

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**



**EFFECTOS COMBINADOS DE COMPUESTOS SECUNDARIOS PRESENTES EN  
NÉCTARES SOBRE LAS HABILIDADES COGNITIVAS DE LA ABEJA  
DOMÉSTICA *Apis mellifera***

Tesina presentada para optar por el título de **Licenciado en Ciencias Biológicas** de la Universidad de Buenos Aires.

**Autor:** *Ignacio Luis Marchi*

**Director:** *Prof. Dr. Walter Marcelo Farina*

**Directora asistente:** *Dra. Florencia Palottini*

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Insectos Sociales. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (FCEN-UBA). Instituto de Fisiología, Biología molecular y Neurociencias (CONICET).

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Junio 2020

# Resumen

El alcaloide cafeína (CAF) y el aminoácido arginina (ARG) están presentes en los néctares florales y afectan el comportamiento de los insectos polinizadores. Puntualmente en la abeja *Apis mellifera*, estos compuestos mejoran la formación de memorias a corto y largo término (MCT y MLT, respectivamente), siendo aún desconocido el efecto de las mezclas de dichos compuestos sobre las habilidades cognitivas de la abeja melífera. En el presente estudio se evaluó el aprendizaje asociativo y la retención de memorias utilizando un condicionamiento olfativo clásico basado en la respuesta de extensión de probóscide (REP) donde los animales fueron entrenados a asociar un olor con una recompensa que ofrecía solución azucarada con trazas de CAF, ARG o mezclas de CAF-ARG a distintas concentraciones. La sobrevida de los individuos luego del entrenamiento también fue cuantificada. Los resultados indican que: a) El desempeño durante el entrenamiento olfativo se incrementa para los tratamientos con CAF y ARG y para la mezcla más concentrada de CAF-ARG (GLMM:  $P < 0,05$ ). b) La MCT aumenta solamente en aquellos tratamientos que ofrecen mezclas de CAF-ARG en ambas concentraciones (GLM:  $P < 0,05$ ), observándose además una tendencia de una mayor respuesta condicionada (RC) para ARG y CAF presentadas individualmente en todas las concentraciones. c) La MLT aumenta exclusivamente en los tratamientos que ofrecen las mezclas de CAF-ARG, en ambas concentraciones (GLM:  $P < 0,05$ ), visualizándose un aumento notable, aunque no significativo, en la respuesta a CAF para la mayor concentración y a ARG para ambas concentraciones. d) La supervivencia se incrementa significativamente sólo para aquellas abejas expuestas a la mezcla CAF-ARG más concentrada (GLM:  $P < 0,05$ ). En conclusión, si bien cada uno de estos compuestos facilitan el aprendizaje asociativo en abejas, se observan efectos sinérgicos de las mezclas manifestados en la formación de memorias estables y prolongadas, así como individuos más saludables durante el ensayo.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, aprendizaje olfativo, adquisición, supervivencia, compuestos traza, cafeína, arginina.

# Combined effects of secondary compounds present in nectars on the cognitive abilities of the honeybee *Apis mellifera*

## Abstract

The alkaloid caffeine (CAF) and the amino acid arginine (ARG) are present in nectars of some flower species and affect the behavior of insect pollinators. In the honeybee *Apis mellifera*, these compounds improve the formation of short and long-term memory (STM and LTM, respectively); however, the effect of the mixtures of these compounds on the cognitive abilities of the honeybee is still unknown. In the present study, acquisition and memory retention are evaluated, using a classical olfactory conditioning based on the proboscis extension response (PER) where harnessed bees were trained to associate an odor with a reward, which offered sugar solution with traces of CAF, ARG or CAF-ARG mixtures at different concentrations. The survival of the individuals was also quantified after the PER assays. The results indicate that: a) The training performance is increased by the treatments with CAF, ARG and the one containing the most concentrated mixture of CAF-ARG (GLMM:  $P < 0.05$ ). b) STM increases only in those treatments that offered CAF-ARG in both concentrations (GLM:  $P < 0.05$ ), there is also a trend of a higher conditioned response (CR) for ARG and CAF in all concentrations. c) The LTM increases exclusively for those treatments offering CAF-ARG combinations (GLM:  $P < 0.05$ ), visualizing a notable increase, although not significant, in the response to CAF for the highest concentration and ARG for both concentrations. d) Survival is significantly increased only for bees exposed to the most concentrated CAF-ARG mixture (GLM:  $P < 0.05$ ). Despite each of these compounds facilitates associative learning in bees, the present study reports synergistic effects of the given compounds expressed in the formation of long and stable memories, as well as the healthiest individuals during the assay.

**Key words:** *Apis mellifera*, olfactory learning, acquisition, survival, trace compounds, caffeine, arginine.

# Índice

## **1 Introducción:**

1.1 Un insecto social.....	6
1.1.1 Importancia económica y ecológica de <i>A. mellifera</i> .....	9
1.1.2 Recolección de recursos y polinización.....	10
1.1.3 Danza de reclutamiento.....	12
1.1.4 Importancia de las claves olfativas en el contexto recolector.....	14
1.2 Aprendizaje.....	
1.2.1 Aprendizaje asociativo.....	14
1.2.2 Sustratos y procesos que subyacen al aprendizaje asociativo.....	16
1.2.3 Formación de la memoria.....	20
1.2.4 Fenómeno de extinción.....	21
1.2.5 La respuesta de extensión de la probóscide en <i>Apis mellifera</i> .....	22
1.2.6 Condicionamiento olfativo clásico basado en la REP.....	22
1.3 Compuestos presentes en néctares, cafeína y arginina.....	23

## **2 Hipótesis y objetivos.....**

## **3 Materiales y métodos:**

3.1 Sitio de estudio, animales y compuestos químicos utilizados.....	25
3.2 Condicionamiento olfativo clásico.....	26
3.2.1 Captura y Encepeado.....	26
3.2.2 Entrenamiento.....	26
3.2.3 Tratamientos.....	27
3.2.4 Evaluación de la respuesta condicionada: Retención a corto término.....	28
3.2.5 Evaluación de la respuesta condicionada: Retención a largo término.....	28
3.3 Sobrevida en el dispositivo REP.....	28
3.4 Análisis estadístico.....	29

#### **4 Resultados:**

4.1 Adquisición.....	30
4.2 Retención a corto término.....	34
4.3 Retención a largo término.....	36
4.4 Sobrevida en el dispositivo REP.....	37

#### **5 Discusión:**

5.1 Adquisición.....	39
5.2 Retención a corto término.....	41
5.3 Retención a largo término.....	42
5.4 Sobrevida en el dispositivo REP.....	43
5.5 Conclusiones generales e implicancias.....	44

#### **6 Referencias bibliográficas.....**

48

# 1 Introducción:

## 1.1 Un insecto social

La abeja *Apis mellifera* L. es un insecto social del orden Hymenoptera (familia: Apidae), apodado con el nombre común de abeja melífera o doméstica. De las 20.000 especies de ápidos descritos, la abeja doméstica es la de mayor distribución en el mundo (Michener 1974). Su principal alimentación reside en los néctares y pólenes de ciertas flores (Figura 1.1a) por lo que está presente en todos los hábitats donde existen angiospermas (plantas con flor), ausentándose exclusivamente en el territorio antártico (Michener 1974). Existen registros históricos de su domesticación por parte del ser humano con 4.400 años de antigüedad, y otros que reportan sobre la utilización de recursos provenientes de colmenas salvajes que se remontan hasta 9.000 años atrás (Roffet-Salque *et al.* 2015). Originaria de África y luego naturalmente dispersa por Asia y Europa, la abeja melífera fue introducida por los hombres europeos (Figura 1.1b) en el resto de los continentes a partir del siglo XV como resultado de su expansión colonialista (Whitfield 2006). Existen más de 30 líneas genéticas en la actualidad, pero *Apis mellifera ligustica*, proveniente de Italia es la raza domesticada más adecuada para ambientes templados-húmedos (Michener 2000).

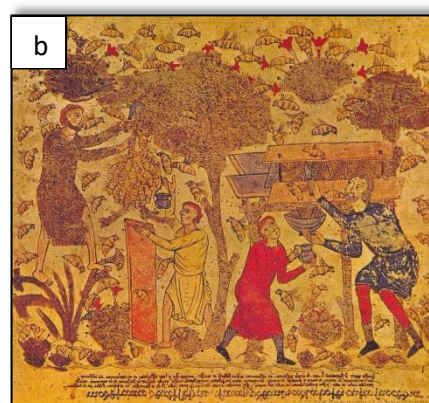
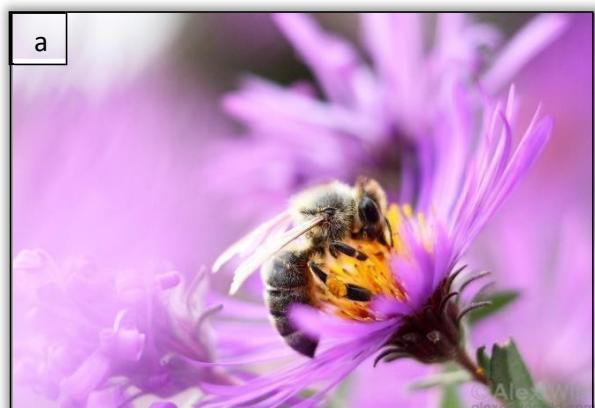


Figura 1.1 **a)** Abeja melífera libando de una flor compuesta (*Symphyotrichum novae-angliae*). **b)** Ilustración de monjes benedictinos, durante el s.XI, realizando diversas tareas como apicultores (Woods 2012).

La especie *Apis mellifera* es considerada un insecto eusocial; es decir, que presenta división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de la cría y solapamiento de las generaciones de individuos que contribuyen en las distintas tareas (Wilson y Hölldobler 2005). Típicamente, cohabitan en un mismo nido tres

castas: una única reina, entre 10.000 y 60.000 abejas obreras y, según la época del año, entre ninguno y varios cientos de zánganos (Wilson 1971) ([Figura 1.2a](#)).

Los nidos se pueden ubicar, naturalmente, en el interior de cavidades (árboles, rocas, etc.) y en el caso de abejas domesticadas en colmenas artificiales hechas de madera, las cuales pueden ser fácilmente manejadas y trasladadas por el hombre ([Figura 1.3a](#)).

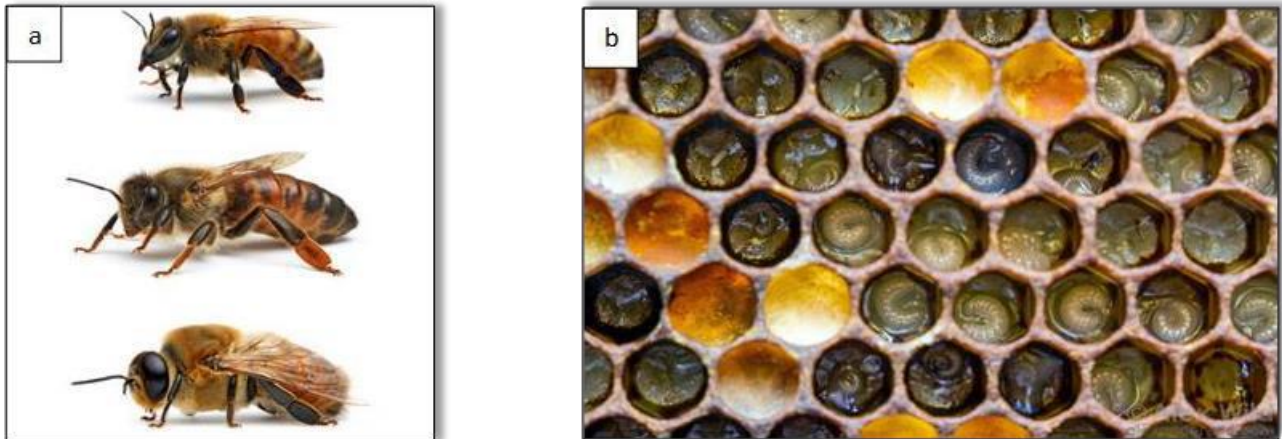
Tanto los nidos naturales como artificiales están conformados por panales, estructuras planas con cavidades hexagonales elaboradas con cera secretada por glándulas abdominales presentes en las abejas adultas ([Figura 1.2b](#)).

Cada panal está constituido a su vez por dos capas planas de celdas hexagonales, las cuales tienen aberturas hacia ambos lados. En condiciones naturales un nido posee en promedio 100.000 celdas distribuidas en media docena de panales, estructuras que permiten almacenar 20 o más kilogramos de miel y 20.000 crías en desarrollo (Winston 1987). Vale aclarar que las abejas son insectos holometábolos, es decir que presentan metamorfosis verdadera. Los diferentes estadios se denominan huevo, larva, pupa y adulto. En particular, las larvas requieren de atentos cuidados por lo que son situadas en lugares específicos de la colmena, en los cuales se las alimenta, higieniza y protege de abruptos cambios ambientales ([Figura 1.2b](#)).

La abeja reina es la única hembra fértil de la colonia. Una vez fecundada durante el vuelo nupcial, por varios machos, es capaz de depositar miles de huevos por día, durante un periodo de 2 a 5 años, lo que garantiza el crecimiento poblacional y la supervivencia de la colonia por tiempos prolongados. Además, a través de sus feromonas, es la principal responsable de mantener la cohesión comportamental y reproductiva de la colonia, la cual es necesaria para la coordinación de la labor social (Seeley 1995).

Los zánganos, es decir los machos que son producto de la reproducción partenogenética, la cual se desarrolla exclusivamente con la dotación genética de la reina, constituyen el otro grupo reproductivo, y su única función es aparearse con hembras vírgenes de otras colonias, luego de lo cual mueren.

La casta no reproductiva de la colonia está constituida por las hembras estériles, las obreras. Estas son hijas de la reproducción sexual entre la reina y los zánganos al producirse la cópula durante el vuelo nupcial. Las obreras muestran un alto grado de coordinación y, a su vez, de descentralización de las tareas que realizan dentro y fuera del nido (Lindauer 1961; Winston 1987; Seeley 1995).



**Figura 1.2 a)** Fotografía de las distintas castas presentes en un nido: obrera, reina y zángano (de arriba hacia abajo). **b)** Panal observado desde un lado, donde se pueden apreciar las larvas desarrollándose en el interior de las celdas.

Esta coordinación operativa es posible debido a la progresión secuencial de tareas que realizan conforme avanzan en edad, fenómeno al que se lo denomina polietismo etario (Lindauer 1961; Seeley 1982; Johnson 2010). Las primeras labores de las abejas adultas se desarrollan dentro del nido durante 21 días aproximadamente. Al comenzar, cumplen el rol de nodrizas, dedicándose a la limpieza y construcción de los panales de cera y a la alimentación de las crías de edad avanzada con una mezcla de polen y miel. También sellan celdas, atienden a la reina, acicalan y alimentan a otras compañeras. Estas actividades se extienden por diez días, aproximadamente, para luego ubicarse en el centro del nido, lugar donde se almacena el alimento de la colonia. Allí participan de la recepción y el procesamiento del néctar recolectado en las flores por sus hermanas, hasta que el mismo alcanza cierto porcentaje de humedad, y lo depositan en celdas para terminar de convertirlo en miel. Parte del polen almacenado en celdas por las recolectoras, fermenta, dando lugar al pan de abeja, alimento proteico de los adultos y en particular de las larvas. Además, ventilan el nido y colaboran protegiendo la entrada de éste en su rol de obreras guardianas. Como última tarea, a partir de los 20 días de edad aproximadamente, las obreras salen del nido y se dedican a la recolección de néctar, polen, agua o resinas, en un lapso promedio de 15 días hasta que mueren (Park 1925; Seeley 1982).

El modo en que se organizan estas sociedades de insectos ha sido de gran interés en el área de la biología del comportamiento y de la fisiología animal. Desde lo comportamental, se ha descubierto que, si bien la edad de las obreras y las actividades que llevan a cabo están bastante correlacionadas, dichas actividades pueden adaptarse a las necesidades de la colonia, las cuales a su vez, dependen de condiciones externas a la colmena (Seeley 1995; Robinson 1992). Un ejemplo de esto es el comportamiento de las abejas recolectoras que se encuentra afectado por la cantidad de reserva de alimento (polen: Fewell y Winston 1992; néctar: Rinderer y Baxter 1978) y la cantidad de cría dentro de la colmena. Fuera de la colmena, el comportamiento recolector



se ve afectado por la productividad de los recursos disponibles en el entorno, situación que afecta el número de abejas recolectoras activas (Lindauer 1955; von Frisch 1967; Seeley 1995).

### 1.1.1 Importancia económica y ecológica de *A. mellifera*

La domesticación milenaria de esta especie viene dada por su capacidad de fabricar miel, entre otros productos como lo son la cera, la jalea real (sustancia con la que se alimenta a las futuras reinas) y el propóleo. La miel resulta un producto comercial ampliamente consumido y tiene un fuerte mercado asociado. A nivel local, se puede afirmar que Argentina es el segundo exportador detrás de China, además de ser el tercer productor mundial. El sector apícola argentino registra 2.400.000 colmenas aproximadamente (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 2019).

Los productos de la colmena son, sin lugar a duda, beneficiosos para el ser humano, pero estos son de un valor sustancialmente menor al del impacto que genera *A. mellifera* como agente polinizador en los agroecosistemas. La abeja doméstica se ha transformado en el polinizador más importante de cultivos a escala mundial, llegando a polinizar hasta el 70% de los mismos (McGregor 1976; Watanabe 1994; Nabhan y Buchmann 1997; Aizen *et al.* 2009). En las últimas décadas se incrementó de tal manera la superficie cultivada dedicada a la agricultura intensiva, que los polinizadores nativos resultan insuficientes para satisfacer la demanda de los cultivos por polinización entomófila (Aizen *et al.* 2008, 2009). Es por ello que en muchos casos se utilizan servicios de polinización, mediante los cuales se colocan colmenas en los bordes de los cultivos durante la floración para garantizar la adecuada polinización (Klein *et al.* 2007) (Figura 1.3b). Este servicio es de gran relevancia en EE. UU. y Europa, así como en otros países desarrollados y es considerado de altísima importancia para mejorar los rendimientos de frutales y semillas (Free 1993).



**Figura 1.3 a)** Colmena comercial con nido de *Apis mellifera*. **b)** Servicio de polinización con colmenas en cultivo de almendro (*Prunus dulcis*).

A pesar de haber ocurrido un aumento neto en la cantidad de colmenas a nivel global, el mismo no se corresponde con el crecimiento del área de cultivo dependiente de polinización entomófila, el cual aumentó un 160% en los últimos 60 años (Aizen *et al.* 2009). De continuar dicha tendencia es esperable una falta de agentes polinizadores y, por ende, una caída en el rendimiento de estos sistemas productivos, lo cual podría culminar en una baja en la disponibilidad de alimento para la humanidad.

Si bien las razones por las que se produce este fenómeno de bajas poblacionales son diversas, todas comparten la naturaleza de su causa originaria: la propia actividad humana. Dentro de las principales causantes se encuentran la pérdida y fragmentación del hábitat (Winfrey *et al.* 2009; Brosi *et al.* 2008); la aplicación de insecticidas de amplio espectro (Rortais *et al.* 2005; Alston *et al.* 2007; Goulson *et al.* 2015); la aplicación de herbicidas como el glifosato, el cual afecta la navegación en abejas (Balbuena *et al.* 2015) y las habilidades cognitivas relacionadas con la capacidad de aprender olores florales (Herbert *et al.* 2014; Farina *et al.* 2019); la escasa diversidad de recursos florales, producto del avance de las técnicas de monocultivo (Baude *et al.* 2016; Biesmeijer *et al.* 2006; Goulson *et al.* 2015); la expansión de patógenos producto del traslado de colmenas o trashumancia (Cox-Foster *et al.* 2007), siendo el ácaro *Varroa destructor* el más perjudicial de todos ellos (De la Rúa *et al.* 2009; Rosenkranz *et al.* 2010).

