

Trabajo Práctico Final

Biometría II - 2021

Matías Alemán, Milagros Azcueta, Manuel Fiz, Emilia Habermeld, Diego Kafer, Ilán Shalom

16/11/2021

Introducción

Los animales se encuentran constantemente tomando decisiones respecto a cuándo alimentarse, aparearse, dormir, y demás acciones (1). A través de aprendizajes y experiencias previas, son capaces de comparar dos o más escenarios probables antes de realizar cualquier acción (2). La generación de una expectativa respecto a dichos escenarios es un proceso que permite a los animales predecir la aparición de estímulos (tanto aversivos como apetitivos) y de este modo, adaptar su comportamiento (3). Esta expectativa incide directamente en sus capacidades mnésicas, debido a que el aprendizaje depende de asociaciones entre claves externas y representaciones internas de dichas claves (4). Este proceso ha sido ampliamente estudiado en vertebrados, pero hay menos información disponible en invertebrados.

El objetivo de este trabajo es estudiar la modulación de memorias a largo término a partir de cambios en la expectativa de la recompensa. El modelo experimental es la abeja *Apis mellifera* y los experimentos fueron realizados en un contexto controlado dentro del laboratorio.

Materiales y métodos

Abejas *Apis mellifera* fueron entrenadas bajo un condicionamiento clásico del reflejo de extensión de probóscide (de aquí en más PER, por sus siglas en inglés) (5,6): se administra un odorante a la vez que se tocan las antenas con una gota de sacarosa. La abeja extiende su probóscide como reflejo de este estímulo, y en ese momento se la alimenta con una solución azucarada. De este entrenamiento, recibieron 4 ensayos. Terminada la etapa de entrenamiento, se realizaron tres testeos donde se presentó solo el odorante a 3, 24 y 48 hs posteriores al último ensayo de entrenamiento.

Las abejas se dividieron en 4 grupos experimentales dependiendo de la sacarosa recibida en las antenas y en la probóscide. Los grupos “constante alto” y “constante bajo” recibieron tanto en las antenas como en la probóscide azúcar de concentración 1,5 M y 0,5 M respectivamente. Por otro lado, los grupos “contraste positivo” y “contraste negativo” recibieron azúcar de distinta concentración en cada pieza sensorial: los animales del grupo contraste positivo recibieron sacarosa 0,5 M en las antenas y 1,5 M en su probóscide. Por otro lado, los animales del contraste negativo recibieron azúcar 1,5 M en las antenas para luego ser alimentados con sacarosa 0,5 M.

A continuación se presentan gráficos en base a una estadística descriptiva exploratoria para observar la tendencia de los datos:

```
gp_entr # Grafico de perfiles de la etapa de entrenamiento
```

