioso. El hecho de recibir estímulos dentro de la colmena, donde las abejas desarrollan sus actividades durante los primeros días de vida, les permite incorporar la información proveniente del exterior. De esta manera cuando las abejas adultas parten de la colmena en búsqueda de alimento, utilizan la información obtenida previamente para desenvolverse exitosamente en las tareas relacionadas con la recolección de recursos. Hasta el momento es desconocido si las memorias olfativas formadas durante estadios larvales pueden evocarse en el adulto modificando las respuestas comportamentales relacionadas con estimulaciones olfativas. Considerando que durante los estadios pupales van conformándose los centros primarios de

integración de la información olfativa (Devaud et al. 2003, Fahrbach 1998) y que los mismos continúan desarrollándose durante los primeros días de vida (Arnold y Masson 1987), se plantea en este capítulo evaluar como los individuos que han sido sujetos a experiencias olfativas pre-imaginales modifican sus habilidades cognitivas en términos de generalización de estímulos olfativos y procesos de adquisición que implican el aprendizaje de nuevos olores.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Sitio de estudio y animales

Los experimentos se realizaron entre octubre y abril de 2010, 2011 y 2012 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O). Al igual que para la serie experimental descrita en la sección anterior (ver 3.2.1), se utilizaron 3 colmenas comerciales de *Apis mellifera* las cuales fueron alimentadas artificialmente con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar. Las abejas experimentales completaron su desarrollo larval dentro de las colmenas y luego concluyeron su desarrollo en incubadoras a temperatura y humedad controladas (36 °C y 55% HR). Una vez emergidas como adultas, las abejas fueron confinadas dentro de una caja de madera en grupos de 120 individuos aproximadamente y alimentadas con solución azucarada 50% p/p y polen *ad libitum*. Luego fueron mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad (31 °C, 55% HR) y oscuridad en el laboratorio hasta el momento de la evaluación.

3.2.2 Procedimiento experimental

Estos experimentos tuvieron por objeto evaluar el efecto de la generalización producto de las diferentes dietas ofrecidas durante el desarrollo de la abeja, en estadios adultos. Para ello 3 soluciones de alimento fueron ofrecidos en 3 diferentes colmenas mediante el uso de un alimentador artificial ubicado en el interior de las mismas. Los alimentos ofrecidos fueron soluciones azucaradas (50% p/p) con distintos olores puros disueltos. En el caso de las abejas provenientes de la colmena control ningún olor fue incorporado en la solución azucarada (Sin olor). Mientras que para las otras dos colmenas y dependiendo el experimento realizado, una fue alimentada con solución azucarada aromatizada con 1-Hexanol (1-Hexanol, 100µl/L, ver sección 3.2.3) y la otra aromatizada con Nonanal (Nonanal, 100µl/L, ver sección 3.2.4). El procedimiento con el cual las colmenas fueron alimentadas así como la elección de las abejas experimentales, fue ya descrito en la sección 2.2.1. Una vez que las abejas emergieron como adultos, fueron mantenidas en condiciones reguladas de laboratorio (32 °C, 55% HR y oscuridad) y entre los 3-5 o los 17-19 días de edad fueron utilizadas para evaluar procesos cognitivos utilizando las metodologías que se detallan a continuación. Por otro lado, también fueron evaluadas abejas capturadas directamente del interior de las colmenas donde circuló solución aromatizada o sin aromatizar.

3.2.3 Respuesta Extensión de Probóscide (REP)

Con el objetivo de evaluar la retención de una memoria olfativa formada luego de la circulación de una solución aromatizada dentro de la colmena, se cuantificó la REP para

cada grupo de abejas tratadas según el procedimiento experimental explicado con anterioridad. Para ello, como se detalló en las secciones 3.2.4 y 3.2.5, los olores puros fueron liberados mediante un dispositivo que entregaba un flujo continuo de aire controlado. En este experimento las abejas experimentales fueron anestesiadas con frío (-4 °C) y amarradas en cepos metálicos dejando sus antenas y piezas bucales libres de movimiento. Luego fueron mantenidas aproximadamente 3 horas bajo condiciones reguladas de laboratorio (32 °C, 55% HR y oscuridad) para minimizar el estrés provocado por la manipulación. Inmediatamente después, la corriente de aire proveniente del dispositivo ya descrito, fue dirigida hacia las antenas de las abejas experimentales cuantificando en el momento de liberación de cada olor en particular, si los individuos respondían o no extendiendo su probóscide, lo cual es un indicio de la retención o no de una memoria olfativa. Dado que el presente experimento apunta al fenómeno de generalización, es por ello que se han utilizado olores alifáticos para alimentar a las colmenas así como al momento de cuantificar la REP. Estos olores fueron elegidos teniendo en cuenta su similitud química (largo de cadena carbonada y grupo funcional, ver tabla 3) así como también la similitud perceptual de los mismos para las abejas (Guerrieri et al. 2005). 4 µl de 1-Hexanol, Hexanal, 1-Nonanol y Nonanal fueron liberados en orden consecutivo con un intervalo de entrega de entre 8 y 10 minutos dependiendo de la cantidad de individuos experimentales a evaluar. Cada olor puro fue impregnado en un papel de filtro (30 x 3 mm) y colocado dentro de la jeringa ubicada en el dispositivo de entrega. Los individuos utilizados para medir la REP ante los respectivos olores, fueron aquellos que al

contactarse las antenas con solución de sacarosa 50% p/p extendieron su probóscide y no presentaron respuesta al estímulo mecánico (flujo de aire).

		Largo de cadena	
		6 carbonos	9 carbonos
Grupo Funcional	Alcohol	1-HEXANOL	1-NONANOL
	Aldehído	HEXANAL	NONANAL

Tabla 3: Similitud química entre los estímulos olfativos

3.2.4 Condicionamiento olfativo absoluto

Con el fin de evaluar las habilidades cognitivas de las abejas expuestas durante su desarrollo larval a distintos alimentos que circulaban en la colmena, se analizó el condicionamiento olfativo utilizando el paradigma de REP. Para ello se utilizaron abejas adultas provenientes de colmenas alimentadas con soluciones azucaradas aromatizadas con 1-Hexanol, Nonanal o sin aromatizar. Dichas abejas fueron mantenidas en condiciones reguladas de laboratorio (32 °C, 55% HR y oscuridad) hasta el momento del condicionamiento. Luego fueron capturadas, anestesiadas con frío (-4 °C) y amarradas en tubos metálicos de manera tal de dejar libres sus antenas y piezas bucales. Después de 3 horas mantenidas bajo condiciones reguladas de temperatura, humedad (32 °C, 55% HR) y

oscuridad para evitar el estrés producto de la manipulación, los individuos experimentales fueron sometidos a una primera presentación del olor a condicionar (Respuesta Espontánea). Para esta evaluación como así también para el condicionamiento, se utilizó el dispositivo ya descrito anteriormente (ver secciones 2.2.4 y 2.2.5) que liberaba el olor puro (4µl de 1-Hexanol embebidos en un papel de filtro dentro de una jeringa) mediante un flujo de aire continuo hacia las antenas de las abejas amarradas ubicadas a 2 cm de la salida del aire. Se cuantificó la REP ante la liberación de 1-hexanol y luego, aquellas abejas que no hayan extendido su probóscide en la primera presentación de dicho olor, fueron condicionadas mediante un condicionamiento del tipo absoluto. El mismo consistió en presentar en tres ensayos el EC (1-Hexanol) acoplado con solución azucarada (1,8M) como recompensa. Para ello se utilizó un protocolo donde la abeja experimental se situó frente a una corriente de aire por 20 segundos, seguida de la exposición de 6 segundos de olor dentro de los cuales en los últimos 3 segundos se presentó como recompensa solución de sacarosa 1,8 M. Entre cada ensayo el intervalo temporal fue de 10-15 min.; el mismo intervalo fue mantenido entre la última presentación de EC y la evaluación, que consistió en la presentación del olor sin asociarlo a la recompensa. En cada ensayo se cuantificó la REP durante los primeros 3 segundos de presentarse el olor, es decir antes de estimular a las abejas con solución azucarada. Las abejas utilizadas en este condicionamiento fueron aquellas que extendieron su probóscide ante la presentación de solución de sacarosa (1,8M) sobre sus antenas (respuesta incondicionada) y a la vez no respondieron al estímulo de la corriente de aire (respuesta mecánica). Durante el protocolo de condicionamiento los

volátiles fueron eliminados mediante un extractor de aire para evitar de esta manera, la contaminación del medio que rodea a los sujetos experimentales.

3.3 Análisis estadístico

Para analizar los valores de REP hacia los cuatro estímulos olfativos ofrecidos (1-Hex, Hexa, 1-Non, Nona), se utilizó un análisis de varianza para medidas repetidas (ANOVA-MR) (Sokal 2000). El estudio de Monte Carlo ha demostrado que es posible utilizar ANOVA en los datos dicotómicos (Lunney 1970). Cuando se encontraron diferencias significativas en los factores principales se realizaron comparaciones *post hoc* de Dunnet. Si las diferencias estadísticas se detectaron en la interacción entre los factores, se calcularon los efectos simples utilizando el error correspondiente y posteriormente se realizó una comparación de Tukey entre los factores. Para comparar entre los grupos experimentales los niveles de REP hacia el 1-Hex en la primera presentación se utilizó una prueba de homogeneidad (prueba de G) mientras que en la etapa de testeo luego de un condicionamiento absoluto a 1-Hex se comparó de a pares, es decir que las respuestas de los grupos tratados se contrastó con la del grupo control mediante un análisis de proporciones (prueba de Z de dos colas, donde el nivel de significancia es $< 0,025$) (Sokal 2000). En la etapa de adquisición durante un condicionamiento hacia 1-Hex, se realizó para analizar el comportamiento durante la etapa de adquisición dentro y entre los grupos experimentales, un análisis de ANOVA-MR. En el caso de haber detectado diferencias significativas en los principales factores, se realizaron comparaciones *post hoc* (LSD). Si

las diferencias estadísticas se detectaron en la interacción entre los factores, se calcularon los efectos simples utilizando el error correspondiente y posteriormente se realizó una comparación de Tukey entre los factores (Sokal 2000).

3.4 Resultados

3.4.1 La respuesta de generalización en abejas adultas luego de una experiencia olfativa pre-imaginal.

El objetivo de estos experimentos fue analizar en abejas adultas el comportamiento de generalización hacia los olores que presentaban diferentes similitudes químicas con el olor del alimento ofrecido en la colmena. Los niveles de REP hacia los 4 olores (1-Hex, Hexa, 1-Non, Nona) se compararon en las abejas provenientes de la colmena así como también en abejas de 3 a 5 o de 17 a 19 días de edad que habían sido expuestas durante las etapas larvales a una solución azucarada aromatizada con 1-Hex. Para las abejas capturadas en el interior de la colmena el ANOVA-MR indicó que la interacción entre los olores ofrecidos y el tratamiento al que se expusieron las colmenas fue significativamente diferente ($F_{3, 348} = 15,363$, $p = 2,08.E^{-9}$; ANOVA-MR, Figura 3.1 A). Dado que la interacción resultó significativa se llevó a cabo un análisis de efectos simples. El mismo mostró diferencias significativas en los niveles de REP hacia 1-Hex ($F_{1, 464} = 92.892$, $p = 3,68.E^{-20}$; Figura 3.1 A), Hexa ($F_{1, 464} = 11, 379$, $p = 0,0008$; figura 3.1 A) y Nona ($F_{1, 464} = 8,360$, $p = 0,004$; figura 3.1 A) en comparación con el resto de los olores ofrecidos entre cada grupo experimental. A su vez el análisis de efectos simples reveló diferencias estadísticas entre

los niveles de REP hacia los olores ofrecidos en las abejas alimentadas con 1-Hex durante sus etapas larvales ($F_{3, 464} = 33,083$, $p < 0,0001$; Figura 3.1 A). Las comparaciones *post hoc* mostraron diferencias estadísticas entre los niveles de REP hacia 1-Hex y Hexa, 1-Non y Nona ($p < 0,05$; comparaciones de Tukey). El ANOVA-MR de abejas de 3 a 5 días de edad, reveló una interacción significativa entre los olores ofrecidos y el tratamiento al que fueron expuestas las abejas durante su desarrollo larval ($F_{3, 750} = 6,699$, $p = 0,00018$; ANOVA-MR, Figura 3.1 B). El análisis de efectos simples mostró diferencias significativas en los niveles de REP hacia 1-Hex ($F_{1, 1000} = 12.396$, $p = 0,00045$; Figura 3.1 B) y Hexa ($F_{1, 1000} = 7,933$, $p = 0,00494$; figura 3.1 B) respecto del resto de los olores ofrecidos al comparar entre cada grupo experimental. A su vez el análisis de efectos simples reveló diferencias estadísticas entre los niveles de REP hacia los olores ofrecidos en las abejas alimentadas con 1-Hex durante sus etapas larvales ($F_{3, 1000} = 16,419$, $p < 0,0001$; efecto simple ANOVA; Figura 3.1 B). Las comparaciones *post hoc* mostraron diferencias estadísticas en los niveles de REP hacia 1-Hex y Hexa respecto a 1-Non y Nona ($p < 0,05$; comparaciones de Tukey). A su vez los niveles de REP hacia Hexa fueron estadísticamente diferentes en comparación con 1-Non y Nona ($p < 0,05$; comparaciones de Tukey). Sin embargo, el ANOVA-MR para las abejas de 17 a 19 días de edad no reveló diferencias estadísticas entre los olores ofrecidos (1-Hex, Hexa, 1-Non y Nona) ni entre los grupos experimentales (es decir, abejas alimentadas con solución azucarada con 1 -HEX o sin olor durante estadios larvales) (olores ofrecidos: $F_{3, 536} = 0,246$, $p = 0,864$ y grupos experimentales: $F_{3, 536} = 0,361$, $p = 0,549$; Figura 3.1 C). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la interacción

entre ellos ($F_{3, 536} = 0,246$, $p = 0,864$, Figura 3.1 C). Finalmente, para evaluar si el aislamiento de las abejas de 17 a 19 días de edad influyó en las respuestas ante los olores ofrecidos, grupos de abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales fueron reintroducidos en las colmenas luego de haber estado aisladas durante aproximadamente una semana. En este grupo experimental no se evidenciaron diferencias significativas entre los olores ofrecidos ni entre los grupos experimentales (olores ofrecidos: $F_{3, 201} = 0,906$, $p = 0,439$ y grupos experimentales: $F_{3, 201} = 0,207$, $p = 0,649$; Figura 3.1 D) ni en la interacción entre ellos ($F_{3, 201} = 1,233$, $p = 0,298$, Figura 3.1 D).

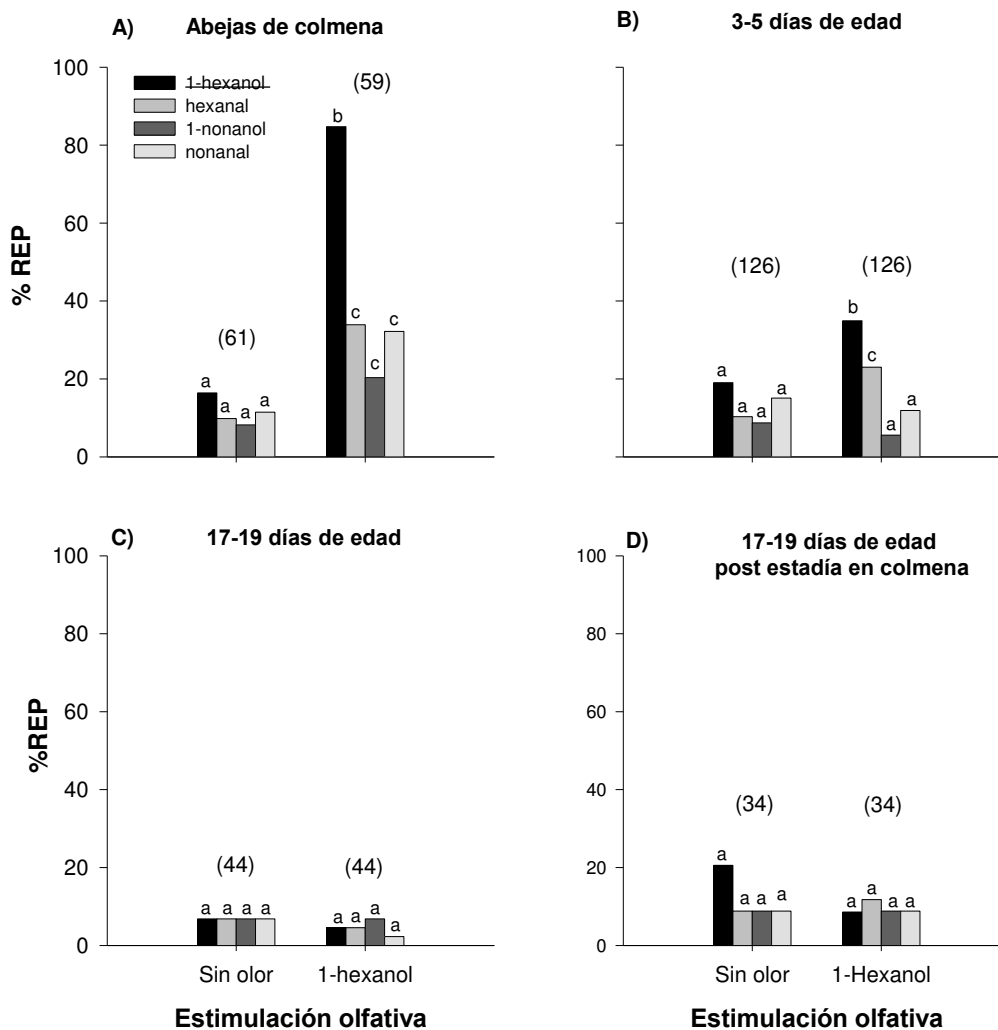


Figura 3.1: Respuesta de extensión de probóscide (REP) ante la presentación de diferentes olores puros. Las abejas fueron estimuladas dentro de la colmena con solución azucarada (50% p/p) aromatizada con 1-Hexanol (100µl/L) o sin aromatizar. En A) se estimularon abejas adultas mientras que en B-D) se estimularon abejas en etapas pre-imaginales del desarrollo que luego de su emergencia como adultos fueron criadas bajo condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación: 3-5 días de edad en B) o 17-19 días de edad en C) y D). En D) las abejas fueron nuevamente incluidas en la colmena por un período de 10 días previos a la evaluación. Se cuantificó el porcentaje de REP (%REP) hacia 1-Hexanol (barras negras), Hexanal (barras grises), 1-Nonanol (barras gris oscuro) y Nonanal (barras gris claro). Las diferentes letras indican diferencias estadísticas en los contrastes realizados para un test de ANOVA de dos factores de medidas repetidas. Entre paréntesis se muestra el número de observaciones.

