UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Amanda Rodrigues Vieira

MODULAÇÃO DA APRENDIZAGEM VISUAL POR AMINAS BIOGÊNICAS E SENSIBILIDADE ESPECTRAL DA FOTOTAXIA POSITIVA EM *Apis mellifera*

Belo Horizonte
2018

Amanda Rodrigues Vieira

MODULAÇÃO DA APRENDIZAGEM VISUAL POR AMINAS BIOGÊNICAS E SENSIBILIDADE ESPECTRAL DA FOTOTAXIA POSITIVA EM *Apis mellifera*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Theo Rolla Paula Mota

Co-Orientador: Jerome Baron

Belo Horizonte

2018

043 Vieira, Amanda Rodrigues.
Modulação da aprendizagem visual por aminas biogênicas e sensibilidade espectral da fototaxia positiva em Apis mellifera [manuscrito] / Amanda Rodrigues Vieira. – 2018.
101 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Theo Rolla Paula Mota. Co-Orientador: Jerome Baron.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Octopamina. 3. Dopamina. 4. Abelhas. 5. Fototaxia. 6. Células Fotorreceptoras de Invertebrados. I. Mota, Theo Rolla Paula. II. Baron, Jerome Paul Armand Laurent. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

Ficha catalografica elaborada pela bibliotecária Fabiane C. M. Reis – CRB: 6/2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA
AMANDA RODRIGUES VIEIRA

Realizou-se, no dia 16 de agosto de 2018, às 15:00 horas, Sala da Congregação bloco F1- ICB, UFMG Campus Pampulha, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 158ª defesa de dissertação, intitulada *Modulação da aprendizagem visual por aminas biogênicas e sensibilidade espectral da fototaxia positiva em Apis mellifera*, apresentada por AMANDA RODRIGUES VIEIRA, número de registro 2016673944, graduada no curso de CIENCIAS BIOLOGICAS/NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Theo Rolla Paula Mota - Orientador (UFMG), Prof(a). Jerome Paul Armand Laurent Baron (UFMG), Prof(a). Grace Schenatto Pereira Morais (UFMG), Prof(a). Reisla Silva de Oliveira (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

(X) Aprovada

( ) Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 16 de agosto de 2018.

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Prof(a). Theo Rolla Paula Mota (Doutor)

Prof(a). Jerome Paul Armand Laurent Baron (Doutor)

Prof(a). Grace Schenatto Pereira Morais (Doutora)

Prof(a). Reisla Silva de Oliveira (Doutora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a toda a energia espiritual do universo por fornecer energia vital para fortalecer minha evolução em busca de ser uma pessoa cada dia melhor neste planeta. Em meio a tantas situações que a vida é capaz de proporcionar, saber que a lei da atração é apenas uma questão de colher frutos do que se plantou é gratificante, pois me garante paz e tranquilidade para ter a certeza de que somos apenas pequenas criaturas que precisam evoluir o pensamento para gerar amor, para que o nosso mundo seja palco de dias cada vez melhores.

Aos meus pais, Antônio e Rose por terem me dado a vida e por fornecer, mesmo que com dificuldades, uma base boa para os meus estudos. Por incentivar e acreditar no meu lado que desde muito pequena, sempre foi interessado em ciência. Se não fosse por vocês, eu não estaria onde estou. Muito obrigada.

À minha amiga, Angélica Samer por estar presente em minha vida. Por ser aquela que sempre esteve ao meu lado em diversas situações e que sempre me ajudou com seu coração puro. Por incentivar meu crescimento, fornecer energia do bem, se lembrar sempre de mim e preocupar comigo. Muito obrigada por ter me incentivado à entrada ao mestrado, e estudado ao meu lado ao longo de todo esse processo seja dia, tarde, noite ou madrugada. Gratidão por ter você em meu caminho.

Aos meus irmãos, Leandro, André e Antônio pelo companheirismo e apoio de sempre, em especial meu querido André por ter me dado enorme apoio e suporte para com as adversidades da vida.

Ao meu tio Marco Antônio por apoiar meu estudo desde criança e por incentivar minha carreira acadêmica.

Ao meu querido primo Luis Carlos, grande amigo! Pelo incentivo aos meus estudos e apoio em vários momentos.

À minha prima Anna Carolina por sempre se preocupar e incentivar meus estudos.

À minha tia Uiara pela atenção e carinho.

Às minhas fiéis companheiras caninas Kika e Mel, que são almas puras e boas e que sempre me alegraram ao longo dessa jornada.

Aos amigos Raquel Speziali, Lucas Kraemer, Marina Jurisch, Lucas Carrijo, Camila de Paula, Mateus Xavier, Phillippe Samer, Sandra Lallo e Mércio Soares, pelo companheirismo, apoio e auxílio em diversos momentos em especial ao Lucas e ao Phillippe por sua dedicação e carinho em me ajudar a desenvolver este trabalho.

Agradeço ao meu professor e orientador Theo Mota por instruir e me guiar mediante os estudos, me fazer crescer como cientista, por se importar com meu desenvolvimento acadêmico e por ser uma ótima pessoa preocupada em me ajudar. Desde a graduação te considero um excelente professor e uma pessoa com o coração muito bom. Sou grata por fazer parte de sua equipe.

Agradeço ao meu coorientador Jerome Baron pelas idéias de grande valia para o desenvolvimento do meu projeto e por ser sempre solícito.

Ao Breno Mansur, por ter me levado ao apiário sempre com muita boa vontade e por me auxiliar em diversos momentos.

À Natália Silveira e ao Lucas Resende por fazerem parte deste projeto e auxiliarem na criação e execução do mesmo.

À equipe da Estação Ecológica da UFMG e ao Ivan por cuidar e manter o apiário, sendo essencial à execução deste projeto.

À equipe de motoristas da UFMG pelo serviço prestado mediante a execução deste projeto, em especial ao Geraldo por ser sempre solícito.

Aos professores do departamento de Neurociências da UFMG pelos valiosos ensinamentos durante disciplinas e aos funcionários pelo apoio prestado.

À professora Grace Schenatto, Reisla Oliveira e Cleiton Aguiar por aceitarem meu convite para formar minha Banca de Defesa.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

A abelha *Apis mellifera* tornou-se um modelo tradicional para estudos da percepção e aprendizagem visual. A principal metodologia utilizada até o momento nestes estudos é o condicionamento apetitivo operante de abelhas em voo, porém esta abordagem dificilmente pode ser combinada a protocolos invasivos para estudo das bases neurobiológicas subjacentes. Diante disso, esforços vêm sendo feitos para desenvolver novos protocolos de condicionamento visual clássico em abelhas imobilizadas no laboratório, porém os níveis de aprendizagem permanecem consideravelmente mais fracos do que aqueles obtidos em animais livres. Foi observado que estímulos luminosos cromáticos são melhor aprendidos por abelhas em condicionamento clássico no laboratório do que estímulos visuais compostos por imagens coloridas que refletem a luz ambiente. Porém dois problemas estão associados ao uso de estímulos luminosos cromáticos nestes estudos: 1- as diferenças de intensidade perceptual dos estímulos dificilmente podem ser calibradas, não permitindo concluir se as abelhas aprendem a discriminar a intensidade ou a cor dos mesmos; 2- abelhas apresentam uma forte fototaxia positiva à luz, a qual pode influenciar a saliência perceptual destes estímulos. O presente trabalho buscou preencher estas lacunas através de um estudo integrativo que avaliou como alguns fatores físicos, neurobiológicos e cognitivos modulam a fototaxia e a aprendizagem visual em abelhas no laboratório. Investigamos inicialmente a capacidade das abelhas em usar informações visuais adquiridas durante um condicionamento clássico para discriminar estímulos visuais em um novo contexto operante. Para isso, realizamos um condicionamento clássico diferencial do reflexo de extensão da probóscide, seguido de testes de orientação operante em um labirinto Y, utilizando o mesmo par de estímulos luminosos. Para evitar a influência da fototaxia neste experimento, foi realizada uma calibração prévia da irradiância do par de estímulos cromáticos até um ponto de isoluminância perceptual. A transferência de discriminação visual do contexto clássico para o operante foi claramente observada, com abelhas orientando-se significativamente mais no labirinto Y em direção ao estímulo previamente recompensado. Isso mostra que as memórias visuais adquiridas pelas abelhas são resistentes a mudanças de contexto entre condicionamento e teste de memória. Essa nova abordagem de discriminação visual foi combinada a injeções farmacológicas seletivas para avaliar o efeito da dopamina e da octopamina na aprendizagem visual apetitiva. Tanto antagonistas dopaminérgicos quanto octopaminérgicos inibiram o desempenho de discriminação, indicando que ambas estas aminas modulam a aprendizagem visual apetitiva em abelhas. Realizamos ainda um estudo comportamental para avaliar como o comprimento de onda da luz e os fotorreceptores presentes nos ocelos e nos olhos compostos influenciam as respostas