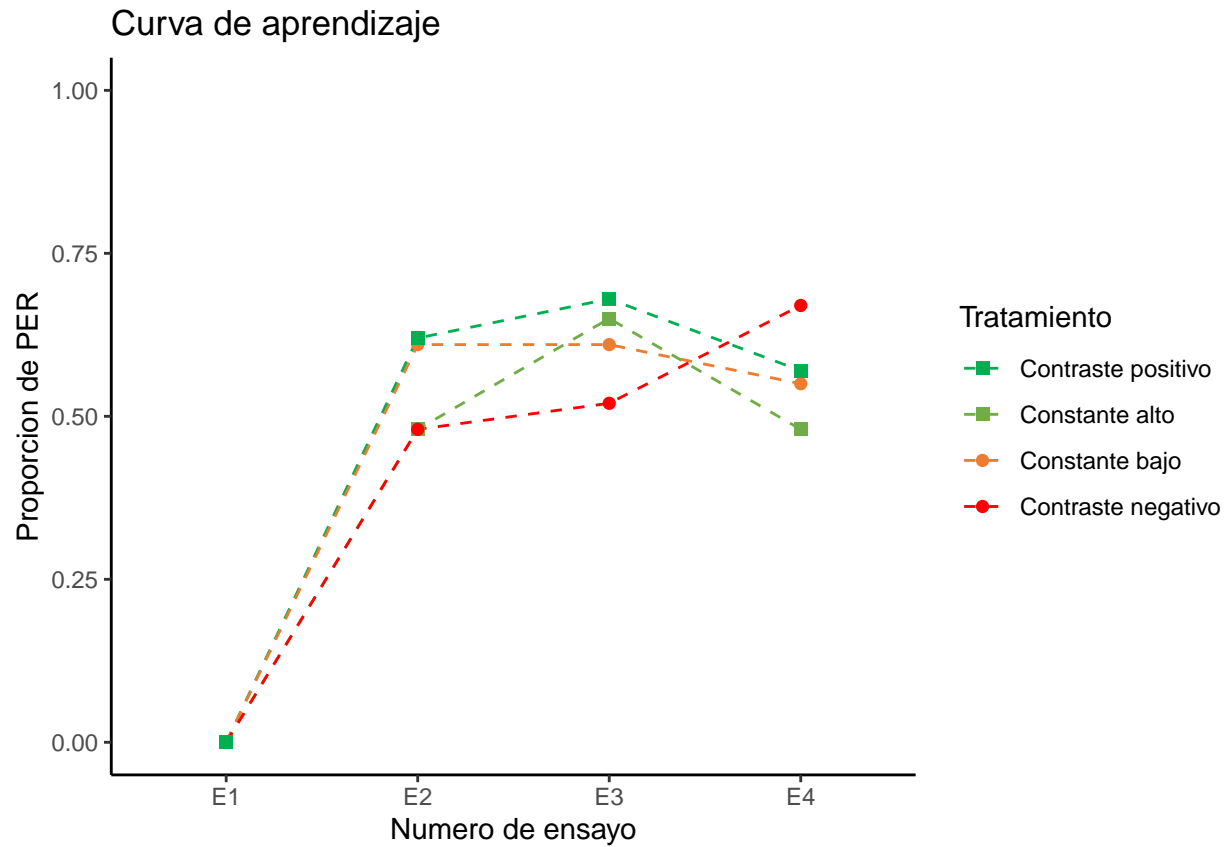


Figura 1: Proporciones de PER para cada tratamiento en cada ensayo de entrenamiento. En la etapa de entrenamiento, se observa que todos los animales parten de una respuesta nula al odorante en el ensayo 1. En los ensayos subsiguientes todos los grupos parecen alcanzar una proporción de PER asintótica alrededor de 0,6, lo que se traduce en un buen aprendizaje de la asociación odorante-recompensa.

