

Trabajo Práctico Final

Biometría II - 2021

Matías Alemán, Milagros Azcueta, Manuel Fiz, Emilia Haberfeld, Diego Kafer, Ilan Shalom

21/10/2021

Introduccion

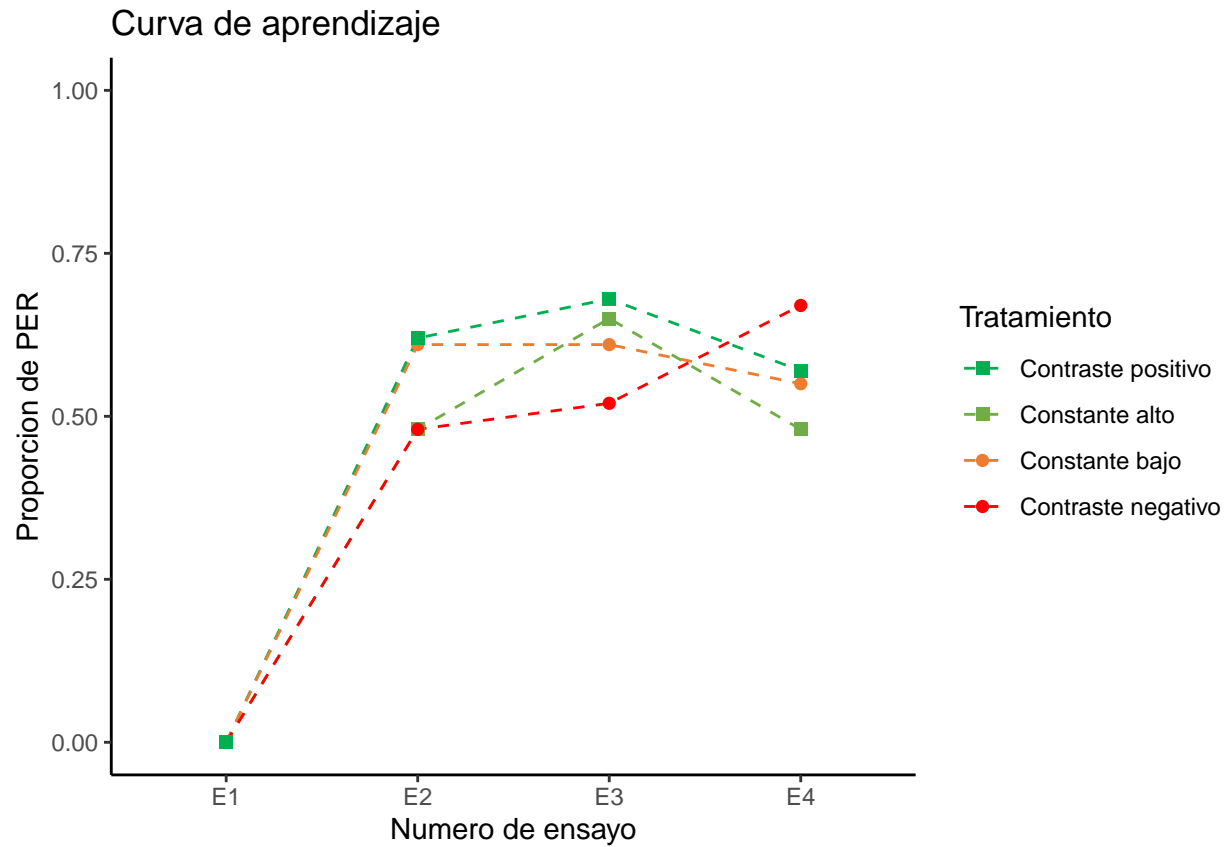
Los animales se encuentran constantemente tomando decisiones respecto a cuando alimentarse, aparearse, dormir, y demas acciones (1). A traves de aprendizajes y experiencias previas, son capaces de comparar dos o mas escenarios probables antes de realizar cualquier accion (2). La generacion de una expectativa respecto a dichos escenarios es un proceso que permite a los animales predecir la aparicion 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 informacion disponible en invertebrados. El objetivo de este trabajo es estudiar la modulacion de memorias a largo termino 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 metodos