### **1.1.2 Recolección de recursos y polinización**

La facilidad con que la abeja melífera ha logrado adaptarse a los tan variados ambientes en los que habita se debe, mayormente, a sus estrategias de recolección y a su amplio espectro de consumo, ya que se la considera una especie generalista. Además, se trata también de una especie con una fuerte adaptación anatómica a la recolección de recursos florales, dado que posee una estructura bucal tubular apta para la ingestión de néctar, además de un buche capaz de almacenar grandes cantidades de líquido (en relación con el volumen total de su cuerpo). Presenta además estructuras capaces de atrapar y almacenar el polen, como lo son su amplia pilosidad corporal y las corbículas (cavidades ubicadas en el tercer par de patas), especializadas en esta función ([Figura 1.4a](#)). Tal como se mencionó, se alimentan de una gran diversidad de flores obteniendo de ellas polen y néctar. Si bien el polen les brinda lípidos, carbohidratos y vitaminas, este supone una fuente crucial de proteínas (Hügel 1962; Vanderplanck *et al.* 2014). La incorporación de estas sustancias resulta crucial para la reproducción, el crecimiento, el sistema inmune y la longevidad de los individuos (Day 1990). Existe evidencia científica que sugiere que el alto contenido proteico del polen podría

ser detectado por especies poliléticas (que se alimentan de distintos pólenes) dado que algunas especies, como los abejorros, recolectan pólenes con alta cantidad de proteínas de manera diferencial (Nicolson 2011).



**Figura 1.4 a)** Abeja recolectora cubierta de polen, el cual se adhiere a los pelos que recubren buena parte de su cuerpo y particularmente a sus corbículas ubicadas en el tercer par de patas. **b)** Abejas realizando trofalaxia en el interior de la colmena, este proceso está implicado tanto en la transferencia de néctar para su posterior almacenamiento como de información sobre una fuente de néctar.

El néctar se trata de una solución acuosa capaz de contener una gran diversidad de distintos compuestos, entre los que predominan los azúcares. El más común de ellos es la sacarosa, encontrándose en concentraciones que van desde el 0,3 a 2,5 M dependiendo, fundamentalmente, de la especie vegetal (Kearns y Inoyne 1997). Además de ser una fuente de carbohidratos de rápida digestión, los néctares contienen una amplia variedad de aminoácidos, muchos de los cuales resultan esenciales para la dieta de las abejas. Estos suelen encontrarse en concentraciones que varían entre los 49  $\mu\text{M}$  y los 25 mM (Baker 1973), los cuales también varían ampliamente en su diversidad y concentración dependiendo de la especie y el estado del individuo vegetal. Estos recursos son almacenados y procesados en el interior del nido para ser consumidos durante el otoño e invierno, períodos donde no hay floración o la misma está en una muy baja proporción por lo que resulta crucial el intenso y eficaz acopiamiento de polen y, fundamentalmente, néctar para la continuidad de la colonia.

La mayor ventaja de esta especie de abeja frente al resto de los polinizadores viene dada por la forma en la que buscan y recolectan recursos, ya que dichas actividades se realizan de una manera colectiva y coordinada, lo que requiere de la transferencia de información entre los miembros de la colonia para el reclutamiento de individuos hacia la/s fuente/s descubierta/s (Couvillon *et al.* 2015). De este modo, las claves visuales, olfativas, gustativas, acústico-vibratorias y mecano-sensoriales son de suma importancia tanto para la recolección como para la transmisión de la información relacionada con la fuente de alimento que está siendo explotada. Durante la búsqueda de recursos las abejas son capaces de percibir formas (Srinivasan 1994; Giurfa y Lehrer 2001); de estimar distancias recorridas (Srinivasan *et al.* 1997); así como también de distinguir una amplia gama de olores (Gerber *et al.* 1996). En su contexto natural, las abejas poseen la habilidad de

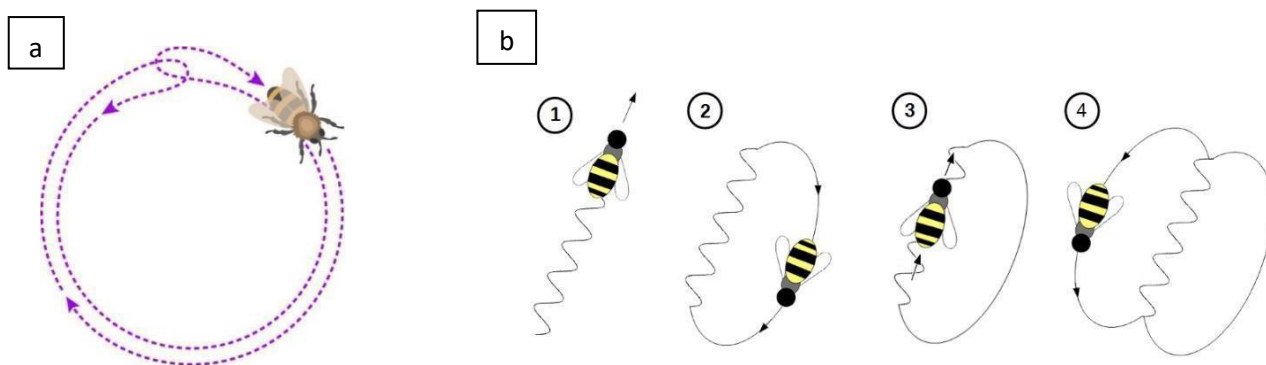
aprender y memorizar claves (visuales, olfativas, etc.) características de los lugares de interés, como la colonia o sitios de recolección de alimento (Menzel 1985; Menzel *et al.* 1999).

### 1.1.3 Danza de reclutamiento

Al regresar de una fuente de alimento productiva, cada abeja recolectora puede desplegar un comportamiento estereotipado denominado danza de reclutamiento, la cual actúa como una señal que ofrece distintas modalidades sensoriales simultáneas (acústica-vibratoria: Michelsen 2003; táctil: Rohrseitz y Tautz 1999; olfativa: Thom *et al.* 2007, Díaz *et al.* 2007). La danza de las abejas atrae a sus congéneres que se encuentran en el área de descarga de alimento dentro de la colmena y próxima a la entrada. Las abejas seguidoras mantienen un recorrido por detrás de la danzarina (Michelsen *et al.* 1999) y ocasionalmente, frente a ella (Díaz *et al.* 2007).

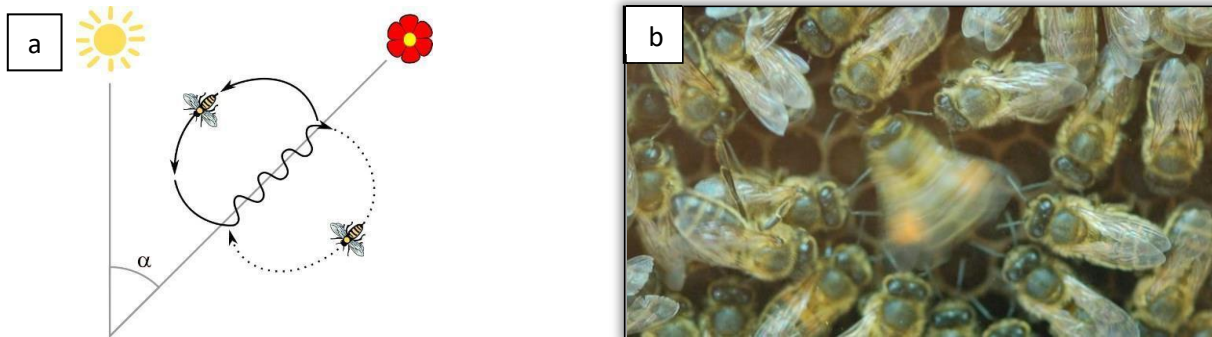
Existen varios patrones motores que se pueden categorizar como danza. Los dos recorridos más conspicuos y conocidos son la danza circular y la danza de contoneo (von Frisch 1967). La danza circular es más simple y “desorganizada”; no comunica información precisa de dirección, aunque se sugiere que podría estar brindándola (Kirchner *et al.* 1998; Gardner *et al.* 2008), informando a las obreras que hay una fuente de alimento en las proximidades del nido. La danzarina realiza repetidamente pequeños círculos, cambiando de dirección luego de completar cada círculo (Figura 1.5a).

La danza de contoneo, en cambio, representa un patrón más complejo y brinda información más precisa sobre la fuente de recursos (von Frisch 1967). En ésta, las abejas realizan un despliegue estereotipado que consiste en una caminata hacia adelante en línea recta por una distancia corta, mientras el abdomen se sacude intensamente. Luego la abeja recorre un semicírculo retornando al punto de partida, repite el contoneo en línea recta y culmina el círculo de baile con otro semicírculo en la margen opuesta (Figura 1.5b)



**Figura 1.5.** **a)** Esquemas de danza circular. **B)** Esquema de la danza de contoneo que muestra las 4 etapas que conforman al círculo completo que recorre dicha danza, en las fases 1 y 3 se produce el paso de contoneo que da el origen al nombre de este comportamiento y cuya duración brinda información sobre la distancia de la fuente de alimento.

La duración de la fase de contoneo brinda información acerca de la distancia en la que se encuentra la fuente de alimento descubierta, mientras que la orientación del cuerpo de la danzarina respecto a la gravedad provee información sobre la dirección en la que está la fuente de alimento en relación con la posición del Sol (von Frisch 1967; [Figura 1.6a](#)).



**Figura 1.6 a)** Esquema del ángulo que reproducen las abejas recolectoras respecto al eje vertical (gravedad) durante la danza de contoneo que corresponde al ángulo entre la fuente de alimento y el Sol, tomando a la colmena como vértice (fase contoneo). **b)** Fotografía de una abeja danzando, siendo seguida por un grupo de hermanas dentro de la colmena con sus antenas extendidas apuntando hacia ella.

Tanto en la danza circular como en la de contoneo, la abeja danzarina se detiene y realiza un comportamiento a través del cual comparte el alimento que trae en su buche (trofalaxia), permitiendo que sus compañeras de nido “prueben” el alimento de la fuente que está siendo explotada y, a su vez, descargando el buche para ir en busca de más alimento (von Frisch 1967; Rohrseitz y Tautz 1999; Díaz *et al.* 2007) ([Figura 1.4b](#)). Mientras todo esto ocurre, la abeja danzarina es seguida de cerca por un grupo de abejas con sus antenas extendidas ([von Frisch 1967](#)) ([Figura 1.6b](#)).

La colmena, entonces, podría pensarse como un centro de información: los individuos comparten y comparan las características de las distintas fuentes de alimento que están siendo explotadas en un determinado momento (Núñez 1982; Farina 1996; Seeley 1995). Más obreras pueden ser reclutadas hacia nuevas fuentes de alimento o incluso, las que están en actividad, cambiar de fuente hacia otra más productiva. A pesar de que una obrera podría recolectar alimento en 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 actualiza la información dentro del nido (Biesmajer y Seeley 2005).

#### **1.1.4 Importancia de las claves olfativas en el contexto recolector**

Durante los vuelos de recolección, las abejas melíferas aprenden claves olfativas de las flores que visitan, lo que les permite orientarse y encontrar el recurso en los sucesivos ciclos recolectores (von Frisch 1923; Lindauer 1961; Seeley 1995). A su vez, las abejas que se encuentran dentro del nido también pueden aprender un olor floral particular tanto a través de la trofalaxia (Farina *et al.* 2005; Grüter *et al.* 2006; Farina *et al.* 2007) como de las moléculas de olor que las abejas recolectoras traen impregnadas en su cuerpo luego de libar en una flor. En este sentido, la danza parece ser relevante para la transmisión de olores asociados a dichas fuentes (von Frisch 1923, 1967; Diaz *et al.* 2007; Balbuena *et al.* 2012); los sonidos, vibraciones y la direccionalidad de la danza van acompañados de estos olores florales que, en algunos casos, pueden ser estímulos suficientes para la activación de la recolección (von Frisch 1923).

### **1.2 Aprendizaje**

Los animales son capaces de percibir el ambiente que los rodea gracias a distintas modalidades sensoriales, por lo que existe un filtrado de la información que ellos reciben del mismo.

En un primer término el filtro viene dado por las estructuras de los aparatos sensoriales del animal y en una segunda instancia por un relevo de la información que estos logran captar, lo cual ocurre en los centros de cómputo propios del sistema nervioso. Una vez internalizada la información, esta puede ser almacenada en el sistema nervioso central. Dado que allí existen circuitos de refuerzo y rechazo a ciertos estímulos es que los animales logran identificar eventos como positivos, neutros o negativos para su propio bienestar (Søvik 2015). En ese contexto, las experiencias previas permiten diferenciar los estímulos relevantes de aquellos que no lo son. De esta manera, la habilidad de aprender se da en casi todos los animales y es a través del aprendizaje que pueden generar reglas que les permiten anticiparse a los eventos de potencial interés que ocurren a su alrededor (Pavlov 1927; Kandel *et al.* 1992).

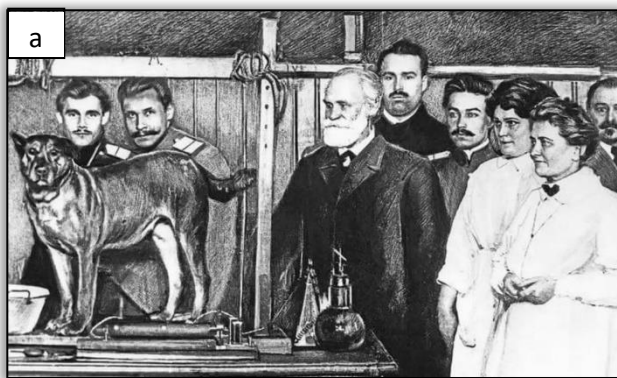
#### **1.2.1 Aprendizaje asociativo**

El aprendizaje asociativo, tal como lo anticipa su nombre, es producto de una asociación entre dos o más estímulos concomitantes. Este tipo de asociaciones permite establecer relaciones predictivas entre eventos que coexisten en el ambiente y de este modo reducen la incertidumbre del animal frente al mismo (Mackintosh 1994).

Suelen distinguirse dos clases de aprendizaje asociativo: el condicionamiento clásico (Pavlov 1927) y el condicionamiento operante (Skinner 1938). En el condicionamiento clásico, los animales aprenden a asociar un estímulo inicialmente neutro, que en un principio carece de significado biológico (estímulo condicionado - EC) con uno biológicamente relevante (estímulo incondicionado - EI), el cual es capaz de generar por sí mismo una respuesta conspicua en el individuo y, en muchos casos, refleja (respuesta incondicionada - RI).



Al generarse un vínculo entre ambos estímulos durante el condicionamiento el animal es capaz de anticipar su respuesta (respuesta condicionada - RC) con la sola presentación del estímulo neutro. Uno de los primeros investigadores en desarrollar y formalizar un protocolo experimental para estudiar las propiedades del condicionamiento clásico (o simple) fue el fisiólogo Ivan Pavlov. En condiciones controladas de laboratorio y utilizando el perro como modelo experimental, Pavlov demostró que la presentación repetida del sonido de una campana (EC, a priori neutro para los sujetos experimentales) seguido de alimento (EI, que generaba por sí mismo una respuesta innata de salivación), era suficiente para desencadenar, posteriormente, la salivación ante la sola presentación del sonido y en ausencia del alimento ([Figura 1.7a](#)). Sin embargo, Pavlov no fue el único en observar este tipo de condicionamiento. El zoólogo Karl von Frisch ([Figura 1.7b](#)) ya había observado que tanto los peces como las abejas melíferas podían discriminar estímulos visuales recompensados de otros no recompensados (von Frisch 1911, 1915).



**Figura 1.7** Condicionamiento clásico. **a)** Ivan Pavlov (centro) y colaboradores junto al dispositivo empleado para estudiar las propiedades del condicionamiento clásico con su sujeto experimental (un perro). **b)** Karl von Frisch, pionero en el campo de las ciencias del comportamiento en abejas.

Por otro lado, el condicionamiento operante (Skinner 1938) es aquel mediante el cual los sujetos experimentales aprenden a asociar un comportamiento propio con una recompensa; es decir, ante un estímulo se produce una respuesta, que puede ser reforzada de manera positiva o negativa, provocando que la conducta, llamada respuesta operante, se fortalezca o debilite. El clásico experimento de “la caja de Skinner” ilustra este tipo de condicionamiento. Esta experiencia mostró que una rata era capaz de aprender a accionar una palanca (respuesta operante) para obtener alimento (refuerzo positivo), y que, a través de los sucesivos eventos de entrenamiento, el individuo era capaz de aprender a vincular que su respuesta motora promovía la obtención del refuerzo.

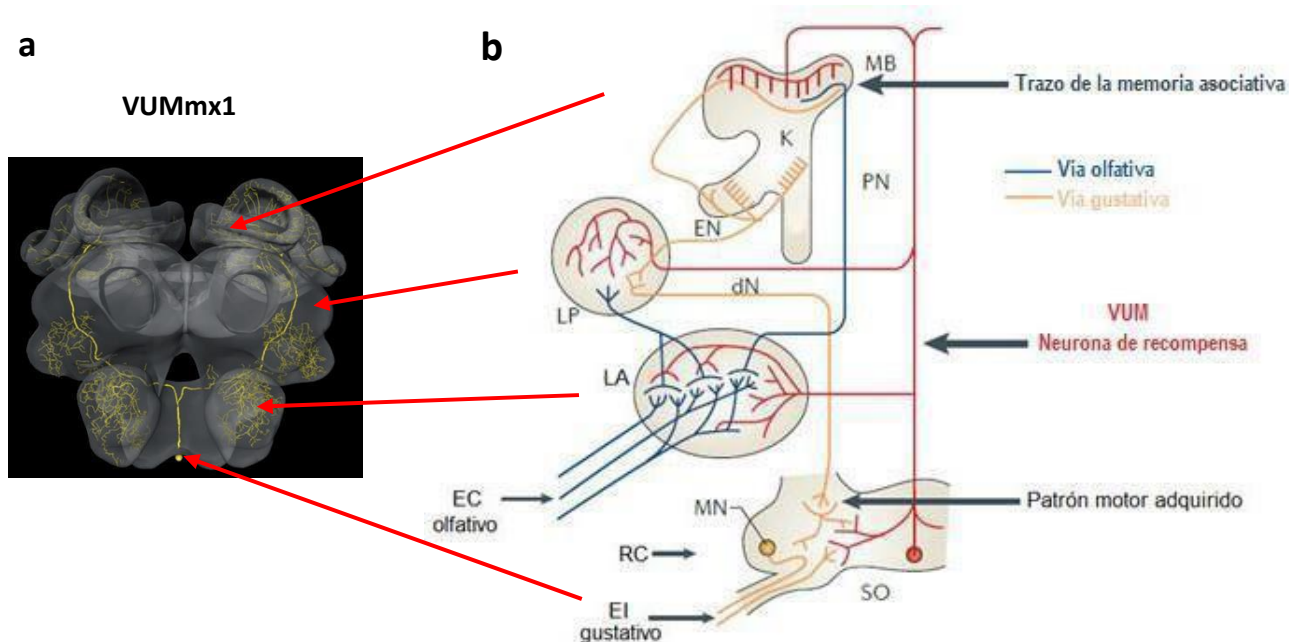
### **1.2.2 Sustratos y procesos que subyacen al aprendizaje asociativo**

El aprendizaje y la formación de memorias tienen como sustrato físico a las redes neuronales que los animales poseen dentro de regiones específicas de su sistema nervioso central (Ebbinghaus 1964). Los eventos de aprendizaje asociativo de naturaleza apetitiva, en particular, tienen tres vías neuronales necesarias para su ocurrencia, siendo dos de “entrada” y una de “salida”. Las vías de entrada reciben información proveniente del exterior y la transmiten hasta el cerebro, donde terminan por asociarse (Ammari 1977). Estas dos vías se corresponden con el EI (propia del sistema de recompensa) y con el EC (propia del sistema sensorial que lo perciba) (Ammari 1977). La información en ambos casos es recibida al acoplarse una molécula a un receptor de membrana, y luego es transformada y transmitida a través de reacciones moleculares y eléctricas a lo largo de los circuitos neuronales involucrados. Ambas vías, si bien se activan de manera independiente, terminan por conectarse mutuamente en regiones específicas del cerebro, donde se puede dar la asociación entre ellas (Hasselmo 1995)

En el caso de los insectos esta conectividad tiene lugar por medio de interneuronas, impares, y en general octopaminérgicas, que conectan distintos centros de procesamiento olfativo con vías quimio-receptivas de contacto o gustativas. Una de las interneuronas conectoras más estudiadas es la VUMmx1 (Hammer 1997) que puede vincular el ganglio subesofágico, los lóbulos antenales, el protocerebro lateral y los cuerpos pedunculados, sustrato cerebral en donde se completa la integración sensorial multimodal. Es allí donde se integran las vías propias del EC y el EI junto con otras vías que se corresponden con las vías motoras de “salida”, lo cual permite una respuesta mecánica automatizada (RC) (Ammari 1977)

Es así como al presentar un estímulo condicionado, el cual no generaba ninguna respuesta fenotípica apreciable previo al entrenamiento, se logra producir un comportamiento automatizado en el animal una vez que se formó la asociación entre las vías involucradas (Figura 1.8).