3.4.2 Aprendizaje olfativo en abejas adultas con o sin experiencias olor-recompensa durante estadios pre-imaginales.

Las abejas de 3-5 días de edad que fueron alimentadas durante sus estadios larvales con solución azucarada aromatizada con 1-Hexanol o Nonanal o sin aromatizar fueron sometidas a un condicionamiento olfativo absoluto hacia 1-Hexanol. Aquellas abejas que han sido pre-expuestas al alimento aromatizado con 1-Hexanol presentaron un mayor nivel de REP hacia la primera presentación de 1-Hexanol (el olor a condicionar) en comparación con las abejas pre-expuestas al Nonanal en el alimento o sin estas experiencias olfativas (respuesta espontánea alimento aromatizado con 1-Hexanol vs alimento sin aromatizar: $G = 5,8592$, $N = 119$, $p = 0,015$, prueba de G; Figura 3.3 A). Con el fin de analizar si los olores pre-expuestos mejoraron la REP hacia 1-Hexanol en las abejas sin respuesta espontánea a este olor, se cuantificaron las REP durante un condicionamiento olfativo. Los resultados analizados mediante un ANOVA-MR mostraron que los niveles de respuesta en la etapa de entrenamiento durante el condicionamiento difieren entre los grupos experimentales. A pesar de que la interacción entre los ensayos y experiencia pre-imaginal no resultó significativa ($F_{2, 156} = 2,5649$, $p = 0,080$) se revelaron diferencias dependiendo de la experiencia pre-imaginal a la que fueron expuestos los individuos (efecto tratamiento: $F_{2, 156} = 2,9759$, $p = 0,05$). Las abejas que han sido alimentadas con alimento aromatizado con 1-Hexanol o Nonanal mostraron un aumento en los niveles de REP hacia 1-Hexanol durante la fase de adquisición respecto a las abejas sin experiencias olfativas (comparación *post hoc* LSD: $p = 0,036$ alimento sin aromatizar vs alimento con 1-Hexanol o Nonanal,

Figura 3.3 B). Luego de la fase de entrenamiento, 15 minutos más tarde, se evaluó la respuesta hacia el olor condicionado (1-Hexanol), se encontraron diferencias estadísticas al comparar los grupos tratados con el control, las abejas pre-expuestas a Nonanal mostraron valores de REP más altos en comparación con las abejas alimentadas con solución azucarada sin aromatizar (Diferencia de proporciones, prueba de Z, $p=0,02$, Figura 3.3 C). Del mismo modo se han condicionado abejas adultas de 17 a 19 días de edad que han tenido o no una experiencia olfativa pre-imaginal y que han sido mantenidas desde su emergencia en condiciones controladas de laboratorio. Primeramente se evaluó la respuesta ante la primera presentación del olor a condicionar (1-Hexanol). No se observaron diferencias significativas en los niveles de REP hacia 1-Hexanol entre las abejas alimentadas con solución azucarada aromatizada con 1-Hexanol y las abejas alimentadas con solución azucarada sin aromatizar (Diferencia de proporciones, prueba de Z: $p=0,07$; figura 3.3 D). Tampoco se evidenciaron en una análisis de ANOVA-MR diferencias significativas entre las REP de ambos grupos experimentales a lo largo del entrenamiento (interacción entre ensayos y experiencia pre-imaginal: $F_{2, 124}=0,574$, $p=0,564$; experiencia pre-imaginal: $F_{2, 124}=0,484$, $p=0,488$; Figura 3.3 E). Finalmente, en la etapa de evaluación no se han encontrado diferencias estadísticas entre los niveles de REP al comparar entre ambos grupos experimentales (Diferencia de proporciones, prueba de Z: $p=0,35$; figura 3.3 F).

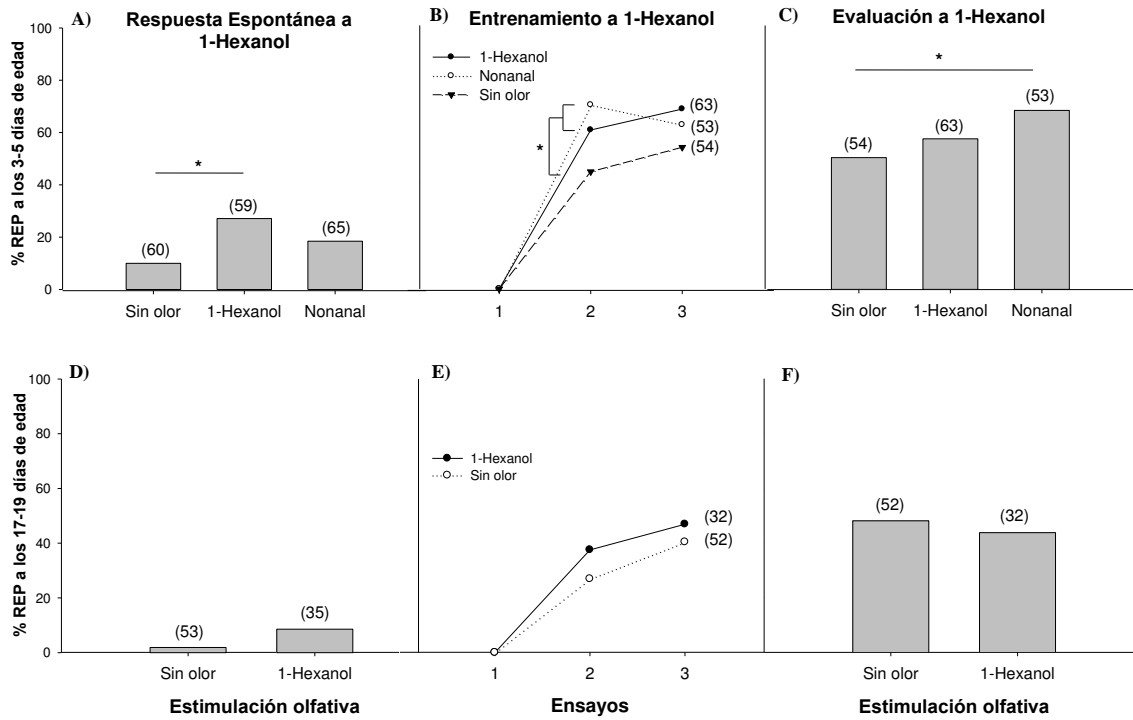


Figura 3.3: Respuesta de extensión de probóscide (REP) hacia un olor pre-expuesto antes, durante y después de un condicionamiento olfativo clásico hacia ese olor. Las abejas fueron estimuladas dentro de la colmena con solución azucarada (50% p/p) aromatizada con 1-hexanol (100µl/L), nonanal (100µl/L) o sin aromatizar durante los estadios pre-imaginales. Luego de su emergencia como adultos, las abejas fueron criadas bajo condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación: 3-5 días de edad (A-C) y 17-19 días de edad (D-F). Se cuantificó el porcentaje de REP (%REP) ante la primera presentación del olor pre-expuesto (A y D, respuesta espontánea). Aquellas abejas que no respondieron espontáneamente a 1-hexanol fueron condicionadas hacia este olor mediante tres ensayos de entrenamiento (B y E). Finalmente, se evaluó la respuesta hacia el olor condicionado, el 1-hexanol, (C y F). Los asteriscos indican diferencias estadísticas en una prueba de G para la respuesta espontánea, A, en un ANOVA-MR para el entrenamiento; B y en una prueba de Z de dos colas para dos proporciones, C (* p < 0,025). Entre paréntesis se muestra el número de observaciones.

3.5 Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que las experiencias pre-imaginales afectan la evaluación de la información proveniente del alimento en edades tempranas de la abeja adulta (cercanas a su emergencia), afectando así sus respuestas conductuales como la respuesta a estímulos pre-expuestos y novedosos así como su capacidad de aprendizaje. En esta sección se demostró también que las experiencias olfativas pre-imaginales incrementan las respuestas del adulto hacia el olor pre-expuesto sugiriendo que la información relacionada con el alimento ofrecido durante el estadio larval puede persistir luego de la emergencia como adulto. Podemos inferir que estas experiencias conllevan aprendizajes asociativos dado que los individuos responden tanto al olor del alimento como a otros olores similares indicando la existencia de un fenómeno de generalización. Este fenómeno se evidenció más notablemente en las abejas adultas provenientes de la colmena estimulada con solución azucarada aromatizada, coincidentemente con lo observado en otros trabajos donde a diferencia de la metodología aquí empleada, la asociación olor-recompensa se realizó bajo el contexto de un condicionamiento olfativo en condiciones de laboratorio en individuos adultos de edades avanzadas (Sandoz et al. 2001, Guerrieri et al. 2005). Tanto los resultados obtenidos por estos grupos de investigación como los expresados en este capítulo, revelan la capacidad de las abejas para generalizar la respuesta del olor aprendido hacia olores novedosos con características químicas similares. Más aún si consideramos el efecto de las experiencias olfativas ocurridas en abejas jóvenes pueden generalizarse a muy largo término hacia estímulos olfativos similares. Arenas y colaboradores (2009)

evidenciaron que la actividad glomerular se incrementa conforme aumenta la similitud perceptual entre el estímulo pre expuesto y uno novedoso, aun cuando la experiencia haya tenido lugar de 9 a 12 días antes de la evaluación. Sumado a esto los patrones de actividad glomerular se correlacionan entre el olor conocido y uno novedoso pero químicamente similar, indicando que estos patrones se corresponden con las respuestas de generalización observadas bajo el paradigma de REP (Arenas et al. 2009). Considerando estas evidencias más lo observado en este capítulo por primera vez respecto a la generalización en abejas adultas jóvenes con experiencias olfativas pre-imaginales, se puede sugerir que el olor no sólo fue previamente asociado (durante los estadios larvales), sino que también la representación neural del mismo persistió por largo término, incluso aun luego de la metamorfosis. Este hecho contribuye a la idea de que los circuitos neuronales presentes en el insecto adulto se establecen durante la metamorfosis (Masson 1993, Winnington et al. 1996, Devaud et al. 2003) y más aun, en estadios larvales ya comenzarían a formarse las bases de dichos circuitos, ya que es sabido que las antenas por ejemplo, se desarrollan a partir de los discos imaginales.

Por otro lado, los resultados indican que una experiencia olfativa pre-imaginal incrementa las habilidades cognitivas de las abejas adultas de corta edad, ya que en un condicionamiento clásico de tres pares de ensayo hacia un olor, que podía ser tanto el pre-expuesto como uno novedoso, los individuos incrementaron los niveles de respuesta hacia el olor condicionado en comparación a la respuesta de las abejas sin estas experiencias. Por lo tanto, las experiencias pre-imaginales podrían brindarle a las abejas el acceso a la

información relacionada con el alimento muy tempranamente en su vida afectando las respuestas orientadas al olor, al menos durante los primeros días de vida luego de la emergencia como adultos. Cabe entonces preguntarse cómo es posible que una información relevante al recurso explotado adquirida durante el desarrollo permanezca en la abeja adulta aun luego de sufrir procesos de cambios profundos a nivel de SNC. Sin embargo, como se mencionó anteriormente hay evidencia que en *Drosophila* las bases neuronales de la larva persisten hasta el adulto (Gerber y Stocker 2007) como así también que las células indiferenciadas de las larvas formarán las futuras interneuronas de los cuerpos pedunculados (Menzel et al. 1994), por lo tanto una experiencia olfativa pre-imaginal podría estar desencadenando mecanismos moleculares involucrados en la memoria olfativa de la larva afectarían las conexiones neurales de los individuos adultos.

4

4. LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE- IMAGINALES Y SUS CORRELATOS NEUROBIOLÓGICOS: ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA Y ELECTROFISIOLOGÍA DE LA ANTENA

4.1 Introducción

Las abejas, como la mayoría de los animales, perciben los estímulos del medio que las rodea y éstos actúan como disparadores de la mayoría de los comportamientos que despliegan. Es por ello que el sentido de la quimio-recepción se encuentra representado en todo el reino animal. En particular, el olfato con reglas básicas en cuanto al procesamiento de la información olfativa, compartidas entre insectos y vertebrados, cumple un rol importante ya que es el responsable de decodificar la información relativa a los volátiles presentes en el ambiente, permitiéndole al animal tomar decisiones y así desencadenar comportamientos adaptativos. El olfato participa en la identificación de fuentes de alimento, como así también en la detección de peligros, el reconocimiento de una potencial

pareja o bien en las interacciones sociales. Para el caso de *Apis mellifera* existen numerosos trabajos que han descrito el procesamiento de la información olfativa, desde la detección del volátil hasta la representación neural del mismo (Masson y Arnold 1987, Galizia et al. 1998; 1999a; b, Sachse y Galizia 2002). Las abejas a lo largo de su vida reciben estímulos olfativos de distinta naturaleza ya que van cumpliendo distintas tareas dependiendo de la edad (Winston 1987), tanto dentro como fuera de la colmena. Por lo tanto el sistema olfativo debe adaptarse a dichas variaciones lo que conlleva a que estos individuos presenten un alto grado de plasticidad tanto a nivel del sistema nervioso como comportamental. Los estímulos olfativos son detectados por las antenas de las abejas y en particular dentro de las sensilias placoides, uno de los órganos sensoriales encargados de la percepción de olores (McIndoo 1914, Frisch 1921, Kaissling y Renner 1968), se ubican las neuronas olfativas receptoras (ORNs de sus siglas en inglés) que serán las encargadas de transmitir la señal desencadenada por la molécula odorífera. Las moléculas ingresan por los poros de las sensilias donde inervan las ORNs en cuyas dendritas se ubican los receptores olfativos y así comienza la cascada de señales que finalmente se traduce en una representación neural que podrá desencadenar un comportamiento relacionado. Reinhard y Claudianos (2012) demostraron que a nivel periférico existe plasticidad en la expresión génica de los receptores olfativos. Estos autores compararon la expresión de determinados receptores olfativos de abejas con diferentes desempeños en un aprendizaje olfativo (ya que provenían de dos períodos del año con distinta oferta floral) y encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión. Estos resultados indicarían que el aprendizaje

olfativo en un individuo adulto se ve reflejado en cambios a nivel del sistema olfativo periférico evidenciando la plasticidad del mismo, producto de las experiencias olfativas a las que fueron expuestos (Reinhard y Claudianos 2012).

Teniendo en cuenta las evidencias de plasticidad de los receptores olfativos dependiendo de la oferta floral y por ende de los volátiles asociados al alimento, así como también que las antenas completan su desarrollo durante el estadio pupal, es factible considerar que una abeja adulta con experiencias olfativas pre-imaginales, presente diferencias estructurales a nivel periférico, es decir en los órganos sensoriales. Algunos estudios (Larsson et al. 2004, Fishilevich et al. 2005, Kreher et al. 2005) demostraron que la expresión de los receptores olfativos en el sistema olfativo de las larvas de *Drosophila* es similar a la de los adultos. En líneas generales el diseño de las vías olfativas en las larvas de *Drosophila* es muy similar al de su contraparte en el individuo adulto (Gerber y Stocker 2007). Por lo tanto, estas evidencias indicarían que el sistema olfativo mantiene su conformación aun luego de la metamorfosis. Es plausible entonces pensar que un aprendizaje olfativo, producto de las experiencias olfativas pre-imaginales, podría promover cambios dinámicos que afecten la estructura del futuro sistema olfativo periférico en las abejas adultas. Evidencias en este sentido se han observado en abejas adultas condicionadas olfativamente en un protocolo de REP a las que luego se les realizó una aproximación cuantitativa de sus receptores olfativos (Claudianos et al. 2014). En dicho estudio concluyeron que un aprendizaje olfativo de largo término es esencial para inducir la plasticidad de ese tipo de receptores sensoriales. Sumado a estas evidencias, se ha demostrado en insectos hemimetábolos que la variación fenotípica

respecto al número de sensilias antenales es producto de las diferencias en el patrón de agregación, de la calidad del alimento y de los olores experimentados durante el desarrollo de estos insectos (Greenwood y Chapman 1984, Heifetz y Applebaum 1995, Ochieng et al. 1998, Chapman 2002). Por ejemplo, Chapman y Lee (1991) mostraron diferencias en las sensilias antenales del último estadio larval de *Schistocerca americana* debido a la experiencia olfativa durante el desarrollo. Es por ello que uno de los objetivos de este capítulo es cuantificar la cantidad de sensilias placoideas en las abejas adultas para evaluar cambios estructurales en el sistema olfatorio periférico producto de la alimentación diferencial durante sus etapas pre-imaginales.

Por otro lado la habilidad de las abejas en responder extendiendo su probóscide hacia el olor previamente asociado con una recompensa, está relacionada con la sensibilidad del receptor y/o con la habilidad para incrementarla (Jong y Pham-Delègue 1991). En este sentido se evidenciaron resultados contradictorios al correlacionar una respuesta a nivel de fisiología sensorial y aprendizaje olfativo. Algunos estudios electrofisiológicos han demostrado la plasticidad inducida por procesos de aprendizaje a nivel de la periferia del sistema olfativo utilizando la técnica de electroantenograma (EAG). Concluyendo por ejemplo que la sensibilidad de las antenas se incrementa luego de un aprendizaje olfativo (Jong y Pham-Delègue 1991, Wadhams et al. 1994). Sin embargo, otros estudios no evidenciaron aumentos en los niveles de EAG e incluso reportaron una disminución en la respuesta, hecho que puede deberse a una adaptación neuronal hacia la presentación continua de un olor (Bhagavan y Smith 1997, Sandoz et al. 2001). Recientemente

Claudianos y colaboradores (2014) demostraron que las respuestas electrofisiológicas de las antenas disminuyen producto de la regulación de la expresión de los receptores olfativos (*downregulation*, su expresión en inglés) luego de un aprendizaje olfativo que permite establecer memorias asociativas estables. Ante estas evidencias es factible pensar que la asociación establecida entre el olor y el alimento durante estadios larvales conlleva a una plasticidad en la abeja adulta recién emergida capaz de ser comprobable mediante técnicas electrofisiológicas como el EAG. Por lo tanto otros de los objetivos de este capítulo es evaluar los niveles de EAG en abejas adultas con o sin experiencias olfativas preimaginables.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Sitio de estudio y animales

Los experimentos se realizaron entre octubre y abril de 2010, 2011 y 2012 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O). Al igual que para la serie experimental descrita en la sección anterior (ver 3.2.1), se utilizaron 2 colmenas comerciales de *Apis mellifera* las cuales fueron alimentadas artificialmente con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar. Las abejas experimentales completaron su desarrollo larval dentro de las colmenas y luego concluyeron su desarrollo en incubadoras a temperatura y humedad controladas (36 °C y 55% HR). Una vez emergidas como adultas, las abejas fueron confinadas en grupos de 120 individuos dentro de cajas de madera con solución azucarada 50% p/p y polen *ad libitum* y

mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad (31 °C, 55% HR) y oscuridad en el laboratorio hasta el momento de la evaluación.

4.2.2 Procedimiento experimental

El objetivo de estos experimentos fue evaluar los efectos de una alimentación diferencial durante el desarrollo larval de las abejas sobre el sistema nervioso periférico. Para ello se alimentaron 2 colmenas con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar mediante el uso de un alimentador artificial ubicado en el interior de las mismas. Los alimentos ofrecidos fueron soluciones azucaradas (50% p/p) sin aromatizar (Sin olor) o aromatizada con 1-Hexanol (1-Hexanol, 100µl/L). El procedimiento con el cual las colmenas fueron alimentadas así como la elección de las abejas experimentales, fue ya descrito en la sección 2.2.1. Una vez que las abejas emergieron como adultos, fueron mantenidas en condiciones reguladas de laboratorio (32 °C, 55% HR y oscuridad) y entre los 3-5 días de edad fueron utilizadas para diseccionar sus antenas. Las antenas fueron utilizadas para cuantificaciones morfológicas de las estructuras sensoriales (conteo de los órganos olfativos sensoriales) o bien para evaluar su respuesta electrofisiológica ante la presencia de diferentes estímulos olfativos. Los procesos de cuantificación de los patrones morfológicos de las antenas así como la evaluación de la actividad electrofisiológica de las antenas se detallan a continuación.