de fototaxia positiva. Avaliando as trajetórias de abelhas que se guiam no escuro atraídas por luzes monocromáticas de diferentes intensidades, observamos que diferentes comprimentos de onda modulam de forma distinta a resposta de fototaxia positiva. Além disso, ficou clara uma participação diferenciada dos ocelos e dos olhos compostos nesta modulação. Nosso estudo representa uma importante contribuição para a compreensão dos mecanismos neurofisiológicos e cognitivos subjacentes à fototaxia positiva e à aprendizagem visual em abelhas.

Palavras-chave: octopamina; dopamina; *Apis mellifera*; aprendizagem visual associativa; fototaxia; fotorreceptores.

ABSTRACT

The honeybee *Apis mellifera* represents a traditional model for studies of visual perception and learning. Operant appetitive conditioning of free-flying bees has been the main methodology used so far in these studies, but this approach can hardly be combined with invasive protocols for studying underlying neurobiological mechanisms. Therefore, efforts have been made to develop new protocols of classical visual conditioning with harnessed bees in the laboratory, but learning performances remain considerably weaker than those obtained in free-flying animals. In a classical conditioning framework, chromatic luminous stimuli are better learned by harnessed bees in the laboratory than visual stimuli composed of colored images that reflect the environmental light. However, two problems are associated with the use of chromatic luminous stimuli in these studies: 1- differences in perceptual intensity of the stimuli can hardly be calibrated, impeding conclusions about whether bees learn to discriminate the intensity or the color of the stimuli; 2-bees present a strong positive phototaxis to light, which may influence the perceptual salience of these stimuli. The present work aimed to fill these gaps through an integrative study that analyzed how some physical, neurobiological and cognitive factors modulate visual learning and phototaxis in bees. We first investigated the ability of bees to use visual information acquired during classical conditioning to discriminate visual stimuli in a new operant context. For this purpose, we performed classical differential conditioning of the proboscis extension reflex, followed by operant orientation tests in a Y-maze, using the same pair of luminous stimuli. In order to avoid the influence of phototaxis in this experiment, we performed a previous calibration of the irradiance of the chromatic-stimuli pair to a point of perceptual isoluminance. Visual discrimination transfer was clearly observed, with pre-trained honeybees significantly orienting their flights towards the former rewarded stimulus. We thus show that visual memories acquired by honeybees are resistant to context changes between conditioning and the retention test. We combined this visual discrimination approach with selective pharmacological injections to evaluate the effect of dopamine and octopamine in appetitive visual learning. Both octopaminergic and dopaminergic antagonists impaired visual discrimination performance, suggesting that both these biogenic amines modulate appetitive visual learning in honeybees. We also performed a behavioral study to evaluate how light wavelength and the photoreceptors present in the ocelli or the compound eyes influence the positive phototactic responses of bees. By evaluating the trajectories of bees that are guided in the dark by monochromatic lights of different intensities, we observed that distinct wavelengths differently

modulate the phototactic response. In addition, different contributions of the ocelli and the compound eyes for this modulation were found. Our study brings an important contribution to the understanding of neurophysiological and cognitive mechanisms underlying positive phototaxis and visual learning in honeybees.

Keywords: octopamine; dopamine*; Apis mellifera*; visual associativity; phototaxis; photoreceptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração dos olhos compostos da abelha 21

Figura 2 – Demonstração do condicionamento visual e calibração das luzes monocromáticas 37

Figura 3 – Condicionamento clássico do PER seguido do teste operante no labirinto Y 39

Figura 4 – Experimento controle para o efeito dos antagonistas aminérgicos na discriminação visual 41

Figura 5 – Curva de aprendizagem do condicionamento clássico e orientação no teste operante para abelhas injetadas com flupentixol 44

Figura 6 – Desempenho do condicionamento visual diferencial e teste de retenção operante em abelhas injetadas com epinastina 45

Figura 7 – Desempenho do condicionamento visual diferencial e teste de retenção operante em abelhas injetadas com mianserina 46

Figura 8 – Índice de discriminação (DI) para o condicionamento visual clássico em abelhas injetadas com solução RINGER ou diferentes concentrações de antagonistas aminérgicos 47

Figura 9 – Desempenho do condicionamento visual clássico e teste de retenção operante em abelhas injetadas com flupentixol 49

Figura 10 – Desempenho do condicionamento visual clássico e teste de retenção operante em abelhas injetadas com epinastina 50

Figura 11 – Orgãos periféricos visuais da abelha e grupos utilizados no experimento de sensibilidade espectral 63

Figura 12 – Imagem ilustrativa do setup para experimento de resposta a fototaxia 64

Figura 13 – Curvas de irradiância absoluta dos LEDs utilizados no experimento 65

Figura 14 – Demonstração da análise de processamento de vídeo do experimento 68

Figura 15 – Gráficos para grupo controle em experimento de análise fototática 71

Figura 16 – Gráficos para grupo olhos compostos em experimento de análise fototática 73

Figura 17 – Gráficos para grupo ocelos em experimento de análise fototática 75

Figura 18 – Gráficos para os grupos controle, olhos compostos e ocelos para a cor verde 76

Figura 19 – Gráficos para os grupos controle, olhos compostos e ocelos para a cor azul 77
Figura 20 – Gráficos para os grupos controle, olhos compostos e ocelos para a cor UV 79
Figura 21 – Curvas de emissão da irradiância dos LEDs sobrepostas as curvas de absorbância dos fotorreceptores S, M e L da abelha 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μW/cm²/nm: micro watts por centímetro cúbico por nanômetro