**Figura 1.8** Representación esquemática de la conectividad neuronal relacionada con un aprendizaje apetitivo del tipo olfatorio en la abeja *Apis mellifera* (Menzel 2012), donde se asocia un aroma (EC, por la vía olfatoria) con una recompensa de solución azucarada (EI, por la vía de recompensa) y se logra desencadenar una respuesta motora de extensión de la probóscide (RC, mediante la vía de salida a través de las neuronas efectoras). **a)** Representación del cerebro de *A. mellifera* remarcando en amarillo la interneurona octopaminérgica VUMmx1, la cual conecta distintos centros de procesamiento relacionados y cuyo soma se encuentra en el ganglio subesofágico (SO), del cual surgen vías eferentes (motoneuronas, MN) que participan en la extensión de la probóscide (indicado en figura de la derecha). **b)** Esquema de las estructuras cerebrales y sus conectividades vinculadas al trazado de la memoria olfativa, donde se representa uno de los hemisferios del cerebro de *A. mellifera*. Lóbulos antenales (LA), son centros de procesamiento de información olfativa y gustativa que poseen algunos insectos; las células Kenyon (K) son un grupo de neuronas dentro de los cuerpos pedunculados (MB, *mushroom bodies* en inglés) asociadas a distintos tipos de aprendizaje y VUMx1 (aquí marcada en rojo) es una neurona cuya función es transmitir información sobre la gustación de soluciones azucaradas desde el sistema de recompensa hasta los cuerpos pedunculados, los lóbulos antenales y el protocerebro lateral (LP). Las flechas rojas vinculan áreas de ambos gráficos. Existen otras vías conectivas entre los centros mencionados mediante neuronas de proyección (PN), interneuronas descendentes (dN) y neuronas extrínsecas (EN).

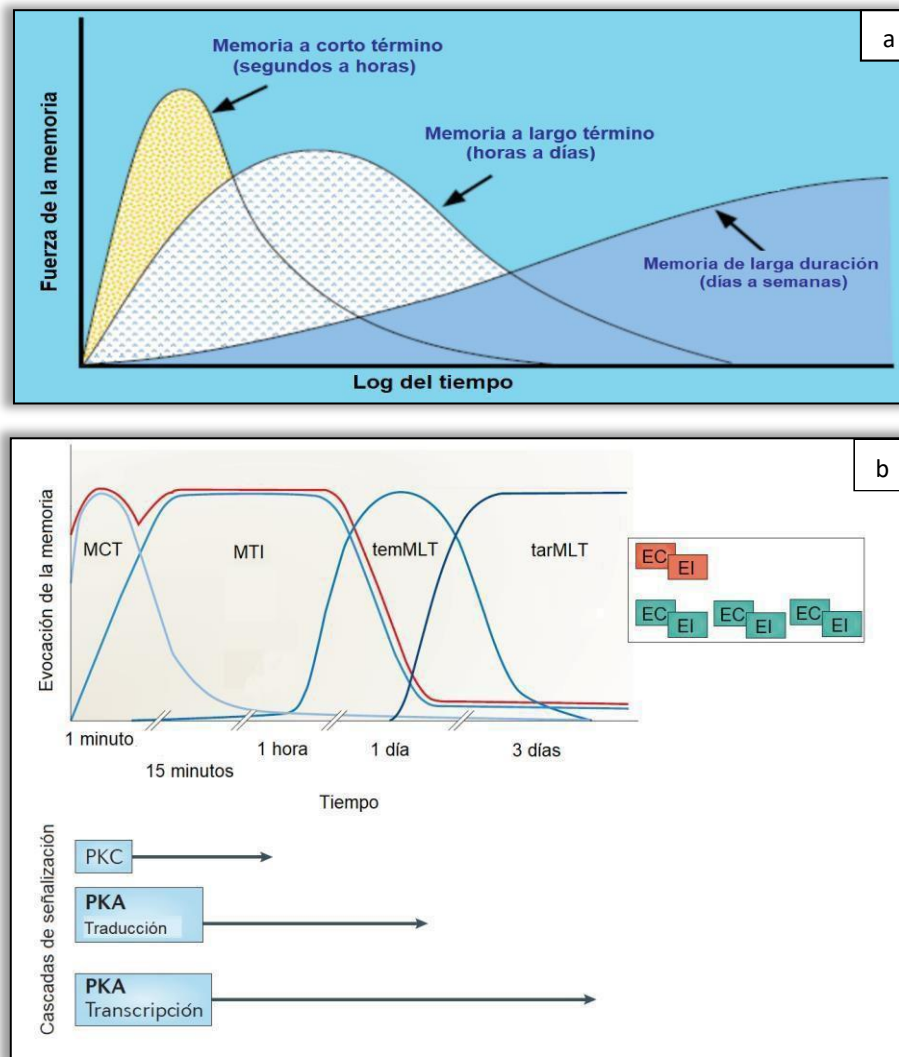
Esta concatenación de fenómenos se da por medio de la comunicación entre neuronas, las cuales son células especializadas en recibir y emitir información gracias a su excelente conductividad eléctrica (Ammari 1977). Su morfología se compone de un cuerpo celular, llamado soma; una o varias prolongaciones ramificadas que transmiten

información hacia el soma celular, denominadas dendritas; y una prolongación larga, denominada axón, el cual conduce los impulsos desde el soma hacia otra neurona u órgano diana (Ammari 1977)

El hecho de que las conexiones neuronales asociadas a ciertos comportamientos adquiridos puedan sostenerse en el tiempo se debe a procesos bioquímicos y transformaciones celulares específicas (Müller y Pilzecker 1900). La duración y naturaleza de estas conexiones dependen de una serie de reacciones químicas que transcurren a lo largo del tiempo. Dichas asociaciones neuronales no son más ni menos, que la representación física de las memorias de los animales. Estas pueden clasificarse en 2 grandes grupos: memorias de corto término (MCT) y de largo término (MLT). (Müller y Pilzecker 1900)

Tal como su nombre lo indica, estas tienen distintos tiempos de duración. Mientras que las MCT pueden durar desde segundos hasta varias horas, las MLT pueden durar varios días, meses o incluso años (dependiendo de la especie animal estudiada). Incluso algunos autores reconocen en organismos, como las abejas, una fase de memoria a término intermedio (MTI) en intervalos que van desde varios minutos hasta horas (Menzel 1999). Además, la fuerza de la memoria, es decir la capacidad de evocarla de manera fidedigna, tiene distintos niveles máximos para cada tipo de memoria, siendo mayores para las memorias a corto término y menores para las de largo plazo (Figura 1.9 a). El hecho de que una memoria pueda alcanzar una u otra cantidad de tiempo de duración depende de cómo haya sido el proceso de aprendizaje que la generó. Si el aprendizaje consiste en una única presentación en simultáneo de EC y EI, la durabilidad de su memoria en el tiempo será menor que si se aplica una seguidilla de eventos asociativos, pudiendo alcanzarse en este caso memorias estables de larga duración (Müller y Pilzecker 1900). En la Figura 1.9 b se demuestra dicho proceso, pero también queda explícito que es una misma memoria la que varía en el tiempo de acuerdo con cómo haya sido su proceso de adquisición. Es decir que las memorias de largo término son, de alguna manera, memorias de corto término que logran transformarse y consolidarse de forma tal de poder perdurar a lo largo del tiempo. (Müller y Pilzecker 1900)

En cualquier caso, la naturaleza de cada tipo de memoria tiene que ver fundamentalmente con sus propiedades bioquímicas y con su susceptibilidad a ser modificadas más que con ciertos límites de duración temporal. Aun así, los mecanismos moleculares involucrados en los distintos tipos de memoria no están del todo dilucidados y aún queda mucho por ser investigado.



**Figura 1.9** Representación de las distintas fases de la memoria. **a)** Esquema general de los distintos tipos de memoria, presentando la fuerza de cada una de ellas en función del log del tiempo (McGaugh 2000). Cada especie animal tiene distintos tiempos de duración asociados para cada fase o tipo de memoria. Aquí se ejemplifica el caso de un insecto como *A. mellifera*. **b)** Fases de la memoria bajo un protocolo asociativo en la abeja melífera (Menzel 2012). Aquí los picos de respuesta dada la fuerza de la memoria no están representados de forma proporcional entre uno y otro tipo de memoria, habría de ser menor a medida que las memorias aumentan su durabilidad. La línea roja demarca la posibilidad de evocación de la memoria generada por la presentación única de EC y EI a lo largo del tiempo, mientras que la línea azul la de aquella memoria producto de varias presentaciones seguidas. El término temMLT corresponde a una memoria de largo término temprana y tarMLT a una de tipo tardía. Abajo se marca la presencia de las cascadas de señalización participantes, las cuales involucran a las proteínas PKC y PKA a lo largo de la formación de los distintos tipos de memoria, en avance con el tiempo. También se indica que, en particular, PKA promueve los procesos de transcripción y traducción, relacionados con la síntesis proteica.

### 1.2.3 Formación de la memoria

El aprendizaje es capaz de generar recuerdos, pero estos no se producen de manera inmediata ni se mantienen invariables; más bien, se desarrollan con el tiempo y cambian sus propiedades. Cuando Hermann Ebbinghaus comenzó sus estudios sobre la memoria en humanos en 1885, descubrió que la formación de la memoria es un proceso lento y depende tanto de la cantidad de ensayos de aprendizaje administrados como del intervalo de tiempo existente entre ellos (Ebbinghaus 1964). Más tarde, James (1890) desarrolló el concepto de memoria primaria y secundaria, refiriéndose al tiempo limitado y la capacidad de información de la memoria primaria (MCT), y la duración y el contenido aparentemente ilimitados de la memoria secundaria (MLT) (James 1890). Alrededor del cambio de siglo, los psicólogos habían establecido un marco de pensamiento sobre las etapas de memoria secuencial, que fue capturado por la hipótesis de preservación-consolidación de Müller y Pilzecker el cual reza: los procesos neuronales subyacentes a los recuerdos recién formados inicialmente se preservan en una forma lábil y luego, con el paso del tiempo, se consolidan en huellas neuronales duraderas (Müller y Pilzecker 1900).

La formación de la memoria involucra un pasaje irreversible desde una fase lábil a una estable y duradera, resistente a disruptores (agentes amnésicos). Estos agentes son drogas capaces de intervenir en la formación de circuitos neuronales asociados a la memoria aún lábil producto de un aprendizaje reciente. Hoy día se sabe que incluso las memorias estables (de largo término) pueden llegar a ser modificadas en ciertas condiciones (Eisenhardt y Menzel 2006).

Estudios en ciertos invertebrados como *Aplysia*, *Hermisenda* y *Drosophila* han demostrado que la adquisición y retención de información a corto término no requieren de la síntesis de nuevas proteínas (Goelet 1986). Más bien, dependen de modificaciones en proteínas ya existentes dadas por la acción de segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros activan kinasas proteicas que fosforilan otras proteínas necesarias para realizar modificaciones plásticas neuronales. Dentro de esas proteínas kinasas se encuentra la proteína kinasa C (PKC) (Figura 1.9 b). La retención de estas transformaciones depende de la continuidad en la estimulación de las vías que forman parte de la pre-sinapsis neuronal (Goelet 1986).

De continuar estas modificaciones en las redes neurales mencionadas, se puede dar paso a una cascada de señales moleculares que activan la síntesis de proteínas, lo cual termina por generar una nueva conformación estructural en las dendritas post-sinápticas involucradas. Se conocen diversas enzimas kinasas que cumplen con esta función de activación, por ejemplo, PKA dependiente de AMP-cíclico (Lisman y Goldring 1988), PKC (Malinow *et al* 1989) y PKMz (Sossin *et al* 2008) (entre otras). A este fenómeno de plasticidad neuronal se lo conoce como potenciación a largo término (PLT) y se cree que es uno de los principales eventos que subyacen a la formación de memorias a largo término (MLT). La PLT implica, fundamentalmente, la modificación de las propiedades celulares de la neurona postsináptica, ampliando su capacidad de recibir los neurotransmisores que provienen de la neurona presináptica asociada. De ocurrir la PLT se desencadena en la célula postsináptica, entre otras cosas, un

aumento en la actividad y en la cantidad de receptores expresados en su superficie. De esa manera frente a algún estímulo que provenga de las vías presinápticas, por más que este sea relativamente pequeño, se podrá desencadenar una respuesta neuronal determinada en la post-sinápsis ya que esta se encuentra altamente receptiva.

Ha sido demostrado que interrumpir la PLT a través del agregado de ciertas drogas que inhiban alguno de los procesos involucrados en su generación, ya sea: síntesis proteica, receptibilidad de neurotransmisores asociados, etc., genera también una interrupción en la formación de memorias a largo término (Davis *et al.* 1992). A su vez, el agregado adicional de neurotransmisores asociados a receptores NMDA (involucrados en la potenciación de las vías neuronales de la memoria) genera un aumento en la capacidad de memorización, ya que refuerza la PLT (Luscher 2012; Ben-Ari *et al.* 1992). Esto va en línea con la teoría de la consolidación, la cual propone que en un principio las memorias son lábiles y susceptibles a modificación y que estas son capaces de perdurar en el tiempo sólo si transcurren una serie de pasos previos (los cuales requieren cierto tiempo de desarrollo).

Si el proceso que genera las sinapsis entre neuronas durante un protocolo asociativo, como el llevado adelante por la experiencia de Pavlov, fuera lo suficientemente intenso para activar la PLT y no se interrumpieran (o incluso se promovieran) la síntesis proteica y los fenómenos asociados a la potenciación, se podría formar una memoria a largo término que sea duradera (Abraham *et al.* 2008) y, en un principio, resistente a los agentes amnésicos ya nombrados.

#### **1.2.4 Fenómeno de extinción**

El fenómeno comportamental de extinción se define como un descenso en la respuesta condicionada (RC) resultado de presentar el EC repetidas veces sin asociarlo al EI (Pavlov 1927). Se piensa que esta disminución en la RC se debe a la formación de un nuevo aprendizaje ("el EC no es seguido por EI") lo que lleva a la extinción de la memoria original por un proceso de consolidación dependiente de síntesis proteica (Berman y Dudai 2001; Bouton y Moody 2004; Pedreira y Maldonado 2003). Entonces si un animal recibe un entrenamiento asociativo y luego se le presenta el estímulo aprendido, pero sin ningún refuerzo alguno, se desencadenan dos fenómenos comportamentales: la reducción de la RC y la estabilización de ésta. Cómo es que estos fenómenos contrarios se relacionan el uno con el otro es todavía incierto. Sin embargo, existen pistas de un posible mecanismo producto de estudios basados en paradigmas de aprendizaje aversivo realizados en cangrejos (Pedreira y Maldonado 2003), peces (Eisenberg y Dudai 2004), roedores (Power *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2004) y también abejas (Eisenhardt y Menzel 2006). Estos estudios demuestran que, con solamente algunos ensayos o incluso un único y débil ensayo, se puede llevar a cabo el fenómeno de reconsolidación (asociado con la estabilización de la memoria mencionada previamente), en paralelo con el

fenómeno de extinción y que la prevalencia de uno sobre el otro depende (fundamentalmente) del tipo e intensidad de reexposición al EC que sufra el sujeto experimental.

### 1.2.5 La respuesta de extensión de la probóscide en *Apis mellifera*

La *respuesta de extensión de probóscide* (REP) frente a la estimulación gustativa es un comportamiento conspicuo y reflejo (Frings 1944) que ha permitido el desarrollo de un protocolo para estudiar habilidades cognitivas en las abejas (Kuwabara 1957), entre otras implicancias. El mecanismo consiste en la extensión de la probóscide, piezas bucales modificadas de los insectos lamedores, al estimular con un palillo embebido en solución azucarada las antenas de un individuo, como estímulo apetitivo similar al néctar que obtienen las abejas en la naturaleza ([Figura 1.10](#)). Incluso, también puede observarse el mismo comportamiento frente a la exposición de olores florales, experimentados previamente dentro o fuera de la colmena, asociados a estímulos apetitivos.



**Figura 1.10** Protocolo REP en un contexto asociativo. En particular el protocolo REP consiste en ofrecerle a la abeja solución azucarada (EI) la cual al tocar las antenas o las partes bucales hace extender su probóscide. Al utilizarse en un contexto asociativo, se puede generar una vinculación entre este EI y un aroma condicionado “EC” (en este caso emanado por una válvula que emite aire a presión). Luego de varios ensayos asociativos se puede dar la RC al presentarse únicamente el EC.

### 1.2.6 Condicionamiento olfativo clásico basado en la REP

Cuando se tocan las antenas de las abejas con solución azucarada (EI), las mismas extienden la probóscide para ingerirla (respuesta incondicionada, RI). Si un olor (EC) se presenta y, luego, es inmediatamente recompensado con solución azucarada, pronto comienza a generar la extensión de la probóscide como respuesta condicionada (RC) (Takeda 1961). Este paradigma de aprendizaje asociativo ofrece un método muy sencillo y conveniente para cuantificar la retención de un olor en abejas individuales, testeando la adquisición

de un olor asociado a ciclos de recolección ya sea dentro o fuera de la colmena (Gerber *et al.* 1996; Menzel y Giurfa 2001) ([Figura 1.10](#)).

El condicionamiento asociativo permite generar una predicción; es decir, le otorga al estímulo condicionado (y a priori neutro) un cierto valor predictivo conforme se establece el vínculo entre los dos.

Este vínculo puede variar fuertemente dependiendo, entre otras cosas, de la intensidad, el intervalo entre presentaciones o de la relevancia o relación que existe en la naturaleza entre los estímulos que pretenden ser asociados (Balsam 1985; Rescorla *et al.* 1985; Bhagavan y Smith 1997). Incluso las memorias formadas mediante este tipo de condicionamientos pueden ser evocadas en contextos muy diferentes al de su adquisición (Gerber *et al.* 1996, Farina *et al.* 2005, 2007; Grüter *et al.* 2006). En abejas, se ha demostrado que las memorias olfativas que se establecen en el contexto de recolección durante la visita a una flor pueden evocarse en condiciones de laboratorio mediante el paradigma REP (Gerber *et al.* 1996). En la [Figura 1.8.b](#) se presenta el esquema de una posible red neuronal asociada a este tipo de condicionamiento olfativo.

### 1.3 Compuestos presentes en néctares, cafeína y arginina

El alcaloide cafeína (CAF) y el aminoácido arginina, en su forma levógira “L-arginina” (ARG) ([Figura 1.12](#)) se han encontrado presentes de manera individual en las flores de distintas especies de angiospermas como compuestos secundarios en el néctar y el polen (Wright *et al.* 2013, Power *et al.* 2017, Taha *et al.* 2019). La ingesta de estos compuestos, en bajas concentraciones, afecta el comportamiento de *Apis mellifera* (Wright *et al.* 2013, Chalisova *et al.* 2011, Couvillon *et al.* 2015). Puntualmente en la abeja melífera, estos compuestos, cuando se encuentran en concentraciones realistas de campo (trazas), mejoran la formación de memorias a largo término, MLT (Müller 1997, Wright *et al.* 2013). Sin embargo, es aún desconocido el efecto de las mezclas de éstos sobre las habilidades cognitivas de la abeja melífera.