4.2.3 Cuantificación de los órganos olfativos sensoriales en las antenas

La finalidad de este experimento fue determinar si la morfología de la antena de las abejas se veía afectada en cuanto a la cantidad de sensilias olfativas (placoideas), producto de una alimentación diferencial durante su desarrollo. Para ello, las antenas de abejas adultas de 3-5 días de edad que se desarrollaron según lo expuesto en el procedimiento experimental, fueron diseccionadas. La disección de las antenas consistió en primera instancia, en sacrificar a las abejas experimentales, algunas mediante frío (4 °C) y otras sumergiéndolas en alcohol (96%). Luego con la ayuda de un bisturí se cortó la antena a la altura del pedicelo separándola de la cabeza. Se cortaron algunas antenas derechas y otras izquierdas dentro de cada grupo experimental. La antena una vez diseccionada de esta forma fue colocada manteniendo siempre la misma posición, en un portaobjeto. Se agregó una gota de glicerina líquida, con la idea de mantener humectado el preparado, y se lo cubrió con un cubre objetos. Una vez elaborado el preparado con la antena, se colocó el mismo bajo microscopio confocal. La autofluorescencia de la cutícula permitió que los láseres del microscopio incidieran captando la fluorescencia emitida y así se pudo observar la morfología de la antena. El microscopio confocal permitió reconstruir tridimensional la antena dado que logra capturar imágenes a diferentes planos focales, por lo que se pudo visualizar aproximadamente el 75% de la superficie total de la antena. Se utilizó un láser de 480nm de longitud de onda que incidió sobre el preparado. Las imágenes obtenidas corresponden a los segmentos antenales número 7 y 8. La cuantificación de las sensilias placoideas presentes en estos segmentos se llevó a cabo utilizando el programa Fiji, las

imágenes se exportaron a este programa el cual permitió establecer un área de medición (equivalente para cada segmento de la antena y entre antenas) dentro de la cual se midió la cantidad de placoideas (ver figura 4.1)

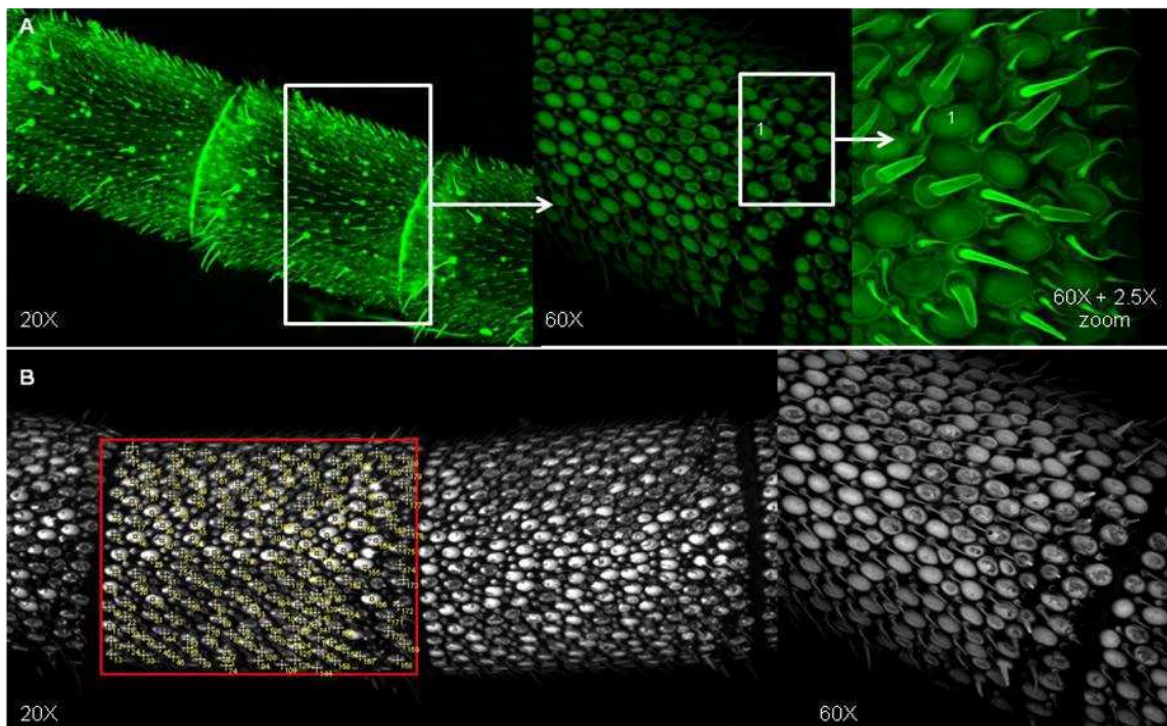


Figura 4.1: Detalle del segmento antenal n° 7 de una abeja adulta de 3-5 días de edad. En A) se observa una secuencia fotográfica con diferentes aumentos del microscopio confocal y en donde se pueden visualizar las sensillas placoideas (1) y en B) se observa como utilizando el programa de computación (ImageJ) se realizó el conteo de estas sensillas.

4.2.4 Registros Electrofisiológicos (Electroantenograma)

El objetivo de este procedimiento fue evaluar el efecto de una estimulación olfativa sobre las respuestas fisiológicas de las antenas de las abejas experimentales. Para ello, se realizaron ensayos electrofisiológicos, a través de *electroantenogramas (EAGs)*, en las antenas de las abejas expuestas a las diferentes dietas durante su desarrollo larval. Estos registros miden diferencias de potencial entre la hemolinfa y la superficie cuticular de la antena, cuantificando la suma de los potenciales receptores de neuronas sensoriales olfativas en la vecindad del electrodo de registro. De esta manera, los EAGs son una buena medida para detectar diferencias en las respuestas de las neuronas receptoras olfativas entre los diferentes grupos experimentales de abejas, las cuales fueron sujetas a distintas estimulaciones olfativas durante su desarrollo. Para ello se aislaron las antenas de las abejas experimentales del mismo modo que lo descrito en otros trabajos (por ejemplo en Claudianos et al. 2014). El hecho de aislar la antena facilitaría la interpretación de los resultados dado que si existieran variaciones en las respuestas electrofisiológicas se deberían a los cambios en las ORNs y no a una señal-respuesta del SNC. Las antenas fueron expuestas a diferentes olores. Se presentó en primera instancia el olor previamente ofrecido en el alimento (1-Hexanol) y luego un olor novedoso (Nonanal). Estos olores se ofrecieron en tres concentraciones diferentes (1/100, 1/10 y 1/1) para establecer la relación dosis-respuesta de la antena frente a distintos estímulos olfativos.

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron mediante un dispositivo específico que se componía de un pre-amplificador, amplificador y un conversor analógico-digital conectado

a una computadora la cual procesaba los registros mediante un software diseñado específicamente para dicho fin. Como primera medida fue necesario diseccionar las antenas de las cabezas de las abejas experimentales. Para ello bajo un estereomicroscopio y con ayuda de una luz fría direccional, se cortó con bisturí la base de la antena (a la mitad del escapo) luego se realizó un pequeño corte en la punta de la misma (en el primer segmento del flagelo) para asegurar que el gel conductor estuviera en contacto con la hemolinfa. De esta manera la antena se montó sobre un “holder” (un dispositivo que se comporta como electrodo de referencia y de registro, ver figura 4.2) donde se colocó un gel conductor para cerrar el circuito entre los extremos de la antena permitiendo así la circulación de la corriente eléctrica. El “holder” se encontraba unido al pre-amplificador y éste a su vez era sostenido por un micromanipulador, el cual se utilizaba para manipular la preparación de la antena. Una vez que la antena se encontraba montada cerrando el circuito eléctrico, se obtuvo en la computadora un registro eléctrico de reposo, el cual se reguló (mediante el osciloscopio del amplificador) para que oscilara alrededor de los $0\mu\text{V}$, obteniendo así la línea de base del EAG. Una vez estabilizada la línea base, y utilizando un dispositivo de liberación de los olores se cuantificó la diferencia de potencial obtenida para cada estimulación olfativa. El dispositivo de liberación de olores consistió en un cañón ubicado en la misma dirección que la antena y por el cual circuló una corriente continua de aire limpio y húmedo (el aire pasaba antes de ser liberado por una columna de carbón activado y otra de agua destilada). Los registros obtenidos reflejaron la diferencia de voltaje obtenida en función del tiempo. En un momento pautado con anterioridad (fijado en el software

utilizado) se liberó el estímulo olfativo, por lo tanto la cuantificación de la diferencia de potencial antes y durante la estimulación pudo ser fácilmente registrada. Los valores de voltaje así obtenidos se compararon entre grupos experimentales de abejas.

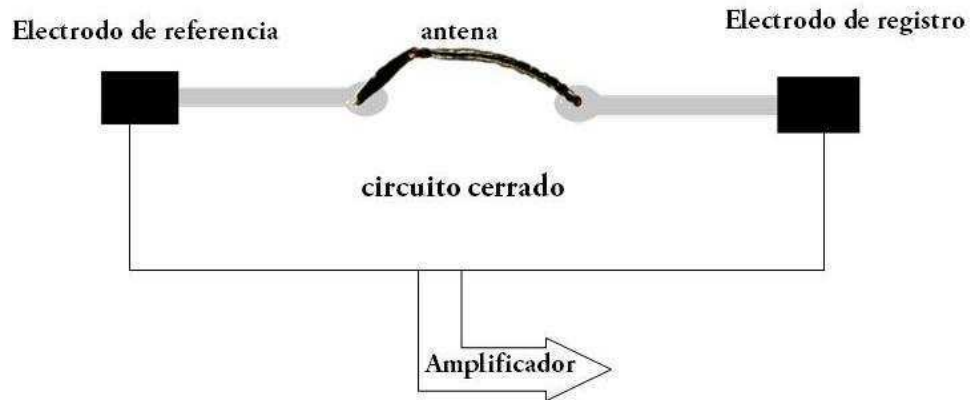


Figura 4.2: Esquema del dispositivo empleado para la obtención de los registros electrofisiológicos de las antenas (EAG)

4.3 Análisis Estadístico

Con el fin de comparar la morfología de las antenas pertenecientes a abejas adultas (de 3 a 5 días de edad) que han sido alimentadas con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar dentro de las colmenas durante sus estadios larvales, se cuantificó la cantidad de sensilias placoideas en el séptimo y octavo segmento del flagelo de las antenas. Para ello se aplicó un análisis de varianza de dos factores, siendo uno de los factores la experiencia olfativa pre-imaginal y el otro de los factores el número de segmento analizado (Sokal 2000). Dado que ambos factores contienen dos niveles, en el caso de existir diferencias significativas no fue necesario realizar contrastes *a posteriori*. Por otro lado, para comparar las respuestas electrofisiológicas de las antenas de abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales, éstas fueron estimuladas con distintas concentraciones de un olor que podía ser conocido o novedoso, dependiendo de la experiencia del individuo. Con el fin de realizar un análisis global entre los tratamientos y el tipo de estimulación olfativa, los valores obtenidos en microvoltios (μV) fueron comparados utilizando un modelo lineal generalizado en R v 3.0 (R Development Core Team 2013). El R ajustó el modelo a la función “Glm” perteneciente al paquete “mass”. Se utilizó como efecto fijo al factor tratamiento mientras que la variable dependiente fue el voltaje. Los datos utilizados se ajustaron a una distribución binomial negativa.

4.4 Resultados

4.4.1 ¿Modifican estas experiencias pre-imaginables a la morfología de la antena?

Para responder si las experiencias olfativas pre-imaginables tienen algún efecto sobre la morfología, por ejemplo en cuanto a la variación en la cantidad de sensilias olfativas como ser las sensilias placoideas, se contabilizó la cantidad de estas sensilias en las antenas de abejas adultas de 3 a 5 días. Luego se compararon las cantidades obtenidas entre los diferentes grupos experimentales. El análisis de varianza de dos factores no reveló diferencias significativas en la interacción entre el tratamiento y el segmento de la antena analizado, así como tampoco en el tratamiento al que fueron sujetas las abejas durante sus estadios larvales: alimento aromatizado vs alimento sin aromatizar (Interacción entre factores $F_{1, 36}=0,79$, $p=0,379$; Factor tratamiento: $F_{1, 36}=0,726$, $p=0,614$; figura 4.3). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los segmentos analizados, presentando el segmento número 8 la mayor cantidad de sensilias placoideas en ambos grupos experimentales (Factor segmento analizado: $F_{1, 36}=16,97$, $p=0,0002$; figura 4.3).

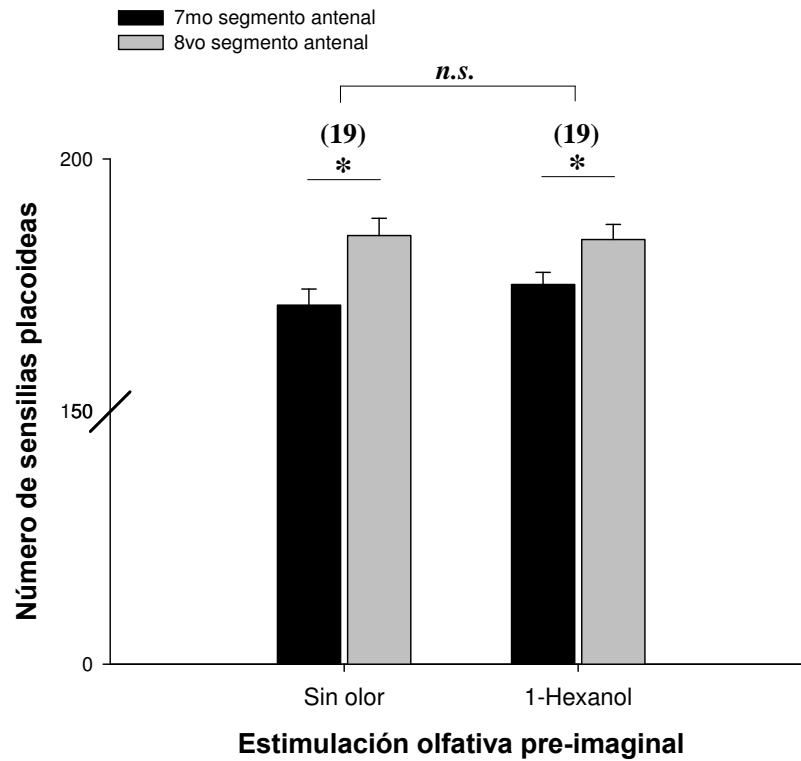


Figura 4.3: Cuantificación de las sensilias placoideas presentes en las antenas de abejas con experiencias olfativas pre-imaginales. Las abejas fueron estimuladas dentro de la colmena con solución azucarada (50% p/p) aromatizada con 1-hexanol (100µl/L) o sin aromatizar durante los estadios pre-imaginales. Luego de su emergencia como adultos, las abejas fueron criadas bajo condiciones controladas de laboratorio hasta el momento de la evaluación (3-5 días de edad). Se contabilizó la cantidad de sensilias placoideas presentes en el 7mo y 8vo segmento antenal. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en un Anova de dos factores (* $p < 0,05$). El número de observaciones se indica entre paréntesis.

4.4.2 La influencia de las experiencias olfativas pre-imaginables sobre las respuestas electrofisiológicas (EAGs) en las antenas de las abejas adultas

Dado que la sensibilidad de los receptores olfativos pudo haber sido modulada por las experiencias olfativas pre-imaginables, se midieron las respuestas electrofisiológicas de todos los receptores presentes en las antenas de las abejas adultas de entre 3 a 5 días de edad mediante un EAG. Los resultados obtenidos fueron analizados de manera global mediante un modelo lineal generalizado (GLM). Al analizar las respuestas de las antenas (μV) se evidenciaron diferencias significativas (GLM, $t = -3,66$, $p = 0,0003$; ver figura 4) entre los grupos experimentales (con o sin experiencias olfativas pre-imaginables). En general, sin discriminar entre concentración y olor de estimulación, los receptores olfativos de las abejas con experiencias olfativas pre-imaginables presentan menores respuestas electrofisiológicas respecto a las respuestas obtenidas en antenas de abejas sin estas experiencias.

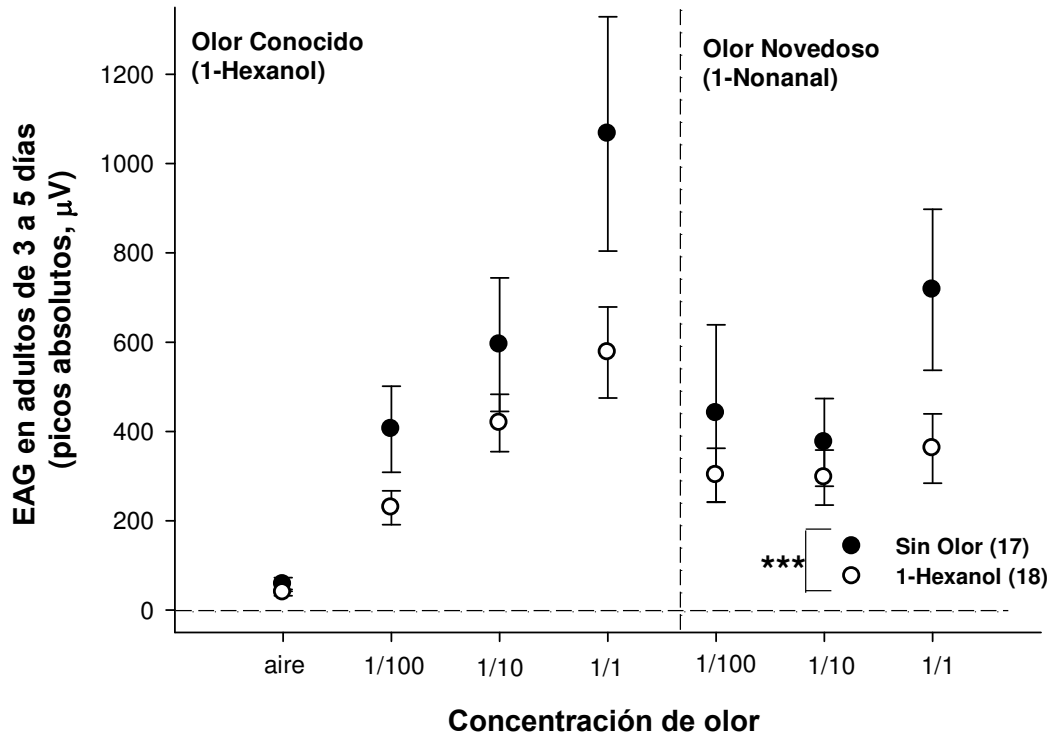


Figura 4.4: Respuestas electrofisiológica en antenas enteras de abejas de 3 a 5 días de vida adulta que han sido expuestas a experiencias olfativas pre-imaginales. Las antenas utilizadas pertenecen a abejas que fueron estimuladas durante etapas pre-imaginales con solución aromatizada con 1-hexanol (puntos blancos) o sin aromatizar (puntos negros). Las antenas fueron estimuladas con diluciones de 1-Hexanol (olor conocido) y Nonanal (olor novedoso). Los asteriscos indican diferencias estadísticas en un modelo lineal generalizado (***) $p < 0,0005$. El número de observaciones se indica entre paréntesis.