AmBOP: opsina de comprimento de onda médio *Apis mellifera*

AmDOP1: receptor dopaminérgico 1 *Apis mellifera*

AmDOP2: receptor dopaminérgico 2 *Apis mellifera*

AmDOP3: receptor dopaminérgico 3 *Apis mellifera*

AmLOP1: opsina de comprimento de onda longo 1 *Apis mellifera*

AmLOP2: opsina de comprimento de onda longo 2 *Apis mellifera*

AmOA1: receptor octopaminérgico 1 *Apis mellifera*

AmUVOP: opsinas opsina de comprimento de onda curto *Apis mellifera*

ANOVA: análise de variância

C: cluster

C1: cluster dopaminérgico 1

C2: cluster dopaminérgico 2

C3: cluster dopaminérgico 3

cm: centímetro

CONCEA: conselho nacional de controle da experimentação animal do brasil

CS: estímulo condicionado

CS-: estímulo condicionado não reforçado

CS+: estímulo condicionado reforçado

DI: índice de discriminação

DL: distância linear entre o ponto de origem e o ponto final

DP: comprimento da curva executada pela abelha

G: proteína g

GTP(G): proteína de ligação g

ISI: intervalo entre estímulo

ITI: intervalo entre ensaio

L(λ): composição espectral

L: fotorreceptor de longo comprimento de onda

LED: diodo emissor de luz

LMC: células monopolares da lâmina

M: fotorreceptor de médio comprimento de onda

M: molar

min: minutos

mM: mili molar

mm: milímetro

mm^3: milímetro cúbico

NaCl: cloreto de sódio

nm: nanômetros

NS: não significativo

PAM: cluster medial anterior pareado

PER: reflexo de extensão da probócide

PWM: pulse width modulation

PX: pixel

RNAi: rna de interferência

S: fotorreceptor de curto comprimento de onda

SEM: erro padrão da média

SOG: gânglio subesofágico

US: estímulo incondicionado

UV: ultravioleta

VUMmd1:célula mediana não-pareada ventral do neurômero mandibular 1

VUMmx1: célula mediana não-pareada ventral do neurômero maxilar 1

λ: comprimento de onda

μL: microlitro

$\mu W/CM^2$: micro watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA..... 17
1.1 A aprendizagem visual no contexto clássico e operante..... 17
1.2 A fototaxia positive em abelhas..... 19
1.3 A visão tricomática e os distintos fotorreceptores em abelhas..... 19
1.3.1 Estrutura dos olhos compostos..... 20
1.3.2 Estrutura dos Ocelos..... 21
1.3.3 O Sistema visual no cérebro da abelha..... 22
1.4 Importância das aminas biogênicas..... 24
2. OBJETIVOS..... 25
2.1 Objetivo Geral..... 25
2.2 Objetivos Específicos..... 25
2.2.1 Objetivos Específicos do Capítulo 1..... 25
2.2.2 Objetivos Específicos do Capítulo 2..... 26
CAPÍTULO 1: TRANSFERÊNCIA DE DISCRIMINAÇÃO VISUAL E MODULAÇÃO POR AMINAS BIOGÊNICAS NA ABELHA *Apis mellifera* 27
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... 28
2. METODOLOGIA..... 31
2.1 Animais..... 31
2.2 Procedimentos experimentais..... 31
2.2.1 Procedimento 1: Condicionamento visual diferencial clássico do PER..... 31
2.2.2 Testes de orientação no labirinto Y..... 33
2.2.3 Calibração e isoluminância dos estímulos visuais..... 34
2.2.4 Injeções farmacológicas..... 35
2.2.5 Análise estatística..... 36
3. RESULTADOS..... 36
3.1 Orientação fototática no labirinto Y e a isoluminância dos estímulos cromáticos..... 36
3.2 Condicionamento visual diferencial do PER..... 38
3.3 Transferência de aprendizagem de um contexto clássico para um operante..... 38
3.4 Efeito da dopamine e da octopamine na aprendizagem visual associativa..... 39
3.4.1 Experimentos controle..... 39

3.4.2 Condicionamento clássico seguido de teste de transferência operante..... 41
3.4.3 Condicionamento clássico seguido de testes de retenção do PER..... 47
4. DISCUSSÃO..... 51
4.1 Condicionamento visual apetitivo em abelhas fixadas..... 51
4.2 Transferência de informação visual em abelhas..... 53
4.3 O papel da dopamina e octopamina na aprendizagem visual..... 53
4.4 Possíveis substratos neurais da aprendizagem visual apetitiva em abelhas..... 56
CAPÍTULO 2: ANÁLISE DA SENSIBILIDADE ESPECTRAL DA FOTOTAXIA POSITIVA EM *Apis mellifera*..... 58
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... 59
2. METODOLOGIA..... 62
2.1 Animais..... 62
2.2 Grupos experimentais..... 62
2.3 Arena experimental..... 64
2.4 Estímulos visuais..... 65
2.5 Registros das respostas de fototaxia positiva..... 66
2.6 Análise de imagem..... 66
2.7 Análise estatística..... 68
2.8 Normas éticas..... 69
3. RESULTADOS..... 69
3.1 Comparação entre a resposta para diferentes cores em abelhas intactas..... 69
3.2 Comparação entre a resposta para diferentes cores em abelhas apenas com olhos compostos (ocelos cobertos) 71
3.3 Comparação entre a resposta para diferentes cores em abelhas apenas com os ocelos (olhos compostos cobertos) 73
3.4 Papel de diferentes estruturas visuais nas respostas fototáticas medidas para a luz verde..... 75
3.5 Papel de diferentes estruturas visuais nas respostas fototáticas medidas para a luz azul..... 76
3.6 Papel de diferentes estruturas visuais nas respostas fototáticas medidas para a luz UV..... 78
4. DISCUSSÃO..... 80
5. CONCLUSÕES FINAIS..... 85

6. REFERÊNCIAS..... 87
7. ANEXOS..... 98

1 REVISÃO DE LITERATURA

O cérebro da abelha é muito mais simples que o de vertebrados, porém, funcionalmente, seu sistema visual é extremamente rico. Estudos pioneiros já demonstravam as incríveis capacidades visuais deste inseto e as notáveis similaridades, em termos psicofísicos, aos processos cognitivos de percepção visual em outros modelos vertebrados, incluindo o homem (Srinivasan *et al.,* 2012). Em 1914, Karl Von Frisch demonstrou que as abelhas possuem visão de cores verdadeira. Posteriormente, Daumer (1956) mostrou que a visão de cores em abelhas domésticas é tricromática, seguindo um princípio de organização similar ao dos seres humanos. Desde então, muitos estudos comportamentais foram desenvolvidos para descrever a discriminação e a aprendizagem de cores nas abelhas (para revisão: Menzel *et al.,* 1991, Dyer 2011, Agarwell e Mota, 2012). A maioria destes estudos revelou similaridades impressionantes entre abelhas e seres humanos no nível perceptual, por exemplo, constância de cor e contrastes sucessivos e simultâneos de cores (Menzel *et al.,* 1991, Dyer 2011, Agarwell e Mota, 2012). Abelhas também aprendem e memorizam outros atributos visuais como formas, padrões, orientação, direção, contraste, intensidade luminosa, profundidade e movimento. A aprendizagem de todos esses atributos garante uma eficiente navegação e desempenho em diversas tarefas motoras complexas envolvendo o cotidiano social da colmeia (Srinivasan *et al.,* 1994; Collet 1994, 1996, Collet *et al.,* 1997; Giurfa e Menzel, 1997).

1.1 A aprendizagem visual no contexto clássico e operante

As abelhas *Apis mellifera* possuem capacidades notáveis de aprendizagem e memória, podendo resolver tarefas de discriminação de diversos atributos visuais, além de categorias e conceitos visuais mais complexos (e.g. simetria, relação espacial: acima/abaixo). Portanto, diferentes protocolos de condicionamento associativo visual foram desenvolvidos para este modelo (Giurfa 2003, 2004, Giurfa e Menzel, 1997; Avarguès-Weber *et al.,* 2012; Avarguès-Weber e Mota, 2016). Antes de descrevermos estes paradigmas de condicionamento visual usados para estudos de aprendizagem e memória visual em abelhas, alguns conceitos fundamentais das teorias de aprendizagem associativa devem ser apresentados.

Aprendizagem associativa é uma capacidade que permite aos animais extraírem a estrutura lógica do mundo. Ela consiste em estabelecer relações preditivas entre eventos contingentes no ambiente, de forma que a incerteza seja reduzida e o comportamento adaptativo possa se desenvolver a partir das experiências individuais com estes eventos (Pearce 1987;

Rescola 1988). Duas formas principais de aprendizagem associativa são geralmente reconhecidas: no *condicionamento clássico* (Pavlov, 1927), os animais aprendem a associar um estímulo originalmente neutro (estímulo condicionado, CS) com um estímulo biologicamente relevante (estímulo incondicionado, US); no condicionamento operante (Skinner 1938), os animais aprendem associar seus próprios comportamento com um evento reforçador. Assim, ambas estas formas de aprendizagem permitem predizer com certo nível de confiança a ocorrência de reforços no ambiente, sejam eles apetitivos ou aversivos. Além disso, diferentes níveis de complexidade associativa podem ocorrer tanto no condicionamento clássico, quanto no operante.