La CAF se trata de un compuesto amargo (Drewnowski 2009), cuyo grado de amargor depende fuertemente de la concentración en que se presente (Keast y Roper 2007). Se la puede hallar en semillas, frutos y hojas de plantas nativas de África (como el café, *Coffea sp.*), Este de Asia (planta de té, *Camellia sinensis*), Asia tropical y subtropical (cítricos, *Citrus sp.*) y Sudamérica (yerba mate, *Ilex paraguariensis*) (Myers 2007). Su presencia ayuda a proteger a estas estructuras frente al ataque de insectos y a prevenir la germinación de semillas adyacentes (Caballero *et al.* 2015). Wright y colaboradores (2013) también reportaron que se la puede encontrar en el néctar de las flores de *Coffea sp.* al igual que en el néctar floral de *Citrus sp.* En estos casos la cafeína se da en concentraciones traza de entre  $0,2 \times 10^{-4} \text{M}$  a  $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$ . Al presentarse en pequeñas cantidades el efecto aversivo desaparece (Wright *et al.* 2013) y está registrado que es capaz de potenciar la formación de MLT de naturaleza olfativa, aumentando la excitabilidad de las células de Kenyon que se localizan en los cuerpos pedunculares (Wright *et al.* 2013) y son de naturaleza intrínseca (Menzel 2012). Se ha propuesto que la CAF actúa como un antagonista del receptor de adenosina en las neuronas de los cuerpos

pedunculados (MB) producto de una mayor actividad de las neuronas que se proyectan a esas regiones del cerebro desde los lóbulos antenales (LA) o deutocerebro (Wright *et al.* 2013). Esta sustancia también ha sido propuesta como un potenciador del comportamiento apetitivo, el cual se manifiesta en una mayor actividad recolectora y de reclutamiento de congéneres hacia nuevas fuentes de alimento a través de intensificar el comportamiento de danza en recolectoras activas (Couvillon *et al.* 2015). Wright y colaboradores (2013) demostraron que la cafeína genera distintos efectos dependiendo de su concentración: aquellas concentraciones menores a  $10^{-7}$ M parecen no generar efecto alguno, mientras que concentraciones mayores a 1M pueden generar rechazo por ser una sustancia poco palatable y hasta tóxica. La cafeína también se trata de un compuesto antioxidante (Lee 2000; Krisko *et al.* 2005) y podría estar implicado en la protección frente a una gran variedad de enfermedades generadas por el estrés oxidativo que sufren algunas células animales con el paso del tiempo (León-Carmona y Galano 2011).

Con referencia a la ARG, la misma participa en la síntesis del óxido nítrico (NO), el cual está implicado en la formación de MLT dado que está involucrado en mecanismos río abajo que prolongan la actividad de PKA dependiente de AMPc, situación que permite la síntesis proteica durante el proceso de formación de MLT y otros procesos celulares que requieran dichas síntesis (Müller 1996, 1997, 2000). Además, este compuesto tiene efectos en la formación de la memoria a corto término (MCT) si es administrada en bajas concentraciones (de 0,001mM) (Chalisova *et al.* 2011; Lopatina 2017). Este aminoácido esencial que se encuentra presente en néctares y pólenes de plantas explotadas por abejas (Baker y Baker *et al.* 1976, Power *et al.* 2017, Taha *et al.* 2019) actúa previniendo la presencia de parásitos en insectos (Rivero 2006) y mejora la respuesta inmune a nivel celular (Negri *et al.* 2013). Si bien es considerado un aminoácido esencial, los insectos son capaces de sintetizarlo aunque con cierta dificultad, entonces deben incorporarlo mediante el alimento (Rivero 2006).

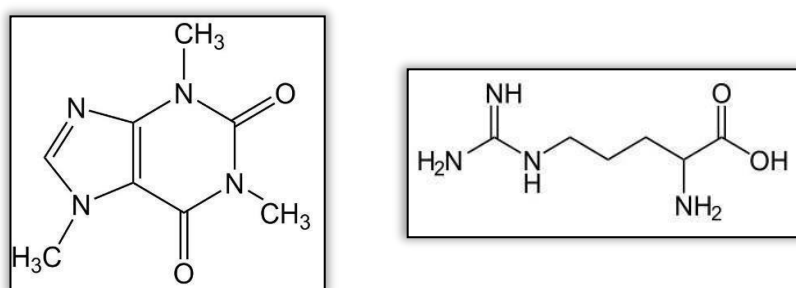


Figura 1.12 Estructura molecular de la cafeína (izquierda) y de la arginina (derecha).



## 2 Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

Se propone que el alcaloide cafeína y el aminoácido arginina afectan positivamente la adquisición y memorización a largo término de la abeja eusocial *Apis mellifera* si los mismos se presentan de forma combinada.

### Objetivos

1. Determinar si la presencia (individual) de compuestos secundarios en concentraciones traza de algunos néctares, como la cafeína y la arginina, afectan la fase de adquisición y la memorización a corto y largo término al suministrarse oralmente durante un condicionamiento olfativo clásico.
2. Determinar si la presencia combinada de ambos compuestos afecta positivamente la fase de adquisición y la memorización a corto y largo término al suministrarse oralmente durante un condicionamiento olfativo clásico.
3. Evaluar la sobrevivencia de los sujetos experimentales luego de los ensayos de condicionamiento olfativo que ofrecen estos compuestos secundarios.

## 3 Materiales y métodos

### 3.1 Sitio de estudio, animales y compuestos químicos utilizados

Los experimentos fueron llevados a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (34° 32' S, 58° 26' O), durante la temporada de verano comprendida entre diciembre de 2018 y marzo de 2019. El predio se ubica en las proximidades de la Reserva Ecológica Ciudad Universitaria - Costanera Norte (RECUCN), la cual alberga una gran diversidad de plantas entomófilas (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UBA 2018) y por lo tanto supone un ambiente con una amplia oferta alimenticia para insectos polinizadores. Además el Campo Experimental cuenta con una huerta orgánica, dentro de la cual se cultivan kinotos (*Fortunella spp*), estrechamente emparentados con el género *Citrus spp*.

Para la realización de los experimentos se capturaron aproximadamente 600 abejas *Apis mellifera* L. adultas de la casta obrera provenientes de colmenas que se encuentran en el Apiario Experimental del predio mencionado.

Las colmenas utilizadas para capturar a los sujetos experimentales eran de tipo Langstroth y constaban de 10 cuadros, con una reina, 3-4 cuadros de cría, reservas de alimento y que contenían aproximadamente 20.000 individuos.

Los compuestos químicos utilizados durante los diferentes ensayos de condicionamiento (ver más adelante) fueron cafeína y arginina (ambos provistos por Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Por otro lado, durante los ensayos de condicionamiento se utilizaron olores puros como estímulos condicionados, como hexanol y nonanal, los cuales se encuentran comúnmente en fragancias florales (Knudsen y Tollste 1993; Raguso y Pichersky 1999) y de los cuales se sabe que las abejas son capaces de memorizar con igual capacidad (sin presentar preferencias por uno sobre el otro) (Arenas *et al.* 2013).

### **3.2 Condicionamiento olfativo clásico**

Con el fin de estudiar el aprendizaje y la memoria olfativa de la abeja melífera se realizaron ensayos de condicionamiento olfativo clásico basados en la respuesta de extensión de probóscide, REP (Takeda 1961).

#### **3.2.1 Captura y Encegado**

Para ello se capturaron abejas en la entrada de al menos 10 colmenas distintas, en el momento que intentaban ingresar a la colmena. Las abejas elegidas no contenían cargas de polen en sus corbículas con el fin de evitar seleccionar abejas especializadas en la recolección de polen (y no de néctar). Una vez capturadas, las abejas fueron anestesiadas a -4 °C durante 1 min e inmediatamente encegadas en tubos de metal de manera tal que permitiera que tanto sus antenas como piezas bucales presenten libertad de movimiento. Luego de este procedimiento, se las alimentó con solución de sacarosa 1,8 M y se las colocó en oscuridad durante 60 minutos a 28 °C de temperatura.

#### **3.2.2 Entrenamiento**

Finalizada esta etapa, los sujetos experimentales fueron sometidos a 5 eventos de aprendizaje asociativo (ensayos de entrenamiento), en los cuales se les presentó un “puff” de aire aromatizado con un olor puro, hexanol o nonanal, a través de una válvula de aire controlada por un programa de computación. Cuatro microlitros del olor embebían un papel de filtro ubicado dentro de la jeringa de estimulación, la cual, al ser presionada liberaba el estímulo olfativo. Cada ensayo de entrenamiento duraba 39 segundos. Durante los primeros 15 segundos, el sujeto experimental sólo recibía una corriente de aire emanada por la válvula. Luego, a los 16 segundos, comenzaba la presentación del olor (estímulo condicionado, EC), la cual se prolongaba hasta los 23 segundos. En simultáneo desde los 19 segundos y hasta los 23 segundos se presenta una gota (5µL) de solución azucarada 1,8 M (50% p/p) sobre las antenas y sobre sus partes bucales, permitiéndole al individuo alimentarse al momento de extender su probóscide (respuesta incondicionada, RI) ([Figura 3.1](#)). Dicha gota podía contener sólo solución azucarada o alguno de los tratamientos (ver más abajo). Por último, desde los 23 segundos hasta los 39 segundos se dejó que corra el aire de forma limpia, sin estimular al individuo de ninguna otra manera. Entre cada uno de los ensayos se dejaron pasar un mínimo de 10 minutos y un máximo de 15 minutos.

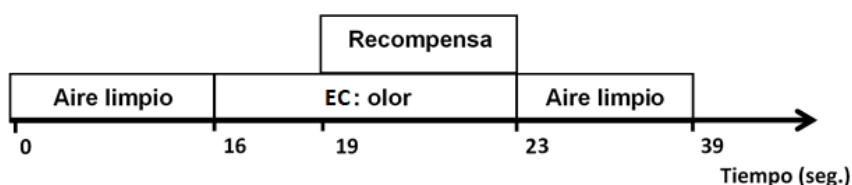


Figura 3.1. Esquema demostrativo del procedimiento realizado en cada ensayo de REP sobre cada abeja encephada.

### 3.2.3 Tratamientos

Se aplicaron distintos tratamientos a lo largo de los 5 ensayos de entrenamiento. Dichos tratamientos consistieron en agregarle a la solución azucarada ofrecida durante el entrenamiento, como El, concentraciones reducidas de CAF, ARG o una mezcla de ambas sustancias (CAF + ARG) dependiendo de cada grupo experimental.

En el caso de la cafeína, las concentraciones presentadas fueron de 0,05mM y 0,15mM, y para la L-arginina de 0,01 mM y 0,03 mM. Dichas concentraciones se encuentran dentro del rango de valores presente en los néctares de distintas especies florales (Baker & Baker 1973, Wright 2013). Además, por una cuestión de parsimonia e imposibilidad temporal de realizar todas las combinaciones posibles, se presentaron mezclas de ambos compuestos seleccionando la mayor concentración de cafeína combinada con ambas concentraciones de L-arginina (Tabla 3.1). Se seleccionó, en particular, a la mayor concentración de cafeína para formar dichas combinaciones debido a que ya se habían podido registrar respuestas favorables en experimentos preliminares al ofrecerse este compuesto (comprobando un efecto similar al propuesto por las hipótesis aquí planteadas), y además por ser aquella sustancia de la cual se tenía un conocimiento más cabal en relación a sus efectos sobre las habilidades cognitivas y los comportamientos apetitivos en obreras de *A. mellifera* (Couvillon *et al.* 2015, Wright *et al.* 2013).

Tabla 3.1 Concentraciones de los compuestos químicos utilizados en la recompensa ofrecida durante el entrenamiento para los distintos grupos experimentales.

Tratamiento	Estímulo Incondicionado	Concentración
Control	Solución de sacarosa (SS)	1,8 M
Cafeína	SS + Cafeína (CAF)	0,05 mM
		0,15 mM
Arginina	SS + Arginina (ARG)	0,01 mM
		0,03 mM
Mezclas	SS + ARG + CAF	0,15 mM CAF + 0,01 mM ARG
		0,15 mM CAF + 0,03 mM ARG

### **3.2.4 Evaluación de la respuesta condicionada: Retención a corto término**

Al finalizar los 5 ensayos del entrenamiento se procedió a evaluar la respuesta del sujeto experimental frente al olor asociado al refuerzo positivo y a un olor novedoso (ON) (control negativo) sin estar acompañado de la recompensa. Lo que se obtuvo como resultado de estos procedimientos fue una respuesta dicotómica del tipo “sí/no” en cuanto a la extensión de la probóscide frente a la presentación de los olores. Aquellas abejas que respondieron positivamente al olor EC y desestimaron al olor ON (mediante una respuesta nula) fueron consideradas como abejas que lograron retener el aprendizaje asociativo. Además, una vez finalizada la presentación de éstos, se procedió a chequear la capacidad de respuesta de los individuos registrando nuevamente la extensión de la probóscide. Esto se realizó ofreciéndoles una gota con agua azucarada (de igual concentración), aquellos que no pudieran extender la probóscide para alcanzar dicha gota, serían descartados del análisis (tanto de la evaluación como del entrenamiento) ya que su nulidad de respuesta en la prueba podría haberse debido a una incumbencia mecánica en la respuesta propia de las abejas y no a una falla en sus habilidades de aprendizaje.

### **3.2.5 Evaluación de la respuesta condicionada: Retención a largo término**

Luego de 24 horas, cantidad de tiempo suficiente para el desarrollo de memorias a largo término en *A. mellifera* (Menzel 1999), se les aplicó a los mismos individuos utilizados en los ensayos anteriores una segunda evaluación (regida por el mismo protocolo) con el fin de analizar la memoria a largo término (MLT). Se tuvo en cuenta para el análisis de datos el porcentaje de individuos que logró retener el aprendizaje específico del aroma condicionado luego de 24 horas. Para ello se calculó sobre el total de abejas que había logrado responder de manera efectiva (respuesta positiva al EC y nula al ON) durante la primera evaluación, el porcentaje de aquellas que lograron sostener la misma respuesta durante esta segunda evaluación (transcurridas las 24 horas).

Cabe destacar que al presentarse el EC sin la recompensa asociada durante la primera evaluación, esta experiencia podría enmarcarse en un protocolo de extinción. Sin embargo, dados los resultados de trabajos anteriores, esta única presentación del EC luego de un condicionamiento tan intenso no habría de iniciar un proceso de extinción capaz de eclipsar dicha memoria olfativa (Eisenhardt y Menzel 2006) (ver Discusión).

Para mantener a los sujetos experimentales vivos hasta esta segunda evaluación se procedió a alimentarlos con 20 µL de solución de sacarosa (también a 1,8M) una vez que hubieran terminado la primera evaluación. Luego se los colocó en una incubadora a 28 °C con la humedad necesaria, agregando un recipiente con agua dentro de la incubadora para tales efectos. A primeras horas de la mañana se los volvió a alimentar con 20 µL de la misma solución (o hasta alcanzar saciedad) y luego por la tarde (pasadas aproximadamente las 24 horas estipuladas) se realizó la evaluación de la memoria a largo término con sus respectivos controles.

### 3.3 Sobrevida en el dispositivo REP

Se evaluó la sobrevida de los sujetos experimentales expuestos al condicionamiento, desde la finalización del entrenamiento hasta la evaluación a las 24hs. La variable respuesta obtenida en este caso también fue del tipo dicotómica “si/no” al finalizar el transcurso de tiempo pautado.

### 3.4 Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con R v3.3.3 (R Development Core Team, 2016). Los modelos propuestos tienen una regresión logística del tipo binomial, ya que sus variables respuesta versan de una cierta cantidad de eventos “exitosos” (individuos que extienden la probóscide o que logran sobrevivir) sobre un total definido (cantidad de individuos que forman parte del grupo experimental). La respuesta de extensión de la probóscide (REP) en los ensayos de entrenamiento se evaluó mediante modelos lineales generalizados de efectos mixtos (GLMM) y dicha respuesta en las etapas de evaluación y sobrevida mediante modelos lineales generalizados (GLM), siguiendo una distribución de error binomial y utilizando las funciones *glmer* y *glm* del paquete *lme4* (Bates *et al.* 2015).

En el caso del entrenamiento se propuso un modelo con dos factores fijos: *ensayo* y *tratamiento*. El factor ensayo cuenta con 4 niveles, que se corresponden con los del ensayo 2 al 5. El factor tratamiento posee 3 niveles: CAF 0,05 mM, CAF 0,15 mM y su control; ARG 0,01 mM, ARG 0,03 mM y su control o; CAF 0,15 mM + ARG 0,01 mM, CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM y su control. Además, se consideró a la abeja como factor aleatorio. En la evaluación de la memoria a corto término se analizó la respuesta al EC, considerando exclusivamente a aquellas abejas que no habían extendido la probóscide frente al olor novedoso (ON). Para la evaluación de la memoria a largo término se utilizó como base total de individuos a aquellos que lograron sobrevivir luego de 24 horas y que además habían logrado responder efectivamente durante la primera evaluación. Luego se registraron como respuestas efectivas en esta instancia las de aquellos individuos que lograron responder al EC pero no al ON (mismo criterio que en la evaluación anterior). En cuanto al análisis de supervivencia a las 24 horas, la variable respuesta también resultó dicotómica, en este caso utilizando las categorías de “vivo/muerto”. Tanto en las 2 evaluaciones como en el análisis de sobrevida se plantearon modelos con el tratamiento como factor fijo, cuyos niveles fueron mencionados anteriormente. Los modelos GLM y GLMM se simplificaron de la siguiente manera: se evaluó la importancia de los diferentes términos a partir del modelo que tenía términos de orden superior (el modelo más complejo) utilizando la función *anova* para comparar entre modelos anidados (Chambers y Hastie, 1992). Los términos no significativos ( $P > 0,05$ ) fueron eliminados. Para el caso de las comparaciones entre los distintos niveles de tratamiento en la etapa de entrenamiento se realizaron comparaciones a posteriori mediante contrastes por cuadrados mínimos, utilizando como modelo el aditivo entre tratamiento y ensayo (agrupando por tratamiento). Para ello se utilizó la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth 2011). Se tomó como corte de significancia un  $p$ valor  $< 0,05$ .

## 4 Resultados

### 4.1 Adquisición

En todos los grupos experimentales se observó un aumento significativo en la respuesta de la extensión de la probóscide a lo largo de la fase de adquisición, es decir, a lo largo de la realización de los 5 ensayos de entrenamiento (Tabla 4.1). Las Figuras 4.1a, 4.2a y 4.3a muestran el desempeño de las abejas durante el entrenamiento para los distintos tratamientos.

En el caso de la cafeína (Figura 4.1a) se observaron diferencias significativas al considerarse al tratamiento como una variable explicatoria del fenómeno (regresión logística,  $X_1^2 = 21,93$ ,  $p=0,0173$ , Tabla 4.1). Las comparaciones indican que las abejas que fueron tratadas con ambas concentraciones de cafeína mostraron un mejor desempeño que aquellas a las que se les administró únicamente solución azucarada (contraste por cuadrados mínimos,  $p<0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones puestas a prueba (CAF 0,05mM con N=62 y CAF 0,15Mm con N=66). Es posible apreciar que el aumento en la respuesta propia de los grupos tratados se acentúa sobre todo en los últimos ensayos, implicando un aumento del porcentaje de individuos que responden efectivamente en casi 10 unidades por arriba del grupo control (N=107, ~70% y ~ 60%, respectivamente).