4.5 Discusión

En base a los resultados obtenidos y respecto a la cuantificación de las sensilias placoideas, se evidenció que las experiencias olfativas preimaginables no modificaron la cantidad de órganos sensoriales olfativos presentes en las antenas de las abejas adultas. Aunque sí se evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de sensilias placoideas entre los segmentos de las antenas analizados en abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginables, situación que también es frecuente entre segmentos antenales de otras especies de insectos (Chapman 2002). Diferentes autores han cuantificado la cantidad de sensilias olfativas (placoideas) en abejas adultas con diferentes patrones de comportamiento. En el caso del comportamiento recolector, Riveros y Gronenberg (2010) evidenciaron una mayor cantidad de sensilias olfativas en abejas recolectoras de polen y agua, argumentando que esta diferencia es debida a una mayor sensibilidad sensorial de dichas abejas en comparación con abejas recolectoras de néctar. Respecto al comportamiento higiénico, Gramacho y colaboradores no encontraron diferencias significativas al comparar la cantidad promedio de placoideas entre abejas que despliegan comportamientos higiénicos y las que no (Gramacho et al. 2003). Por lo tanto la sensibilidad olfativa a nivel periférico no siempre se evidencia con una variación en la cantidad de las sensilias olfativas presente en las antenas de las abejas experimentales, al menos en estos insectos holometábolos. Sin embargo, la plasticidad del sistema olfativo es resultante de la plasticidad en las neuronas involucradas en las diferentes etapas del procesamiento de la información olfativa. Por lo tanto, es relevante evaluar la sensibilidad olfativa periférica, a través de la población de

receptores olfativos que inervan los distintos tipos de sensilias olfativas distribuidas espacialmente a lo largo de la antena (Masson y Arnold 1984). Es por esto que se evaluó la respuesta electrofisiológica mediante el EAG en las antenas de las abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales. Los resultados sugieren que la sensibilidad de los receptores de las antenas frente a diferentes estímulos olfativos difiere dependiendo de si las abejas adultas estuvieron sujetas a experiencias olfativas recompensadas durante su desarrollo larval. Las antenas de las abejas que tuvieron experiencias olor-recompensa, mostraron respuestas significativamente menores tanto al ofrecérseles el olor conocido (1-Hexanol) como el novedoso (Nonanal). Este resultado muestra un vínculo entre el aprendizaje olfativo durante la etapa pre-imaginal y la sensibilidad olfativa a nivel periférico del adulto joven. En este sentido, un trabajo recientemente publicado demostró que en abejas adultas, la plasticidad en la vía olfativa producto de una experiencia olfativa previa se evidencia también a nivel periférico, ya que se encontraron modificaciones tanto en la expresión génica de los receptores olfativos (disminución en la expresión génica de un tipo de receptores olfativos), como en las respuestas electrofisiológicas de las antenas (Claudianos et al. 2014). Similarmente a los resultados obtenidos en este capítulo, los autores indicaron que un aprendizaje olfativo a largo término conllevó a una menor respuesta electrofisiológica de los receptores olfativos involucrados y que este hecho correlaciona con una regulación negativa de dichos receptores (Claudianos et al. 2014). Más aun, los autores destacan que la memoria olfativa de largo plazo parece ser esencial para la inducción de estos cambios, lo que sugiere que los mecanismos moleculares

implicados en la formación de esta memoria también regulan la expresión de los receptores olfativos (Claudianos et al. 2014). Los registros del EAG de abejas adultas jóvenes aquí presentados mostraron que la respuesta neuronal de las antenas disminuyó luego de la exposición olfativa durante estadios pre-imaginales. Por lo tanto, las experiencias olor-recompensa durante las etapas pre-imaginales inducen modificaciones estructurales y funcionales en todo el sistema olfativo extendiéndose incluso hacia la periferia sensorial. Las evidencias obtenidas en este capítulo, podrían ir en esta dirección y sería aun más interesante dado que las experiencias olfativas se han llevado a cabo antes de que las antenas completen su desarrollo. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Masson y Arnold donde se sugiere que en abejas la experiencia sensorial previa (en este caso abejas criadas en condiciones de aislamiento versus abejas criadas en grupo) modifica la respuesta electrofisiológica. Estos investigadores también evidenciaron que las abejas recién emergidas presentan respuesta electrofisiológica distinta de 0% por lo que sugieren que los mecanismos de maduración del sistema olfativo comienzan antes de la emergencia como adulto. Es sabido que las antenas terminan de conformarse en los estadios pupales (Snodgrass 1956) y que en las abejas adultas el aprendizaje olfativo a distintos olores modifica la sensibilidad de las antenas en aquellos individuos que aprendieron a asociar un olor con la recompensa (Jong y Pham-Delègue 1991). Por lo tanto, en base a estas evidencias y los resultados obtenidos en este capítulo, se puede sugerir que la experiencia olfativa durante el desarrollo larval, que conllevaría a un aprendizaje olfativo, influye en la

sensibilidad y por ende en la respuesta de los receptores olfativos de la antena de las abejas experimentales.

5

5. LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS PRE- IMAGINALES Y SUS CORRELATOS NEUROBIOLÓGICOS: EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS CON PLASTICIDAD SINÁPTICA.

5.1 Introducción

La plasticidad del cerebro ha sido extensamente estudiada en vertebrados e incluye la variación del volumen cerebral, el número de sinapsis y la conexión y actividad neuronal (Bruel-Jungerman et al. 2007). Sin embargo, otros trabajos han demostrado que la plasticidad cerebral no es exclusiva de vertebrados, también ocurre en los invertebrados (Heisenberg et al. 1995, Murphey 1986, Withers et al. 1993). Dado que las abejas atraviesan diferentes etapas en su estadio adulto y por ende experimentan ambientes sensoriales variables, ha sido un modelo ampliamente estudiado y del cual se han obtenido evidencias sobre las variaciones anatómicas y funcionales que explican la plasticidad cerebral de estos individuos (Reinhard y Claudianos 2012). En particular la plasticidad en las vías olfativas tanto de vertebrados como invertebrados está inducida por el aprendizaje

asociativo y las experiencias vividas. Una vez más, la abeja melífera resultó un buen modelo de estudio para comprender la plasticidad de las vías olfativas, dado que presenta la habilidad para aprender el olor de una determinada oferta floral que explotará para conseguir alimento. Lo interesante es que estos individuos se ven enfrentados a un ambiente floral constantemente variable, por lo que deben extinguir las memorias olfativas existentes y generar nuevas, es por ello que las vías olfativas deben responder también a estas fluctuaciones. En este sentido, la plasticidad olfativa afecta a todos los niveles de los circuitos olfativos, desde las neuronas sensoriales hasta los neuropilos primarios y los centros superiores de procesamiento de la información olfativa (Wilson et al. 2004, Sandoz 2012). También se han evidenciado cambios neuroanatómicos de estos centros de procesamiento, los lóbulos antenales y los cuerpos pedunculados, producto del aprendizaje olfativo (Withers et al. 1993, Sigg et al. 1997, Farris et al. 2001, Hourcade et al. 2009, Arenas et al. 2012). Sumado a estas variaciones, se observó que la arquitectura sináptica de estos centros de alta complejidad y nivel de procesamiento de información es altamente plástica, dado que nuevas sinapsis se conforman una vez que las abejas encuentran y aprenden nuevos estímulos sensoriales durante la recolección de recursos (Menzel 2012, Reinhard y Claudianos 2012). Por lo tanto, es factible que también se vea modificada la expresión de moléculas sinápticas que están involucradas en la conexión de las neuronas pre y post-sinápticas. Se ha demostrado que en vertebrados dos moléculas son cruciales para la formación y maduración de las sinapsis, a saber, las pre-sinápticas *neuroxinas* (*Nrx*) y su contraparte post-sináptica, las *neuroliginas* (*Nlg*). Biswas y colaboradores han

demostrado que estas moléculas existen en abejas y por lo tanto constituyen un complejo de adhesión sináptica altamente conservado (Biswas et al. 2008). Este complejo de proteínas transmembrana que vincula las neuronas pre y postsinápticas, tiene como finalidad mantener los componentes del citoesqueleto de las neuronas para la localización de las vesículas sinápticas. Las neuroxinas son necesarias para activar los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje que se requieren para la liberación de dichas vesículas, mientras que las neuroliginas se unen a las neuroxinas con el fin de localizar los receptores correspondientes a los neurotransmisores liberados en la sinapsis. Para ello, en las neuronas post-sinápticas las neuroliginas están conectadas con proteínas especializadas que estimulan a los receptores de neurotransmisores y canales específicos a que ocupen regiones especializadas de la terminal post-sináptica durante la maduración de la sinapsis (ver figura 5.1). Debido a que todas las sinapsis en desarrollo contienen neurexinas y neuroliginas, las células en desarrollo pueden hacer muchas conexiones diferentes con otras células. Es por ello que puede utilizarse la expresión de dichas moléculas para ahondar en los estudios de la plasticidad cerebral de las abejas ya que es un indicador de conectividad sináptica. Existen en las abejas un tipo de *neuroxina* (*Nrx 1*) y cinco tipos de *neuroliginas* (*Nlg 1-Nlg 5*). Estas moléculas sinápticas se expresan a lo largo de todo el desarrollo de la abeja. En particular la expresión de *Nrx 1* y *Nlg 2-5* se incrementa luego de la emergencia de la abeja como adulto y aumenta a lo largo de su desarrollo desde su rol como nodriza hasta recolectora (Biswas et al. 2008). La *Nlg 3* fue encontrada predominantemente en los cuerpos pedunculados del cerebro de la abeja adulta, aunque también se encontró expresión

en lóbulos antenales entre otras estructuras cerebrales (Biswas et al. 2008). Un patrón similar de distribución fue encontrado para su contraparte pre-sináptica, la *Nrx I*. Por lo tanto, dada la presencia de estas moléculas en los cuerpos pedúnculados, que se sabe son los centros de procesamiento de la información sensorial importantes para el aprendizaje y memoria, se sugirió que estas moléculas juegan un rol fundamental en la formación de sinapsis relacionadas con procesos de aprendizaje (Reindhard y Claudianos 2012). En pos de comprender el rol de estas moléculas sinápticas Biswas y colaboradores realizaron experimentos comportamentales donde las condiciones de cría de las abejas fueron diferentes, un grupo se desarrolló en aislamiento mientras que el otro lo hizo en el entorno de la colmena. Los resultados indicaron que tanto la deprivación como el enriquecimiento sensorial influyen en la expresión de las *Nrx* y *Nlgs* indicando que estas moléculas participan en la plasticidad cerebral inducida por las experiencias sensoriales en el adulto (Biswas et al. 2010). Basado en estas evidencias y dado que no se ha probado hasta el momento si las experiencias sensoriales del tipo olfativas, experimentadas durante el desarrollo larval de las abejas, afecta la expresión de estas moléculas, se plantea el segundo objetivo de este capítulo. Dicho objetivo tiene por finalidad comparar la expresión de las *Nrx* y *Nlgs* en abejas adultas que tuvieron o no experiencias olfativas pre-imaginales.

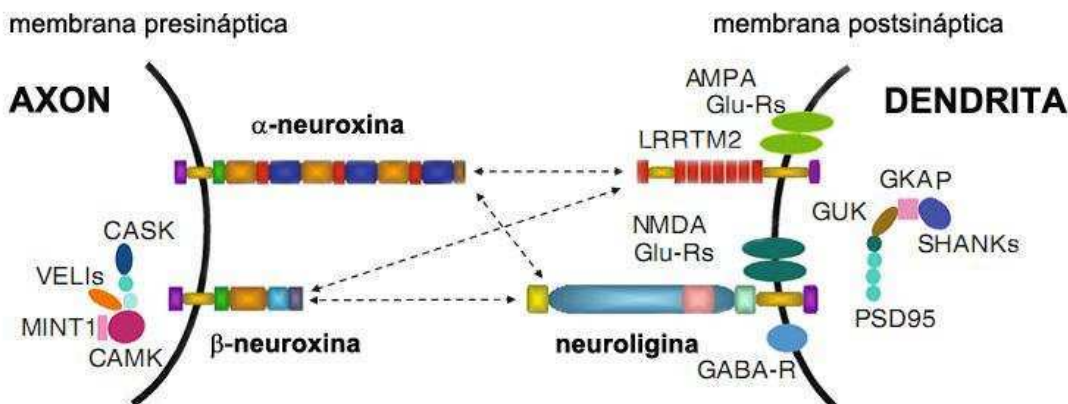


Figura 5.1: Representación esquemática de las neuroxinas y neuroliginas junto a otras proteínas involucradas en la sinapsis, como ser la proteína transmembrana rica en leucocina (LRRTM2) y otras proteínas de conexión tanto pre como postsinápticas involucradas en los procesos de señalización. En el esquema se muestran las isoformas conservadas (α y β) de la neuroxina que se unirán a las neuroliginas (1-4) y a la LRRTM2 especificando el desarrollo de las sinapsis excitatorias e inhibitorias. Las proteínas citoplásmicas CASK, CAMK, VEL y MINT interactúan con las neuroxinas para formar un “andamio” de proteínas multidominio y así anclar los receptores presinápticos involucrados en el tráfico de iones. Lo mismo ocurre en la postsinapsis donde las proteínas citoplásmicas PSD95, GUK, GKAP y SHAMKs forman un complejo “andamio” para crear una densidad de moléculas postsinápticas que conectarán a los NMDA neurotransmisores, los AMPA y GABA receptores, los canales iónicos y a otras proteínas de membrana con el citoesqueleto de actina y la proteína G acopladas a la vía de señalización de la neurona. Este complejo de neuroxina-neuroligina está altamente conservado entre vertebrados e invertebrados (Biswas et al. 2008) reflejando los roles funcionales claves asociados con el procesamiento cognitivo (Südhof 2008). Esquema modificado a partir de Reinhard y Claudianos 2012.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Sitio de estudio y animales

Para esta serie experimental se utilizaron cerebros provenientes de abejas *Apis mellifera* criadas en colmenas comerciales del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias

Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O), entre los meses de octubre y abril de 2011 y 2012. Las 2 colmenas utilizadas fueron alimentadas artificialmente una con solución azucarada aromatizada y la otra, sin aromatizar (mediante el procedimiento detallado en la sección 2.1). Las abejas experimentales completaron su desarrollo larval dentro de las colmenas y luego concluyeron su desarrollo en incubadoras a temperatura y humedad controladas (36 °C y 55% HR). Una vez emergidas como adultas, las abejas fueron confinadas en grupos de 120 individuos dentro de cajas de madera con solución azucarada 50% p/p y polen *ad libitum* y mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad (31 °C, 55% HR) y oscuridad en el laboratorio hasta el momento de la disección de los cerebros.

5.2.2 Procedimiento experimental

El objetivo de estos experimentos fue evaluar los efectos producidos por una alimentación diferencial durante el desarrollo larval de las abejas sobre el sistema nervioso central. Para ello se alimentaron 2 colmenas con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar mediante el uso de un alimentador artificial ubicado en el interior de las mismas. Los alimentos ofrecidos fueron soluciones azucaradas (50% p/p) sin aromatizar (Sin olor) o aromatizada con 1-Hexanol (1-Hexanol, 100µl/L). El procedimiento con el cual las colmenas fueron alimentadas así como la elección de las abejas experimentales, fue ya descrito en la sección 2.1. Una vez que las abejas emergieron como adultos, fueron mantenidas bajo condiciones reguladas de laboratorio (32 °C, 55% HR y oscuridad) y entre

los 3-7 días de edad fueron utilizadas para diseccionar sus cerebros. Los cerebros fueron utilizados para cuantificar la expresión génica de ciertos genes involucrados en los procesos sinápticos entre neuronas durante procesos de aprendizaje (Neuroliginas y Neuroxina).

5.2.3 Cuantificación de la expresión de genes vinculados con plasticidad sináptica

Con el objeto de correlacionar la plasticidad conductual observada con cambios putativos en el sistema nervioso, se evaluó la expresión de genes involucrados en los procesos sinápticos durante un proceso de aprendizaje. Dichos genes codifican proteínas receptoras de neuronas pre y post-sinápticas (*Nrx* y *Nlgs* correspondientemente, Biswas et al. 2008). Para ello se extrajeron los cerebros de abejas adultas de entre 3-6 días de edad sujetas durante su desarrollo larval a diferentes dietas (aromatizada con 1-Hex o sin aromatizar). La disección de cerebros se llevó a cabo bajo lupa, en primera instancia las abejas fueron anestesiadas en frío (-4 °C) y luego fueron decapitadas utilizando una tijera de disección. Fijando luego la cabeza en cera de abeja previamente derretida, se colocó solución fisiológica y se procedió a abrir la cutícula para extraer el cerebro. Para preservar el cerebro con el fin de poder realizar el protocolo de extracción del ARN, el mismo no fue fijado. Los lóbulos ópticos de los cerebros fueron eliminados. Así los cerebros fueron mantenidos en crio-viales en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción de ARN que se detalla a continuación. Cada crio-vial contenía 10 cerebros diseccionados, en total se completaron 10

crio-viales con cerebros de abejas con experiencias olfativas pre-imaginales y 8 crio-viales con cerebros de abejas sin estas experiencias.

El ARN total fue extraído utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies®). Una vez extraído fue conservado en freezer de -70°C. Luego una alícuota de ARN se utilizó para controlar su estado mediante un gel de agarosa al 1% y corroborar que no esté degradado. Posteriormente se procedió a su cuantificación por espectrometría a partir de una dilución 1/100 (1µl de ARN en 99µl de agua filtrada). Para eliminar cualquier posible contaminación con ADN se realizó un tratamiento con una enzima degradadora de ADN (desoxirribonucleasa): 4 a 5 µg de ARN fueron tratados con la enzima “RQ1 *DNAsa*” (Promega®). Posteriormente se llevó a cabo una PCR utilizando como molde el ARN tratado, de manera de asegurarse que no hayan quedado restos de ADN genómico. Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa al 2%. Si el tratamiento con RQ1 *DNAsa* fue efectivo, no se habrán observado bandas en el gel. En caso contrario, el tratamiento tuvo que ser repetido. Luego de eliminar cualquier resto de ADN, el ARN tratado fue cuantificado mediante espectrometría y 1µg fue utilizado para la síntesis de ADN copia (ADNc). A continuación, se controló que la transcripción reversa haya sido efectiva mediante una *PCR* en tiempo real utilizando el ADNc como molde.

Las reacciones de *PCR* en tiempo real se llevaron a cabo en el ciclador Lightcycler 2.0 Instrument (Roche®) utilizando la enzima Taq Platinum (Invitrogen®) y el colorante Syber Green I (Invitrogen®).

Las secuencias de los primers para las *Nlg 1-5* (Neuroliginas 1 a 5) y la *Nrx 1* (Neurexina 1) fueron obtenidas de la bibliografía (Biswas et al. 2008). Los primers para RPL8 (proteína ribosomal 8) y para los distintos genes a estudiar se detallan en la tabla 5.1, así como el tamaño del producto amplificado y la temperatura de hibridación o *annealing*. Para corroborar la especificidad de los primers para *Apis mellifera* y la hibridación en la secuencia deseada se realizó un alineamiento utilizando el programa BLAST. Los primers fueron puestos a punto con ADNc de un pool de cerebros de abeja y se verificó la presencia de un único producto del peso molecular esperado en un gel de agarosa al 3%. Para cada par de primers se calculó la eficiencia de la reacción utilizando una curva de calibración con diluciones seriadas a partir del pool de ADNc de las muestras (1/20, 1/40, 1/80 y 1/160) y se decidió trabajar con una dilución de 1/40 partiendo de 10µl de molde. Cada muestra fue amplificada por duplicado y se llevó a cabo una curva interna de calibración, la cual permitió determinar la concentración de cada gen.

Los valores de las muestras obtenidos para cada gen fueron normalizados al gen constitutivo *RPL8* (concentración gen/concentración *RPL8*), cuya expresión no varía entre los distintos tejidos ni en los distintos estadios de la abeja (Collins et al. 2004). De esta manera, los valores de expresión génica normalizados fueron comparados entre los grupos de cerebros provenientes de abejas con distintas experiencias olfativas pre-imaginales.

Primer	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del Producto (PM)	Temperatura de hibridación de primers
Rpl8	F: CACACGGTGGTGGTAATCAT	114 pb	56
	R: CTCGGATTCTCCTGTACGA		
Nlg2	F: GGTGTTCTCCTCGTGCTCAA	68 pb	59
	R: ACGAGTTCCTGTCCTCTGGTA		
Nlg3	F: CATAGAGCTCAAGTCGAAACTGAA	124 pb	56
	R: GAGAAGATGATGCGATCTAGGAA		
Nlg4	F: CTTCTGATTCTCGTCTGTCTGA	71 pb	56
	R: GTGGATTCAGCTTGCTCTTGA		
Nlg5	F: GGTGTATTCTGTTGGTGCTCAATA	67 pb	55
	R: TGTCTCGATCCCTCTGATAGTAAA		
Nrx1	F: TCGAGTTCAAGACCGAGCA	81 pb	57
	R: GCTTCGCCTCGAAGAAGTC		

Tabla 5.1: Diseño de los primers, tamaño del producto amplificado y temperatura de hibridación tanto para el gen constitutivo (*Rpl8*) como para los genes de estudio, Neuroxina 1 (*Nrx 1*) y Neuroliginas 2-5 (*Nlg 2*, *Nlg 3*, *Nlg 4* y *Nlg 5*). Estos diseños se realizaron utilizando el programa Primer 3 y sus propiedades termodinámicas se evaluaron con el software de *Invitrogen Vector NTI Advance™ 10*.

5.2.4 Análisis Estadístico

Con el fin de comparar los niveles de expresión de los genes de la *Nrx 1* y las *Nlg 2*, *Nlg 3*, *Nlg 4* y *Nlg 5*, obtenidos mediante la reacción de *PCR* en tiempo real, entre las abejas con experiencias olfativas pre-imaginales y las abejas sin estas experiencias, se realizó un test de homogeneidad, la prueba de t (Sokal 2000). Se utilizó un análisis por cada gen comparando en cada caso la expresión entre el grupo de abejas tratadas y las abejas control.