gp_testeo # *Grafico de perfiles de la etapa de evaluacion*

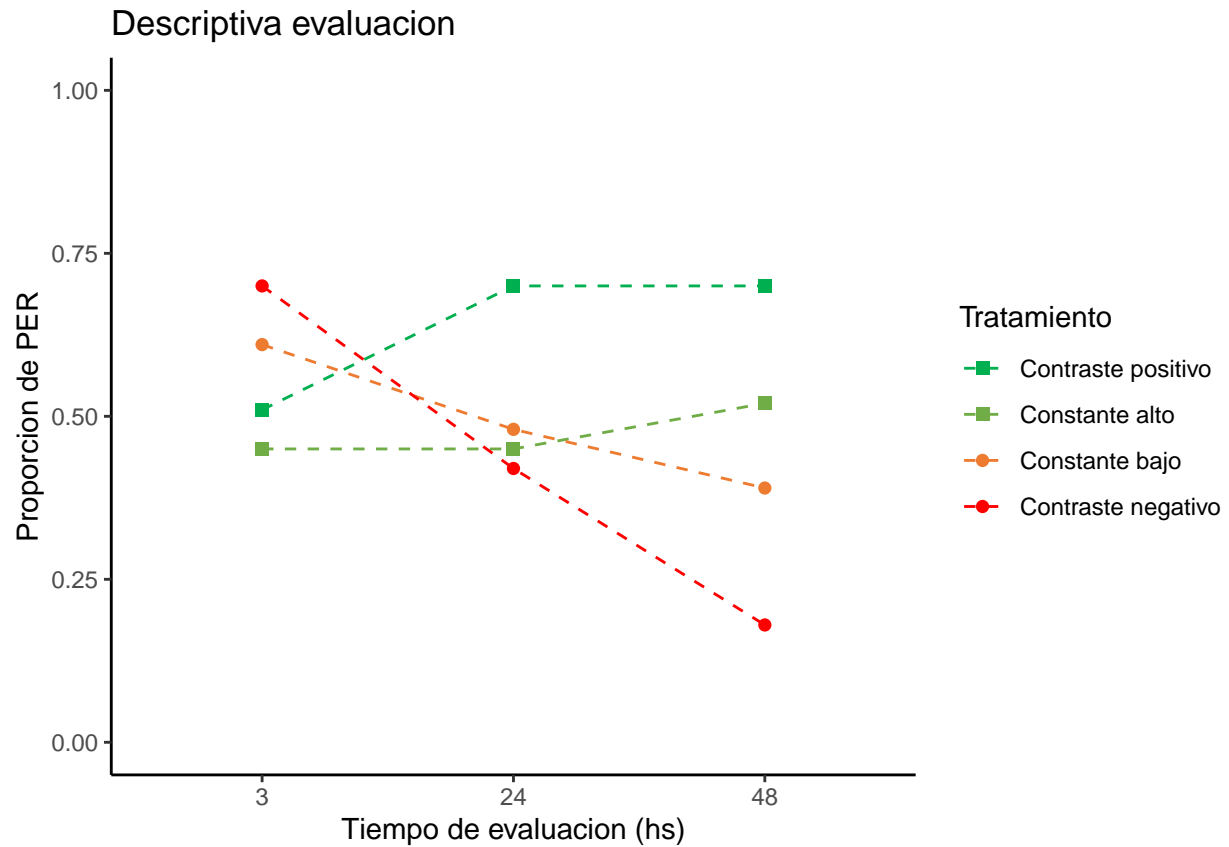


Figura 2: Proporciones de PER para cada tratamiento en cada tiempo de evaluación. Respecto a la etapa de evaluación, a 3 hs los resultados parecen ser opuestos a la hipótesis (los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO tienen respuestas más altas que CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO), pero luego, esta relación se revierte en las pruebas a 24 y 48 hs.