En cuanto a la administración del aminoácido arginina (Figura 4.2a) también se encontraron diferencias significativas al aplicar el tratamiento, aunque en este caso las diferencias resultaron varios ordenes de magnitud mayores (regresión logística,  $X_1^2 = 48,22$ ,  $p=3,42E-08$ , Tabla 4.1). Al igual que en el caso anterior, las comparaciones entre los niveles arrojaron diferencias significativas entre las dos concentraciones aplicadas (ARG 0,01mM, N=58; ARG 0,03Mm, N=43) y el control (N=54, contraste por cuadrados mínimos,  $p<0,05$ ), sin encontrarse diferencias significativas entre dichas concentraciones. Cabe resaltar la gran diferencia observada en el ensayo número 2 entre los tratamientos con arginina y el grupo control con casi 30 puntos porcentuales de diferencia (~60% y ~30% respectivamente). Dicha diferencia, si bien disminuye su amplitud en los intervalos intermedios, mantiene la tendencia y termina por repetirse en el último ensayo.

En el caso de las mezclas también se observó un aumento en la respuesta de los individuos con diferencias significativas al analizarse el tratamiento como variable explicatoria (regresión logística,  $X_1^2 = 80,72$ ,  $p=0,0177$ , Tabla 4.1) (Figura 4.3a). Al analizar si dicha diferencia respecto del control se daba por causa de ambas concentraciones (tal como en los casos anteriores) o por la acción de una de ellas respecto del control, se procedió a realizar comparaciones por cuadrados mínimos y se encontró que el único tratamiento que generó diferencias significativas ( $p<0,05$ ) resulta de la mezcla con mayor concentración de ambos compuestos únicamente (CAF 0,15mM + ARG 0,03Mm, N=55).

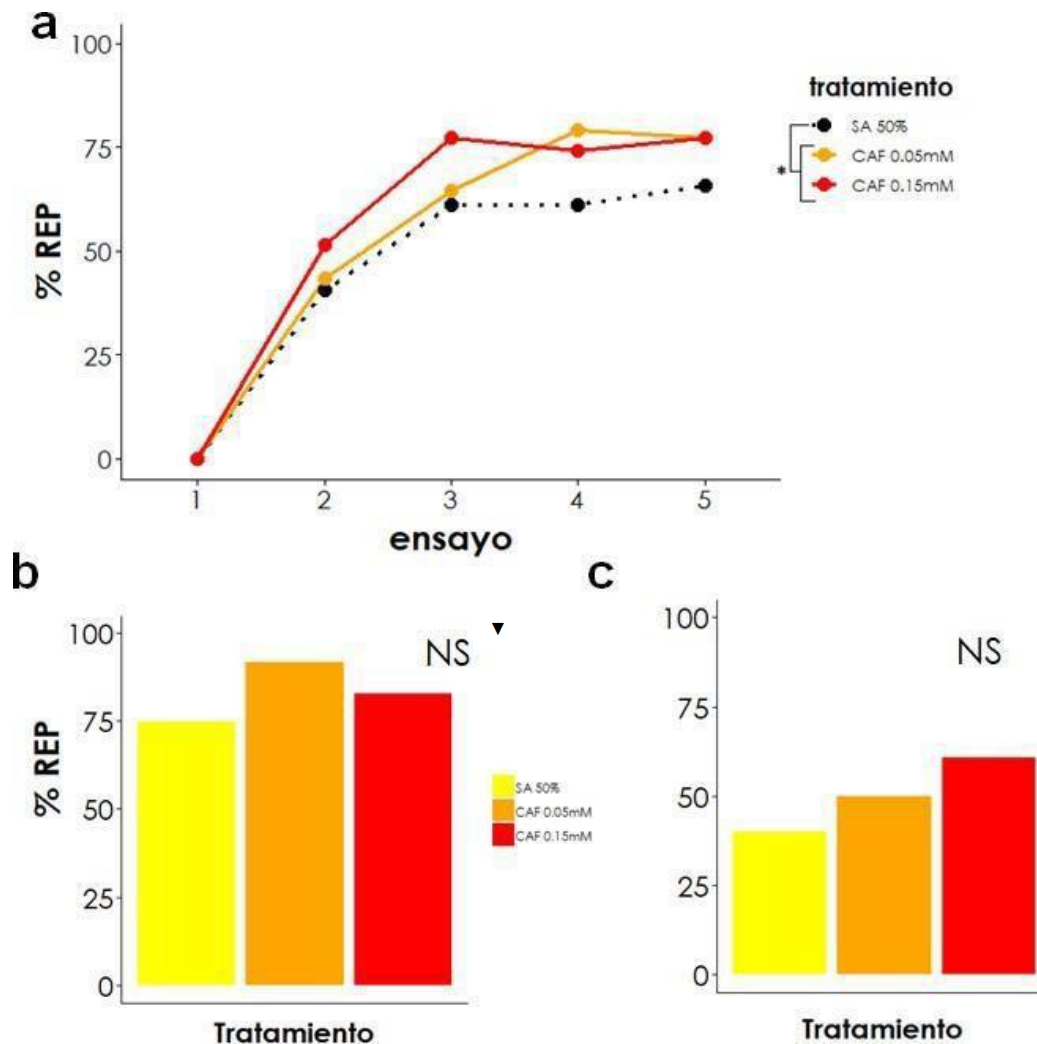
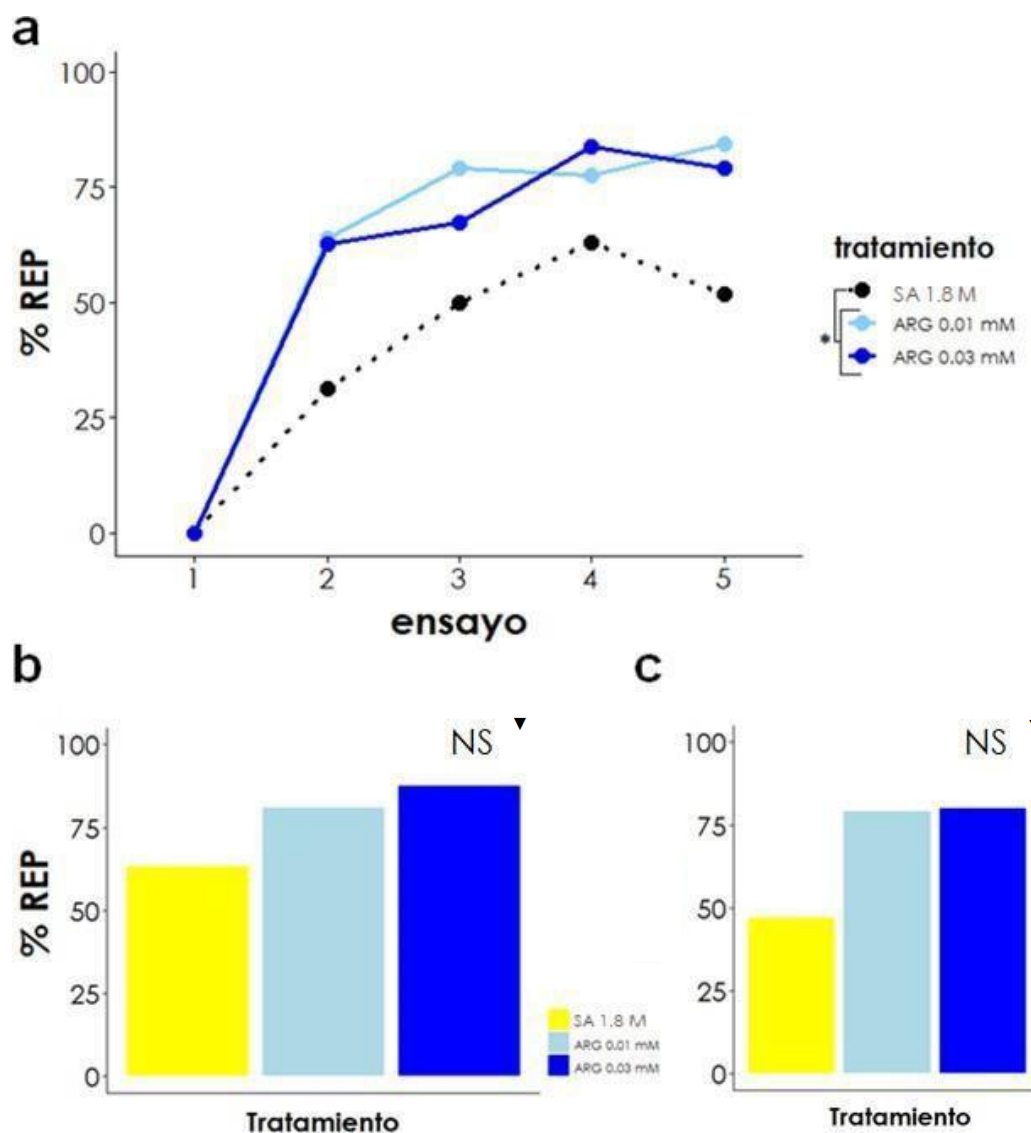
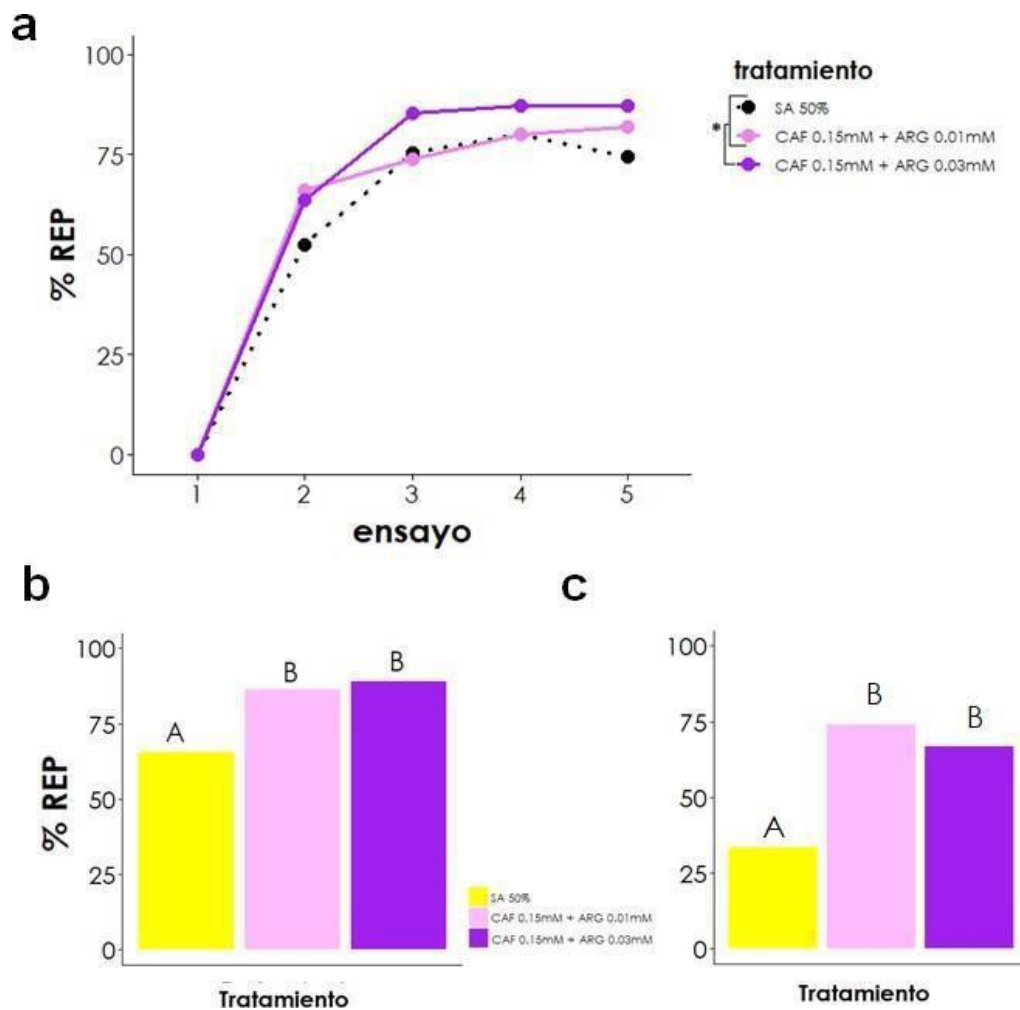


Figura 4.1: Efecto de la cafeína sobre la adquisición y retención de la memoria de corto y largo término en abejas sometidas a un condicionamiento olfativo absoluto basado en el protocolo de respuesta de extensión de la probóscide (REP). **(a) Fase de adquisición o entrenamiento:** respuesta de las abejas a lo largo de los 5 ensayos de aprendizaje. Las abejas que recibieron una concentración de cafeína al 0,05mM (N=62) y 0,15mM (N=66) presentaron diferencias significativas (contraste por cuadrados mínimos,  $p < 0,05$ ) respecto del grupo control (N=107) que recibió únicamente solución azucarada 1,8M, indicando un aumento en la respuesta (%REP). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos correspondientes a dichas concentraciones. El símbolo \* representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **(b) Retención de la memoria a los 15 minutos luego del entrenamiento:** evaluación de la respuesta condicionada, la cual corresponde sólo a la respuesta al olor aprendido. No se hallaron diferencias significativas, aunque estas estuvieron muy cerca del punto de corte, entre los distintos tratamientos dado el modelo propuesto (ver Tabla 4.2). El número de individuos por cada tratamiento fue de: CAF 0,05mM (N=48); CAF 0,15mM (N=46) y grupo control (N=67). ▼ NS refiere a que se hallaron diferencias marginalmente no significativas luego de las pruebas estadísticas aplicadas. **(c) Retención de la memoria a las 24 horas luego del entrenamiento:** evaluación de la respuesta condicionada, la cual corresponde sólo a la respuesta al olor aprendido. El porcentaje de respuesta para cada grupo fue de 40% para el control de solución azucarada (N=30), 50% para CAF 0,05 mM (N=28) y 60,8% para CAF 0,15 mM (N=23). Si bien se observa una tendencia hacia el aumento de la retención dado el agregado de cafeína, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos involucrados (ver Tabla 4.2).



**Figura 4.2:** Efecto de la arginina sobre la adquisición y retención de la memoria de corto y largo término en abejas sometidas a un condicionamiento olfativo absoluto basado en el protocolo de respuesta de extensión de la probóscide (REP). **(a) Fase de adquisición o entrenamiento:** respuesta de las abejas a lo largo de los 5 ensayos de aprendizaje. La respuesta de los grupos experimentales que recibieron arginina en concentraciones de 0,01 mM (N=58) y 0,03 mM (N=43) presentaron diferencias significativas respecto del grupo control (N=54) (contraste por cuadrados mínimos,  $p < 0,05$ ), pero no presentaron dicho tipo de diferencias entre ellos. El símbolo \* representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **(b) Retención de la memoria a los 15 minutos luego del entrenamiento:** evaluación de la respuesta condicionada, la cual corresponde sólo a la respuesta al olor aprendido. El modelo que propuso al tratamiento como variable explicatoria no se diferenció significativamente del modelo nulo, aunque esto se dio de manera marginal (ver [Tabla 4.2](#)). El número de individuos para cada grupo fue: ARG 0,01 mM (N=47); ARG 0,03 Mm (N=32); control (N=30). *NS* ▼ refiere a que se hallaron diferencias marginalmente no significativas luego de las pruebas estadísticas aplicadas. **(c) Retención de la memoria a las 24 horas luego del entrenamiento:** evaluación de la respuesta condicionada, la cual corresponde sólo a la respuesta al olor aprendido. El porcentaje de respuesta para cada grupo fue: 47% para el control de solución azucarada (N=17), 79% para ARG 0,01 mM (N=24) y 80% para ARG 0,03 mM (N=20). La aplicación del tratamiento no presentó diferencias significativas, aunque esto se dio de forma marginal (ver [Tabla 4.2](#)).





**Figura 4.3:** Efecto de las mezclas formadas por cafeína 0,15mM y arginina 0,01 y 0,03 mM arginina sobre la adquisición y retención de la memoria en abejas sometidas a un condicionamiento olfativo absoluto basado en el protocolo de respuesta de extensión de la probóscide (REP). **(a) Fase de adquisición o entrenamiento:** respuesta de las abejas a lo largo de los 5 ensayos de aprendizaje. Solamente se encontraron diferencias significativas (contraste por cuadrados mínimos:  $p < 0,05$ ) entre el grupo control ( $N=86$ ) y la mezcla con mayor concentración de ambas sustancias ( $N=55$ ), siendo el número de individuos que recibió CAF 0,15 mM + ARG 0,01 mM igual a 52. El símbolo \* representa diferencias significativas (comparación por cuadrados mínimos,  $p < 0,05$ ). **(b) Retención de la memoria a los 15 minutos luego del entrenamiento:** evaluación de la respuesta condicionada, la cual corresponde sólo a la respuesta frente al olor aprendido. Ambas concentraciones de mezclas (CAF 0,15 mM + ARG 0,01 mM ( $N=44$ ) y CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM ( $N=50$ )) resultaron en una mejora de la capacidad de discriminación de las abejas respecto del grupo control ( $N=64$ ) (contraste por cuadrados mínimos con  $p = 0,007$  para la mayor concentración y  $p = 0,019$  para la menor concentración), pero no se hallaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron dichas mezclas. Letras distintas corresponden a diferencias significativas entre cada grupo. **(c) Retención de la memoria a las 24 horas luego del entrenamiento:** El porcentaje de respuesta para cada grupo fue: 33% para el control de solución azucarada ( $N=27$ ), 74% para CAF 0,15 mM + ARG 0,01 mM ( $N=27$ ) y 66% para CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM ( $N=36$ ). Ambas concentraciones de las mezclas generaron un aumento significativo de la RC respecto del grupo control (contraste por cuadrados mínimos con  $p = 0,004$  para CAF 0,15 mM + ARG 0,01 mM y  $p = 0,010$  para CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM). No se hallaron diferencias significativas en la respuesta de las dos concentraciones ofrecidas.

**Tabla 4.1** Conjunto de variables consideradas en los modelos GLMM que explican la respuesta de las abejas durante la experiencia de entrenamiento (fase de adquisición de la memoria).

Compuesto	Experimento	Fase	Variable	Chi sq	P-valores
Cafeína	<i>Condicionamiento REP</i>	Adquisición	TratamientoxEnsayo	33,13	0,7687
			Tratamiento	21,93	<b>0,0173</b>
			Ensayo	57,23	<b>2,30E-09</b>
Arginina	<i>Condicionamiento REP</i>	Adquisición	TratamientoxEnsayo	4,67	0,5865
			Tratamiento	48,22	<b>3,42E-08</b>
			Ensayo	22,61	<b>0,0486</b>
Mezclas	<i>Condicionamiento REP</i>	Adquisición	TratamientoxEnsayo	3,31	0,7690
			Tratamiento	80,72	<b>0,0177</b>
			Ensayo	37,13	<b>4,32E-05</b>

Los modelos “TratamientoxEnsayo” suponen una interacción entre ambas variables cualitativas. Los valores indicados en la tabla para estos modelos son el resultado de aplicar la función anova que compara dichos modelos contra otros que también incluyen a estas variables pero que las asocian de manera aditiva. Para todos los “compuestos” mencionados se desestimó el modelo “TratamientoxEnsayo” por no poseer diferencias significativas respecto del modelo más simple que es el aditivo, y por ende es este último el que se toma en cuenta para las comparaciones a posteriori. En negrita quedan marcados aquellos p valores significativos ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Retención a corto término

La retención de la memoria a corto término fue evaluada a los 15 minutos de concluir el entrenamiento. Se consideró para su evaluación la capacidad de “discriminación” que muestra una abeja al ofrecérsele, sin la presencia de recompensa, el olor asociado al refuerzo durante el entrenamiento (estímulo condicionado, EC) y un olor novedoso (ON). Del total de individuos que respondieron positivamente al EC (respuesta condicionada, RC) se calculó el porcentaje de aquellos que fueron capaces de discriminarlo del ON.

Los resultados muestran que el agregado tanto de CAF como de arginina ARG generan un aumento en la tendencia de la respuesta, aunque con valores marginalmente no significativos, a diferencia del tratamiento con mezclas que sí mostró un efecto positivo en la respuesta con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) ([Figuras 4.1b](#), [4.2b](#) y [4.3b](#) y [Tabla 4.2](#)).