Abejas *Apis mellifera* fueron entrenadas bajo un condicionamiento clasico del reflejo de extension de proboscide (PER, por sus siglas en ingles) (5,6): se administra un odorante a la vez que se tocan las antenas con una gota de sacarosa. La abeja extiende su proboscide como reflejo de este estímulo, y en ese momento se la alimenta con una solucion azucarada. De este entrenamiento, recibieron 4 ensayos. Terminada la etapa de entrenamiento, se realizaron tres testeos donde se presento solo el odorante a 3, 24 y 48 hs posteriores al ultimo 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 proboscide azucar de concentracion 1,5 M y 0,5 M respectivamente. Por otro lado, los grupos “contraste positivo” y “contraste negativo” recibieron azucar de distinta concentracion en cada pieza sensorial: los animales del grupo contraste positivo recibieron sacarosa 0,5 M en las antenas y 1,5 M en su proboscide. Por otro lado, los animales del contraste negativo recibieron azucar 1,5 M en las antenas para luego ser alimentadas con sacarosa 0,5 M.

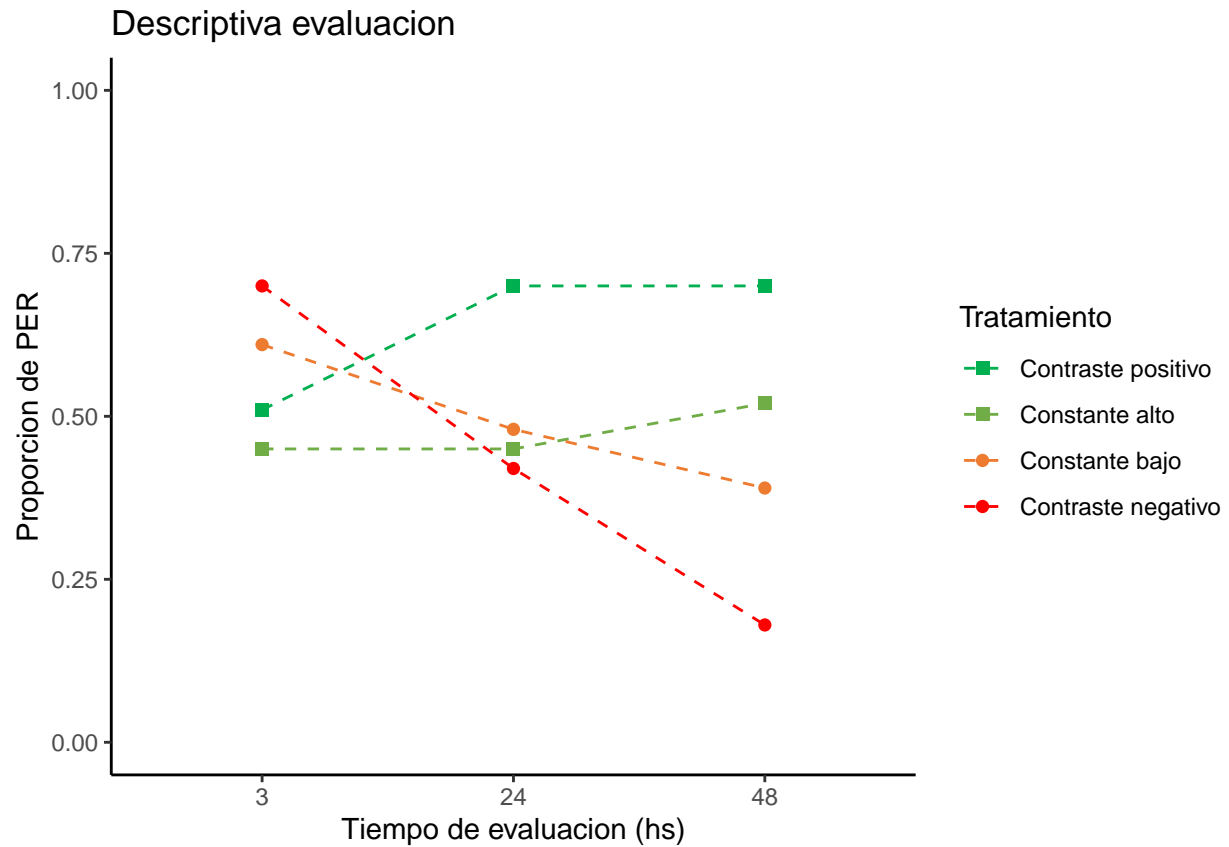
A continuacion se realizo una estadística descriptiva exploratoria para observar la tendencia de los datos:

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



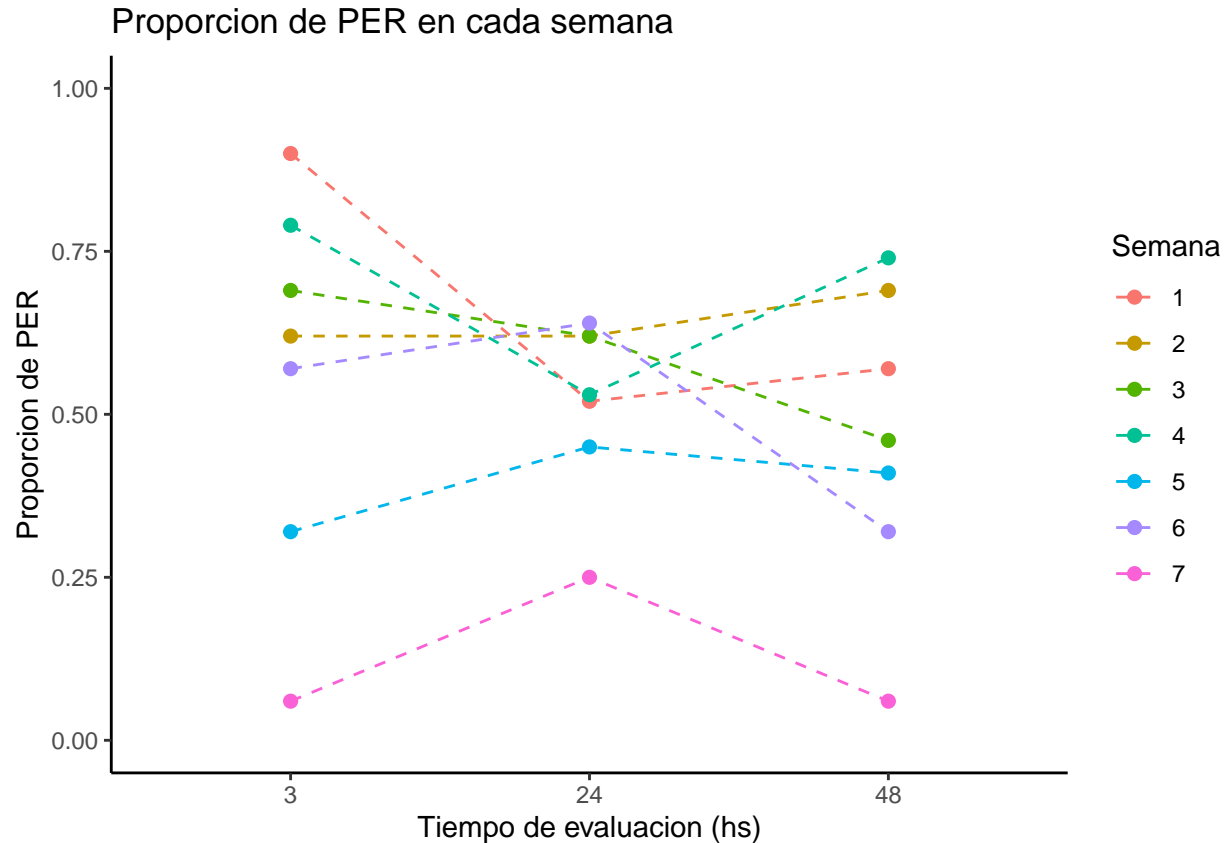
Proporciones de PER para cada tratamiento en cada ensayo de entrenamiento. En la etapa de entrenamiento, se observa que todos los animales parten de una respuesta nula al odorante en el ensayo 1. En los ensayos subsiguientes todos los grupos parecen alcanzar una proporción de PER asintótica alrededor del 60%, lo que se traduce en un buen aprendizaje de la asociación odorante-recompensa.

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



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*



Respecto a la proporcion de PER en cada tiempo de evaluacion en cada semana, se observa cierto grado de variabilidad en las respuestas. Resulta conveniente incluirla como variable explicatoria del modelo.