5.3 Resultados

5.3.2 La influencia de las experiencias pre-imaginales sobre la expresión de genes relacionados con la plasticidad sináptica en abejas melíferas adultas.

Para evaluar si las experiencias olfativas pre-imaginales modifican la expresión de genes involucrados en procesos sinápticos, se cuantificaron y compararon los niveles de expresión génica de Neuroxinas y Neuroglinas entre abejas con y sin este tipo de experiencias. Se realizaron pruebas de t para comparar la expresión de cada gen. No se evidenciaron diferencias significativas para ninguno de los genes estudiados (ver figura 5.2). Tanto para la *Nrx 1* como para la *Nlg 2*, *Nlg 3*, *Nlg 4* y *Nlg 5* la prueba de t no reveló diferencia entre los grupos experimentales ($p=0,569$; $p=0,378$; $p=0,407$; $p=0,206$; $p=0,628$, respectivamente).

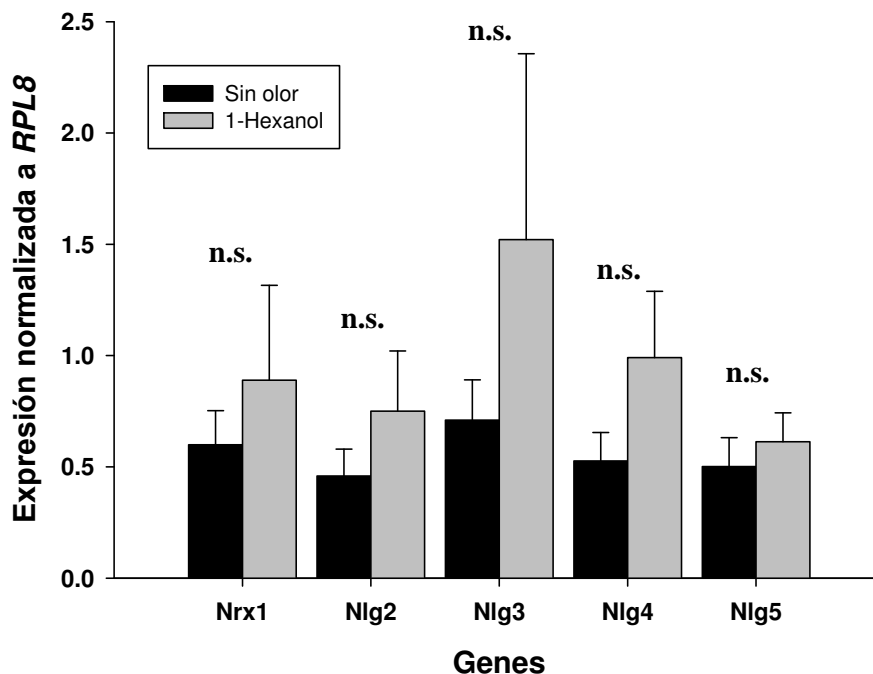


Figura 5.2: Expresión génica de *neuroglinas* y *neuroxin 1* en cerebros de abejas con experiencias olfativas pre-imaginales. Los tejidos cerebrales examinados pertenecen a abejas que fueron estimuladas durante etapas pre-imaginales con solución aromatizada con 1-hexanol (barras grises) o sin aromatizar (barras negras). La expresión de *neuroglinas* y *neuroxin 1* se realizó mediante la amplificación de una PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó al gen constitutivo ribosomal *RPL8* como nivel de referencia. Los niveles de expresión génica se muestran relativos y normalizados a la expresión de *RPL8*. *Nrx1*: neuroxina 1, *Nlg 2*: neuroligina 2, *Nlg 3*: neuroligina 3, *Nlg 4*: neuroligin 4 y *Nlg 5*: neuroligina 5. No se hallaron diferencias estadísticas en una prueba de t (n.s.).

5.4 Discusión

En los cerebros analizados de abejas adultas, los niveles de expresión de los genes involucrados en los procesos sinápticos, según los resultados obtenidos no se vieron modificados producto de las experiencias olfativas pre-imaginales. A pesar de esta conclusión, se observa una tendencia a incrementar la expresión de determinados genes, como la *Nlg3* presente en los cuerpos pedunculados y partícipe de los procesos sinápticos involucrados en el aprendizaje. Se ha evidenciado que las abejas adultas modulan la expresión de estos genes dependiendo de las experiencias sensoriales a las que fueron expuestas (Reinhard y Claudianos, 2012). Por las evidencias obtenidas en los resultados presentados en este capítulo, las experiencias pre-imaginales no parecerían incrementar significativamente la expresión de los genes estudiados. Sin embargo las tendencias en aumentar la expresión de ciertos genes luego de una experiencia pre-imaginal, estimulan a continuar con estos análisis para aumentar el tamaño de la muestra y así determinar si efectivamente la expresión génica se ve modificada producto de las experiencias olfativas previas. Es necesario entonces, profundizar con estos análisis para poder evidenciar un correlato a nivel de SNC con los cambios comportamentales observados y reportados en los capítulos anteriores. Esto sería factible si se replicara el análisis de la expresión génica de las neuroxinas y neuropeptidos así como también si se analizara la expresión de otros genes con alta relevancia en procesos cognitivos como por ejemplo, el gen del receptor de Octopamina (OA1). Esta amina biogénica juega un rol importante en los procesos de adquisición y establecimiento de memorias en un contexto apetitivo (Farooqui et al. 2003,

Schroll et al. 2006, Mitzunami y Matsumoto 2010). Por lo que su estudio podría ser de utilidad para continuar dilucidando las variaciones a nivel de SNC producto de las experiencias olfativas llevadas a cabo durante etapas donde este sistema se encuentra en pleno desarrollo.

6

6. EFECTO DE LAS EXPERIENCIAS OLOR-RECOMPENSA SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS LARVAS DE ABEJAS.

6.1 Introducción

Muchos estudios han evidenciado que los insectos holometábolos son capaces de aprender asociativamente durante etapas pre-imaginales y estas memorias pueden persistir por largos períodos de tiempo, incluso luego de la metamorfosis (Isingrini et al. 1985, Gandolfi et al. 2003, Blackiston et al. 2008). Lo interesante en este punto es la capacidad de las larvas de estos insectos para asociar estímulos neutros con estímulos excitatorios como la recompensa o un castigo. Existen evidencias que indican que las larvas de *Drosophila* aprenden de manera asociativa la contingencia entre un estímulo olfativo y la recompensa (Gerber y Stocker 2007). Gerber y colaboradores, establecieron un experimento estándar que les permitió arribar a esta conclusión. Dicho experimento consistió en ofrecerle a las larvas, dos olores de manera recíproca: mientras que un grupo de larvas fue expuesto a un olor A junto con recompensa (solución azucarada) y posteriormente fue expuesto a un olor B sin refuerzo; un segundo grupo de larvas recibió un entrenamiento recíproco. Es decir

que este segundo grupo fue expuesto al olor A sin refuerzo y posteriormente fue expuesto al olor B con recompensa. Luego se evaluó para ambos grupos la preferencia entre los dos olores. Las altas preferencias relativas hacia el olor recompensado reflejaron un aprendizaje asociativo que fue evaluado mediante un índice de aprendizaje. La conclusión sobre la naturaleza asociativa del índice de aprendizaje fue convincente, ya que además de la contingencia entre los olores y la recompensa, otros parámetros, como la exposición olor, la exposición a la recompensa, el transcurso del tiempo y la manipulación no difirió entre ambos grupos (Gerber et al. 2004, Neuser et al. 2005). Por otro lado, se ha demostrado en principio, que utilizando un protocolo en el cual durante el entrenamiento a una larva de *Drosophila* se le presenta un estímulo olfativo asociado a recompensa mientras que a su vez se le presenta otro estímulo asociado a un castigo, los efectos de un aprendizaje asociativo se ven maximizados (Scherer et al. 2003). Sin embargo, Hendel y colaboradores (2005) determinaron que la formación de memorias en este contexto parece deberse exclusivamente al efecto de la recompensa: los entrenamientos recompensados y no los entrenamientos de castigo son los que producen efectos significativos en el aprendizaje (Hendel et al. 2005). Por lo expuesto anteriormente, las larvas de la mosca de la fruta presentan la capacidad de asociar un estímulo olfativo con un estímulo gustativo, hecho de potencial relevancia biológica para estos animales ya que se desplazan sobre un sustrato (fruta) para alimentarse.

En lo que respecta a la abeja *Apis mellifera* como se mencionó anteriormente, son insectos que en su etapa larval viven confinados en una celda y son alimentados por sus compañeras de nido. Sin embargo en el alimento que reciben pueden estar asociados olores provenientes

de los recursos explotados en ese momento. En este contexto, no se había estudiado hasta este momento cómo la exposición de alimento aromatizado influye sobre el comportamiento de la larva de la abeja doméstica. Tampoco se había demostrado la capacidad de estos individuos para generar memorias olfativas durante estadios larvales que perduren a través de la metamorfosis y puedan evocarse en los estadios adultos como se evidenció en los capítulos anteriores. Por lo que en el presente capítulo se plantea la pregunta sobre la capacidad de las abejas en estadios larvales en evocar memorias olfativas producto de la asociación entre el alimento ofrecido durante su desarrollo y un olor disuelto en el mismo. Debido al modo de vida de las larvas, las mismas presentan poca motilidad y atraviesan todo su desarrollo en el interior de las celdas por lo que hasta este momento no se han puesto a punto protocolos que permitan analizar el comportamiento de las mismas. Sin embargo, en ensayos preliminares fue posible comprobar que las larvas pueden desplazarse en una arena experimental, por lo tanto uno de los objetivos de este capítulo implica la puesta a punto de un bioensayo de conducta estandarizado. El fin de este objetivo es permitir la evaluación de respuestas mediadas por estímulos olfativos. Por lo tanto, otro de los objetivos de este capítulo, es utilizar este nuevo protocolo metodológico en larvas de abejas melíferas para evaluar si las experiencias olfativas sesgan las preferencias de estos individuos en un contexto operante.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Sitio de estudio y animales

Este experimento fue realizado entre febrero y abril de 2013 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34° 32' S, 58° 26' O). En esta serie experimental se utilizaron larvas provenientes de colmenas comerciales de *Apis mellifera*. Las larvas experimentales fueron traslarvadas completando su desarrollo en incubadoras a temperatura, humedad controladas (34°C y 70-96% HR) y oscuridad como se explica a continuación.

6.2.2 Procedimiento experimental

Este experimento se llevó a cabo con la finalidad de poner a punto un protocolo experimental que permitiera evaluar el efecto de un olor asociado a la dieta ofrecida durante los estadios larvales sobre el comportamiento de la misma. Para ello en primera instancia se marcaron cuadros de cría con huevos con un tiempo de puesta homogéneo, luego de la eclosión de los huevos, las larvas de entre 1,5 y 2 días de vida fueron traslarvadas bajo condiciones reguladas de laboratorio. El traslarve consistió en colocar, utilizando pinzas específicas, a las larvas desde su ubicación en las celdillas hasta unos contenedores que las albergaban, luego se colocaba el contenedor con la larva dentro de caja de petri de vidrio (10 x 15 cm) uno al lado del otro (ver figura 6.2 A). Estos contenedores son recipientes de acrílico utilizados en labores de apicultura para la cría de reinas. Los mismos contenían el alimento para las larvas, aromatizado o sin aromatizar. Para la cría *in vitro* de *Apis*

mellifera se utilizó un protocolo modificado respecto del empleado en Kaftanoglu et al. 2011. La dieta utilizada fue descrita en el trabajo de Kaftanoglu y colaboradores, la misma estaba compuesta de la siguiente manera: 53% Jalea real, 6% Glucosa, 6% Fructosa, 1% Extracto de levadura y 34% agua destilada. En el caso del alimento aromatizado, el olor puro (1-Hexanol o Nonanal) fue disuelto en agua destilada a una concentración de 100µl/L. Al momento del traslarve, se colocó en cada recipiente contenedor 160µl de alimento, si las larvas durante su desarrollo y antes del período de pupación necesitaban más alimento, una alícuota de 40µl fue ofrecida. Antes de la pupación, al quinto día desde el traslarve, las larvas fueron sometidas a un protocolo de elección que será explicado en la siguiente sección. Luego todas las larvas, dado que comenzaron a desechar ácido úrico, fueron colocadas en cajas de Petri de vidrio (10 x 15 cm) recubiertas con papel de filtro. Este papel se cambió diariamente hasta que los individuos empezaron a empupar y continuaron su desarrollo hasta emerger como adultos. Durante el período de pupación, las abejas no necesitaron ser alimentadas ya que contaban con sus reservas. Cabe destacar que las cajas de petri fueron inspeccionadas diariamente, retirando las larvas y pupas muertas. Así como también la sala de traslarve y todos los materiales utilizados fueron limpiados, esterilizados y/o desinfectados. Durante todo el período de cría, los individuos fueron mantenidos en una incubadora construida para este fin, con temperatura y humedad regulable. Según el protocolo en los 10 primeros días la humedad debe mantenerse en 96% mientras que en los días restantes se debe disminuir a 70% de humedad relativa. La temperatura fue constante a lo largo del desarrollo y consistió en 34°C. La sala en donde se llevó a cabo el traslarve, la

cría *in vitro* y los experimentos de elección fue mantenida en condiciones de humedad y temperatura acordes a lo descrito en el protocolo.

6.2.3 Bioensayo de conducta: protocolo de elección

Con el fin de cuantificar si se modificó el patrón de conducta de una larva alimentada con una dieta aromatizada y a la vez si se generó una preferencia por un alimento u otro, se desarrolló el siguiente protocolo de elección. Se utilizó una arena de elección, siendo la misma una caja de petri de plástico de 10 x15 cm, la cual se dividió a la mitad generando dos zonas (ver figura 6.2 B). En el extremo de una zona se colocaron 40µl de alimento aromatizado con 1-Hexanol y en el extremo de la otra con Nonanal. Al quinto día de haber realizado el traslarve, se tomó una larva (de entre 6 y 7 días de vida) y se la colocó en el centro de la arena de elección (ver figura 6.2 C). Cabe destacar que las larvas experimentales no recibieron alimento por aproximadamente 24 horas. Se evaluó la ubicación de la larva en la arena experimental luego de 1, 3 y 20 horas de haberla colocado en el centro de la misma. Si más de la mitad del cuerpo de la larva se encontraba ubicado en una de las zonas, se consideró que la larva eligió ese alimento. Una vez finalizado el experimento, las larvas fueron colocadas en cajas de petri de vidrio (10 x 15 cm) con papel de filtro ya que habían empezado a desechar ácido úrico. El desarrollo continuó en la incubadora bajo condiciones reguladas de humedad, temperatura y oscuridad hasta el momento de la emergencia como adultos.

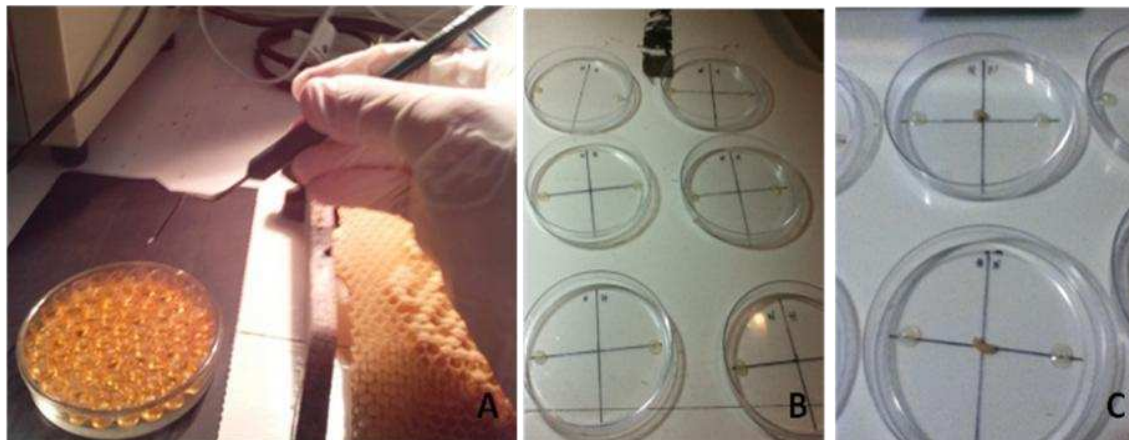


Figura 6.2: En la fotografía A se puede observar cómo se realiza un traslarve mientras que en B se observa el dispositivo experimental utilizado para el bioensayo de conducta, donde se coloca a la larva en el centro del mismo, como se puede apreciar en la fotografía C.

6.3 Análisis estadístico

El objetivo de este experimento fue analizar si las larvas modifican sus conductas debido a que fueron criadas con una dieta aromatizada, se compararon entre los grupos experimentales las proporciones de actividad locomotora cuantificadas en la arena de elección en 3 diferentes momentos desde el comienzo del experimento. Para ello se utilizó un análisis de diferencia de proporciones (prueba de Z) (Sokal 2000). Para cada tiempo se compararon las proporciones de actividad (es decir cuántas larvas del total se movilizaron hacia un sector u otro de la arena) entre los grupos experimentales (larvas alimentadas con

dietas aromatizadas o sin aromatizar). Ya que los datos han sido utilizados más de una vez, se realizó una corrección mediante el método de Bonferroni para reducir el riesgo de cometer error del tipo I, por lo tanto el valor de significancia se corrigió de la siguiente manera: $\alpha' = \alpha/k$ donde $\alpha = 0,05$ y $k=2$ (Sokal 2000). De esta manera en este caso, el nivel de significancia fue de $\alpha'=0,025$. A su vez, dado que las larvas con actividad se dirigieron hacia un sector u otro de la arena de elección, se comparó mediante un análisis de frecuencias (Chi-cuadrado) y sus posteriores contrastes de Sidak, para cada grupo experimental, la proporción de individuos que se encontraban en el sector con alimento aromatizado con el olor pre-expuesto o uno novedoso dada su experiencia olfativa previa (Sokal 2000).

6.4 Resultados

6.4.1 La actividad locomotora en larvas de abeja y su modulación producto de una experiencia olfativa.

Con el fin de evaluar si la actividad locomotora en larvas criadas *in vitro* se veía modificada por la experiencia olfativa previa, se analizaron las proporciones de actividad en diferentes períodos de tiempo. Las larvas alimentadas con una dieta aromatizada presentan mayor actividad locomotora a partir de las 3 horas de iniciado el protocolo de elección (prueba de Z, tiempo 1 hora: 1-hexanol vs sin olor: $p = 0,354$; Nonanal vs sin olor: $p = 0,025$; tiempo 3 horas: 1-hexanol vs sin olor: $p = 0,465$; Nonanal vs sin olor: $p = 0,003$; tiempo 20 horas: 1-hexanol vs sin olor: $p = 0,041$; Nonanal vs sin olor: $p = 0,011$; figura 6.1).

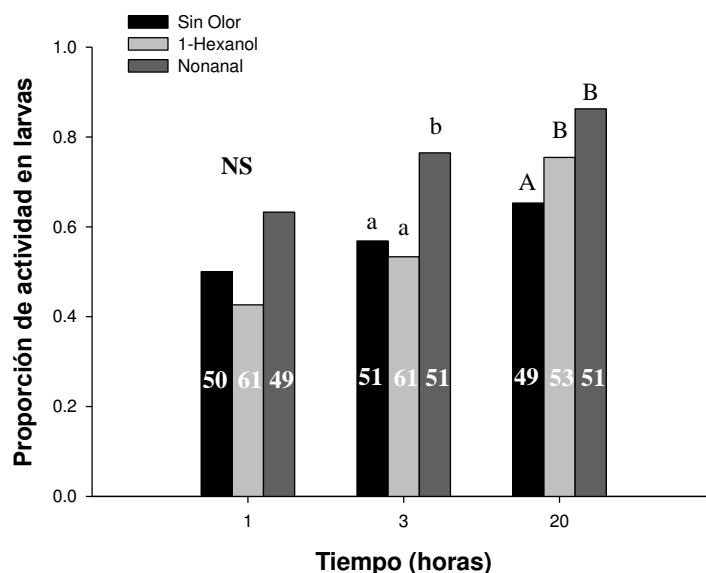


Figura 6.1: Actividad de larvas en una arena de elección. Las larvas fueron pre-expuestas con alimento aromatizado (con 1-Hexanol o Nonanal) o sin aromatizar. Se cuantificó la proporción de larvas que mostraron actividad locomotora a 1, 3 y 20 horas desde el comienzo del protocolo de elección en la arena. Las diferentes letras indican diferencias significativas en un test de diferencia de proporciones ($p < 0,05$). El número de observaciones se indica en cada barra.