Para el caso particular de la cafeína, los porcentajes de individuos que pudieron discriminar los olores redundaron en valores relativamente altos: 74%, 91% y 82% (para el grupo control, N=67; CAF 0,05Mm, N=48; CAF 0,15Mm, N=46; respectivamente, [Figura 4.1b](#)). Teniendo en cuenta que las pruebas estadísticas fueron marginalmente no significativas para el modelo que proponía al tratamiento como variable

explicatoria (Tabla 4.2), podemos decir que existe una tendencia al aumento de la respuesta dada la aplicación del alcaloide (si bien las diferencias no resultaron estrictamente significativas).

En el caso de ARG, los porcentajes de discriminación obtenidos alcanzaron el 63%, 80% y 87% para los diferentes tratamientos (grupos control: N=30, ARG 0,01Mm: N=47 y ARG 0,03Mm: N=32; respectivamente; (Figura 4.2b). Una vez más, el modelo estadístico que proponía al tratamiento como variable explicativa mostró diferencias marginalmente no significativas (Tabla 4.2). Aun así, es posible apreciar un claro aumento en la tendencia de la respuesta al aplicar las distintas concentraciones de ARG.

En cuanto a las mezclas, los porcentajes de respuesta correspondientes fueron: 65% para el grupo control (N=64), 86% para CAF 0,15Mm + ARG 0,01Mm (N=44) y 89% para CAF 0,15Mm + ARG 0,03mM (N=50) (Figura 4.3 b). Tal como se mencionó previamente las diferencias en este caso sí resultaron significativas (Tabla 4.2) para el modelo propuesto, por lo que se puede afirmar que las mezclas tuvieron un efecto en el aumento de la capacidad de discriminación de las abejas utilizadas. Al realizar las comparaciones, se encontraron diferencias significativas entre la mayor concentración ofrecida y el grupo control (Z valor=2,69 y p= 0,007) y también entre la menor concentración de la mezcla y el control (Z valor=2,14 y p= 0,019). No se encontraron diferencias significativas de ningún tipo entre las dos concentraciones de las mezclas aplicadas.

**Tabla 4.2** Evaluación estadística de los modelos de regresión logística (GLM) que incluyen al tratamiento como única variable explicatoria en las experimentaciones de discriminación (evaluación de la memoria a corto término) y retención de la discriminación (evaluación de la memoria a largo término).

Compuesto	Experimento	Fase	Variable	Devianza	P-valores
Cafeína	<i>Condicionamiento REP (Evaluación)</i>	Memoria a corto término (MCT)	Tratamiento	59,08	<i>0,0521</i>
		Memoria a largo término (MLT)	Tratamiento	22,92	0,3180
Arginina	<i>Condicionamiento REP (Evaluación)</i>	Memoria a corto término (MCT)	Tratamiento	5,47	<i>0,0650</i>
		Memoria a largo término (MLT)	Tratamiento	59,22	<i>0,0518</i>
Mezclas	<i>Condicionamiento REP (Evaluación)</i>	Memoria a corto término (MCT)	Tratamiento	74,34	<b>0,0041</b>
		Memoria a largo término (MLT)	Tratamiento	10,80	<b>0,0045</b>

Se compararon dichos modelos respecto a un modelo nulo mediante la función anova, utilizándose como corte de significancia un p-valor menor a 0,05. Aquellos p-valores remarcados en negrita resultaron menores al punto de corte y aquellos expresados en itálica fueron superiores al corte, aunque de forma marginal (valores con menos de un orden de magnitud de diferencia respecto del corte).

### 4.3 Retención a largo término

La RC también fue evaluada a las 24 horas después del entrenamiento y consistió en el mismo protocolo implementado durante la etapa de discriminación a corto término. Se calculó el porcentaje de individuos que logró retener la asociación específica del aroma condicionado luego de 24 horas ([Figuras 4.1c, 4.2c y 4.3c](#)).

Para el caso de la cafeína, si bien se pudo apreciar un aumento en el porcentaje de individuos que lograron retener el aprendizaje (Control= 40% [N=30]; CAF 0,05mM= 50% [N=28] y CAF 0,15mM= 60,8% [N=23], [Figura 4.1c](#)) no se encontraron diferencias significativas entre ninguno los niveles del tratamiento ([Tabla 4.2](#)).

En cuanto al agregado de arginina, también se observó un aumento de la respuesta: Control=47%, N=17; ARG 0,01mM=79%, N=24 y ARG 0,03mM=80%, N=20; ([Figura 4.2c](#)) aunque las diferencias resultaron no significativas para el modelo que incluye al tratamiento como variable explicatoria, dichas diferencias fueron marginales ( $p=0,0518$ , [Tabla 4.2](#)).

La aplicación de mezclas sí redundó en diferencias significativas para el modelo estadístico que propone al tratamiento como variable explicatoria de la respuesta de las abejas ( $p=0,0045$ , [Tabla 4.2](#)). Los porcentajes de retención a largo término para cada nivel de tratamiento fueron: Control= 33%, N=27; CAF 0,05mM + ARG 0,01mM= 74%, N=27 y CAF 0,15mM + ARG 0,03mM= 66%, N=36; [Figura 4.3c](#)). En cuanto a las comparaciones, se encontraron diferencias significativas entre los grupos que recibieron ambas concentraciones de mezclas y el control ( $Z_{valor}= 2,907$  y  $p= 0,004$  para la mezcla CAF 0,15mM + ARG 0,01mM y  $Z_{valor}=2,567$  y  $p=0,010$  para la mezcla CAF 0,15mM + ARG 0,03mM). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre dichas mezclas.

#### 4.4 Sobrevida en el dispositivo REP

Se registró el porcentaje de abejas que logró sobrevivir desde el entrenamiento hasta el momento de realizar la segunda evaluación 24 horas después (Figura 4.4). Una vez más se tuvo en cuenta al tratamiento como variable explicatoria del fenómeno observado. Sólo en el caso de las mezclas, el factor tratamiento fue significativo (Tabla 4.3,  $p=0,0015$ , Figura 4.4c), donde se observó que la mezcla de mayor concentración (CAF 0,15mM + ARG 0,03mM) presentó diferencias significativas en comparación con el grupo control y con la otra mezcla (contraste por cuadrados mínimos:  $Z_{valor}=2,797$  y  $p=0,005$  para solución azucarada y  $Z_{valor}=2,390$  y  $p=0,017$  para CAF 0,15 mM+ ARG 0,01 mM). La aplicación de dicha mezcla durante el tratamiento redundó en una tasa de supervivencia del 98% en relación con el 74% propia del grupo control que había recibido únicamente solución azucarada y con el 80% de la otra mezcla. En el resto de los tratamientos se observaron niveles relativamente similares de sobrevida. Para el caso de la cafeína (incluido su grupo control) los valores redundaron en ~70% (Figura 4.4a), en cambio para el caso de la arginina los grupos ARG 0,01Mm (N=58) y SA 1,8 M (N=58) se diferenciaron respecto de ARG 0,03mM (N=43), teniendo los primeros una tasa de ~88% y el último de ~76% (Figura 4.4b). De todas formas, tal como se mencionó previamente, en ninguno de estos casos se hallaron diferencias significativas (Tabla 4.3).

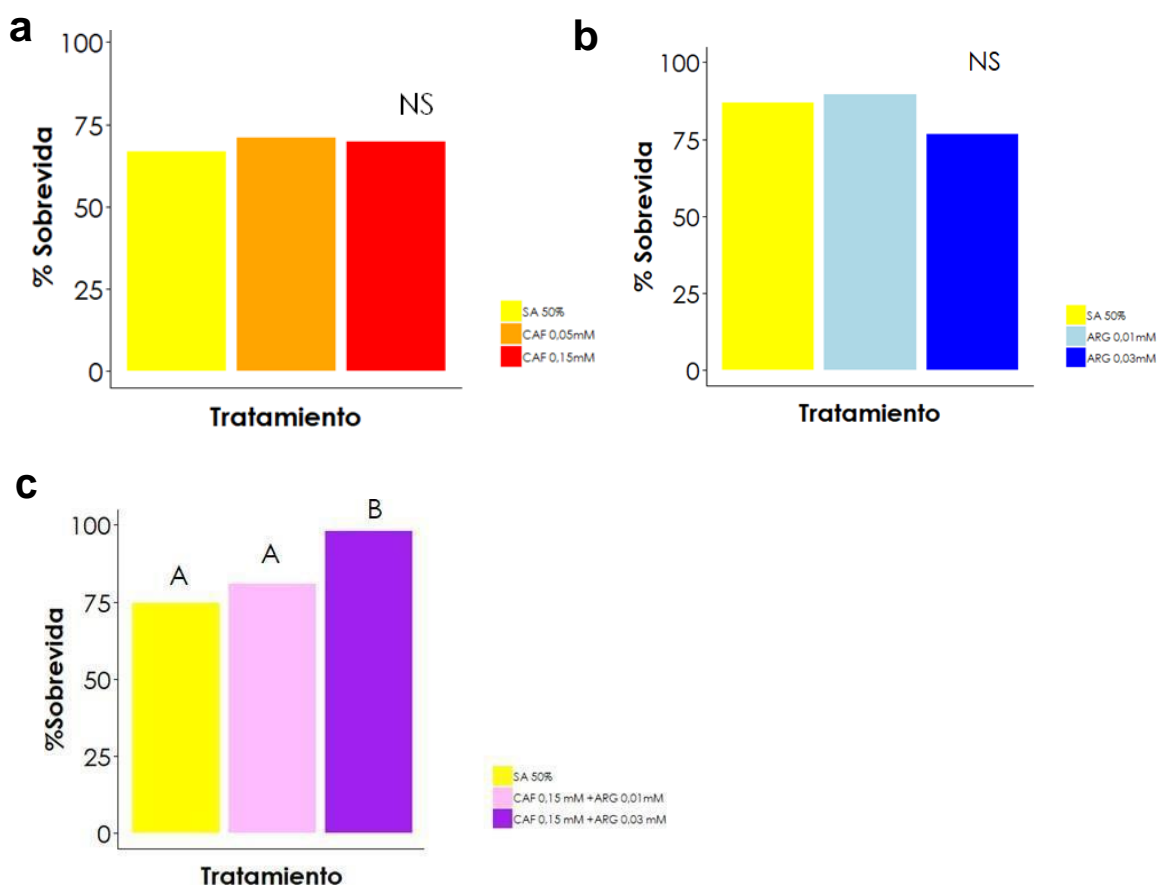


Figura 4.4 Efecto de la cafeína, arginina y mezclas entre ambas a 24 horas de su administración sobre la supervivencia de las abejas bajo el contexto de un protocolo REP. **a)** Porcentaje de individuos que lograron

sobrevivir luego de las 24 horas posteriores a la etapa de entrenamiento, donde habían recibido solución azucarada con cafeína en baja o alta concentración: El porcentaje de sobrevida para cada grupo fue: 66% para el control de solución azucarada (N=107), 70% para CAF 0,05mM (N=62) y 69% para CAF 0,15mM (N=74). No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos involucrados (ver Tabla 4.4). NS refiere a que no se hallaron diferencias significativas luego de las pruebas estadísticas aplicadas. **b) Porcentaje de individuos que lograron sobrevivir en las 24 horas posteriores a la etapa de entrenamiento, donde habían recibido solución azucarada o arginina en baja o alta concentración:** El porcentaje de sobrevida para cada grupo fue: 87 % para el control de solución azucarada (N=54), 89% para ARG 0,01 mM (N=58) y 76% para ARG 0,03 mM (N=43). No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos involucrados (ver Tabla 4.4). **c) Porcentaje de individuos que lograron sobrevivir en las 24 horas posteriores a la etapa de entrenamiento, donde habían recibido solución azucarada o mezclas con cafeína y arginina en distintas concentraciones:** El porcentaje de sobrevida para cada grupo fue: 74 % para el control de solución azucarada (N=87), 80% para CAF 0,15 mM + ARG 0,01 mM (N=52) y 98% para CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM (N=55). La única concentración que se destacó por sus diferencias significativas frente al resto de los grupos fue la de CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM (contraste por cuadrados mínimos: Zvalor=2,797 y p=0,005 para solución azucarada y Zvalor=2,390 y p= 0,017 para CAF 0,15 mM+ ARG 0,01 mM). *Letras distintas corresponden a diferencias significativas entre cada grupo.*

Tabla 4.3 Análisis estadístico de los modelos de regresión logística (GLM) que incluyen al tratamiento como única variable explicatoria del fenómeno de supervivencia de los individuos a lo largo de 24 horas.

Compuesto	Experimento	Variable	Devianza	P-valores
Cafeína	Sobrevida a las 24hs	Tratamiento	0,386	0,8245
Arginina	Sobrevida a las 24hs	Tratamiento	3,293	0,1927
Mezclas	Sobrevida a las 24hs	Tratamiento	17,646	<b>0,0015</b>

Se compararon dichos modelos respecto a un modelo nulo mediante la función anova, utilizándose como corte de significancia un p-valor menor a 0,05. Aquellos p-valores que cumplieran con esta condición quedan marcados en **negrita**.

## 5 Discusión

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran el potente efecto que puede tener la administración oral de compuestos presentes en el néctar de algunas flores en concentraciones traza sobre las capacidades cognitivas y sobre la supervivencia en la abeja *Apis mellifera*, al ser presentados tanto de forma individual como conjunta. En el caso de la adquisición o performance del aprendizaje, el consumo de todos los compuestos, presentados de manera individual o conjunta, implicó un aumento en la respuesta respecto de los grupos que recibieron únicamente solución azucarada 1,8M, la cual representa por si sola un estímulo incondicionado de fuerte preferencia por parte de las abejas. Es decir, que el agregado de estas sustancias en pequeñas cantidades fue suficiente para generar un efecto diferencial en el aprendizaje asociativo, incluso al compararse con el efecto generado por un estímulo altamente atractivo como el que había recibido el grupo control. En cuanto a la retención de la memoria a corto plazo las mezclas (en sus 2 concentraciones posibles) presentaron una amplia mejora respecto del grupo control, mientras que la cafeína y la arginina no mostraron efectos significativos, aunque es importante mencionar que las diferencias respecto del modelo nulo resultaron marginales. Lo mismo ocurrió en la retención de la memoria a largo plazo para los distintos tratamientos mencionados. Al analizar el efecto de estas sustancias en la sobrevivencia de las abejas se encontró que la mezcla de cafeína y arginina en sus máximas concentraciones (0,15 mM y 0,03 mM respectivamente) posibilitó una tasa de supervivencia del 98% luego de 24 horas, siendo este el único tratamiento que presentó diferencias significativas al compararse con sus respectivos grupos.

### 5.1 Fase de adquisición

La administración tanto del alcaloide cafeína como del aminoácido esencial arginina, ya sea de manera individual o combinada, redundó en una mejora de la fase de adquisición. Sin embargo, esta mejora tuvo un efecto diferencial para cada compuesto administrado.

En un principio podría sorprender que la cafeína sea capaz de generar un aumento en la tasa de adquisición, ya que se la considera una sustancia aversiva para muchos artrópodos (Wright *et al.* 2013). Sin embargo, este fenómeno sólo se observó en abejas al ofrecerse dicha sustancia en concentraciones relativamente altas. En una experiencia donde se evaluó la tasa de ingesta de solución azucarada que contenía distintas concentraciones del alcaloide se halló que dicha tasa era menor solamente para aquellas soluciones que tuvieran concentraciones de cafeína superiores a 1mM (Wright *et al.* 2013). En ese mismo estudio, al analizar la curva de aprendizaje bajo un protocolo REP, se encontró que también existía un efecto positivo en la

adquisición al administrarse cafeína en concentraciones entre 0,001 mM y 1mM. Por lo que los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los de la bibliografía citada referida a este alcaloide.

En cuanto al agregado del aminoácido arginina se podría esperar una tasa de adquisición más alta que el grupo control, ya que se trata de un componente nutricional esencial para estos insectos, por lo que deben incorporarlo mediante su ingesta (Rivero 2006). De allí que sería esperable su potencial reconocimiento por parte de las abejas como una sustancia palatable. En línea con ello, estudios previos muestran que la presencia de aminoácidos (distintos a ARG) ofrecidos durante el entrenamiento, o previo a él, afectan la performance de adquisición (Kim y Smith 2000; Simcock *et al.* 2014; Nicholls *et al.* 2019). Además, en este sentido, otros estudios muestran que las abejas son capaces de identificar el gusto umami, indicador de la presencia de aminoácidos, caracterizándose un receptor quimio-sensorial gustativo que responde a L-aminoácidos (*AmGr10*), entre los que se encuentra la L-arginina (Lim *et al.* 2019). Sin embargo, ninguno de estos estudios analiza cómo ARG influye en la performance de un entrenamiento asociativo de naturaleza gustativa como el presente en este trabajo.

Sería conveniente realizar a futuro evaluaciones específicas de palatabilidad utilizando arginina en el rango de concentraciones mencionadas dado que los resultados de este trabajo reflejan un intenso aumento de la respuesta durante la adquisición y no hay registro bibliográfico de este fenómeno bajo las concentraciones mencionadas. En ese sentido, estos resultados son la primera evidencia de mejoras de la performance durante un condicionamiento olfativo utilizando este aminoácido esencial.

Para el caso de las mezclas, las diferencias de respuestas obtenidas entre grupos tratados y control fueron relativamente bajas, tal como ocurrió en el caso de la cafeína. Dicha semejanza podría explicarse por una mayor concentración del alcaloide en la mezcla en relación con la arginina, dado que esta primera se presentó en un orden de magnitud mayor (0,15 mM para cafeína en contraste con 0,01 mM y 0,03 mM para arginina). Si bien dicha concentración del alcaloide no implicó diferencias significativas cuando se la presentó de manera individual frente a la menor concentración (0,05 mM), sí generó un aumento en la tendencia de la respuesta, sobre todo en los primeros ensayos. Hubiese sido interesante poner a prueba dentro de un distinto par de mezclas la menor concentración de cafeína (0,05 mM) para, de esta manera verificar si existían o no diferencias significativas respecto de las mezclas originales. Esto no fue posible, fundamentalmente, por falta de tiempo producto de la tamaño cantidad de tratamientos administrados y la limitante temporal que implica el trabajo en la temporada de abejas que se ve restringida principalmente al verano (recordar que las abejas fueron capturadas entrando a sus colmenas, luego de un viaje de recolección de recursos y estas se encuentran lo suficientemente activas durante dicha estación).

A pesar del posible efecto recién mencionado de la cafeína dentro de la mezcla, la única diferencia significativa se dio entre la mezcla con mayor concentración de arginina y los otros 2 grupos restantes, esto



es posible verlo representado en cómo su curva de aprendizaje queda por encima del resto en prácticamente todos los ensayos ([Figura 4.3a](#)). Las razones por la que el aumento en la concentración del aminoácido dentro de la mezcla generó una respuesta diferencial no pueden ser explicadas únicamente por la experiencia individual de arginina (en esta no se había registrado un cambio en la respuesta entre una y otra concentración). Entonces, es posible que exista algún tipo de efecto combinado sobre la adquisición al administrarse la mezcla de CAF 0,15Mm + ARG 0,03mM.

## 5.2 Retención a corto término

El agregado de cafeína (en cualquiera de sus concentraciones) no implicó un mejoramiento en la memoria a corto término, aunque la falta de significatividad en sus diferencias respecto del control fue marginal ( $p=0,052$ ). Estudios previos han reportado experiencias similares (Wright *et al.* 2013), allí se argumentó (mediante experimentaciones celulares) que el mecanismo de acción del alcaloide implica un aumento en la excitabilidad de las neuronas Kenyon, las cuales se encuentran localizadas en los centros superiores del protocerebro, los cuerpos pedunculados, y están involucradas en la formación de memorias estables. Sin embargo, esta excitación parece no ser tan incidente en la memoria a corto plazo.