gp_semana # Grafico de perfiles de la etapa de evaluacion por semana

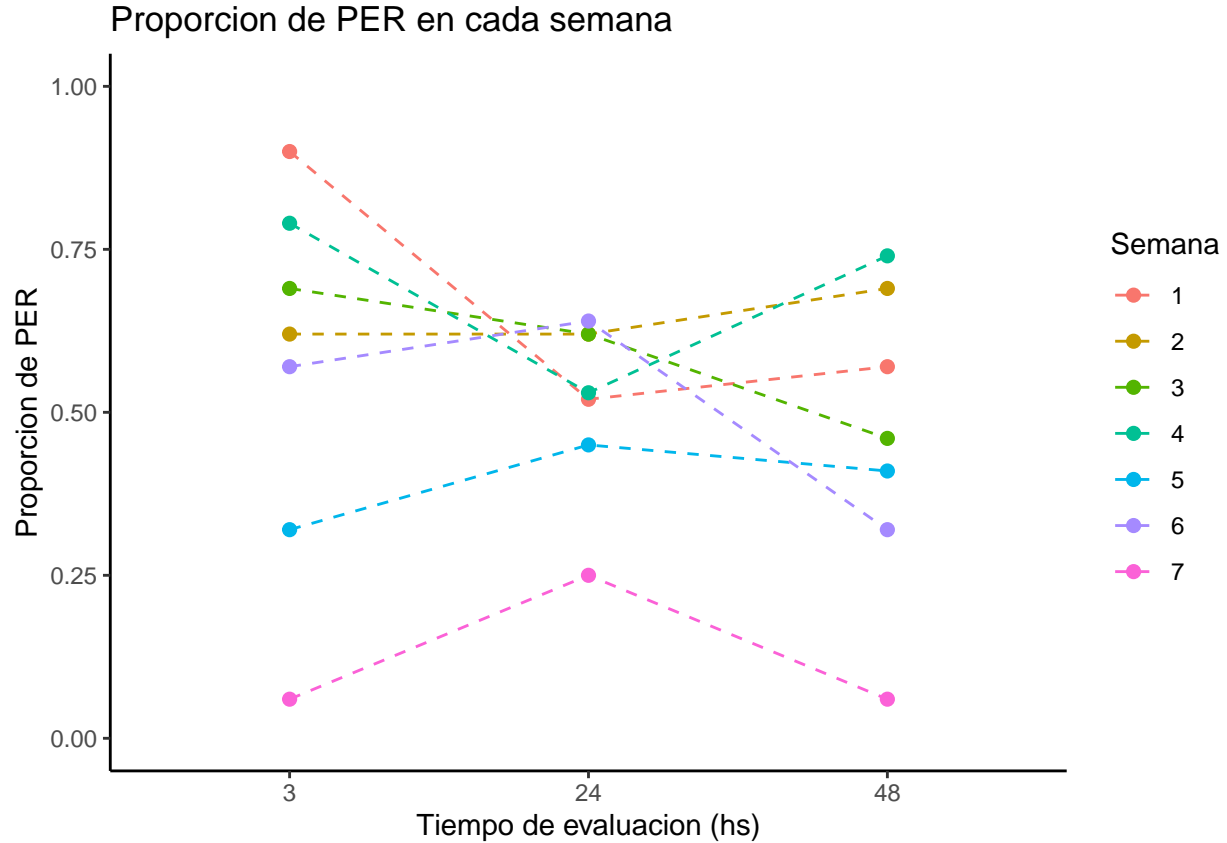


Figura 3: Respecto a la proporción de PER en cada tiempo de evaluación en cada semana, se observa cierto grado de variabilidad en las respuestas. Resulta conveniente incluirla como variable explicatoria del modelo.

Modelado

Como VR se midió la extensión de la probóscide frente al olor (si-no). Al ser una variable dicotómica, la distribución de probabilidades esperada es una Bernoulli. El diseño es de medidas repetidas ya que cada abeja fue medida 7 veces (4 ensayos de entrenamiento + 3 testeos). Se realizó estadística descriptiva de la etapa de entrenamiento y un modelo estadístico para la etapa de evaluación ya que el mayor interés del análisis está depositado en las diferencias observables durante esta etapa. Como variables explicativas se incluyeron:

VE1: Tiempo de testeo → cualitativa fija de 3 niveles (3, 24, 48 hs).

VE2: Tratamiento → cualitativa fija de 4 niveles (constante alto, constante bajo, contraste positivo, contraste negativo)

VE3: ID de abeja → cualitativa aleatoria de 132 niveles (abeja 1 a 132).

VE4: Semana de trabajo → cualitativa aleatoria de 7 niveles (semanas 1 a 7). Covariable.

Se implementó un modelo lineal generalizado condicional con la función `glmmTMB` de la librería `glmmTMB`. Se optó por un modelo condicional ya que se compararon modelos marginales con distintas matrices de correlación y, a partir de un ranking de QIC (el cual compara modelos según su verosimilitud y cantidad de parámetros estimados), el más conveniente resultó ser un modelo marginal con matriz de simetría compuesta. Como los modelos condicionales tienen implícita una matriz de simetría compuesta y resultan más familiares para su implementación en R, se elige esta opción. Desde un punto de vista más teórico quisimos, en un

principio, incluir a la variable “semana” como una de efectos aleatorios, dado que no presentamos preguntas o hipótesis puntuales acerca de las diferencias entre semanas. Sin embargo, al chequear los supuestos, el supuesto de normalidad de los residuos de la variable de efectos aleatorios “ID” no cumplía las expectativas.