6.4.2 El efecto de una experiencia olfativa sobre la elección de olores conocidos y novedosos en larvas de abeja.

Particularmente se compararon las proporciones de elección en aquellas abejas que presentaron actividad locomotora, es decir, para cada grupo experimental y para los 3 tiempos medidos se cuantificó la cantidad de larvas que se movilizaron hacia un sector u otro de la arena. Los resultados indicaron que a las 3 horas de comenzado el experimento,

las proporciones de elección difieren entre las larvas criadas *in vitro* con alimento aromatizado y sin aromatizar ($X^2=7,94$, $N=128$, $p=0,047$; Contrastes de Sidak: Sin olor vs 1-Hexanol: $p=0,016$; Sin olor vs Nonanal: $p=0,009$; 1-Hexanol vs Nonanal: $p=0,943$; figura 6.2). Sin embargo tanto para la hora y las 20 horas desde el inicio del experimento no se observaron diferencias significativas al comparar la proporciones de elección entre los grupos experimentales (1 hora: $X^2=1,50$, $N=104$, $p=0,681$; 20 horas: $X^2=1,51$, $N=165$, $p=0,678$; figura 6.2)

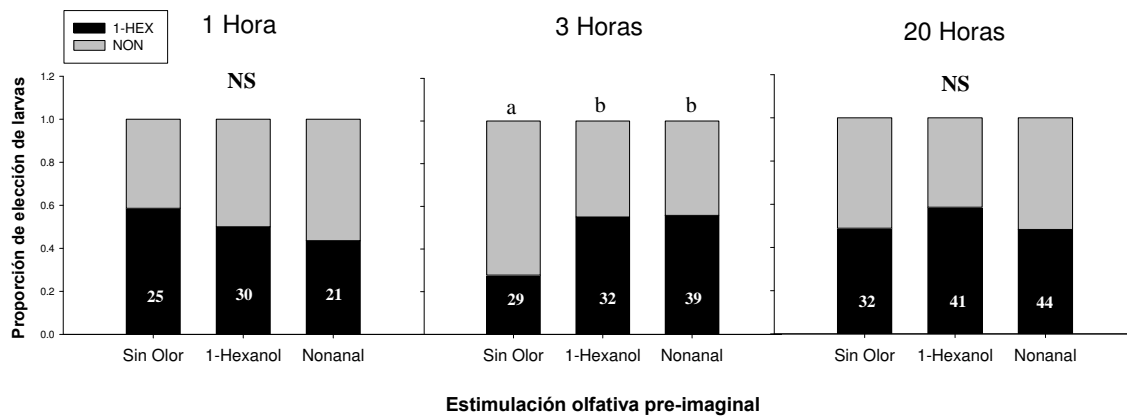


Figura 6.2: Elección entre un olor novedoso y un olor pre-expuesto en larvas activas. Las larvas fueron pre-expuestas con alimento aromatizado (con 1-Hexanol o Nonanal) o sin aromatizar. Se cuantificó la proporción de larvas activas que eligieron la sección de la arena con el olor pre-expuesto o el olor novedoso (1-Hexanol o Nonanal) a 1 hora, a 3 horas y a 20 horas desde el comienzo de la elección. Las diferentes letras indican diferencias significativas en un test de análisis de frecuencia ($p < 0.05$). El número de observaciones se indica cada barra.

6.5 Discusión

En este trabajo por primera vez se ha reportado el desarrollo de un bioensayo de conducta estandarizado para las larvas de abejas melíferas con el cual fue posible cuantificar la actividad locomotora al igual que realizar ensayos de elección entre estímulos olfativos. A diferencia de los estudios realizados en larvas de *Drosophila* que se han mencionado en la introducción de este capítulo, en las larvas de *Apis mellifera*, de organización fisiológica y morfológica similar a las de la mosca de la fruta, no se había estudiado hasta el momento ningún aspecto de su comportamiento y en particular aquel relacionado con las respuestas mediadas por un olor. Gracias al bioensayo desarrollado, se ha demostrado por primera vez que las respuestas comportamentales de las larvas de la abeja melífera pueden ser modificadas producto de la experiencia previa. Basándonos en los protocolos de elección y considerando que el alimento aromatizado tiene la potencialidad de generar aprendizajes olfativos asociativos, se evaluó la elección de la larva. En primera instancia se cuantificó la actividad locomotora de la misma. Los resultados indican que aquellas larvas a las que se les ha brindado alimento aromatizado, presentan mayor actividad luego de 3 horas de haber iniciado el protocolo de elección. Esto nos sugiere que las larvas con experiencias olfativas se encuentran más activas, es decir con mayor movimiento dentro de la arena experimental. En esta dirección es válido preguntarse si aquellas larvas con mayor actividad locomotora evidencian preferencias a la hora de elegir entre un alimento con un aroma conocido o con uno novedoso. Los resultados no reflejan una clara preferencia hacia el olor conocido, sin embargo la proporción de larvas con experiencias olfativas previas que eligieron un olor u otro difiere de la proporción de elección en larvas sin estas experiencias. En conclusión, las

preferencias innatas se ven modificadas, producto de una experiencia olfativa previa. Es importante en este punto remarcar que las respuestas de locomoción y por ende de elección, se realizaron horas después de la estimulación con alimento aromatizado. Por lo tanto, las modificaciones en estas variables, producto de la experiencia previa, reflejan una respuesta comportamental de largo término.

Lamentablemente no fue posible mediante el protocolo utilizado evidenciar la capacidad de las larvas de abejas melíferas de aprender asociativamente, si bien las evidencias expuestas con anterioridad en esta tesis indican que en el período larval se conforman memorias asociativas que pueden evocarse en los primeros días de vida adulta. Posiblemente debería reverse el diseño experimental así como también la presentación de la estimulación olfativa. Lo que resulta interesante y relevante dado que es la primera aproximación al estudio del comportamiento de la larva de *Apis mellifera*, es la capacidad de las larvas para aumentar su actividad locomotora luego de un estimulación olfativa en búsqueda del alimento o bien en dirección a un estímulo olfativo independientemente de si se trata de un estímulo pre-expuesto o de otro novedoso. Se sabe por trabajos realizados en larvas de *Drosophila* que estos animales tiene la capacidad de reconocer olores y que presentan una preferencia por algunos estímulos olfativos respecto de otros, sin embargo esta preferencia es dependiente de la concentración en la que se encuentra el olor (Boyle y Cobb 2005). Las larvas pueden comportarse indiferencialmente, pueden ser atraídas o bien pueden ser repelidas por el estímulo olfativo conforme incrementa su concentración. Sin embargo, el hecho de que puedan detectar un olor, no aborda la cuestión de si pueden distinguirlo de otro (Gerber y Stocker 2007). Si las larvas muestran una preferencia relativa por un olor

sobre otro, con los protocolos utilizados hasta el momento no es posible deducir una discriminación entre estímulos (Gerber y Stocker 2007). Esto es debido a que ambos olores pueden activar el mismo conjunto de neuronas receptoras olfativas, aunque en un grado diferente ya que difieren por ejemplo, en su presión de vapor o en la afinidad para los receptores olfativos (Gerber y Stocker 2007). Por lo tanto, a pesar de evidenciarse efectos tanto de atracción como repulsión, producidos por la exposición a un olor, no se han abordado a conclusiones certeras sobre la naturaleza de los efectos mencionados (Gerber y Stocker 2007). Hecho que podría ocurrir también en las larvas de abejas melíferas por lo que primordialmente se debería ahondar en el diseño de protocolos que permitan comprender a nivel fisiológico la atracción o repulsión hacia diferentes estímulos olfativos.

7

7. CONCLUSIONES GENERALES

La abeja *Apis mellifera* es un modelo experimental muy utilizado en estudios relacionados con el aprendizaje y la memoria (von Frisch, 1967; Menzel 1999, 2012; Giurfa, 2004); no sólo por sus habilidades para aprender y memorizar, sino también porque es factible acceder a su sistema nervioso con el fin de correlacionar sus cambios con variables comportamentales. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre el aprendizaje asociativo pre-imaginal en abejas melíferas y la posible retención de las memorias que se formen durante esas etapas, en estadios post-metamórficos es decir en la etapa adulta. Es por ello que a lo largo de esta tesis se focalizó en tratar de dilucidar si las larvas de *Apis mellifera* pueden establecer memorias asociativas del tipo olfativa que perduren en estadios adultos, donde la casta obrera desarrolla tareas de mantenimiento, cuidado y obtención de recursos que son indispensables para la supervivencia y crecimiento de las sociedades de abejas.

En primer lugar, se evaluó la respuesta de las abejas adultas jóvenes hacia los olores asociados con el alimento ofrecido durante su desarrollo larval. Se evidenció que las abejas con experiencias olfativas pre-imaginales presentan un mayor porcentaje de respuesta al

olor pre-expuesto durante sus estadios larvales en comparación a las abejas sin experiencias previas (Capítulo 2). Por lo tanto, los resultados mostraron por primera vez, la capacidad de las abejas para retener información relacionada con el recurso y evocarla incluso luego de la metamorfosis, proceso en el cual se reorganiza gran parte del sistema nervioso entre otros grandes cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el organismo. Esta capacidad afecta, al menos a los pocos días de la emergencia como adultos, las respuestas conductuales como así también la capacidad de aprendizaje de las abejas con experiencias olfativas pre-imaginales. Sin embargo, estas respuestas no son específicas para el olor pre-expuesto, observación que lleva a la hipótesis de que las abejas con información adquirida en estadios pre-imaginales, utilizan el conocido proceso de generalización olfativa al momento de realizar la evocación de dicha información en estadios juveniles. Es por ello que esta hipótesis se puso a prueba en el Capítulo 3, visualizándose efectivamente que la información olfativa presente en el alimento ofrecido a los individuos en estadios larvales permiten establecer memorias asociativas entre el olor y la recompensa. Sumado a que aquellos estímulos olfativos que se muestran como similares desde el punto de vista químico, desencadenan respuestas apetitivas en los adultos durante su primera semana de vida. Estas memorias asociativas parecen extinguirse tanto en el contexto de cría bajo condiciones controladas de laboratorio como dentro de la colmena al alcanzar las edades recolectoras (más de 17 días de vida). ¿Cuál es entonces la implicancia del establecimiento de estas memorias cuando los individuos son funcionales dentro de la colmena pero aun no desarrollan tareas recolectoras? Las experiencias pre-imaginales permitirían entonces evaluar la información proveniente del alimento en edades pre recolectoras afectando las

respuestas conductuales y la capacidad de aprendizaje de estos individuos hacia estímulos olfativos conocidos o novedosos que estén circulando en la colonia. ¿Cómo es posible que una memoria del tipo olfativa sea retenida luego de que el sistema nervioso sufra profundos cambios durante su desarrollo involucrando tanto procesos de muerte celular como de neurogenesis? Para tratar de responder esta pregunta, en los capítulos 4 y 5 se hizo hincapié en aproximaciones neurobiológicas que involucraron estudios desde biología sensorial, el análisis de la expresión de genes vinculados a la plasticidad sináptica hasta estudios de neuroanatomía descriptos a continuación en el Anexo. En lo que respecta a la biología sensorial, en el capítulo 4 se pudo observar que las experiencias olfativas pre-imaginales alteran negativamente la sensibilidad olfativa periférica, sugiriendo que la relación entre el aprendizaje olfativo y la periferia sensorial estaría provocando cambios a largo término que ocurren incluso luego de un proceso abrupto como la metamorfosis. Sin embargo, la cantidad de sensilias olfativas que albergan a estos receptores olfativos no se ve alterada luego de una experiencia olfativa pre-imaginal. En cuanto a la expresión de genes que codifican proteínas pre y post-sinápticas involucradas en la formación de sinapsis, aunque las diferencias no sean estadísticamente contundentes, se evidencia una tendencia a incrementar la expresión de algunos de estos genes luego de que los individuos hayan sido expuestos a experiencias olfativas pre-imaginales. Finalmente es importante destacar como se evidenció en el capítulo 6, la puesta a punto de la primera aproximación experimental para evaluar la respuesta de orientación mediada por claves olfativas en larvas de abejas melíferas, siendo este procedimiento promisorio para el estudio de fenómenos cognitivos durante este estadio.

Por último, las conclusiones a las que se han arribado en el presente trabajo, abren las puertas para continuar y profundizar con el estudio del efecto de las experiencias vividas durante el desarrollo sobre la fisiología y el comportamiento en etapas adultas. Siendo más interesante aun estos estudios en animales como la abeja melífera que sufren procesos de grandes reestructuraciones a nivel central y periférico durante su desarrollo desde el huevo hasta el adulto, por lo que poder dilucidar en dónde subyacen las variaciones producto de las experiencias olfativas tempranas es un objetivo que no puede dejar de abordarse.

Anexo

ANÁLISIS NEUROANATÓMICOS EN ABEJAS CON O SIN EXPERIENCIAS PRE-IMAGINALES

El sistema nervioso es el encargado de comandar y controlar el comportamiento. Existen numerosas evidencias en diferentes modelos animales que sugieren que los comportamientos complejos se correlacionan con la composición del cerebro o con alguna de sus estructuras (Gronenberg y Couvillon 2010). En general es más factible encontrar ejemplos en modelos vertebrados sobre la correlación entre la composición y el tamaño del cerebro con el comportamiento. Sin embargo, se ha utilizado a la abeja melífera como modelo de estudio para dilucidar estas problemáticas. El trabajo de Gronenberg y Couvillon se ha focalizado en correlacionar la plasticidad neural con los procesos de aprendizaje olfativo. Los autores encontraron una correlación positiva entre el volumen total del cerebro y de los cuerpos pedunculados (las estructuras involucradas en el aprendizaje y memoria) con el rendimiento en el aprendizaje en abejas africanizadas adultas (actual línea genética derivada de la introducida en Brasil hace más de 50 años). Es decir que aquellas abejas con mejores capacidades para aprender, son las que presentan un cerebro de mayor tamaño y en particular sus cuerpos pedunculados presentan mayor volumen comparados

con las abejas que no aprendieron en un protocolo de condicionamiento olfativo (Gronenberg y Couvillon 2010). Se ha corroborado también en base a otras investigaciones, que las abejas presentan una plasticidad en el tamaño del cerebro y sus componentes conforme despliegan diferentes comportamientos, dado que están sujetas a distintas experiencias sensoriales. En este contexto, Arenas y colaboradores (2012) demostraron que las experiencias olfativas tempranas, durante edades pre-recolectoras, promueven cambios específicos en los tamaños de los glomérulos que han sido activados tempranamente (Arenas et al. 2012). Sin embargo hasta el momento no se ha evidenciado si las experiencias sensoriales del tipo olfativas que ocurren durante el desarrollo larval de la abeja melífera influyen en la plasticidad del cerebro y sus estructuras. El objetivo de este anexo es evaluar la existencia de variaciones cuantitativas en la morfología del cerebro y sus componentes luego de que las abejas fueran expuestas a experiencias olfativas pre-imaginales.

Procedimiento experimental

El objetivo de este experimento fue evaluar los efectos producidos por una alimentación diferencial durante el desarrollo larval de las abejas sobre el sistema nervioso central. Para ello se alimentaron 2 colmenas ubicadas en el campo experimental con solución azucarada aromatizada o sin aromatizar mediante el uso de un alimentador artificial ubicado en el interior de las mismas. Los alimentos ofrecidos fueron soluciones azucaradas (50% p/p) sin aromatizar (Sin olor) o aromatizada con 1-Hexanol (1-Hexanol, 100µl/L). El procedimiento con el cual las colmenas fueron alimentadas así como la elección de las abejas

experimentales, fue ya descrito en la sección 2.1. Una vez que las abejas emergieron como adultos, fueron mantenidas bajo condiciones reguladas de laboratorio (32 °C, 55% HR y oscuridad) y entre los 3-7 días de edad fueron utilizadas para diseccionar sus cerebros. Los cerebros fueron utilizados para cuantificar los volúmenes de las diferentes estructuras cerebrales

Cuantificación de los volúmenes de diferentes estructuras cerebrales

Con el objetivo de evaluar si se evidenciaron cambios anatómicos-estructurales en el cerebro de las abejas producto de sus experiencias olfativas pre-imaginales, los cerebros de abejas alimentadas durante su desarrollo larval con alimento aromatizado o sin aromatizar fueron diseccionados y sujetos a un protocolo de histología básica que se detalla a continuación. Los cerebros de las abejas experimentales de entre 3 y 7 días de edad fueron diseccionados en solución salina y bajo lupa. Para ello en primera instancia, se separó la cabeza del resto del cuerpo en cada abeja con la ayuda de una tijera para disección y luego mediante la utilización de unas pinzas se logró separar las piezas bucales permitiendo así que el líquido fijador (4% de formaldehído en solución buffer) penetre. Esta parte del protocolo fue realizada en Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Luego, en colaboración con el doctor Wulfila Gronenberg de la División de Neurobiología de los Laboratorios de Investigación de la Universidad de Arizona, Estados Unidos, se continuó con el protocolo. Las cabezas fijadas fueron incrustadas en una mezcla de cera de abeja y resina la cual se derritió con un microcauterio, una vez solidificada la mezcla se procedió a cortar con bisturí la cutícula de

la cabeza inmovilizada. Una vez expuesto el cerebro y demás órganos encefálicos, se embebió la preparación en solución salina y bajo lupa mediante el uso de bisturí y pinzas se separó el cerebro de la cabeza. Las glándulas y tejido conectivo fueron removidos. Los cerebros fueron mantenidos en agua por un par de horas. Luego fueron colocados en tetróxido de osmio al 1% frío y mantenidos por 3 horas en la heladera. Para finalizar con el proceso de tinción, los cerebros embebidos en tetróxido de osmio fueron colocados en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente y en un mezclador por el término de una hora. Posteriormente los cerebros fueron lavados con agua dos veces y se los dejó por 2 horas a temperatura ambiente en el mezclador. Los siguientes pasos se llevaron a cabo para poder colocar los cerebros en una solución (Spurr's) que una vez solidificada permitió cortarlos en secciones utilizando un micrótomo: se deshidrataron los cerebros en alcohol 50% durante 10 minutos y luego para finalizar el proceso de deshidratación se los colocó en dimetilpropano acidificado por 15 minutos. Inmediatamente se pasó los cerebros a una solución de acetona 100% (dos veces, 10 minutos cada vez), luego se los colocó en una solución 30% de acetona y 70% de solución Spurr's por más de 12 horas. Finalmente los cerebros fueron colocados en 100% solución Spurr's por 8 horas. Una vez finalizado este proceso los cerebros con la solución Spurr's fueron colocados en cápsulas de plástico específicas y se los llevaron a una estufa a 70°C donde la solución Spurr's polimerizó y al cabo de 12 horas los cerebros quedaron así incrustados en un bloque. Luego las cápsulas plásticas fueron removidas y el bloque de cerebro incrustado en solución Spurr's fue cortado en secciones de 15 µm. Los cortes fueron montados en un portaobjeto, embebidos con medio de montaje y cubiertos con un cubre-objeto (ver figura A.1 A). Luego bajo

microscopio óptico se visualizaron los cortes y se fotografió cada dos secciones una mitad del cerebro observado a 100X (ver figura A.1 B). De esta manera se obtuvieron por cerebro alrededor de 30 fotografías que fueron procesadas utilizando Photoshop®. Se cuantificó así el volumen de las diferentes estructuras cerebrales a partir de la sumatoria de píxeles calculados para cada una de las secciones coloreadas diferencialmente (ver figura A.1 C). La cantidad de pixels fue convertida en unidades de superficie (considerando una escala de 500µm a la cual se calculó la cantidad de píxeles incluidos en esa longitud con 1 pixel de grosor) que multiplicada por la profundidad de la sección dio el valor de volumen (mm³) correspondiente. Los volúmenes de cada estructura cerebral analizada corresponden a un total de 12 cerebros que pudieron ser cuantificados utilizando la técnica descrita anteriormente.