Modelado

Como VR se midio la extension de la proboscide frente al olor (si-no). Al ser una variable dicotomica, la distribucion 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 realizo estadística descriptiva de la etapa de entrenamiento y un modelo estadístico para la etapa de evaluacion ya que el mayor interes del analisis esta depositado en las diferencias observables durante esta etapa. Como variables explicatorias 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 implemento un modelo lineal generalizado condicional con la funcion `glmmTMB` de la librería `glmmTMB`. Se opto por un modelo condicional ya que se compararon modelos marginales con distintas matrices de correlacion y, a partir de un ranking de QIC (el cual compara modelos según su verosimilitud y cantidad de parametros estimados), el mas conveniente resulto ser un modelo marginal con matriz de simetria compuesta. Como los modelos condicionales tienen implícita una matriz de simetria compuesta y resultan mas familiares para su implementacion en R, se eligio esta opcion. 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 teorico:

Escala del Predictor Lineal $\text{logit}(?) = + i + j + *ij + Sk + Al(ij)(k)$

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

```
## 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 interaccion tratamiento*tiempo resulta significativa. Por ende, no se pueden evaluar los efectos principales.

Contrastes a priori:

Se espera que el grupo contraste positivo aprenda la asociacion olor-azucar mas fuertemente que el constante alto, debido a un mayor estado motivacional gracias a la “sorpresa” recibida en la proboscide (azucar 1,5 M) en contraste con el azucar esperada que toco las antenas segundos antes (0,5 M). Caso opuesto, se espera que la proporcion de animales de contraste negativo que aprendan la asociacion sea menor que la proporcion de constante bajo, debido a un estado motivacional degradado por la “decepcion” de recibir azucar 0,5 M cuando esperaban 1,5 M. El apareamiento de las comparaciones se realizó entre grupos con igual concentración de azucar en probóscide, dado que la ingesta de alimento, la recompensa, es lo que consolida la memoria.

Resultados