Em suas versões mais simples, ambas as formas de condicionamento consistem em estabelecer relações elementares que conectam dois eventos específicos não-ambíguos no ambiente (Pearce and Bouton 2003; Giurfa 2007). Exemplos típicos deste tipo de associação classificada como *aprendizagem elementar* são o *condicionamento absoluto*, no qual um único estímulo A é reforçado (A+), e o *condicionamento diferencial*, no qual um estímulo A é reforçado (A+) e outro estímulo B não é reforçado (A+ vs. B-). Na primeira forma de associação (A+), o animal deve aprender a responder ao estímulo A que se associa sem ambiguidades ao reforço. Na segunda forma (A+ vs. B-), o animal deve aprender a responder ao estímulo A e não responder ao estímulo B, porque ambos estão associados de forma não ambígua à presença e à ausência de reforço, respectivamente (Pearce e Bouton, 2003).

Até o momento, a maioria dos estudos sobre a percepção visual das abelhas foi realizada usando-se condicionamento apetitivo operante (absoluto ou diferencial) de animais livres em voo. A vantagem destes protocolos é que se observa uma aprendizagem rápida e eficaz dos animais em diversas tarefas de aprendizagem visual, envolvendo distintos níveis de complexidade associativa. Tradicionalmente, o condicionamento operante de abelhas livres em labirinto Y vem sendo utilizado como principal ferramenta para estudar a discriminação de atributos visuais na abelha. Apesar disso, este protocolo dificilmente pode ser combinado com técnicas de neurofisiologia e neurofarmacologia para estudo das bases neurais da aprendizagem visual (Giurfa 2007, Avarguès-Weber e Mota, 2016). Devido a isso, o estudo da aprendizagem e memória visual em abelhas raramente ultrapassou o nível comportamental. Neste contexto, a imobilização das abelhas se torna vantajosa por facilitar o acesso ao cérebro do animal posteriormente ou durante tarefas de condicionamento. Devido a isso, o estudo da aprendizagem e memória em abelhas raramente ultrapassou o nível comportamental.

O principal protocolo disponível para estudos de aprendizagem e memória em abelhas imobilizadas no laboratório é o condicionamento apetitivo clássico do reflexo de extensão da

propóscide (PER). Embora este protocolo tenha sido amplamente utilizado no estudo da aprendizagem olfativa, somente nas últimas décadas foi possível adaptá-lo para estudos de aprendizagem visual na abelha (Avarguès- Weber e Mota, 2016). Ainda que os níveis de aprendizagem obtidos no condicionamento clássico do PER usando estímulos visuais sejam inferiores àqueles obtidos para estímulos olfativos, este protocolo pode ser combinado a diversas técnicas de neurofarmacologia e neurofisiologia. Dessa forma, representa uma ferramenta importante para avançar nosso conhecimento sobre as bases neurobiológicas da percepção, aprendizagem e memória visual na abelha (Mota *et al.,* 2011, 2013; Scheiner *et al.,* 2014).

1.2 A fototaxia positiva em abelhas

Além dos comportamentos guiados por aprendizagem e memória visual, a abelha *Apis mellifera* também apresenta alguns comportamentos inatos estereotipados envolvendo a percepção visual. Dentre estes comportamentos, podemos citar a orientação pelo padrão de luz polarizada no céu durante navegação (Rossel e Wehner, 1986) e a fototaxia positiva. A fototaxia positiva é definida como uma resposta de orientação em direção à luz, sendo que na abelha esta resposta participa dos comportamentos de saída da colmeia, decolagem de uma flor, escape e navegação (Menzel 1979, Menzel e Greegs 1985). Apesar desta resposta fototática ter sido estudada por alguns autores no nível comportamental, quase nada se sabe até o momento sobre os mecanismos celulares e fisiológicos envolvidos (Bertholf 1931, Sander 1933; Weiss 1943; Heintz 1959; Labhart 1974; Kaiser *et al.,* 1977; Menzel e Greegs 1985). Ainda especula-se sobre quais são os fotorreceptores envolvidos na resposta de fototaxia positiva das abelhas, mas estudos sugerem que a mesma envolveria um somatório da captura de fótons em todos os tipos de fotorreceptores (intensidade total), não envolvendo porém o processamento cromático neste comportamento Kaiser *et al.,* 1977, Menzel an Gregges, 1985). Estudos recentes sobre a fototaxia positiva das abelhas à luz verde demonstraram um papel importante das aminas biogênicas tiramina, octopamina e serotonina na modulação deste comportamento estereotipado (Thann *et al.,* 2010; Sheiner *et al.,* 2014).

1. 3 A visão tricromática e os distintos fotorreceptores em abelhas

A visão tricromática (visão de cores verdadeira) da abelha *Apis mellifera* é construída a partir da informação proveniente de três tipos de fotorreceptor presentes na retina dos olhos

compostos (Wakakuwa *et al.,* 2005). Estes fotorreceptores apresentam picos de absorção em três regiões distintas do espectro de luz compreendido entre 300nm e 650nm. Em maior abundância encontra-se o fotorreceptor que capta a luz na faixa do verde e possui um pico de absorção em 540nm aproximadamente (fotorreceptor *L*). Este fotorreceptor é encontrado em maior quantidade nos omatídeos das abelhas, que são as unidades funcionais olhos compostos. Os outros fotorreceptores encontram-se em menor quantidade nos omatídeos, sendo que um deles possui um pico aproximado na faixa do azul 440nm (fotorreceptor *M*) e o outro na faixa do ultra-violeta 345nm (fotorreceptor *S*). Enquanto o fotorreceptor *L* é utilizado tanto em processamento acromático (intensidade luminosa, movimento e contraste de bordas), quanto em processamento cromático, sugere-se que os fotorreceptores *M* e *S* sejam utilizados exclusivamente para a visão de cores (Brandt e Vorobyev 1997; Vazas 2017).

1.3.1 Estrutura dos olhos compostos

Os olhos compostos das abelhas operárias são constituídos por um conjunto de cerca de 5.500 omatídeos em cada olho composto (Gribakin, 1975). Cada omatídeo possui ao longo de sua estrutura uma córnea biconvexa, que é formada por uma cutícula transparente, produzida pela célula corneagena. Abaixo, encontra-se o cristalino, formado por quatro células (Varela e Porter, 1969). Abaixo de cada cone cristalino está a retínula do omatídeo, formada por oito células fotorreceptoras, compondo um rabdoma quadripartido constituído por microvilosidades. Os pigmentos visuais estão distribuídos nestas microvilosidades, formando o rabdômero fotorreceptor, constituído por oito células R1-8 que estão distribuídas ao longo de toda a superfície do rabdoma (Gribakin, 1975, Wakakuwa *et al.,* 2005). Na base do omatídeo encontram-se microvilosidades que abrigam uma célula fotorreceptora denominada R9 (Gribakin e, 1975). Nas células fotorreceptoras ocorre a expressão de opsinas, proteínas da superfamília de receptores do tipo rodopsina acoplados a proteína G, responsáveis pelo início da transdução visual (Velarde *et al.,* 2005). Estas proteínas transmembrana encontram-se acopladas a cromóforos sensíveis a luz nos fotorreceptores. Diferentes opsinas, envolvidas na absorção da luz em diferentes comprimentos de onda, foram descritas nas células fotorreceptoras dos olhos compostos das abelhas. A opsina AmLop1, expressa de forma abundante em todo o olho composto de operárias, constitui o fotoreceptor tipo *L*, para comprimento de onda longo (região verde). As opsinas AmBop e AmUVop, expressas em menor quantidade, constituem os fotorreceptores tipo *M* e *S*, para comprimentos de onda médios (revião azul) e curtos (região UV), respectivamente (Wakakuwa *et al.,* 2005, Velarde *et al.,*

2005). Estudos de hibridização *in situ* revelaram a existência de três tipos distintos de omátidios nos olhos compostos das abelhas (Figura 1), todos eles possuindo seis células que expressam a opsina AmLop1 (receptoras *L*) (Wakakuwa *et al.,* 2005):

- Tipo I: representa 44% do total de omatídeos e é composto por um fotorreceptor *S* e um fotorreceptor *M*, além dos seis fotorreceptores *L*;
- Tipo II: representa 46% do total de omatídeos e é composto por dois receptores *S* e seis receptores *L*;
- Tipo III: representa 10% do total de omatídeos e é composto por dois receptores *M* e seis receptores *L*.