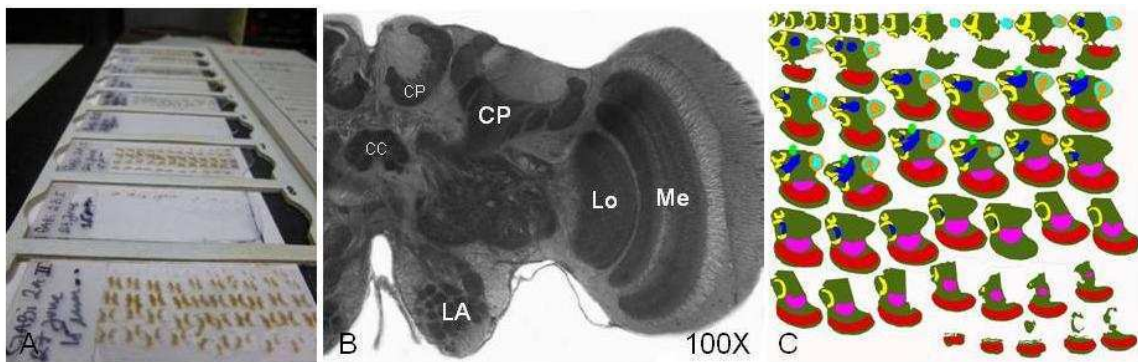


Figura A.1: Cortes histológicos de los cerebros de abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales. Los cortes fueron montados en portaobjetos (A) y las secciones de cerebros fueron analizadas bajo microscopio óptico con aumento del 100X, las estructuras se pueden visualizar en la foto (B) y corresponden al Lóbulo Antenal (LA), los Cuerpos Pedunculados (CP), la Lóbula (Lo) y Médula (Me). Cada fotografía fue procesada mediante Photoshop®, las estructuras fueron coloreadas diferencialmente (C) y los píxeles cuantificados fueron reconvertidos a unidades de volumen (mm³).

¿Se observan cambios estructurales en el cerebro de la abeja adulta luego de las experiencias pre-imaginales?

Con el fin de responder a esta pregunta, se planteo comparar los volúmenes de las distintas estructuras cerebrales en los cerebros de abejas con o sin experiencias olfativas pre-imaginales. Para ello los volúmenes de cada estructura fueron analizados mediante un Anova de un factor. En ninguna de las comparaciones realizadas se evidenciaron diferencias significativas (ver figura A.2). Del lóbulo óptico se midió el volumen de la Médula y Lóbula separadamente, al comparar entre los cerebros de abejas con y sin experiencia olfativa pre-imaginal, el ANOVA de un factor no reveló diferencias significativas (Médula: $F_{1, 11}=2,59$, $p=0,138$; Lóbula: $F_{1, 11}=0,012$, $p=0,916$). La comparación de los volúmenes de los Cuerpos Pedunculados (CP) tampoco mostró diferencias significativas ($F_{1, 11}=2,29$, $p=0,160$) al igual que cuando se compararon los Lóbulos Antenales (LA), el Cuerpo Central (CC) y la totalidad del cerebro ($F_{1, 11}=0,31$, $p=0,585$, $F_{1, 11}=0,02$, $p=0,885$, $F_{1, 11}=0,14$, $p=0,708$, respectivamente).

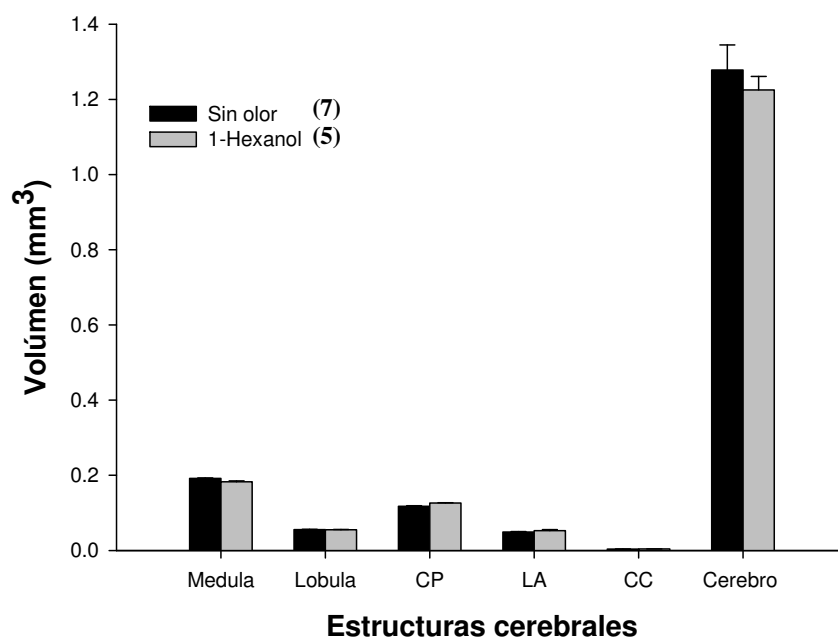


Figura A.2: Volumen absoluto de los componentes cerebrales de abejas con experiencias olfativas pre-imaginales. Los cerebros analizados pertenecen a abejas que tuvieron experiencias olfativas pre-imaginales con solución aromatizada con 1-hexanol (barras grises, 5 cerebros) o sin aromatizar (barras negras, 7 cerebros). No se observaron diferencias estadísticas en un test de Anova de un factor. Los volúmenes medidos corresponden a la Medula y Lóbula de los lóbulos ópticos, los Cuerpos Pedunculados (CP), los Lóbulos Antenales (LA), el Cuerpo Central (CC) y a la totalidad del Cerebro.

Durante el desarrollo de un insecto holometábolo, se experimenta una extensa neurogénesis así como también se evidencia muerte celular en los cerebros de estos insectos. Por ejemplo es el caso de las estructuras sensoriales externas de la cabeza, como las antenas, los ojos y los neuropilos asociados, las cuales se forman durante los estadios larvales y pupales (Farris et al. 1999). Estos mismos autores han estudiado en la abeja el desarrollo de los cuerpos pedunculados, dada su relevancia en los procesos de aprendizaje y memoria. Los resultados obtenidos mostraron que inmediatamente antes de la pupación, el cerebro de la abeja en desarrollo contiene aproximadamente 2000 neuroblastos (células precursoras neuronales)

que están involucrados en la producción de las células de los cuerpos pedunculados (las células Keynon). Los investigadores concluyeron que los cuerpos pedunculados se desarrollan en dos semanas comenzando a partir de los neuroblastos de la larva y completando su desarrollo hacia la mitad del estadio pupal (Farris et al. 1999). Por lo tanto, los procesos de neurogenesis durante las etapas pre-imaginales son necesarios para el correcto desarrollo de las estructuras cerebrales presentes en el adulto. Dadas estas evidencias sumado a la plasticidad de las estructuras cerebrales producto de las experiencias vividas a lo largo de la vida de la abeja, se propuso la posibilidad de encontrar diferencias en cuanto al tamaño del cerebro y sus componentes en función de las experiencias pre-imaginales a las que fueron sujetas las abejas en desarrollo. Hasta al momento y en base a lo que fue posible analizar, las experiencias olfativas durante el desarrollo larval de la abeja no estarían influyendo sobre la neurogenesis de las estructuras cerebrales. Sin embargo, cabe destacar que posiblemente debido al bajo tamaño muestral, no se han evidenciado diferencias con respecto a las modificaciones anatómicas del cerebro de las abejas con experiencias olfativas pre-imaginales, hecho que podría revertirse si se incrementara la cantidad de cerebros a analizar. La mayor parte de este experimento se realizó en la Universidad de Tucson, Estados Unidos, donde lamentablemente no fue posible concluir con los cortes histológicos como así tampoco fue posible continuar una vez en la Argentina dado que los dispositivos disponibles no eran compatibles con las muestras obtenidas. Es por ello y dado estos inconvenientes técnicos que la cantidad de cerebros analizados no es la óptima para obtener una conclusión certera y fehaciente.

8. BIBLIOGRAFIA

Arenas A. (2010) Tesis Doctoral: Aprendizaje olfativo temprano en la abeja (*Apis mellifera*) y su rol en la toma de decisiones relacionadas con la obtención de recursos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Arenas A. y Farina W. F. (2008) Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *J. Comp. Physiol. A* 194:629–640

Arenas A., Fernández V. M. y Farina W. M. (2009b) Associative learning during early adulthood enhances later memory retention in honeybees. *PLoS ONE* 4: e8046

Arenas A., Fernández V. M., Farina W. M. (2007) Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissens.* 94: 218–222

Arenas A., Giurfa M., Farina W. M., Sandoz J. C. (2009a) Early olfactory experience modifies neural activity in the antennal lobe of a social insect at the adult stage. *Eur. J. Neurosci.* 30: 1498-1508

Arenas A., Giurfa M., Sandoz J. C., Hourcade B., Devaud J. M., Farina W. M. (2012) Early olfactory experience induces structural changes in the primary olfactory center of an insect brain. *Eur. J. Neurosc.* 35: 682-690, doi:10.1111/j.1460-9568.2012.07999.x

Behrends A. y Scheiner R. (2009) Evidence for associative learning in newly emerged honey bees (*Apis mellifera*). *Anim. Cogn.* DOI 10.1007/s10071-008-0187-7

Bibliografía

- Bhagavan S. y Smith B. H. (1997) Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity. *Physiol. and Behav.* 61 (1): 107-117
- Biswas S., Reinhard J., Oakeshott J., Russell R., Srinivasan M. V.I (2010) Sensory regulation of neuropeptides and neurexin I in the honeybee brain. *PLoS One* 5(2):e9133
- Biswas S., Russell R. J., Jackson C. J., Vidovic M. y Ganeshina O. (2008) Bridging the synaptic gap: neuropeptides and neurexin I in *Apis mellifera*. *PLoS One* 3(10):e3542
- Bitterman M. E., Menzel R., Fietz A. y Schäfer S. (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97: 107-119
- Blackiston D. J., Silva Casey E., Weiss M. R. (2008) Retention of memory through metamorphosis: can a moth remember what it learned as a caterpillar? *PLoS ONE* 3(3): e1736. doi:10.1371/journal.pone.0001736
- Bouton y M. E y Moody W. E (2004) Memory processes in classical conditioning. *Neurosc. and Biobehav. Reviews* 28 663-674
- Boyle J. y Cobb M. (2005) Olfactory coding in *Drosophila* larvae investigated by cross-adaptation. *J. Exp. Biol.* 208(18): 3483-3491.
- Brainard M. S. y Doupe A. J. (2002) What songbirds teach us about learning. *Nature* 417(6886): 351-358
- Brandon J. G. y Coss R. G. (1982) Rapid dendritic spine stem shortening during one-trial learning: The Honeybee's first orientation flight. *Brain Research* 252 (1): 51-61
- Brown S. M., Napper R. M. y Mercer A. R. (2004) Foraging experience, glomerulus volume and synapse number: a stereological study of the honey bee antennal lobe. *J. Neurobiol.* 60: 40-50
- Brown S. M., Napper R. M. y Mercerl A. R. (2000) Analysis of structural plasticity in the honey bee brain using the Cavalieri estimator of volume and the dissector method. *Image Anal. Stereol.* 19:139-144
- Bruel-Jungerman E., Davis S. y Laroche S. (2007) Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist* 13(5):492–505

Bibliografía

Carew T. J. (2000) Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior. Sinauer Associates, Inc. Publishers

Carlsson M. A., Galizia C. G. y Hansson B. S. (2002) Spatial representation of odours in the antennal lobe of the moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Senses. 27: 231-244

Chapman R. F. (1998). The Insects: Structure and Function. B y R.F. Chapman 770 pp. Cambridge University Press.

Chapman R. F. (2002) Development of phenotypic differences in sensillum populations on the antennae of a grasshopper, *Schistocerca americana*. J. Morphol. 254:186–194

Chapman R. F. y Lee J. C. (1991) Environmental effects on numbers of peripheral chemoreceptors on the antennae of a grasshopper. Chem Senses 16:607–616

Chittka L., Thomson J. D. y Waser N. M. (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. Naturwissen. 86:361–377

Claudianos C., Lim J., Young M., Yan S., Cristino A. S., Newcomb R. D., Gunasekaran N. y Reinhard J. (2014) Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery Euro. J. Neurosc. 1–13.

Collins A. M., Williams V. y Evans J. D. (2004) Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. Insect Mol. Biol. 13(2): 141–146

Cornwell-Jones C. A., Velasquez P., Wright E. L. y McGaugh J. L (1988) Early experience influences adult retention of aversively motivated tasks in normal, but not DSP4-treated rats. Dev. Psychobiol. 21: 177–185

Crailsheim K. (1998) Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). Apidologie 29: 97-112

Crailsheim K., Schneider L. H. W., Hrasnigg N., Bühlmann G., Brosch U., Gmeinbauer R. y Schöffmann B. (1992) Pollen consumption and utilization in worker honey bees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. J. Insect. Physiol. 38: 409-419

Bibliografía

Cramer C. P., Pfister J. P. y Haig K. (1988) Experience during suckling alters later spatial learning. *Dev. Psychobiol.* 21: 1-24

Daly K. C., Durtschi M. L. y Smith B. H. (2001) Olfactory-based discrimination in the moth, *Manduca sexta*. *J. Insect. Physiol.* 47:375-384

Davis R. K., Cherry J., Dauwalder B., Han P. L. y Skoulakis E. (1995) The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Molecular and Cellular Biochemistry* 149-150, 271-278

Davis, R. L. (1993) Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* 11 (1): 1-14

De Belle J. S. y Heisenberg M. (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263: 692-695

De Jong R. y Pham-Delègue M. H. (1991) Electroantennogram responses related to olfactory conditioning in the honey bee (*Apis mellifera* Ligustica). *J. Insect. Physiol.* 37(4): 319-324

DeGrandi-Hoffman y Hagler (2000) The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Soc.* 47: 302-306

Devaud J. M. y Masson C. (1999) Dendritic pattern development of the honeybee antennal lobe neurons: a laser scanning confocal microscopic study. *J. Neurobiol.* 39: 461-474

Devaud J. M., Acebes A., Ramaswami M. y Ferr's A. (2003) Structural and functional changes in the olfactory pathway of adult *Drosophila* take place at a critical age. *Inc. J. Neurobiol.* 56: 13-23

Durst C., Eichmuller S. y Menzel R. (1994) Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honey bee mushroom body. *Behav. and Neural Biol.* 62: 259-263

Erber J., Masuhr T. y Menzel R. (1980) Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* 5: 343-358

Fahrbach S. E. y Robinson G. E. (1996) Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Developm. Neurosc.* 18(1-2): 102-114

Bibliografía

Fahrbach S. E., Moore D., Capaldi E. A., Farris S. M. y Robinson G. E. (1998) Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learn. Mem.* 5: 115-123

Farbman A. I. (1994) Developmental biology of olfactory sensory neurons. In *Seminars in cell biology* 5: 3-10. Academic Press.

Farina W. M., Grüter C. y Diaz P. C. (2005) Social learning of floral odours within the honeybee hive. *Proc. R. Soc. B* 272: 1923-1928

Farooqui T., Robinson K., Vaessin H. y Smith B. H. (2003) Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J. Neurosc.* 23: 5370-5380

Farris S. M., Robinson G. E. y Fahrbach S.E. (2001) Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *J. Neurosc.* 21(16): 6395-6404

Farris S. M., Robinson G. E., Davis R. L. y Fahrbach S. E. (1999) Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 414:97-113

Fishilevich E., Domingos A. I., Asahina K., Naef F., Vosshall L. B., y Louis M. (2005) Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15: 2086-2096

Free J. B. (1967a) Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Anim. Behav.* 15: 134-144

Free J. B. (1979) Managing honeybee colonies to enhance the pollen-gathering stimulus from brood pheromones. *Appl. Anim. Ethol.* 5: 173-178

Friedrich R. W. y Korsching S. I. (1997) Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18: 737-752

Frings H (1944) The loci of olfactory end-organs in the honeybee *Apis mellifera* Linn. *J. Exp. Zoo.* 97: 123-134

Bibliografía

Galizia C. G., McIlwrath S. L. y Menzel R. (1999a) A digital three-dimensional atlas of the honeybee AL based on optical sections acquired using confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 295: 383–394

Galizia C. G., Nägler K., Hölldobler B. y Menzel R. (1998) Odour coding is bilaterally symmetrical in the AL of honeybees (*Apis mellifera*). *Eur. J. Neurosci.* 10, 2964–2974

Galizia C. G., Sachse S., Rappert A. y Menzel, R. (1999b) The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat. Neurosci.*, 2, 473-478

Gandolfi M., Mattiacci L. y Dorn S. (2003) Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 2623–2629

Gascuel J. y Masson C. (1991) Developmental study of afferented and deafferented bee antennal lobes. *J. Neurobiol.* 22: 795-810

Gerber B y Stocker R. F. (2007) The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chem. Senses* 32: 65–89

Gerber B. y Hendel T. (2006) Outcome expectations drive learned behaviour in larval *Drosophila*. *Proc. R. Soc. B* 273: 2965-2968

Gerber B., Tanimoto H. y Heisenberg M. (2004) An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14: 737-744

Giurfa M. (2003) Cognitive neurothology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr. Opinion Neurobiol.* 13, 726-735

Giurfa M. (2004) Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissen.* 91(5), 228-231

Goodman L. (2003) *Form and Function in the Honey Bee*. Westdale Press, Cardiff.

Gramacho K. P. y Spivak M. (2003) Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 54:472–479

Bibliografía

Gramacho P. K., Gonçalves S. L., Stort A. C. y Noronha B. A. (2003) Is the number of antennal plate organs (sensilla placodea) greater in hygienic than in non-hygienic Africanized honey bees?. *Genetic and Mol. Research* 2 (3): 309-316

Greenwood M. y Chapman R. F. (1984) Differences in numbers of sensilla on the antennae of solitary and gregarious *Locusta migratoria* L.(Orthoptera: Acrididae). *Intern. J. Insect Morphol. and Embryol.* 13(4): 295-301

Groh C. y Rössler W. (2008) Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. *Arthropod Struct. and Developm.* 37:459-468

Groh C., Ahrens D. y Rössler W. (2006) Environment- and Age-Dependent Plasticity of Synaptic Complexes in the Mushroom Bodies of Honeybee Queens. *Brain Behav. Evol.* 68: 1–14

Gronenberg W. y Couvillon M. J. (2010) Brain composition and olfactory learning in honey bees. *Neurobiol. of Learn. and Mem.* 93: 435–443

Gronenberg W., Heeren S. y Hölldobler B. (1996) Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Exp. Biol.* 199: 2011-2019

Grüter C., Acosta L. E. y Farina W. M. (2006) Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60: 707-715

Grüter C. y Farina W. M. (2009a) The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends Ecol. Evol.* 24(5): 242–247

Gschanes A., Eggenreich U., Windisch M. y Crailsheim K. (1998) Early postnatal stimulation influences passive avoidance behaviour of adult rats. *Behav. Brain Res.* 93: 91-98

Guerrieri F., Schubert M., Sandoz J. C. y Giurfa M. (2005) Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol.* 3, e60

Hall M. y Holliday T. (Eds.) (1998) *Behaviour and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin.