Como solución a este problema decidimos probar incluir en el modelo la variable semana como una de efectos fijos. El modelo ahora incluye más parámetros y por lo tanto logra un mejor ajuste, resultando en predichos más precisos con nuestros datos. Es por esto que al chequear nuevamente los supuestos, se logra obtener una prueba satisfactoria de Shapiro-Wilk para los residuos de la variable de efectos aleatorios “ID”.

Modelo teórico

$$\begin{aligned} \text{logit}(\pi_{ijkl}) = & \mu \\ + & \alpha_i \\ + & \beta_j \\ + & \alpha * \beta_{ij} \\ + & \gamma_k \\ + & A_{l(ij)(k)} \end{aligned}$$

Modelo implementado en R

```
m10 <- glmmTMB(rta ~ TRATAMIENTO*tiempo_testeo + SEMANA + (1|ID), data=long_testeo, family="binomial")
Anova(m10) # Prueba de ANOVA del modelo seleccionado

## Analysis of Deviance Table (Type II Wald chisquare tests)
##
## Response: rta
##               Chisq Df Pr(>Chisq)
## TRATAMIENTO      3.3627  3  0.3390115
## tiempo_testeo     2.0484  2  0.3590747
## SEMANA           24.8214  6  0.0003684 ***
## TRATAMIENTO:tiempo_testeo 26.5204  6  0.0001780 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

La interacción tratamiento*tiempo resulta significativa. Por ende, no es posible evaluar efectos principales. Las comparaciones se realizaron con contrastes ortogonales ya que se poseen hipótesis a priori sobre las mismas.

Contrastes a priori

Se espera que el grupo CONTRASTE POSITIVO aprenda la asociación olor-azúcar más fuertemente que el CONSTANTE ALTO, debido a un mayor estado motivacional gracias a la “sorpresa” recibida en la probóscide (azúcar 1,5 M) en contraste con el azúcar esperada que tocó las antenas segundos antes (0,5 M). Caso opuesto, se espera que la proporción de animales del grupo CONTRASTE NEGATIVO que aprendan la asociación sea menor que la proporción de animales del grupo CONSTANTE BAJO, debido a un estado motivacional degradado por la “decepción” de recibir azúcar 0,5 M cuando esperaban 1,5 M.

Las comparaciones se realizaron entre grupos con igual concentración de azúcar en probóscide, dado que la ingesta de alimento, la recompensa, es la señal post-ingestiva que permite la consolidación de la memoria asociativa de largo término.

Resultados

```
ortogonales # Implementacion de contrastes ortogonales
```

```
## $semmeans
## TRATAMIENTO tiempo_testeo prob SE df lower.CL upper.CL null t.ratio
## constante_alto 3hs 0.3916 0.1441 377 0.1638 0.679 0.5 -0.728
## constante_bajo 3hs 0.7430 0.1193 377 0.4583 0.908 0.5 1.699
## contraste_neg 3hs 0.7648 0.1097 377 0.4950 0.915 0.5 1.934
## contraste_pos 3hs 0.4877 0.1379 377 0.2433 0.738 0.5 -0.090
## constante_alto 24hs 0.3916 0.1441 377 0.1638 0.679 0.5 -0.728
## constante_bajo 24hs 0.5241 0.1504 377 0.2519 0.783 0.5 0.160
## contraste_neg 24hs 0.3176 0.1248 377 0.1304 0.591 0.5 -1.328
## contraste_pos 24hs 0.8030 0.0954 377 0.5545 0.930 0.5 2.329
## constante_alto 48hs 0.5070 0.1506 377 0.2393 0.771 0.5 0.047
## constante_bajo 48hs 0.3493 0.1393 377 0.1386 0.642 0.5 -1.015
## contraste_neg 48hs 0.0642 0.0423 377 0.0168 0.215 0.5 -3.802
## contraste_pos 48hs 0.8030 0.0954 377 0.5545 0.930 0.5 2.329
## p.value
## 0.4671
## 0.0902
## 0.0539
## 0.9287
## 0.4671
## 0.8727
## 0.1851
## 0.0204
## 0.9627
## 0.3108
## 0.0002
## 0.0204
##
## Results are averaged over the levels of: SEMANA
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale
## Tests are performed on the logit scale
##
## $contrasts
```