Cada omatídeo também apresenta um nono receptor basal, cuja função exata ainda não está elucidada (Wakakuwa *et al.,* 2005).

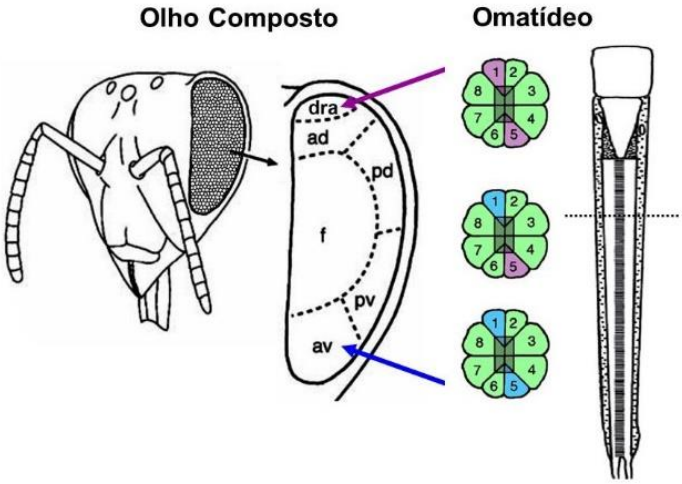

Figura 1: Imagem ilustrativa dos olhos compostos da abelha, mostrando as unidades formadoras dos olhos compostos (omatídeos) e sua distribuição nas diferentes regiões desta estrutura visual. Modificado de Wakakuwa *et al.,* 2005, Spaethe e Briscoe 2005.

1.3.2 Estrutura dos ocelos

Abelhas operárias da espécie *Apis mellifera* possuem três ocelos dorsais distribuídos de uma forma triangular na região posterior da cabeça. O ocelo medial está localizado na região central e os outros dois ocelos posicionados lateralmente ao medial, formando um triângulo. A retina ocelar é dividida em sub-retina dorsal e ventral (Ribi *et al.,* 2011, Hung e Ibbotson 2014). Cada ocelo é protegido externamente por uma lente convexa, disposta sobre uma camada de células denominadas células corneagenas. Abaixo destas estruturas, encontra-se a camada retinular, formada por cerca de 800 retínulas, sendo cada retínula formada por dois neurônios fotorreceptores. Os dendritos destes neurônios se dispõem em paralelo, formando na sua face

de contato um rabdoma bipartido, com uma forma plana, constituído por microvilosidades, região na qual ocorre a absorção dos fótons pelas opsinas. Este arranjo do radboma indica que esta região provavelmente seja sensível à polarização da luz (Kral, 1978; Ribi *et al.,* 2011; Zeil *et al.,* 2014). O ocelo da abelha contém apenas dois tipos de fotorreceptores, relatados por estudos de eletrofisiologia como tendo picos de sensibilidade na faixa do verde (~ 500nm) e do UV (~ 345nm) (Goldsmith e Ruck 1958; Greiser e Labhart 1982; Mizunami e Takagi, 1994). Posteriormente, estudos de hibridização *in situ* revelaram que a opsina para comprimentos de onda longos (*L*) do ocelo, denominada AmLop2, era distinta daquela expressa nos olhos compostos (AmLop1). Já a opsina responsável pela absorção da luz UV nos ocelos, trata-se da mesma identificada nos olhos compostos: AmUVop (Velarde *et al.,* 2005).

1.3.3 O sistema visual no cérebro da abelha

O cérebro da abelha *Apis mellifera* é composto por aproximadamente 960.000 neurônios e ocupa um volume aproximado de 1 mm^3. Os principais centros responsáveis pelo processamento visual periférico encontram-se nos lobos ópticos, que são compostos pelas seguintes neurópilas: lâmina, medula e lóbula (Srinivasan 2012). Nestes locais ocorre o processamento das informações provenientes dos fotorreceptores localizados na retina dos olhos compostos. A partir destes, a informação é passada a centros superiores como corpos pedunculados, lobos protocerebrais, complexo central e complexo lateral (Dyer *et al.,* 2011).

A lâmina é a primeira neurópila visual dos lobos ópticos. Ela recebe informação proveniente exclusivamente dos fotorreceptores *L* (Dyer *et al.,* 2011). Dessa forma, esta neurópila está envolvida principalmente em processamento visual acromático, sendo que seus neurônios apresentam pouca variação de resposta para diferentes comprimentos de onda. Os axônios dos receptores *L* conectam-se a interneurônios de primeira ordem, denominados células monopolares da lâmina (LMC). A lâmina possui várias colunas ópticas, e cada coluna recebe um agrupamento de axônios dos respectivos omatídeos, assim como axônios de quatro tipos diferentes de células monopolares (Mobbs, 1982). Esta organização que inclui axônios fotorreceptores e de células LMC se mantêm constantes ao longo da lâmina, garantindo, desta forma, uma organização retinotópica (Menzel *et al.,* 1974, Ribi 1975a,b).

A medula é a segunda neurópila visual, a qual recebe informações provenientes tanto das células monopolares da lâmina, quanto dos receptores *S* e *M*. Muitos neurônios presentes na medula apresentam oposição espectral, sendo esta uma propriedade característica de neurônios envolvidos em visão de cores. Foram registrados pelo menos 10 tipos de oposição

cromática em neurônios da lâmina, resultantes da interação entre as vias dos fotorreceptores *S*, *M* e *L* (Kien e Menzel 1977; Hertel *et al.,* 1978; Yang *et al.,* 2004). Esta região contém a maior quantidade de neurônios dentro do sistema visual, e nela a organização retinotópica é mantida, porém invertida em relação à lâmina (Ribi 1975a,b; Bicker *et al.,* 1987; Ehmer e Gronenberg 2002). Estudos realizados através de registros intracelulares de neurônios mostraram que nas camadas internas da medula ocorrem respostas neuronais com oposição cromática, enquanto nas camadas externas as respostas são principalmente acromáticas e relacionadas a processamento de movimento (Paulk *et al.,* 2009a,b).

A lóbula é a terceira neurópila visual e assim como na medula, o processamento acromático parece ocorrer nas camadas externas, enquanto o processamento cromático ocorre nas camadas internas. Estes dados sugerem que as vias acromáticas e cromáticas são segregadas em diferentes etapas do processamento visual no cérebro da abelha (Mota 2011). Na lóbula, ocorre uma reversão da organização retinotópica no eixo antero-posterior (Ribi e Scheel 1981; Paulk *et al.,* 2008). Além de diversos neurônios com oposição cromática, foram identificados na lóbula neurônios com respostas de oposição espacial (Hertel *et al.,* 1987, Yang *et al.,* 2004). Estes neurônios exibem respostas excitatórias para uma orientação espacial específica e inibitórias para outra orientação espacial oposta (p. ex. excitação para 45º e inibição para 135º).

Diferentes tratos conectam a medula e a lóbula aos corpos pedunculados, estruturas cerebrais de ordem superior, associadas à integração multimodal e a fenômenos cognitivos (Mobbs 1984; Ehmer e Gronenberg 2002; Paulk e Gronenberg 2008; Menzel 1999; Giurfa 2007). Estudos mostram que neurônios dopaminérgicos e octopaminérgicos presentes nos corpos pedunculados de insetos estão associados a fenômenos de aprendizagem e memória (Kim *et al.,* 2007; Liu *et al.,* 2012; Vogt *et al.,* 2014; Burke *et al.,* 2012). Em abelhas, os principais estímulos aferentes visuais recebidos pelos corpos pedunculados estão envolvidos em processamento cromático (Gronenberg 1986; Ehmer e Gronenberg 2002; Mauelshagen 1993; Menzel e Manz 2005; Paulk e Gronenberg 2008).