Hammer M. (1997) The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci.* 20:245-252

Bibliografía

Hammer M. y Menzel R. (1995) Learning and Memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15, 1617-1630

Heifetz Y. y Applebaum S. W. (1995) Density-dependent physiological phase in a non-migratory grasshopper *Aiolopus thalassinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77(3): 251-262

Heisenberg M., Heusipp M. y Wanke C. (1995) Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* 15:1951–1960

Hendel T. (2005) The carrot, not the stick: appetitive rather than aversive gustatory stimuli support associative olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *J. Comp. Physiol. A.* 191: 265–279

Hildebrand J. G. y Shepherd G. M. (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla. *Annu. Rev. Neurosci.*, 20: 595-631

Hourcade B., Perisse E., Devaud J. M., Sandoz J. C. (2009) Long-term memory shapes the primary olfactory center of an insect brain. *Learn. Mem.* 16(10):607–615

Isingrini M., Lenoir A. y Jaisson P. (1985) Preimaginal learning as a basis of colony-brood recognition in the ant *Cataglyphis cursor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8545-8547

Joerges J., Küttner A., Galizia C. G. y Menzel R. (1997) Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387: 285–288

Kaftanoglu O., Linksvayer T. A., Page R. E. Jr. (2011) Rearing honey bees, *Apis mellifera*, *in vitro* I: Effects of sugar concentrations on survival and development. *J. Insect Scienc.* 11: 1-10

Kaissling K. E. (1974) Sensory Transduction in Insect Olfactory Receptors. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie. Biochemistry of Sensory Functions. L. Jaenicke (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 243-273.

Kaissling K. E. y Renner M. (1968) Antennale Rezeptoren für Queen Substance und Sterzelduft bei der Honigbiene. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 59: 357-361

Kandel E. R., Schwartz J. H. y Jessell T. M. (Eds.) (1992) Principles of neural science. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier.

Bibliografía

- Kreher S. A., Kwon J. Y., y Carlson J. R. (2005) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva. *Neuron* 46: 445–456
- Kuwabara M. (1957) Bildung des bedingten reflexes van Pavlovs typus bei der honigbiene, *Apis mellifica*. *Hokkaido Univ. Zool. J. Fac. Sci.* 16:458-464
- Laloi D. y Pham-Delègue M. H. (2004) Bumble bees show asymmetrical discrimination between two odors in a classical conditioning procedure. *J. Insect. Behav.* 17 (3): 385-396
- Larsson M. C., Domingos A. I., Jones W. D., Chiappe M. E., Amrein H. y Vosshall L. B. (2004) *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43: 703-714
- Le Conte Y., Mohammedi A. y Robinson G. E. (2001) Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 268:163-168
- Lerner R. L., Gyorgy T. K., Reagan J., Roby-Shemkovitz A., Rybcynski R. y Vogt R. G. (1990) Peripheral events in moth olfaction. *Chem. Senses* 15: 191-198
- Lindauer M. (1952) Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z vergl. Physiol.*, 34: 299-345
- Logan F. A. (1960) *Incentive*. New Haven, CT: Yale University.
- Lorenz K. (1935) Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. *Zeitschrift für Ornithologie.* 83: 137-213, 289-413
- Lunney G. H. (1970) Using analysis of variance with a dichotomous dependent variable: an empirical study. *J. Educ. Meas.* 7:263–269
- Mackintosh N. J. (1994) *Animal learning and cognition*. Academic Press, London, UK.
- Maleszka J., Barron A. B., Helliwell P. G. y Maleszka R. (2009) Effect of age, behaviour and social environment on honey bee brain plasticity. *J. Comp. Physiol. A*, 1-8.
- Maleszka R. y Helliwell P. (2001) Effect of juvenile hormone on short-term olfactory memory in young honeybees (*Apis mellifera*) *Hormones and Behav.* 40: 403-408

Bibliografía

Malun D., Oland L. A. y Tolbert L. P. (1994) Uniglomerular projection neurons participate in early development of olfactory glomeruli in the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 350: 1-22

Martínez-Harms J., Márquez N., Menzel R. y M. Vorobyev (2014) Visual generalization in honeybees: evidence of peak shift in color discrimination. *J. Comp. Physiol. A* 200: 317-325

Masson C. y Arnold G. (1984) Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the worker bee. *J. Insect Physiol.* 30: 7-14

Masson C. y Arnold G. (1987) Organization and plasticity of the olfactory system of the honeybee, *Apis mellifera*. En: Menzel R, Mercer A, editors. *Neurobiology and Behavior of Honeybee*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 280-295

Masson C., Mustaparta H. (1990) Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiol. Rev.* 70: 199-245

Masson C., Pham-Delègue M. H., Fonta C., Gascuel J., Arnold G., Nicolas G. y Kerszberg M. (1993) Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in the honeybee *Apis mellifera* L. *Apidolog.* 24: 169-194

Matsumoto Y. y Mizunami M. (2000) Olfactory learning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 203:2581-25882000

Matthews K. y Robbins T. W. (2003) Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci. Biobehav. R.* 27: 45-55

Mc Cabe S. I., Hartfelder K., Santana W. C. y Farina W. M. (2007) Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to Africanized honeybee. *J. Comp Physiol A* 193: 1089-1099

McIndoo N. E. (1914) The olfactory sense of the honey bee. *J. Exp. Zool.* 16: 265-346

Menzel R. (1985) Learning in honey bees in an ecological and behavioural context. *Fortschritte der Zoologie, B. D. 31 Hölldobler/Lindauer (Hrsg.): Experimental Behavioral Ecology* G Fischer Verlag. Stuttgart. New York.

Bibliografía

Menzel R. (1990) Learning, memory and cognition in honey bees. *Neurobiology of Comparative Cognition*. Erlbaum Inc, Hillsdale, NJ, 237-292

Menzel R. (1993) Associative learning in honey bees. *Apidolog*. 24: 157-168

Menzel R. (1999) Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 185:323-340

Menzel R. (2012) Learning and memory: commentary. *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Galizia G. C., Eisenhardt D. y Giurfa M. (eds.) pp, 485-492

Menzel R. y Müller U. (1996) Learning and memory in honeybee: from behavior to neural substrate. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 379-404

Menzel R., Durst C. D., Erber J., Eichmüller S., Hammer M., Hildebrand H., Maelshagen J., Müller U., Rosenboom H., Rybak J., Schäfer S. y Scheidler A. (1994) The mushroom bodies in the honeybee: From molecules to behaviour. *Fortschritte der Zoologie* 39. In Schildberger K., & Elsner N. (eds) *Neural basis of behavioural adaptations* 81-102. Fischer, Stuttgart, Germany.

Michener C. D. (1974) *The Social Behavior of Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press, Cambridge

Michener C. D. (2007) The professional development of an entomologist. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 1-15

Mitzunami M. y Matsumoto Y. (2010) Roles of aminergic neurons in formation and recall of associative memory in crickets. *Frontiers in Behav. Neurosci.* 4: 1-11

Mizunami M., Weibrecht J. M. y Strausfeld N. J. (1993) A new role for the insect mushroom bodies: Place memory and motor control. Beer R. D., Ritzmann R., y McKenna T. (Eds): *Biological Neural Networks in Invertebrate Neuroethology and Robotics*. Cambridge, MA: Academic Press 199-225

Mohammedi A., Crauser D., Paris A. y Le Conte Y. (1996) Effect of a brood pheromone on honeybee hypopharyngeal glands. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sci. Vie/Life Sci.* 319:769-772

Moore J. (2001) *A neuroscientist's guide to classical conditioning*. Springer.

Bibliografía

Murphey R. (1986) The myth of the inflexible invertebrate: competition and synaptic remodelling in the development of invertebrate nervous systems. *J. Neurobiol.* 17:585–591

Neal W. R. (1972) The effect of environmental deprivation on speech and language development: Implications for child care workers. *Child Care Quarterly* 1:157-172

Neuser K., Husse J., Stock P. y Gerber B. (2005) Appetitive olfactory learning in *Drosophila* larvae: effects of repetition, reward strength, age, gender, assay type and memory span. *Anim. Behav.* 69: 891–898

Nixon H. L. y Ribbands C. R. (1952) Food transmission within the honeybee community. *Proc. R. Soc. B* 140: 43-50

Núñez J. A. (1982) Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *J. Apic. Res.* 21: 139–150

Ochieng S. A., Hallberg E. y Hansson B. (1998) Fine structure and distribution of antennal sensilla of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) *Cell and Tissue Research.* 291: 525-536

Page R. E., Erber J. y Fondork M. K. (1998). The effect of genotype on response to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 182: 489-500

Pankiw T. (2004) Cued in: honeybee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidolog.* 35: 217-226

Pankiw T. (2004) Worker honey bee pheromone regulation of foraging ontogeny. *Naturwissen.* 91: 178-181

Pankiw T. y Garza C. (2007) Africanized and European honey bee worker ovarian follicle development respond to racial brood pheromone extracts. *Apidolog.* 38: 156-163

Pankiw T. y Page R. E (2001) Brood pheromone modulates honeybees (*Apis mellifera* L.) sucrose response thresholds. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49: 206-213

Pankiw T. y Page R. E. (1999) The effects of genotype, age, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees. *J. Comp. Physiol. A* 185:207-213.

Bibliografía

Pankiw T., Nelson M., Page R. E. y Fondork M. K. (2004) The communal crop modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 55: 286-292

Pankiw T., Page R. E. y Fondrk M. K. (1998) Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 44:193-198

Pankiw T., Sagili R. R. y Metz B. N. (2008) Brood pheromone effects on colony protein supplement consumption and growth in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) in a subtropical winter climate. *J. Econ. Entomol.* 101: 1749-1755

Park W. (1925) The storing and ripening of honey by honeybees. *J. Econ Entomol.* 18: 405-410

Pascual A. y Pr eat T. (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294: 1115-1117

Pavolv I. P. (1927) Lectures on conditioned reflexes. International publishers, New York

Pearce J. M. (1987) A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. *Psychol. Rev.* 94(1): 61.

Pham-Del egue M. H., Blight M. M., Le Metayer M., Marion-Poll F., Picard A. L., Pickett J. A., Wadhams L. J. y Woodcock C. M. (1992) Plant chemicals involved in honeybee-rapeseed relationships: behavioral, electrophysiological and chemical studies. *Proc. 8th Int. Symp. Insect-Plant Relationships* (Menken S. B. J., Viser J. H. y Marrewijn P., eds) Kluwer Academic Publ. BV, Wageningen, 129-130

Pham-Del egue M. H., Etievant I P., Guichard E. y Masson C. (1989) Sunflower volatiles involved in honeybee discrimination among genotypes and flowering stages. *J. Chemic. Ecol.* 15: 329-343

Pryce C. R. y Feldon J. (2003) Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci. Biobehav. R.* 27: 57-71

Bibliografía

Ramírez G P., Martínez A. S., Fernández V. M., Corti Bielsa G. y Farina W. M (2010) The influence of gustatory and olfactory experiences on responsiveness to reward in the honeybee. PLoS ONE 5(10): e13498. doi:10.1371/journal.pone.0013498

Ray S. y Ferneyhough B. (1997) The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. NeuroReport 8: 789–793

Ray S. (1999) Survival of olfactory memory through metamorphosis in the fly *Musca domestica*. Neurosc. Letters 254: 37-40

Reinhardt J. y Claudianos C. (2012) Molecular insights into honey bee brain plasticity. Honeybee Neurobiology and Behavior . Galizia G. C., Eisenhardt D. y Giurfa M. (eds.), pp 359-372

Ribbands C. R. (1955) The scent perception of the honeybee. Proc. R. Soc. of London. Series B, Biolog. Scienc. 143: 367-379

Riveros A. J. y Gronenberg W. (2010) Sensory allometry, foraging task specialization and resource exploitation in honeybees. Behav. Ecol. Sociobiol. 64:955–966

Roat T. C., Cruz-Landim C. (2008) Temporal and morphological differences in post-embryonic differentiation of the mushroom bodies in the brain of workers, queens, and drones of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Micron 39, 1171–1178

Robinson G. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. Ann. Rev. Entomol. 37: 637-665

Rösch G. A. (1925) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. Z. vergl. Physiol. 2: 571-631

Rössler W., Randolph P. W., Tolbert L. P. y Hildebrand J. G. (1999) Axons of olfactory receptor cells of transsexually grafted antennae induce development of sexually dimorphic glomeruli in *Manduca sexta*. J. Neurobiol. 38: 521-541

Rubin B. D. y Katz L. C. (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. Neuron 23: 499-511

Bibliografía

Sachse S. y Galizia C. G. (2002) The role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.* 87: 1106–1117

Sachse S. y Galizia C. G. (2002) The role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.* 87: 1106–1117

Sachse S., Rappert A. y Galizia C. G. (1999) The spatial representation of chemical structures in the AL of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur. J. Neurosci.* 11: 3970–3982

Sandoz J. C. (2012) Olfaction in honey bees: from molecules to behavior. *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Galizia G. C., Eisenhardt D. y Giurfa M. (eds.) pp, 235-252

Sandoz J. C., Laloï D., Odoux J. F. y Pham-Delègue M. H. (2000) Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim. Behav.* 59:1025–1034

Sandoz J. C., Pham-Delègue M. H., Renou M y Wadhams L. J. (2001) Asymmetrical generalisation between pheromonal and floral odours in appetitive olfactory conditioning of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 187: 559–568

Schäble S., Poeggel G., Braun K. y Gruss M. (2007) Long-term consequences of early experience on adult avoidance learning in female rats: Role of the dopaminergic system. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87: 109-122

Scheiner R, Kuritz-Kaiser A., Menzel R. y Erber J. (2005) Sensory responsiveness and the effect of equal subjective rewards on tactile learning and memory of honeybees. *Learn. and Mem.* 12: 626-635

Scheiner R., Barnert M. y Erber J. (2003) Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidolog.* 34: 67-72

Scheiner R., Page R. E. y Erber J. (2001a) Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav. Brain Res.* 120: 67–73

Bibliografía

Scheiner R., Page R. E. y Erber J. (2001b) The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol. Learn. Mem.* 76: 138–150

Scheiner R., Page R. E. y Erber J. (2004) Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidolog.* 35: 133–142

Scheiner R., Weiß A., Malun D. y Erber J. (2001c) Learning in honey bees with brain lesions: How partial mushroom-body ablations affect sucrose responsiveness and tactile learning. *Anim. Cogn.* 4: 227–235

Scherer S., Stocker R. F. y Gerber B. (2003) Olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *Learn. and Mem.* 10(3): 217-225

Schneider D. y Steinbrecht R. A. (1968) Checklist of insect olfactory sensilla. *Symp. Zool. Soc.* 23: 279-297

Schroll C., Riemensperger T., Bucher D., Ehmer J., Völler T., Erbguth K., Gerber B., Hender T., Nagel G., Buchner E. y Fiala A. (2006) Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr. Biol.* 16: 1741–1747

Schröter U. y Malun D. (2000) Formation of Antennal Lobe and Mushroom Body Neuropils During Metamorphosis in the Honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 422: 229-245

Seeley T. D. (1982) Adaptive significance of the age polytheism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11 (4): 287-293

Seeley T. D. (1989). Social foraging in honey bees: how nectar foragers assess their colony's nutritional status. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 24: 181-199

Seeley T. D. (1995) *The Wisdom of the Hive*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

Shepard R. N. (1982) Towards a universal law of generalization for psychological science. *Science* (237): 1317-1323

Sigg D, Thompson C. M., Mercer A. R. (1997) Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *J. Neurosci.* 17(18):7148–7156

Bibliografía

Sigg D., Thompson C. M. y Mercer A. R. (1997) Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *J. Neurosci.* 17: 7148-7156

Skinner B.F. (1938) *The behavior of organisms*. Appleton, New York.

Snodgrass R. E. (1956) *Anatomy and physiology of the honey bee*. Ithaca, Comstock Publish.

Snodgrass R. E. (1984) *Anatomy of the Honey bee*. Cornell University Press Ltd., London

Sokal R. R. y Rohlf F. J (2000) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. State University of New York, New York.

Squierre y Kandel (1999) *Memory: from mind to molecules*. Scientific American Library.

Stach S. y Giurfa M. (2001) How honeybees generalize visual patterns to their mirror image and left-right transformation. *Anim. Behav.* 62: 981-991

Stach S., Benard J. y Giurfa M. (2004) Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. *Nature* 429:758-761

Strambi C., Cayre M. y Strambi, A. (1999) Neural plasticity in the adult insect brain and its hormonal control. *Int. Rev. Cytol.* 190,137-174

Südhof T. (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455(7215):903-911

Suga N. y Jen, P. H. (1976) Disproportionate tonotopic representation for processing CF-FM sonar signals in the mustache bat auditory cortex. *Science* 194 (4264): 542-544

Takeda K. (1961) Classical conditioned response in the honey bee. *J. Insect. Physiol.* 6:168-179

Thom C., Gilley D. C., Hooper J. y Esch H. E. (2007) The scent of the waggle dance. *PLoS Biol.* 5: e228

Tissot M. y Stocker R. (2000) Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: The fate of neurons throughout the stages. *Progress in Neurobiol.* 89-111

Bibliografía

Tomberlin J. K., Rains G. C., Allan S. A., Sanford M. R., Lewis W. J. (2006) Associative learning of odor with food- or blood-meal by *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Naturwissen.* 93:551-556

Tully T., Cambiazo V. y Kruse L. (1994) Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *J. Neurosci.* 14 (1): 68-74

Uchida N., Takahashi Y. K., Tanifuji M., Mori K. (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat. Neurosci.*, 3: 1035–1043

van den Berg M. J. y Ziegelberger G. (1991) On the function of the pheromone binding protein in the olfactory hairs of *Antherea polyphemus*. *J. Insect Physiol.* 3: 79-851

von Frisch K (1919) Über den Geruchssinn der Bienen und seine blütenbiologische Bedeutung. *Zool. Jahrb Phys.* 37: 1-238

von Frisch K. (1914) Demonstration von Versuchen zum Nachweis des Farbsehens bei angeblich total farbenblinden Tieren. *Verhandl. Deutsch. Zool. Ges* 24: 50-58

von Frisch K. (1914/1915) Der Farbensinn und Formensinn der Bienen. *Zool. Jahresber. (Physiol.)* 35: 1-88

von Frisch K. (1921). *Zool. Jb. Abt. allg. Zool. Physiol.* 38: 449-514

von Frisch K. (1923) Über die "Sprache" der Bienen. *Zool Jahrb (Zoologie und Physiologie)* 40: 1-186

Wadhams L. J., Blight M. M., Kerguelen V., Métayer M. L., Marion-Poll F., Masson C., Pham-Delègue M. H. y Woodcock C. M. (1994) Discrimination of oilseed rape volatiles by honey bee: novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay. *J. Chem. Ecol.* 20:3221–3231

Wang W. S., Zhang S., Sato K. y Srinivasan M. V. (2005) Maturation of odor representation in the honeybee antennal lobe. *J. Insect Physiol.* 51: 1244-1254

Watanabe H. y Mizunami M. (2007) Pavlov's Cockroach: Classical Conditioning of Salivation in an Insect. *PLoS ONE* 2(6): e529. doi:10.1371/journal.pone.0000529

Bibliografía

Watanabe H., Kobayashi Y., Sakura M., Matsumoto Y. y Mizunami M. (2003) Classical Olfactory conditioning in the Cockroach *Periplaneta americana*. *Zool. Scienc.* 20:1447-1454

Wilson E. O. (1971) *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Wilson R. I., Turner G. C., y Laurent G. (2004) Transformation of olfactory representations in the *Drosophila* antennal lobe. *Science* 303(5656): 366-370

Winnington A., Napper R. M. y Mercer A. R. (1996) Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *J. Comp. Neurol.* 365: 479-490

Winston M. (1987) *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press. Cambridge, Mass.

Withers G. S., Fahrbach S. E. y Robinson G E. (1993) Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364(6434):238-240

Withers G. S., Fahrbach S. E., Robinson G. E. (1993) Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364 (6434): 238-240

Withers G. S., Fahrbach S. E., Robinson G. E. (1995) Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honey bees. *J. Neurobiol.* 26 (1): 130-144

Zar J. H. (1999) *Biostatistic Analysis*. 4th edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Zars T. (2000) Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Current Opinion in Neurobiol.* 10: 790-795

Ziegelberger G (1995) Redox-shift of the pheromone-binding protein in the silk moth *Antheraea polyphemus*. *Europe. J. Biochem.* 232 (3): 706-711