```
## contrast      odds.ratio    SE  df lower.CL upper.CL null t.ratio p.value
## 3hs_alto_pos    0.676 0.545 377   0.1387   3.297    1  -0.485  0.6277
## 3hs_bajo_neg    0.889 0.767 377   0.1631   4.845    1  -0.137  0.8914
## 24hs_alto_pos   0.158 0.134 377   0.0296   0.842    1  -2.168  0.0308
## 24hs_bajo_neg   2.367 1.980 377   0.4566  12.266    1   1.029  0.3039
## 48hs_alto_pos   0.252 0.213 377   0.0481   1.324    1  -1.634  0.1031
## 48hs_bajo_neg   7.832 7.238 377   1.2726  48.202    1   2.227  0.0265
##
## Results are averaged over the levels of: SEMANA
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log odds ratio scale
## Tests are performed on the log odds ratio scale
```

```
gp_final # Gráfico final, medidas resumen del modelo
```

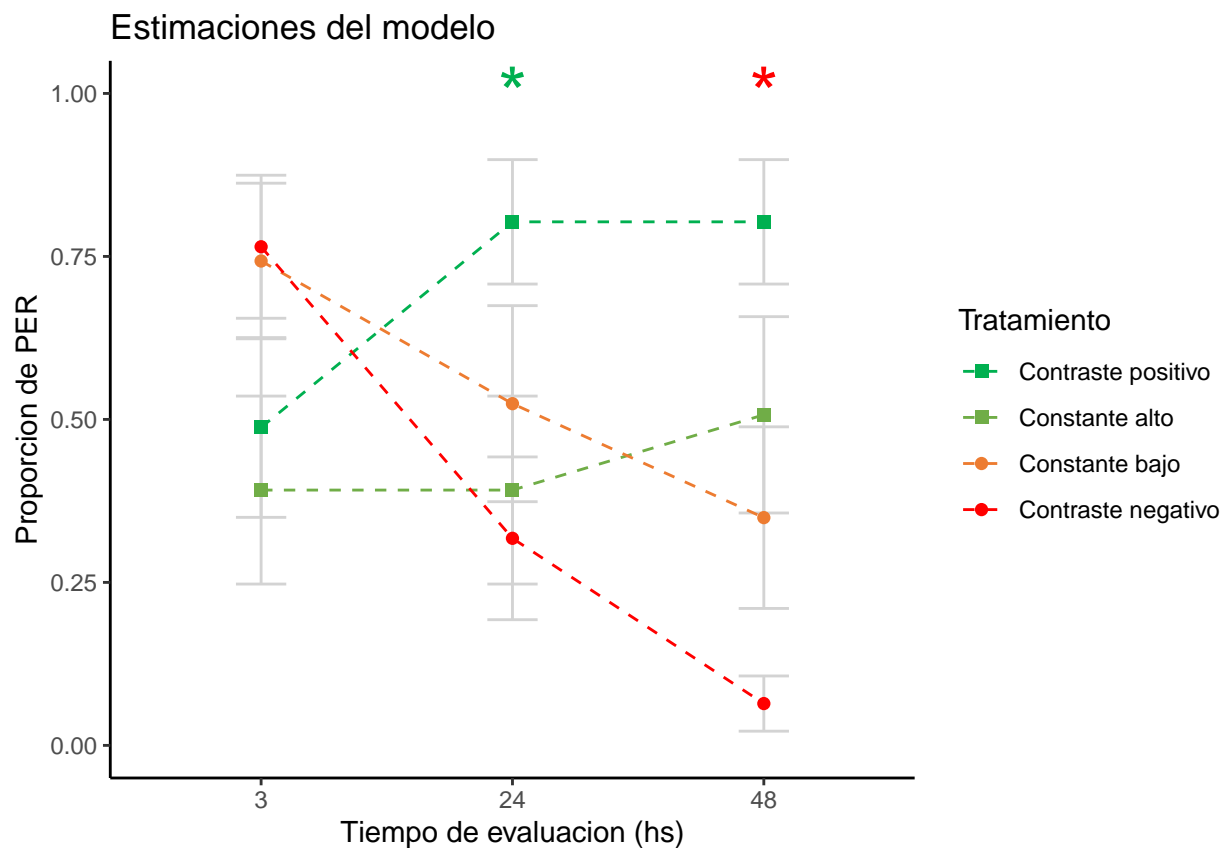


Figura 4: Proporciones estimadas de PER para cada tratamiento en cada tiempo de evaluación. Los resultados se informan como la media \pm el error estándar de cada combinación de tiempo y tratamiento. A partir de un modelo mixto/condicional, se vio que la proporción de PER a 24 hs es mayor para el grupo CONTRASTE POSITIVO que para el grupo CONSTANTE ALTO ($p < 0.05$) y que la proporción de PER a 48 hs es menor para el grupo CONTRASTE NEGATIVO que para el grupo CONSTANTE BAJO ($p < 0.05$).

En el primer tiempo de evaluación (3 hs) no se observaron diferencias significativas en los contrastes ($p > 0.05$).

A 24 hs se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO. Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE POSITIVO aumenta en promedio entre un 2,96% y un 84,2% respecto al grupo CONSTANTE ALTO, con un 95% de confianza ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en la comparación CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO a 24 hs ($p > 0.05$).

En la evaluación a 48 hs, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO. Se estima que la chance de extensión de probóscide para el grupo CONTRASTE NEGATIVO disminuye en promedio entre un 21,4% y un 97,93% respecto al grupo CONSTANTE BAJO, con un 95% de confianza ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en la comparación CONSTANTE ALTO vs CONTRASTE POSITIVO a 48 hs ($p > 0,05$), aunque la tendencia de las estimaciones coincide con lo observado a 24 hs.

Discusión