Além das projeções para os corpos pedunculados, diversas comissuras inter-hemisféricas conectam os lobos óticos de ambos os hemisférios cerebrais (Mobbs 1984, Ehmer e Gronenberg 2002). A medula e a lóbula também enviam numerosas projeções para o protocérebro lateral, sendo as vias de processamento cromático e acromático segregadas nas porções anterior e posterior desta região, respectivamente. (Gronenberg 1986; Paulk *et al.,* 2009b; Dyer *et al.,* 2011). Estudos mostram que no protocérebro lateral anterior, principalmente nas regiões conectadas ao tubérculo óptico anterior, os neurônios apresentam forte sensibilidade cromática (Paulk *et al.,* 2008, 2009b; Mota *et al.,* 2011, 2013). Os circuitos neuronais do

tubérculo óptico anterior, através da segregação de informação proveniente das partes dorsal e ventral do olho contribuem ainda para a visão espacial (Mota *et al.,* 2011, 2013, Avarguès-Weber e Mota 2016). A informação processada no protocérebro lateral anterior é enviada ao protocérebro lateral posterior e às neurópilas centro-mediais do cérebro que compõem complexo central (Homberg, 1985; Avarguès-Weber e Mota 2016). Acredita-se que o complexo central esteja envolvido nas etapas finais de integração visual e visuo-motora.

1.4 Importância das aminas biogênicas

As aminas biogênicas são de extrema importância no sistema nervoso central e órgãos periféricos de diversos animais, agindo como substâncias mensageiras e modulando distintas funções neurais (Sheiner *et al.,* 2006). Estas aminas controlam e regulam diversas funções vitais, incluindo ritmos circadianos, secreção endócrina, controle circulatório, além de aprendizado e memória em vertebrados e invertebrados (Barron *et al.,* 2010; Liberstat e Pflueger, 2004; Wise 2004). Em abelhas, estas aminas vêm sendo descritas como importantes na modulação de diversas funções neurais e comportamentos, tendo papel crucial no contexto da aprendizagem associativa olfativa (Sheiner *et al.,* 2006). Dentre as principais aminas presentes no cérebro das abelhas, estão a dopamina, a octopamina, a serotonina e a tiramina. A dopamina e a serotonina são encontradas em maiores concentrações no cérebro das abelhas, enquanto a octopamina e a tiramina são encontradas em menor quantidade.

A octopamina tem sido identificada como uma molécula-chave para o controle de diversos estados motivacionais e comportamentos das abelhas. Geralmente tem um efeito excitante e leva a uma maior sensibilidade para entradas sensoriais olfativas e visuais, melhorando o desempenho de aprendizagem apetitiva (Sheiner *et al.,* 2002, 2006). Já a dopamina medeia principalmente comportamentos agressivos o reforço aversivo (Mercer and Menzel, 1982; Macmillan and Mercer, 1987; Michelsen 1988, Sheiner *et al.,* 2006, Vegoz 2007). Estas aminas biogênicas se ligam a receptores de membrana pertencentes principalmente a grande família de genes de receptores acoplados a proteína de ligação GTP(G). A ativação destes receptores leva a mudanças transitórias em concentrações de segundos mensageiros intracelulares tais como cAMP, IP_3 e/ou Ca^{2+}. Na abelha, três receptores dopaminérgicos foram caracterizados, sendo eles AmDOP1 (Blenau *et al.,* 1998, Mustard *et al.,* 2005), AmDOP2 (Humphries 2003, Mustard *et al.,* 2003) e AmDOP3 (Barron *et al.,* 2002). O principal receptor octopaminérgico descrito até o momento foi chamado AmOA1 (Erber 1993, Grohmann *et al.,* 2003).

Estudos sobre aprendizagem olfativa em abelhas demostram que os neurônios octopaminérgicos envolvidos na formação de associações apetitivas (VUMmx1 e VUMmd1), bem como neurônios dopaminérgicos envolvidos na formação de associações aversivas (aglomerados C1, C2 e C3) possuem arborizações concentradas na região dos corpos pedunculados (Schröter *et al.,* 2007; Tedjakumala *et al.,* 2017). Não apenas em abelhas, mas também em moscas da fruta e grilos, a octopamina e a dopamina foram identificados como importantes neurotransmissores envolvidos na sinalização de recompensa e punição, respectivamente (Schwaerzel *et al.,* 2003; Unoki *et al.,* 2006; Vergoz *et al.,* 2007; Argawel 2011; Klappenbach 2013). Apesar da aparente dicotomia funcional entre essas duas aminas biogênicas, estudos recentes em moscas identificaram a dopamina como um modulador de recompensa apetitiva, juntamente com a octopamina (Kim *et al.,* 2007; Krashes *et al.,* 2009; Selcho *et al.,* 2009; Liu *et al.,* 2012; Vogt *et al.,* 2014). Todos os estudos sobre o papel da octopamina e da dopamina na aprendizagem associativa em abelhas foram realizados com o uso de condicionamento apetitivo, sendo que até o momento não existem estudos sobre o papel destas aminas na aprendizagem visual (Vergoz *et al.,* 2007; Tedjakumala 2017). Neste trabalho, preenchemos esta e outras lacunas no conhecimento sobre a percepção e aprendizagem visual em abelhas, conforme os objetivos descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo estudar aspectos cognitivos e neurofisiológicos envolvendo a aprendizagem visual (Capítulo 1) e a fototaxia positiva (Capítulo 2) em abelhas da espécie *Apis mellifera*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivos específicos do Capítulo 1:

a) Avaliar a capacidade das abelhas em transferir uma aprendizagem visual adquirida em contexto de condicionamento clássico para um novo contexto operante em labirinto Y. Para atingir este objetivo, foi necessário excluir a influência da fototaxia positiva nos

testes de orientação operante, através de uma calibração dos estímulos cromáticos (azul e verde) a um ponto de isoluminância perceptual para as abelhas.

b) Combinar microinjeções farmacológicas de antagonistas dopaminérgicos e octopaminérgicos no cérebro da abelha aos estudos de aprendizagem e transferência visual citados acima (objetivo específico 1), visando analisar o papel da dopamina e da octopamina nestes fenômenos cognitivos.

2.2.2 Objetivos específicos do Capítulo 2:

a) Testar a sensibilidade espectral da resposta de fototaxia positiva das abelhas, avaliando as trajetórias de animais que se locomovem no escuro sendo guiados por luzes monocromáticas nas faixas do UV, azul e verde, em diferentes intensidades.

b) Avaliar a contribuição dos olhos compostos e dos ocelos na resposta de fototaxia positiva para diferentes luzes monocromáticas (UV, azul e verde), combinando a metodologia citada acima (objetivo específico 2.2.1 (b)) à oclusão seletiva destas estruturas visuais.

CAPÍTULO 1

Transferência de discriminação visual e modulação por aminas biogênicas na abelha *Apis mellifera*

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Há mais de um século, a abelha forrageadora *Apis mellifera* tem sido utilizada como modelo para estudos de aprendizagem e memória visual. No nível comportamental, obteve-se muito conhecimento sobre a capacidade das abelhas para aprender cores, formas, padrões, estímulos de movimento, entre outros atributos visuais presentes em seu rico ambiente (Giurfa e Menzel 1997; Srinivasan, 2010; Zhang *et al.,* 2012). Além disso, as abelhas possuem habilidades cognitivas impressionantes na resolução de tarefas visuais não-elementares, como categorização conceitual e aprendizagem de regras (Avarguès-Weber *et al.,* 2012; Avarguès-Weber e Giurfa, 2013). Até o momento, praticamente todos esses estudos sobre a cognição visual em abelhas têm sido realizados usando-se o condicionamento operante apetitivo de animais livres em voo, um protocolo muito eficaz que, infelizmente, não pode ser combinado a técnicas invasivas para estudar os mecanismos neurobiológicos subjacentes (Avarguès-Weber *et al.,* 2012).