```
ortogonales # Contrastes ortogonales
```

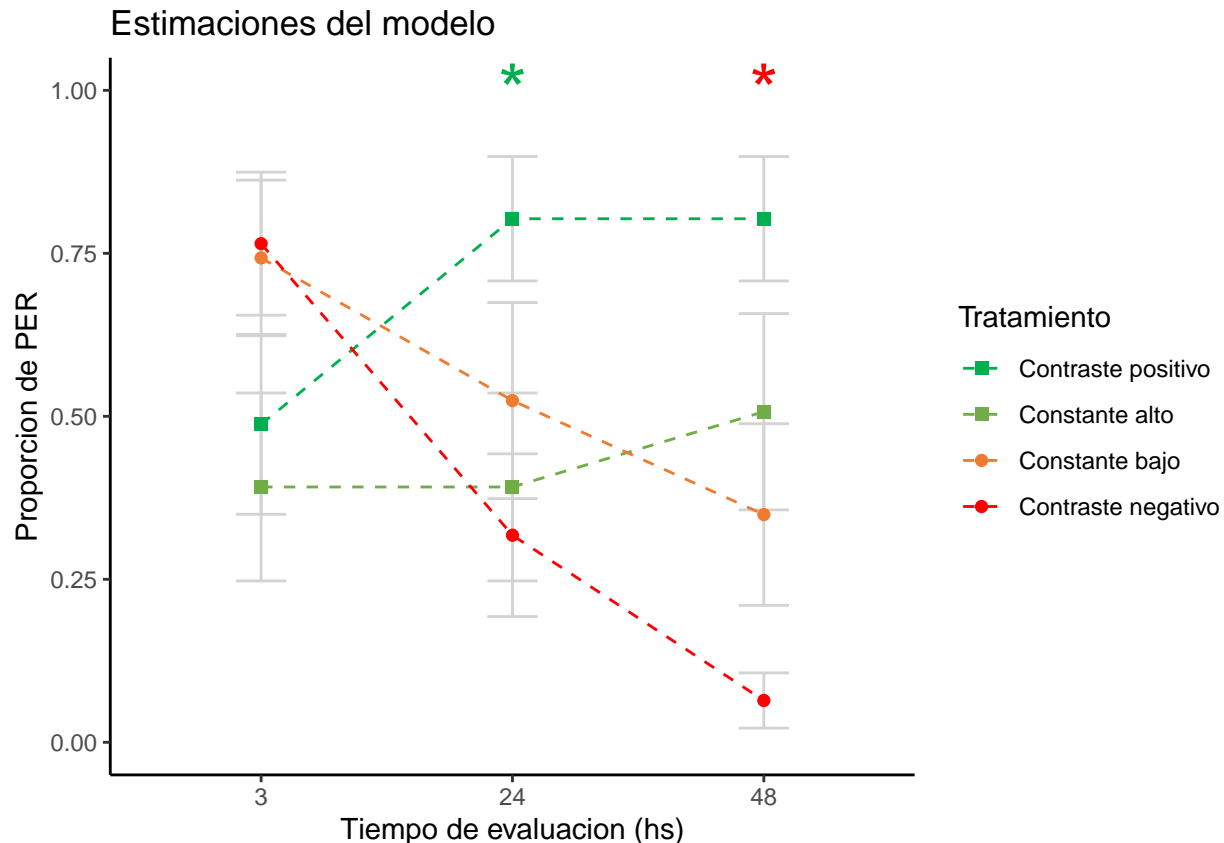
```
## $emmeans
##   TRATAMIENTO tiempo_testeo prob SE df lower.CL upper.CL null t.ratio
##   constante_alto 3hs      0.3916 0.1441 377  0.1638    0.679  0.5  -0.728
##   constante_bajo 3hs      0.7430 0.1193 377  0.4583    0.908  0.5   1.699
##   contraste_neg  3hs      0.7648 0.1097 377  0.4950    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 # Grafico final, medidas resumen del modelo
```



REDACTARSE UN EPIGRAFE PIOLA DE ESTO

Discussion

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 extension de proboscide 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 comparacion CONSTANTE BAJO vs CONTRASTE NEGATIVO a 24 hs ($p > 0,05$). En la evaluacion a 48 hs, se observaron diferencias significativas entre los grupos CONSTANTE BAJO y CONTRASTE NEGATIVO. Se estima que la chance de extension de proboscide 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 comparacion 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 o conclusión Debido a que la interaccion 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 mostro diferencias significativas. Lo que es mas 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 proporcion de PER presentaron. Debido a que la memoria observada a las 3 hs posteriores de finalizado el ultimo ensayo de entrenamiento es una memoria de corto término, puede estar influida por diversos fenomenos ajenos al tratamiento aplicado. En particular, se propone que en este punto temporal hay un conflicto en relacion a la expresion de la memoria generada. Los animales de los grupos contraste negativo y constante bajo son los que menos azucar ingirieron (en terminos nutricionales), ya que siempre consumieron azucar de concentración 0,5 M. Por lo tanto, es muy probable que a 3

hs estos animales esten mas motivados que los otros dos grupos y que por ende, lo que parece ser una mayor retencion de la memoria (que solo es posible de observar a traves de la extensión de la proboscide, en este experimento) sea un reflejo de la motivacion de estos animales por seguir ingiriendo azucar. En contraste, las abejas de los grupos contraste positivo y constante alto habrian alcanzado un nivel de saciedad mas alto, respondiendo menos al estimulo (odorante). El dia siguiente al aprendizaje, se buscó estudiar la consolidación de memoria de largo termino 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 consolidacion de memoria de largo termino mas robusta, la cual tiene un efecto directo en el comportamiento. Creemos que el animal al sensor con las antenas genera expectativas de lo que va a ingerir y es la sorpresa positiva que siente lo que generaria un estado motivacional que predispone a una mayor retención de la experiencia. Por otro lado al comparar constante bajo con 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 consolidacion de la memoria de largo termino por mismatch negativo. La abeja al sentir frustrada su expectativa le resta importancia a la experiencia y en consecuencia la memoria no perdura tanto en el tiempo. Es interesante haber observado que no solo es importante que haya contraste o mismatch para generar un efecto diferencial en el comportamiento, sino tambien la valencia del mismatch, siendo la valencia positiva una que genera un mayor efecto diferencial a las 24 hs. 48 hs luego de la etapa de aprendizaje se volvio a medir el PER, con el objetivo de analizar como se desarrollaba la memoria de largo termino en los distintos grupos. Contrariamente a lo observado a las 24 hs, no se observaron diferencias significativas entre los grupos constante alto y contraste positivo. Se puede deber a que el grupo contraste positivo habria llegado a un estado asintótico a las 24 hs mientras que el grupo constante positivo, con mayor margen, aumenta respecto a las 24 hs, reduciendo asi la brecha entre los grupos a las 48 hs. Por otro lado, los grupos constante bajo y contraste negativo presentaron diferencias significativas. Se pudo observar que la sorpresa negativa que sufre el animal tiene un efecto fuerte en la retencion o evocacion de la memoria a las 48 hs. Si bien la memoria del grupo constante bajo decae en el tiempo, la memoria del grupo contraste negativo lo hace a un ritmo mayor. A diferencia de lo observado a las 24 hs, es la valencia negativa la que genera un mayor efecto diferencial.

Bibliografia

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).