Debido a que la interacción tratamiento*tiempo resultó significativa, se realizaron contrastes ortogonales teniendo en cuenta ambas variables. Si nos situamos en primer lugar en las comparaciones en $t = 3$ hs, se observa que ninguno de los dos contrastes propuestos mostró diferencias significativas. Lo que es más curioso aun es que la tendencia de la respuesta parece ser opuesta a la esperada por los contrastes a priori: los grupos CONTRASTE NEGATIVO y CONSTANTE BAJO son aquellos que mayor proporción de PER presentaron. Debido a que la memoria observada a las 3 hs posteriores de finalizado el último ensayo de entrenamiento es una memoria de corto término, puede estar influida por diversos fenómenos ajenos al tratamiento aplicado. En particular, se propone que en este punto temporal hay un conflicto en relación a la expresión de la memoria generada. Los animales de los grupos CONTRASTE NEGATIVO y CONSTANTE BAJO son los que menos azúcar ingirieron (en términos nutricionales), ya que siempre consumieron azúcar de concentración 0,5 M. Por lo tanto, es muy probable que a 3 hs estos animales estén más motivados que los otros dos grupos y que por ende, lo que parece ser una mayor retención de la memoria (que solo es posible de observar a través de la extensión de la probóscide en este experimento) sea un reflejo de la motivación de estos animales por seguir ingiriendo azúcar. En contraste, las abejas de los grupos CONTRASTE POSITIVO y CONSTANTE ALTO habrían alcanzado un nivel de saciedad más alto, respondiendo menos al estímulo que se asocia con la llegada de azúcar (odorante).

El día siguiente al aprendizaje, se buscó estudiar la consolidación de memoria de largo término en las abejas. Al hacer las comparaciones a $t = 24$ hs se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO. Esto sugiere que un mismatch positivo entre lo que el animal capta con las antenas y lo que ingiere genera una consolidación de memoria de largo término más robusta, la cual tiene un efecto directo en el comportamiento. Creemos que el animal al sensar con las antenas genera expectativas de lo que va a ingerir y es la sorpresa positiva que siente lo que generaría un estado motivacional que predispone a una mayor retención de la experiencia. Por otro lado, al comparar los grupos CONSTANTE BAJO contra CONTRASTE NEGATIVO, no observamos diferencias significativas. Sin embargo se pudo observar una tendencia que encaja con lo teorizado a priori: aquellos animales pertenecientes al grupo contraste negativo presentaron una menor proporción de PER que el grupo constante bajo. Esto sugiere que puede haber un efecto en la consolidación de la memoria de largo término por mismatch negativo. Si trasladamos la evaluación a 24 hs al entorno natural de un animal “decepcionado”, se relaciona con la evocación de una memoria de un sitio que otorga recompensas pero que no alcanzan la calidad esperada por la abeja. Es probable que la relación de compromiso entre un estímulo positivo (presencia de una recompensa) y un estímulo menos motivante (que la recompensa