Contrariamente, um protocolo de condicionamento clássico eficiente para treinar abelhas fixadas utilizando estímulos olfativos vem sendo combinado a diversos métodos invasivos de farmacologia e fisiologia para estudar as bases neurais da aprendizagem olfativa e da memória. (Giurfa e Sandoz, 2012; Matsumoto *et al.,* 2012; Menzel 2012). No entanto, o chamado condicionamento clássico do reflexo de extensão de probóscide (PER) (Kuwabara 1957; Takeda 1961), que provou ser muito eficiente no treinamento de abelhas fixadas na aprendizagem de associações entre odor e recompensa apetitiva (Giurfa e Sandoz, 2012), não costuma apresentar a mesma robustez quando atributos visuais são utilizados como estímulos condicionados. Especialmente nas últimas décadas, diferentes tentativas foram feitas para desenvolver protocolos de condicionamento visual clássico do PER em abelhas fixadas, mas os desempenhos de aprendizagem permaneceram sempre mais fracos do que aqueles obtidos no condicionamento olfativo do PER (Avarguès-Weber e Mota, 2016). Curiosamente, alguns autores relataram que a amputação das antenas era essencial para a aprendizagem de associações entre estímulo visual e recompensa ocorrer em abelhas fixadas, enquanto outros autores mostraram que este drástico procedimento nem sempre era necessário (Avarguès-Weber e Mota, 2016). Independentemente de estarem intactas ou privadas de suas antenas, abelhas fixadas condicionadas em um contexto apetitivo clássico nunca apresentaram os mesmos níveis elevados de aprendizagem visual geralmente observados em estudos de condicionamento visual

operante (Avarguès-Weber e Mota, 2016). Considerando que o uso de sinais visuais por abelhas é predominante quando elas estão forrageando ou navegando, um contexto operante de voo livre parece de fato muito mais natural para a aprendizagem visual associativa do que a situação de imobilização imposta durante o condicionamento visual clássico.

Os níveis de aprendizagem e memória adquiridos por um animal dependem não apenas dos estímulos relevantes utilizados para o condicionamento, mas também são fortemente influenciados por pistas contextuais que o mesmo experimenta durante esses processos (Rescorla *et al.,*1985). Nesse sentido, a capacidade de transferir informações aprendidas de um contexto para outro faz parte dos mecanismos adaptativos que aprimoram o uso de memórias estabelecidas pelos animais (Balsam e Tomie, 1985). Um exemplo fascinante de transferência de informação na abelha é sua capacidade de encontrar recursos alimentares durante o forrageamento usando informações obtidas através da observação de uma forrageadora dançarina que retorna à colmeia (von Frish, 1967). Esse e outros comportamentos complexos exibidos pelas abelhas provavelmente envolvem a transferência de informações de contextos associativos clássicos para contextos operantes, porém as bases neurais desses processos permanecem desconhecidas até o momento. Estudos comportamentais anteriores mostraram que abelhas são capazes de transferir informações olfativas entre contextos de aprendizagem clássica e operante (Bakchine *et al.,* 1992; Gerber *et al.,* 1996; Sandoz *et al.,* 2000; Chaffiol *et al.,* 2005; Carcaud *et al.,* 2009), mas nenhum estudo investigou até agora este tipo de transferência de informação no caso de estímulos visuais. No presente trabalho, preenchemos essa lacuna através do desenvolvimento de um protocolo de condicionamento visual no qual abelhas fixadas são primeiramente treinadas a discriminarem estímulos visuais em um contexto clássico, e depois confrontadas com um teste de memória que apresenta os mesmos estímulos visuais em um contexto operante. Também aproveitamos que as abelhas foram inicialmente fixadas para combinar este protocolo de condicionamento com injeções de antagonistas farmacológicos para estudar a possível modulação da aprendizagem visual apetitiva pela dopamina e/ou pela octopamina.

A dopamina e a octopamina são neurotransmissores que têm sido amplamente implicados na modulação das vias neurais de reforço durante a aprendizagem associativa (Schultz *et al.,* 2002; Wise 2004). No entanto, o papel destas aminas biogênicas na aprendizagem associativa não parece ser totalmente equivalente em vertebrados e invertebrados (Perry e Baron, 2013). A dopamina, por exemplo, foi identificada como um importante modulador de vias de recompensa em vertebrados (Schultz 2002 *et al.,* 2002; Wise 2004), enquanto que em insetos essa molécula parece desempenhar um papel majoritário na modulação

de vias de punição (Tedjakumala e Giurfa 2013). A principal amina biogênica até agora relacionada às vias de recompensa em insetos é a octopamina, um neurotransmissor que apresenta forte homologia com os neurotransmissores adrenérgicos de vertebrados (Roeder 2005, Perry e Baron 2013). Tipicamente, em diferentes modelos de insetos, a octopamina modula fortemente as associações olfativas apetitivas, enquanto a dopamina parece estar envolvida principalmente em associações olfativas aversivas (moscas: Schwaerzel *et al.,* 2003; grilos: Unoki *et al.,* 2005, 2006; abelhas: Vergoz *et al.,* 2007).

Um único neurônio octopaminérgico de ampla arborização no cérebro da abelha, chamado de célula mediana não-pareada ventral do neurômero maxilar 1 (VUMmx1) (Hammer, 1993), foi identificado como o principal substrato neural da aprendizagem olfativa apetitiva durante o condicionamento olfativo do PER. Estimulações elétricas intracelulares do VUMmx1, bem como micro-injeções de octopamina em regiões cerebrais arborizadas por este neurônio, foram capazes de substituir a função da recompensa de sacarose quando combinadas com apresentações de odor, induzindo respostas condicionadas do PER (Hammer, 1993; Hammer ande Menzel, 1998). Por outro lado, injeções de antagonistas octopaminérgicos (Vergoz *et al.,* 2007) e inibição de genes que codificam receptores octopaminérgicos no cérebro de abelhas por RNAi (Farooqui *et al.,* 2003) interromperam a aprendizagem olfativa apetitiva por abelhas. A dopamina tem sido implicada na modulação da aprendizagem olfativa aversiva, mas não na aprendizagem olfativa apetitiva em abelhas. Alguns estudos farmacológicos mostram que injeções de antagonistas dopaminérgicos no cérebro da abelha inibem a formação de associações olfativas aversivas, mas não inibem associações olfativas apetitivas (Vergoz *et al.,* 2007; Wright *et al.,* 2010). Curiosamente, descobriu-se recentemente que a dopamina prejudica a formação de memória olfativa apetitiva de longo prazo em abelhas, embora nenhum efeito tenha sido observado durante a aquisição e a memória de curto prazo (Klappenbach *et al.,* 2013).

Comparando o conhecimento acumulado sobre o papel da dopamina e octopamina na aprendizagem olfativa (Scheiner *et al.,* 2006; Menzel 2012; Tedjakumala e Giurfa 2013), quase nada se sabe sobre como essas monoaminas modulam a aprendizagem visual em abelhas. Em um contexto de condicionamento espacial aversivo de abelhas que andavam, a formação de associações entre um espaço colorido e uma punição por choque elétrico parece ser modulada de diferentes maneiras pela dopamina e octopamina (Agarwell *et al.,* 2011). Enquanto a dopamina melhorou, seu antagonista inibiu a aprendizagem espacial aversiva. Surpreendentemente, a octopamina inibiu a aprendizagem aversiva em tal tarefa operante, mas seu antagonista não teve efeito sobre os desempenhos de aprendizagem (Agarwell *et al.,* 2011). Enquanto este único trabalho analisou o efeito de aminas biogênicas em uma tarefa visuo-

espacial operante aversiva, nenhum estudo foi realizado até agora para analisar o papel da dopamina e octopamina na aprendizagem visual apetitiva por abelhas. O presente trabalho cumpre este objetivo combinando micro-injeções de antagonistas dopaminérgicos e octopaminérgicos no cérebro da abelha a um novo protocolo de condicionamento visual apetitivo clássico seguido por teste de memória operante em labirinto. Nosso estudo fornece novas informações valiosas para a compreensão da transferência de discriminação visual entre contextos associativos distintos e o papel das aminas biogênicas na aprendizagem visual apetitiva por abelhas.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Abelhas forrageadoras da espécie *Apis mellifera* foram coletadas no apiário mantido na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram coletados com um alimentador contendo solução de sacarose a 30%. Após esse período os animais foram introduzidos em tubos de vidro e em seguida anestesiadas no gelo até seus movimentos cessarem. Logo após este procedimento anestésico, as abelhas foram fixadas em tubos de plástico com uma fita adesiva que foi inserida na região cervical dorsal para auxiliar na fixação e suas asas foram protegidas por pedaços de papel filtro (Fig. 2 A,B).