En el caso de la arginina, si bien se dio un aumento en la RC conforme con el aumento de la concentración administrada de dicha sustancia, también se hallaron diferencias marginalmente no significativas al proponer al tratamiento como variable explicatoria del fenómeno ( $p=0,065$ ). Quizás esta falta de significancia se deba al relativamente bajo número de individuos que formaban parte del control ( $N=30$ ). Probablemente, al aumentar el N muestral, se podrían haber manifestado diferencias que resultaran significativas. Además, dada la bibliografía consultada sería esperable un mejoramiento en la memoria a corto término ya que esto fue reportado en varias publicaciones anteriores (Chasilova 2011, Lopatina 2017). Lo que aún no resulta claro es por qué habría de generarse un fortalecimiento de este tipo de memoria dado que el mecanismo de acción de la sustancia implica un aumento en la síntesis proteica y por lo tanto una potencial mejora en el fenómeno de consolidación, por lo que sería esperable una influencia positiva en la memoria a largo plazo más no en aquella de corto término. Sin embargo, en lo referido al corto término, debe remarcarse que en la mosca *Drosophila* sp. se ha determinado que el óxido nítrico, en cuya síntesis interviene la L-arginina, además de participar en los procesos bioquímicos que desencadenan la síntesis de proteínas y conforman las marcas mnésicas durables (Müller 1997, 2000), participa también en la modulación de las vías excitatorias de naturaleza colinérgica durante las primeras etapas de las vías de procesamiento olfativo en insectos (Duan *et al.* 2012).

En cuanto a las abejas que recibieron las mezclas se encontraron mejoras en la capacidad de memorización a corto término respecto del grupo control. Es probable que se haya dado un efecto combinado de ambas

sustancias el cual no pudo alcanzarse al presentarlas de forma individual. Por otro lado, también cabe la posibilidad de que al haberse dado una mayor cantidad de individuos en el grupo control la significancia de la variable explicatoria haya resultado mayor que, por ejemplo, el caso de ARG (N=64 en este caso y N=30 en el de arginina, tal como se mencionó antes).

### 5.3 Retención a largo término

Para evaluar la memoria a largo término se procedió a utilizar los mismos individuos que habían concluido la etapa de entrenamiento y la primera evaluación (retención a corto término), por lo que éstos recibieron una exposición al olor condicionado sin una recompensa asociada de manera previa a la segunda evaluación. Este último procedimiento podría tenerse en cuenta como un protocolo de extinción (Menzel 1999), en el que se formaría una nueva memoria capaz de enmascarar a la memoria asociativa recientemente producida. Sin embargo, el hecho de que se presente dicho EC sin recompensa en una única oportunidad inmediatamente después del entrenamiento parece no afectar la correcta memorización a largo término del aroma en las abejas (Eisenhardt y Menzel 2006).

En esta prueba se puso bajo análisis el decaimiento de una memoria asociativa luego de 24 horas. Lo que se observó fue el porcentaje de abejas que habían logrado retener una memoria (la MCT analizada en la primera evaluación), luego de un día de cautiverio. De acuerdo con lo postulado por la teoría de la consolidación es esperable que la fuerza de una memoria decaiga a medida que transcurra el tiempo, lo cual se observa en todos los tratamientos realizados. Sin embargo, los porcentajes de retención siempre fueron mayores en los casos tratados en relación con los grupos control (aunque esto no se dio de forma significativa en todos ellos), y variaron fuertemente dependiendo del tipo de tratamiento administrado.

En el caso de la cafeína si bien se observó una amplia diferencia en los porcentajes de retención a largo término no se apreciaron efectos significativos, contrario a lo observado en trabajos anteriores (Wright *et al.* 2013). Vale la pena resaltar el escaso número de individuos analizados, la cantidad de cada grupo rondaba entre las 23 y 30 abejas, debido a que eran relativamente pocas las que lograban responder efectivamente durante la primera evaluación además de sobrevivir durante una jornada entera en las condiciones de aislamiento del laboratorio. De haber contado con más individuos es probable que las diferencias entre grupos tratados y control hubieran resultado significativas (sobre todo para CAF0,15mM).

En el caso de la arginina también se registró una gran diferencia en la RC respecto del grupo control, para ambas concentraciones aplicadas. En este caso la cantidad de individuos también fue escasa por razones similares a las explicadas para la cafeína, lo cual quizás también explique por qué solo se encontraron

diferencias marginalmente no significativas ( $p=0,051$ ) al proponer al tratamiento como una variable influyente de este fenómeno cognitivo. Dado que el mecanismo de acción de la arginina promueve la síntesis proteica y la consecuente formación de memorias a largo término sería esperable hallar un aumento significativo en la respuesta al aplicar esta sustancia. Sin embargo, este fenómeno tampoco se había registrado en trabajos anteriores donde únicamente se vio una mejora en la memoria a corto término (Chasilova 2011, Lopatina 2017). De modo contrario, también existen registros en otros insectos tal como en la mantis religiosa (*Stagmatoptera biocellata*) donde en un contexto aversivo (simulación de un ataque predatorio) se observó que la arginina puede mejorar la formación de memorias a largo término (D'alessio *et al.* 1982). Una vez más, sería ideal poder repetir este ensayo a futuro con mayor cantidad de individuos para dilucidar el efecto de esta sustancia en la MLT en un protocolo REP.

En cuanto a las mezclas, sí se registró una mejora efectiva en la formación de la memoria a largo término para ambas concentraciones respecto del control. Es probable que el porqué de esta respuesta se deba a un efecto combinado entre la cafeína y arginina sobre los circuitos neuronales que enlazan a la memoria asociativa registrada. Vale destacar que en este caso también se contó con una relativamente pequeña cantidad de individuos (entre 27 y 36, si bien un poco mayor que en los casos de CAF y ARG), aun así se encontró un fuerte efecto al analizar al tratamiento como una variable explicatoria del fenómeno observado. Por lo anterior es posible inferir que la aplicación de las mezclas resulta un tratamiento con alta incidencia en la memoria de las abejas, y que de contar con mayor cantidad de individuos en un futuro experimento (tal como se propuso para los casos anteriores) este fenómeno habría de evidenciarse con aún más robustez.

#### **5.4 Sobrevida en el dispositivo REP**

Tanto en el caso de la presentación individual de cafeína como de arginina no se registraron niveles de sobrevida diferenciales. Sería esperable que la cafeína, en estas concentraciones, implique una mejora en la tasa de supervivencia, ya que es sabido que puede resultar un antioxidante benéfico (Lee 2000; Kriško *et al.* 2005; León-Carmona y Galano 2011). Se conoce además que este alcaloide puede aumentar la cantidad de días de vida de una abeja obrera (Strachecka *et al.* 2014). Sin embargo, en esta última publicación la administración del alcaloide y la concentración de éste difieren de las dadas en el actual trabajo ya que la solución se les ofrece *ad libitum* a las abejas y la concentración resulta mayor (0,25 mM).

En cuanto al aminoácido esencial utilizado no existen registros de la influencia de esta sustancia en la supervivencia de las abejas, aunque sí es sabido que puede prevenir la presencia de parásitos en ciertos insectos (Rivero 2006), mejorar la respuesta inmune a nivel celular (Negri *et al.* 2013) y aumentar la tasa de supervivencia en embriones de vertebrados (Bérard y Bee, 2010). Por lo anterior, hubiese sido esperable un

aumento en la tasa de supervivencia, quizás la cantidad de arginina ofrecida no haya sido lo suficientemente grande para generar tal efecto.

En el caso de las mezclas se registró un aumento de la sobrevivencia para la mezcla con mayor concentración (CAF 0,15 mM + ARG 0,03 mM), donde el valor alcanzado fue del 98% de los individuos (frente al 74% del control y el 80% que recibió la mezcla con menor concentración). Resulta interesante que al administrarse de manera individual dichos compuestos no hayan generado efecto alguno, pero al hacerlo de manera conjunta se haya producido un cambio tan notorio. Es probable que exista una conjunción de los efectos independientes de cada uno. Por un lado, la conocida acción sobre la retención a largo término de ambos compuestos: mientras la cafeína potencia las vías neurales que llevan información a centros superiores de procesamiento, la arginina actúa como precursor de compuestos clave en la formación de memoria a largo término como es el óxido nítrico (Müller 1996, 1997). Otro aspecto para remarcar es la acción antioxidante de la cafeína y la activación del sistema inmune de la arginina que al aunarse en las concentraciones dadas generen un aumento en la supervivencia de las abejas. Estas acciones permitirían imaginar estos efectos combinados de naturaleza aditiva tanto en procesos de formación de memorias estables y duraderas, como en el aumento de la sobrevivencia del insecto.

## 5.5 Conclusiones generales e implicancias

Si se tiene en cuenta que la tasa de ingesta promedio de solución de sacarosa para una concentración de 1M es de 1  $\mu\text{L/s}$  (Núñez 1966) por parte de una abeja y que las concentraciones de los compuestos utilizados oscilaban entre 0,01-0,15 mM es posible concluir que la cantidad de cafeína y arginina ingeridas fueron realmente ínfimas. Al calcularse dicha cantidad consumida a lo largo del entrenamiento (único momento donde fueron administradas las sustancias) se encontró que esta rondaba los 0,05  $\mu\text{g}$ . Estos escasos microgramos fueron suficientes para afectar no sólo la tasa de aprendizaje, sino también la formación de memorias a corto y largo plazo, además de la propia supervivencia de las abejas a lo largo de 24 horas. Lo cual demuestra lo potente que puede ser la presencia de ciertos compuestos presentes en concentraciones traza en la biología de estos insectos.

Además, es importante considerar que las concentraciones ofrecidas, y por lo tanto la cantidad de sustancias activas ingeridas, se seleccionaron dentro del intervalo de concentraciones que habitualmente se encuentran en los nectarios de ciertas especies florales (Baker y Baker 1976, Power *et al.* 2017, Taha *et al.* 2019, Wright *et al.* 2013). Es decir, ambas concentraciones seleccionadas, tanto para el caso de cafeína como el de arginina, pueden hallarse de manera individual en nectarios silvestres. Sin embargo, no se encontraron reportes que demuestren la presencia conjunta de ambos compuestos en néctares. Esto puede deberse a que los estudios publicados que versan sobre la composición química del néctar de distintas especies vegetales se centran en el análisis de una familia de compuestos determinada, por ejemplo, aminoácidos presentes (Baker y Baker

1973, 1976; Power *et al.* 2017); o en un análisis global de clases de compuestos, por ejemplo, proporción de carbohidratos , flavonoides, etc.(Nicolson y Thornburg 2007; Nicolson 2011). Más allá de lo anterior, si tenemos en cuenta que la mayoría de los néctares cuenta con una amplia diversidad de aminoácidos (Kearns e Inouye 1997), sería esperable que de encontrar cafeína en algún néctar, tal como sucede en *Citrus sp* y *Coffea sp* (Wright *et al.* 2013), también podría hallarse aminoácidos como la L-Arginina.

Además, en línea con la emulación de la experiencia natural que viven las abejas al interactuar con los néctares, la aplicación de fármacos en el protocolo de condicionamiento siguió una fuerte analogía con lo que les sucede a estos insectos en su actividad recolectora habitual dentro de los ambientes en los que se desarrollan.

Esto se debe a que el protocolo de entrenamiento conserva una estrecha relación con los procesos de visita floral e interacción con néctares que las abejas desarrollan. Por un lado, el tiempo promedio que pasa una abeja doméstica libando de una flor es de 3,77 segundos (Wright *et al.* 2013) que se equivalen con los 4 segundos utilizados en el protocolo. En cuanto a los intervalos de visita entre una y otra flor, estos resultan relativamente más cortos a los que aquí se dieron entre uno y otro ensayo, siendo de 30 segundos para el caso de las flores (Wright *et al.* 2013) y de 10 minutos para los ensayos. Sin embargo, al tenerse en cuenta que el tiempo promedio de recolección en cada recorrido de búsqueda (o sea desde que una abeja recolectora sale y vuelve a entrar de la colmena en búsqueda de recursos) es de varios minutos y en promedio menores a una hora (Núñez 1966, 1982) y que en un mismo recorrido las abejas son capaces de visitar un gran número de flores, resulta prudente pensar que este tipo de interacción con eventuales néctares de características similares podría darse en la naturaleza. Es decir que existe la posibilidad de que una abeja se encuentre con flores que ofrezcan estos recursos cada 10 min. a lo largo de un potencial recorrido de pecoreo.

Este trabajo, si bien se basa en un protocolo relativamente sencillo, muestra resultados contundentes y abre una serie de caminos hacia investigaciones futuras. Aquí se muestra la incumbencia de estas sustancias a nivel individual, pero si se tiene en cuenta que *A. mellifera* es un animal social, el efecto de las mismas podría llegar a trasladarse a toda la colmena, y en última instancia tener repercusiones en las plantas entomófilas y en los ecosistemas de los que forma parte. Partiendo de la teoría de que estos insectos manejan dos tipos de información, una que se conforma de las experiencias individuales y otra que es producto de la comunicación dentro de la colmena, al aplicarse esta serie de tratamientos dentro de una colmena se podrían producir cambios en el comportamiento con implicancias a escala colectiva. Si entendemos al aprendizaje como la capacidad de focalizar en la relación de una serie de eventos y retener dicha información, sería esperable que los procesos que potencian al mismo también faciliten el aprendizaje mediado por interacciones sociales (aprendizaje social). Por ejemplo, en el caso de que una serie de abejas consuman estas sustancias cabe esperar que las mismas sean más capaces de retener la información que sus congéneres transmiten durante las danzas de contoneo y que por ende sean más efectivas en la búsqueda y explotación de la fuente que

esté siendo explicitada. Además, también sería esperable que estas sustancias activen la búsqueda y promoción de fuentes de alimento que las posean, ya que se estaría estimulando su comportamiento apetitivo (de manera análoga a lo que se observó en este trabajo durante la fase de adquisición). Efectivamente, Couvillon y colaboradores (2015) demostraron que al agregarse cafeína a alimentadores artificiales dispuestos fuera de la colonia se da un aumento en la tasa de forrajeo (cantidad de abejas que salen de la colmena en búsqueda de alimento por cierta cantidad de tiempo) y en la tasa de danza (cantidad de danzas realizados por abeja), yendo en línea con lo aquí propuesto.

Por otro lado, estos hallazgos pueden tener una fuerte implicancia a nivel humano y ecológico, si se tiene en cuenta el rol de polinizadores que cumplen las abejas domésticas. Un ejemplo de esto podría darse si se alimenta con soluciones que contengan estas sustancias a las colmenas que son trasladadas para realizar servicios de polinización en los campos de cultivo. Es muy común en esta práctica apícola que se refuerce la alimentación de las abejas con soluciones ricas en azúcares y otros alimentos para poder soportar el estrés y la falta de diversidad de recursos que presentan los monocultivos. En línea con ello, en nuestro laboratorio se ha desarrollado una plataforma de formulados que contienen aromas sintéticos, los cuales logran mimetizar a los de la flor propia de distintos cultivos específicos dependiente de polinizadores. Su administración dentro de las colmenas ubicadas en los bordes del cultivo, potencia la búsqueda y recolección en las plantas portadoras de ese aroma en particular, incrementando el rinde del cultivo. Lo que aquí se propone es añadir a dicha mezcla azucarada (y aromatizada) la mezcla de estos compuestos psicoactivos, con el fin de promover una actividad recolectora más intensa, situación que promovería tanto una mayor cantidad de productos de colmena como una polinización más eficiente de los cultivos, lo que implicaría un mayor rinde de frutos/semillas. Vale recordar que la trashumancia de colmenas a cultivos dependientes de polinizadores se encuentra frente a un enorme desafío, ya que deben subsistir por varias semanas en un ambiente novedoso y con una dieta empobrecida, como presentan la mayoría de los monocultivos. En estas condiciones resulta particularmente útil poder retener con mayor firmeza una batería de memorias asociativas vinculadas al recurso y su entorno. De aplicar las mezclas de sustancias aquí mencionadas en los alimentadores de aquellas colmenas sería esperable poder mejorar dichas memorias y por ende la eficiencia de ese servicio. La primera de las memorias en ser retenidas (recordadas) resultaría de la asociación entre el aroma sintético del alimentador artificial dentro de la colmena y la recompensa azucarada. Este aprendizaje facilitaría la búsqueda de recursos con aromas similares a los aprendidos dentro de la colmena. Una vez detectadas, también les resultaría más fácil memorizar su ubicación y transferirla de manera eficiente al resto de sus congéneres dentro del nido. También podrían fortalecerse las memorias espaciales (vinculadas a la navegación) y los niveles de atención, los cuales son relevantes al decodificar la información transmitida durante las danzas de contoneo.

El fortalecimiento de las interacciones focalizadas entre abejas domésticas y ciertos cultivos no sólo podría

resultar útil para las especies directamente involucradas (incluyendo a los humanos en la ecuación), sino también para otros miembros de las comunidades biológicas que forman parte de los agroecosistemas. Existe un amplio registro bibliográfico sobre el fuerte grado de competencia que puede generar *A. mellifera* sobre otras abejas y demás polinizadores (Briggs *et al.* 2013; Paini 2004; Steffan-Dewenter y Tscharnkte 2000; Sugden *et al.* 1996), esto se da (tal como en prácticamente todos los eventos de competencia entre seres vivos) por explotar los mismos recursos. De poder focalizar la actividad recolectora de las abejas traslocadas en los campos de cultivo, el resto de los ambientes asociados, tales como los bordes de éste, quedarían libres de su presencia, resultando disponibles para el resto de los polinizadores (principalmente nativos). De esta manera, los últimos obtendrían una dieta relativamente diversa en nutrientes y las abejas podrían subsistir gracias al refuerzo alimenticio y la estimulación cognitiva que ofrezcan los alimentadores.

Por último, queda analizar el tratamiento que marcó una diferencia significativa en la supervivencia de las abejas. La combinación de las mayores concentraciones de ARG y CAF logró llevar la tasa de supervivencia de los individuos luego de 24 horas a un 98%, lo cual no se alcanzó con ninguno de los otros tratamientos administrados. Si bien los resultados aquí obtenidos se dieron en condiciones de laboratorio, las abejas utilizadas provenían de colmenas que tienen las mismas características que cualquier colmena comercial manejada por apicultores. Resulta claro que el próximo paso consiste en verificar dicho efecto a nivel colmena. Si tenemos en cuenta que las abejas están sufriendo enormes bajas poblacionales en distintas partes del mundo, resulta apremiante verificar este tipo de hallazgos y lograr así acercarnos a una solución del problema

- Abraham, W.C. & Williams J. M. (2008) LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3): 260–268.
- Aizen M. A., Morales C. L. & Morales J. M. (2008) Invasive Mutualists Erode Native Pollination Webs. *PLOS Biology*, 6(2): e31
- Aizen, M. A., & Harder, L D (2009) The global stock of domesticated honeybees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19: 915-918.
- Alston D.G. et al. (2007) Effects of the insecticide Phosmet on solitary bee foraging and nesting in orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environmental Entomology*, 36: 811–816.
- Amari, S.I. (1977) Neural theory of association and concept-formation. *Biological Cybernetics*, 26(3): 175–185.
- Arenas, A.; Ramírez, G.; Balbuena, M. S., & Farina, W. M. (2013) Behavioral and neural plasticity caused by early social experiences: the case of the honeybee. *Frontiers in Physiology*, 4:41
- Baker, H.G. & Baker, I. (1973) Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature*, 241: 543– 545
- Baker, H.G. & Baker, I. (1976) Analyses of amino-acids in flower nectars of hybrids and their parents, with phylogenetic implications. *New Phytologist*, 76: 87–98.
- Balbuena, M. S.; Arenas, A. & Farina, W. M. (2012) Floral scents learned inside the honeybee hive have a long-lasting effect on recruitment. *Animal Behaviour*, 84(1): 77–83.
- Balbuena, M. S.; Tison, L.; Hahn, M.-L., Greggers; U., Menzel, R., & Farina, W. M. (2015) Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology*, 218(17): 2799–2805.
- Balsam, P. D. (1985) The function of context in learning and performances. In: *Context and Learning* (Ed. by P. D. Balsam & A. Tomie). Lawrence Erlbaum, 1–22.
- Bates, D.; Maechler, M.; Bolker B. & Walker S. (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1): 1-48.
- Baude, M.; Kunin, W. E.; Boatman, N. D.; Conyers, S.; Davies, N.; Gillespie, M. A. K., ... Memmott, J. (2016) Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature*, 530(7588): 85–88.
- Ben-Ari, Y.; Aniksztejn, L., & Bregestovski, P. (1992) Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends in neurosciences*, 15(9): 333-339.
- Bérard, J., & Bee, G. (2010) Effects of dietary l-arginine supplementation to gilts during early gestation on foetal survival, growth and myofiber formation. *Annual Review of Animal Biosciences*, (10): 1680–1687.
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the



molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291: 2417–2419.