no sea de la calidad esperada) genere que los animales igualmente visiten la fuente de alimento (en este caso, sería análogo a responder al odorante). Sin embargo, pasadas 48 hs del encuentro con ese sitio, es altamente probable que ese mismo animal haya encontrado una locación que le permita obtener recursos de mayor calidad. Por lo tanto, se propone que en el grupo CONTRASTE NEGATIVO se genera una traza mnésica inhibitoria en relación a la degradación de la recompensa esperada, que resulta evidente en evaluaciones posteriores a las 24 hs.

En la evaluación a 48 hs no se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE ALTO y CONTRASTE POSITIVO. Esto puede explicarse en base a la distribución de probabilidades de nuestros datos. En una distribución Bernoulli, el punto de máxima varianza se encuentra en $p=0,5$. Traslado al ejemplo de este trabajo, sería el caso en el cual el 50% de las abejas extiende su probóscide y el 50% no lo hace, bajo un mismo tratamiento. Debido a que la proporción de PER estimada para el grupo CONSTANTE ALTO a 48 hs es de 0,51, este grupo tiene la máxima varianza posible. Por lo tanto, a pesar de que se mantiene la misma tendencia observada en la evaluación a las 24 hs, la comparación con el grupo

CONTRASTE POSITIVO resulta no significativa en este caso. Por otro lado, la comparación entre los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO resultó significativa. Se pudo observar que la sorpresa negativa que sufre el animal en este último grupo es capaz de modular la memoria a largo término. Si bien la memoria del grupo CONSTANTE BAJO decae en el tiempo, la memoria del grupo CONTRASTE NEGATIVO lo hace a un ritmo mayor.

Como conclusión, resulta interesante haber observado que no solo es importante que haya un mismatch entre lo esperado y lo obtenido para modular una memoria a largo término, sino que también la valencia de ese contraste tendrá un efecto diferencial sobre esa memoria.

Bibliografía

1. McFarland, D. J. Decision making in animals. *Nature* 269, 15–21 (1977).
2. Menzel, R. & Giurfa, M. Dimensions of Cognition in an Insect, the Honeybee. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* 5, 24–40 (2006).
3. Gil, M., De Marco, R. J. & Menzel, R. Learning reward expectations in honeybees. *Learn. Mem.* 14, 491–6 (2007).
4. Rescorla, R. A. A Pavlovian analysis of goal-directed behavior. *Am. Psychol.* 42, 119–129 (1987).
5. Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A. & Schäfer, S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97, 107–119 (1983).
6. Takeda, K. Classical conditioned response in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 6, 168–179 (1961).