Bhagavan, S. & Smith, B. H. (1997) Olfactory conditioning in the honeybee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity. *Physiology and Behavior*, 61:107-117.

Biesmeijer, J. C.; Roberts, S. P. M.; Reemer, M...Kunin, W. E. (2006) Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313: 351–354.

Bouton, M. E., & Moody, E. W. (2004) Memory processes in classical conditioning. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 28(7), 663–674 Review.

Briggs, H. M.; Perfecto, I., & Brosi, B. J. (2013) The Role of the Agricultural Matrix: Coffee Management and Euglossine Bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) Communities in Southern Mexico. *Environmental Entomology*, 42(6): 1210–1217.

Brosi, B. J. et al. (2008) The effects of forest fragmentation on bee communities in tropical countryside. *Journal of Applied Ecology*, 45: 773–783.

Caballero, B.; Finglas, P., & Toldrá, F. (2015) *Encyclopedia of food and health*. Academic Press.

Carrew, T. J. (2000) *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behaviour*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Chalisova, N. I.; Kamyshev, N. G.; Lopatina, N. G.; Kontsevaya, E. A.; Urtieva, S. A., & Urtieva, T. A. (2011) Effect of encoded amino acids on associative learning of honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 47(6): 607–610.

Chambers, J. M., & Hastie, T. J. (1992) *Statistical Models in S*. Chapman and Hall: New York, United States of America

Couvillon, M. J.; Al Toufaily, H.; Butterfield, T. M.; Schrell, F.; Ratnieks, F. L. W., & Schürch, R. (2015). Caffeinated Forage Tricks Honeybees into Increasing Foraging and Recruitment Behaviors. *Current Biology*, 25(22): 3017

Cox-Foster, D. L.; Conlan, S.; Holmes, E. C.; Palacios, G.; Evans, J. D.; Moran, N. A., ... Lipkin, W. I. (2007) A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318 (5848): 283– 287.

D'Alessio, G.; Di Donato, A.; Jaffé, K.; Maldonado, H., & Zabala, N. A. (1982). Arginine and memory consolidation in praying mantis. *Journal of Comparative Physiology*, 147(2): 231–235.

Díaz, P. C.; Grüter C., & Farina W. M. (2007) Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 1589–1597.

Davis, S.; Butcher, S., & Morris, R. (1992) The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5- phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *The Journal of Neuroscience*, 12(1): 21–34.

- Day, S.; Beyer, R.; Mercer, A., & Ogden, S. (1990) The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *Journal of Apicultural Research*, 29: 138–146.
- De la Rua, P.; Jaffe, R.; Dall’Olio, R.; Muñoz, I.; Serrano, J., (2009) Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40: 263– 284.
- De Marco, R. J. & Farina, W. M. (2003) Trophallaxis in forager honeybees (*Apis mellifera*): resource uncertainty enhances begging contacts? *Journal of Comparative Physiology A*, 189:125–134.
- Díaz, P. C; Grüter, C., & Farina, W. M. (2007) Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers. *Behavioural Ecology Sociobiology*, 61: 1589–1597.
- Drewnowski, A. (2009) The Science and Complexity of Bitter Taste. *Nutrition Reviews*, 59(6): 163–169.
- Duan, J.; Li, W.; Yuan, D.; Sah, B.; Yan, Y., & Gu, H. (2012) Nitric oxide signaling modulates cholinergic synaptic input to projection neurons in *Drosophila* antennal lobes. *Neuroscience*, 219: 1-9.
- Ebbinghaus H. (1964) *Memory: A contribution to experimental psychology*. HA Ruger & CE Bussenius, Trans.
- Eisenberg, M., & Dudai, Y. (2004) Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don’t die. *European Journal of Neuroscience*, 20(12): 3397-3403
- Eisenhardt, D., & Menzel, R. (2006) Extinction learning, reconsolidation and the internal reinforcement hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(2): 167-173.
- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2018)  
<https://exactas.uba.ar/reservaecologica-cu/informe-reserva-ecologica-CU.pdf>
- Farina, W. M. (1996) Food-exchange by foragers in the hive: a means of communication among honeybees? *Behavioural Ecology Sociobiology*, 38: 59-64.
- Farina, W.M., & Wainseboim, A. J. (2005) Trophallaxis within the dancing context: a behavioral and thermographic analysis in honeybees. *Apidologie*, 36: 43-47.
- Farina, W.M.; Grüter, C., & Díaz, P. C. (2005) Social learning of floral odors inside the honeybee hive. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273: 1923–1928.
- Farina, W.M.; Grüter, C.; Acosta, L. E., & McCabe, S. (2007) Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften*, 94: 55–60.
- Farina, W. M.; Balbuena, M. S.; Herbert, L. T.; Mengoni Goñalons, C., & Vázquez, D. E. (2019) Effects of the Herbicide Glyphosate on Honey Bee Sensory and Cognitive Abilities: Individual Impairments with Implications for the Hive. *Insects*, 10(10): 354.

- Fewell, J. H.; Winston, M. L. (1992) Colony state and regulation of pollen foraging in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Behavioural Ecology Sociobiology*, 30: 387-393.
- Free, J. B. (1993) *Insect pollination of crops*. Academic Press: London, United Kingdom.
- Frings, H. (1944) The loci of olfactory end organs in the honeybee *Apis mellifera* Linn. *Journal of Experimental Zoology*, 97: 123-134.
- Gardner, K. E.; Seeley, T. D., & Calderone, N. W. (2008) Do honeybees have two discrete dances to advertise food sources? *Animal Behaviour*, 75: 1291-1300.
- Gerber, B.; Geberzahn, N.; Hellstern, F.; Klein, J.; Kowalksy, O.; Wüstenberg, D., & Menzel, R. (1996) Honeybees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Animal Behaviour*, 52: 1079-1085.
- Giurfa, M. & Lehrer, M. (2001) Honeybee vision and floral displays: from detection to close-up recognition. In: Chittka L, Thomson JD (eds) *Cognitive ecology of pollination*. Cambridge University Press, 61-82.
- Goelet, P.; Castellucci, V. F.; Schacher, S., & Kandel, E. R. (1986) The long and the short of long-term memory—a molecular framework. *Nature*, 322(6078): 419-422.
- Goulson, D.; Nicholls, E.; Botias, C., & Rotheray, E. L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957–1255957.
- Grüter, C.; Acosta, L. E., & Farina, W. M. (2006) Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behavioural Ecology Sociobiology*, 60: 707-715.
- Hammer, M. (1997) The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends in Neurosciences*, 20(6): 245-252.
- Hanley, M. E.; Franco, M.; Pichon, S.; Darvill, B., & Goulson, D (2008) Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology*, 22: 592-598.
- Hasselmo, M. E. (1995) Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behavioural Brain Research*, 67(1): 1-27.
- Herbert, L. T.; Vázquez, D. E.; Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *The Journal of experimental biology*, 217(19): 3457-3464.
- James, W. (1890) *The principles of psychology*, vol. 2. Henry Holt and company: New York, United States of America.
- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(3): 305-316.
- Kandel E. R.; Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (1992) *Principles of neural science*. Elsevier. New York, Amsterdam, London, Tokyo.

Kearns, C. A., & Inouye, D. W. (1997) Pollinators, Flowering Plants, and Conservation Biology. *BioScience*, 47(5): 297–307.

Keast, R. S. J., & Roper, J. (2007). A Complex Relationship among Chemical Concentration, Detection Threshold, and Suprathreshold Intensity of Bitter Compounds. *Chemical Senses*, 32(3): 245–253.

Kim, Y. S., & Smith, B. H. (2000) Effect of an amino acid on feeding preferences and learning behavior in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 46(5): 793–801.

Kirchner, W. H., & Grasser, A. (1998) The Significance of Odor Cues and Dance Language Information for the Food Search Behavior of Honeybees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behaviour*, 11(2): 169-178.

Klein, A. M.; Vaissiere, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608) : 303-313.

Knudsen, J. T.; Tollsten, L., & Bergström, L. G. (1993) Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33(2): 253–280.

Kriško, A.; Kveder, M., & Pifat, G. (2005). Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 355(1-2): 47-53.

Kuwabara, M. (1957) Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifera*. *J Fac Hokkaido Univ Serv VI Zool*, 13: 458-464.

Lee, C. (2000) Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295(1-2): 141-154.

Lenth, R.; Singmann, H., & Love, J. (2018) Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. R package version, 1(1): 3

León-Carmona, J. R., & Galano, A. (2011) Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals?. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(15): 4538-4546.

Lim, S.; Jung, J.; Yunusbaev, U.; Ilyasov, R., & Kwon, H. W. (2019) Characterization and its implication of a novel taste receptor detecting nutrients in the honey bee, *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 9(1): 1-13

Lindauer, M. (1955) Schwarmbienen auf Wohnungssuche. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 37: 263-324.

Lindauer, M. (1961) Communication among social bees. Harvard University Press

Lisman, J., & Goldring, M. (1988) Evaluation of a model of long-term memory based on the properties of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *Journal de Physiologie*, 83(3): 187-197.

- Lopatina, N. G. (2017) The Influence of Combinations of Encoded Amino Acids on Associative Learning in the Honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 53(2): 123—128.
- Luscher, C., & Malenka, R. C. (2012) NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6): a005710.
- Mackintosh, N. J. (1994) *Animal learning and cognition*. Academic Press: London, UK.
- Malinow, R.; Schulman, H., & Tsien, R. W. (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245(4920): 862-866.
- Hügel, M. F. (1962) Étude de quelques constitutants du pollen. *Ann. Abeille*, 5 (2): (97-133).
- McGaugh, J. L. (2000) Memory--a Century of Consolidation. *Science*, 287(5451): 248–251.
- McGregor, S. E. (1976) Insect pollination of cultivated crop plants (pp. 1-9). Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.
- Menzel, R. (1985) Learning in honeybees in an ecological and behavioural context. *Fortschritte der Zoologie*, 31: 55-74.
- Menzel, R.; Heyne, A.; Kinzel, C.; Gerber, B., & Fiala, A. (1999) Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-realising functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 113 (4): 744-754.
- Menzel, R., & Giurfa, M. (2001) Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 5(2): 62–71.
- Menzel, R. (2012) The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(11): 758-768.
- Michelsen, A. (1999) The dance language of honeybees: Recent findings and problems. In Hauser, M. D. & Konishi, M. (eds.) *The Design of Animal Communication*, 111-131. MA:MIT Press, Cambridge.
- Michelsen, A. (2003) Signals and flexibility in the dance communication of honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 189: 165-174.
- Michener, C. D. (1974) *The social behaviour of Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press, Cambridge.
- Michener, C. D. (2000) *The bees of the world*. Second Edition. The Johns Hopkins University Press.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2019) <https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-miel-argentina-ingresara-al-mercado-chino>.

- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900) Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss (Vol. 1). J. A. Barth.
- Müller, U. (1996) Inhibition of Nitric Oxide Synthase Impairs a Distinct Form of Long-Term Memory in the Honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*, 16: 541–549.
- Müller, U. (1997) The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology*, 51: 363–381.
- Müller, U. (2000) Prolonged Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase during Conditioning Induces Long-Term Memory in Honeybees. *Neuron*, 27: 159–168.
- Myers, R. L. (2007) *The 100 Most Important Chemical Compounds: A Reference Guide*. Greenwood Press, 55.
- Nabhan, G. P., & Buchmann, S. (1997) The fraying web of life. In: *World resources 2000–2001*. UNDP, UNEP, WB, WRI, pp 136–138.
- Negri, P.; Maggi, M.; Correa-Aragunde, N.; Brasesco, C.; Eguaras, M., & Lamattina, L. (2013) Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie*, 44(5): 575–585.
- Nicholls, E.; Krishna, S.; Wright, O.; Stabler, D.; Krefft, A.; Somanathan, H., & Hempel de Ibarra, N. (2019) A matter of taste: the adverse effect of pollen compounds on the pre-ingestive gustatory experience of sugar solutions for honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 205(3): 333–346.
- Nicolson, S. W., & Thornburg, R. W. (2007) *Nectar chemistry. Nectaries and Nectar*, 215–264. Springer Science & Business Media: New York, United States of America
- Nicolson, S. W. (2011) Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46 (2): 197–204.
- Núñez, J. A. (1966) Quantitative Beziehungen zwischen den Eigenschaften von Futterquellen und dem Verhalten von Sammelbienen *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 53: 142–164.
- 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. *Journal Apicultural Research*, 21: 139-150.
- Page, R. E.; Erber, J., & Fondrk, M. K. (1998) The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 182: 489-500.
- Paini, D. R. (2004) Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) on native bees: A review. *Austral Ecology*, 29(4): 399–407.
- Park, W. (1925) The storing and ripening of honey by honeybees. *Journal of Economic Entomology*, 18(2): 405-410.
- Pavlov, I. P. (1927) *Lectures on conditioned reflexes*. International publishers, New York.

Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38: 863–869.

Power, A. E.; Berlau, D. J.; McGaugh, J. L., & Steward, O. (2006) Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learning & Memory*, 13(1): 27–34.

Power, E. F.; Stabler, D.; Borland, A. M.; Barnes, J., & Wright, G. A. (2017) Analysis of nectar from low-volume flowers: A comparison of collection methods for free amino acids. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(3):734-743

R Development Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org/>

Raguso, R. A., & Pichersky, E. (1999) New Perspectives in Pollination Biology: Floral Fragrances. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biology*, 14(2): 95–120

Rescorla, R. A; Durlach, P. J., & Grau, J. W. (1985) Context learning in Pavlovian conditioning. In: *Context and Learning* (Ed. by P. D Balsam & A. Tomie), pp. 23–56. L. Erlbaum: New Jersey, United States of America.

Riley, J. R.; Greggers, U.; Smith, A. D.; Reynolds, D. R.; Menzel, R. (2005) The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature*, 435: 205–207.

Rinderer, T. E., & Baxter, J. R. (1978) The effect of empty comb on the hoarding behavior and honey production of the honeybee. *Journal of Economic Entomology*, 71: 757-759.

Rivero, A. (2006) Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology* Vol.22 No.5.

Robinson, G. E. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review of entomology*, 37(1), 637-665.

Roffet-Salque, M.; Regert, M.; Evershed, R. P.; Outram, A. K.; Cramp, L. J. E.; Decavallas, O., ... Mirabaud, S. (2015) Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature*, 527(7577): 226–230.

Rohrseitz, K.; Tautz, J. (1999) Honey bee dance communication: waggle run direction coded in antennal contacts? *Journal of Comparative Physiology A*, 184: 463-470.

Rortais, A.; Arnold, G., Halm, M.-P., & Touffet-Briens, F. (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36: 71–83.

Rosenkranz, P.; Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 96–119.

Sammataro, D.; Gerson, U., & Needham, G. (2000) Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications, and Impact. *Annual Review of Entomology*, 45(1): 519–548.

Seeley, T. D. (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4): 287-293.

Seeley, T. D. (1995) *The wisdom of the hive: the social physiology of honeybee colonies*. Harvard University Press.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [SENASA], Dirección Nacional de Sanidad Animal (2014). Miel argentina de alta calidad endulza al mundo. *Gacetilla*, Abril 2014. Online: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1606&ino=1606&io=27155>.

Shiraishi, A., & Kuwabara, M. (1970) The effects of amino acids on the labellar hair chemosensor cells of the fly. *Journal of General Physiology*, 56: 768–782.

Simcock, N. K.; Gray, H. E., & Wright, G. A. (2014) Single amino acids in sucrose rewards modulate feeding and associative learning in the honeybee. *Journal of Insect Physiology*, 69: 41–48.

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

Sossin, W. S.; Lacaille, J. C.; Castellucci, V. F., & Belleville, S. (2008). PKMz, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Essence of Memory*, 27.

Søvik, E., Perry, C. J., & Barron, A. B. (2015). Insect Reward Systems. *Genomics, Physiology and Behaviour of Social Insects*, 189–226.

Srinivasan, M. V. (1994) Pattern recognition in the honeybee: recent progress. *Journal Insect Physiology*, 40: 183–194.

Srinivasan, M. V.; Zhang, S. W., & Bidwell, N. J. (1997) Visually mediated odometry in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 200: 2513– 2522.

Steffan-Dewenter, I., & Tscharntke, T. (2000). Resource overlap and possible competition between honeybees and wild bees in central Europe. *Oecologia*, 122(2): 288–296.

Strachecka, A.; Krauze, M.; Olszewski, K.; Borsuk, G.; Paleolog, J.; Merska, M., & Grzywnowicz, K. (2014) Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry (Moscow)*, 79(11): 1192–1201

Sugden, E. A.; Thorp, R. W., & Buchmann, S. L. (1996) Honey bee-native bee competition: focal point for environmental change and apicultural response in Australia. *Bee World*, 77(1): 26 – 44.

Suzuki, A.; Josselyn, S. A.; Frankland, P. W.; Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, 24: 4787–4795.

Taha, E. A.; Al-Kahtani, S., & Taha, R. (2019) Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (2): 232-237.

Takeda, K. (1961) Classical conditioned response in the honeybee. *J. Insect Physiology*, 6: 168–179.



- Thom, C.; Gilley, D. C.; Hooper, J., & Esch, H. E. (2007) The scent of the waggle dance. *PLoS Biol* 5: e228.
- Vanderplanck, M., Moerman, R.; Rasmont, P.; Lognay, G.; Wathelet, B.; Wattiez, R., & Michez, D. (2014) How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? *PLoS ONE*, 9(1): e86209
- Van Engelsdorp, D., & Meixner, M. D. (2010) A historical review of managed honeybee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 80–95
- von Frisch, K. (1911). Das Parietalorgan der Fische als funktionierendes Organ. *Ges Morphol Physiol München, Sitzungsber*, 27: 16-8.
- von Frisch, K. (1915) Ueber den Geruchsinne der Biene und seine Bedeutung fuer den Blumenbesuch.
- von Frisch, K. (1923) Über die Sprache der Bienen. *Zoologie Jour Physiol* 40: 1-186.
- von Frisch, K. (1967) The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, Cambridge.
- Watanabe, M. E. (1994) Pollination worries rise as honeybees decline. *Science*, (265): 1170.
- Whitfield, C. W.; Behura, S. K.; Berlocher, S. H.; Clark, A. G.; Johnston, J. S; Sheppard, W. S., ... Tsutsui, N. D. (2006) Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honeybee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799): 642–645.
- Wilson, E. O. (1971) The insect societies. The Belknap Press
- Wilson, E. O., & Hölldobler, B. (2005) Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38): 13367-13371.
- Winfree, R.; Aguilar, R.; Vázquez, D. P.; LeBuhn, G., & Aizen, M. A. (2009) A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90(8): 2068–2076
- Winston, M. L. (1987) The biology of the honeybee. Harvard University Press.
- Woods, T.E. (2012) How the Catholic Church Built Western Civilization. Simon and Schuster
- Wright, G. A., & Schiestl, F. P. (2009) The evolution of floral scent: The influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Functional Ecology*, 23: 841
- Wright, G. A.; Baker, D. D.; Palmer, M. J.; Stabler, D.; Mustard, J. A.; Power, E. F., ... Stevenson, P. C. (2013) Caffeine in Floral Nectar Enhances a Pollinator's Memory of Reward. *Science*, 339(6124): 1202–1204.
- Zhu, R.; Lv, H.; Liu, T.; Yang, Y.; Wu, J., & Yan, S. (2016) Feeding Kinematics and Nectar Intake of the HoneyBee Tongue. *Journal of Insect Behavior*, 29(3): 325–339.