2.2 Procedimentos experimentais

2.2.1 Procedimento 1: Condicionamento visual diferencial clássico do PER

Para avaliar a influência das antenas no condicionamento visual clássico, um grupo de abelhas teve suas duas antenas cortadas com uma tesoura de ponta fina na base do escalpo, enquanto um outro grupo de abelhas foi mantido com antenas intactas. Após a fixação, cada abelha foi alimentada com solução de 1 µl de sacarose a 30% e em seguida transferida para uma câmara escura com alta umidade, onde permaneceu por um período de uma hora. O condicionamento diferencial visual foi realizado em uma sala escura, com a abelha posicionada em uma plataforma dentro de um dos braços de um labirinto Y preto. (Fig 2.C; descrito em detalhes em ‘Testes de orientação no labirinto em Y’, abaixo). É importante ressaltar que dentro deste braço (Fig. 2.A, B) a abelha fixada não podia ver a forma geral do labirinto Y. O tubo plástico onde a abelha estava fixada foi inclinado a 45° (Fig. 2 A, B), de forma que o olho direito

da abelha ficava posicionado a uma distância de 10 cm dos estímulos visuais apresentados lateralmente. Os estímulos visuais foram compostos por panoramas de luz monocromática apresentados em uma tela de 20 X 20 cm coberta com filtro de transmissão monocromática (*LF124S Dark Green*: pico a 535 nm ou *LF119S Dark Blue:* pico a 455 nm; LEE Filters) e papel vegetal para dispersão de luz. Uma fonte de luz de LED branco (E27-5W Cool White; Epistar) conectada a um potenciômetro linear foi utilizada para iluminar a tela por trás com intensidade luminosa controlada. Esta estimulação cromática de amplo campo receptivo subtendia um ângulo visual de 90º em relação ao olho direito da abelha. Levando em conta as sensibilidades espectrais dos fotorreceptores das abelhas (Peitsch *et al.,* 1992), o estímulo verde excitou a 0%, 15% e 85% os fotorreceptores de curto (S), médio (M) e longo (L) comprimento de onda, respectivamente. Para o estímulo azul, esses valores foram 2%, 68% e 30%, respectivamente. A intensidade do estímulo azul e verde foi previamente ajustada a um ponto de isoluminância perceptual usando-se a resposta fototática de abelhas voando livremente, como descrito em "Calibração e isoluminância dos estímulos visuais ", abaixo (Fig. 2.D, E).

As abelhas fixadas foram treinadas para discriminar entre uma luz monocromática (CS +, Fig. 2A) recompensada com solução de sacarose (US) e com uma outra luz monocromática isoluminante não recompensada (CS-, Fig. 2B). Foram treinados em paralelo um subgrupo de abelhas usando azul como CS+ e outro subgrupo com mesmo número de animais usando-se verde como CS+. O número de abelhas por subgrupo foi sempre igual. Dez ensaios de CS + e 10 ensaios de CS- foram apresentados a cada abelha em uma seqüência pseudo-randômica com intervalo (*inter-trial interval*; ITI) de 10 min. Ambos os estímulos visuais (CS+ e CS-) foram apresentados na mesma tela lateral, alternando-se o filtro cromático de cobertura durante os ensaios. No início de cada ensaio (*trial*), a abelha fixada foi posicionada na plataforma de condicionamento por 30 s para se familiarizar com o contexto experimental. Após este período, a tela colorida apresentando o estímulo condicionado (CS) foi iluminada por 7 s. Quatro segundos após o início da apresentação do CS+, 1 μL de solução de açúcar a 30% foi oferecido à abelha por meio de uma micropipeta por 3 s (Fig. 2.A). Dessa forma, o intervalo inter-estímulos foi de 4s e o pareamento entre CS e US foi de 3 s. A abelha foi removida do setup 23 s depois que a recompensa foi dada, completando assim um total de 60 s por ensaio. Ensaios realizados sem recompensa (CS-) foram realizados com o mesmo período de tempo, mas o estímulo visual não foi pareado com a recompensa de solução de açúcar (Fig. 2.B). A ocorrência de extensão de probóscide foi registrada nos primeiros 4 s de apresentação de cada CS (resposta condicionada), bem como durante a apresentação do US. Os animais que não apresentaram resposta de PER durante a apresentação do US por mais de 3 ensaios (<5%) foram excluídos

de nossa análise, devido a um possível comprometimento do reflexo muscular e / ou sensibilidade de resposta à sacarose.

Após o fim da seção de condicionamento diferencial, cada abelha com antenas intactas foi cuidadosamente removida do tubo e colocada dentro de um pequeno frasco de vidro. Este procedimento foi realizado dentro de uma sala escura iluminada por uma fonte de luz vermelha de baixa intensidade (pico de emissão em 660nm). Os tubos de vidro com abelhas foram mantidos durante uma hora na sala escura.

2.2.2 Testes de orientação no labirinto Y

Uma hora após a seção de condicionamento visual clássico do PER, cada abelha com antenas intactas foi liberada individualmente na entrada de um labirinto Y para um teste de orientação aos mesmos estímulos visuais (azul ou verde) usados durante condicionamento clássico, apresentados agora simultaneamente no final de cada braço do labirinto. Os animais que morreram durante este período de 1 h (<10%) foram excluídos da análise para permitir a comparação do desempenho entre o condicionamento clássico e o teste de orientação operante em indivíduos equivalentes. Abelhas com antenas removidas não participaram deste teste operante, pois a privação de antenas prejudica consideravelmente o voo destes animais. O labirinto Y era composto por um material acrílico preto opaco, possuindo 28x20x20 cm (comprimento x altura x largura) de dimensões na entrada (Fig. 2.C) e 20x20x20 cm de dimensões em cada um dos seus braços. Os estímulos visuais foram apresentados ao final de cada braço do labirinto, em uma distância de 20 cm do local no qual as abelhas fazem sua escolha (região de decisão), com um ângulo subtendido de 53º em relação ao centro da região de decisão, tanto na direção vertical, quanto horizontal. Dessa forma, cada estímulo cobria um campo visual largo o suficiente para recrutar as vias de processamento cromático do sistema visual da abelha (Giurfa 1996). Toda a estrutura do labirinto era coberta uma tampa removível de acrílico transparente. Cada abelha foi posicionada na entrada do labirinto uma única vez e sua primeira escolha por um dos braços do labirinto foi registrada. Após esta escolha, cada abelha livre em voo foi recolhida no final do braço escolhido no labirinto através de um aspirador de insetos (*pooter*). Apesar de que cada abelha foi testada uma única vez no labirinto Y, a posição (direita ou esquerda) dos filtros azul e verde foi constantemente alternada em diferentes testes realizados com animais distintos.

2.2.3 Calibração e isoluminância dos estímulos visuais

Para avaliar as propriedades espectrais e ajustar a irradiância dos estímulos monocromáticos utilizamos um espectrofotômetro (USB2000 + UV-VIS-ES, Ocean Optics) calibrado radiometricamente usando uma fonte de luz de deutério / tungstênio (DH-2000-BAL, 220- 1050 nm, Ocean Optics). A irradiância absoluta foi medida usando uma fibra óptica (QP600-2-UV-VIS, Ocean Optics) acoplada a um corretor de coseno com material de difusão espectral (CC-3-UV-S, Ocean Optics) que foi fixado a 10 cm do centro da tela colorida usada como estímulo visual. O software *SpectraSuite* (Ocean Optics) foi utilizado para aquisição e análise das curvas espectrais.

A orientação de abelhas em um ambiente escuro na presença de estímulos luminosos é fortemente influenciada pela fototaxia positiva destes insetos, que por sua vez é um comportamento diretamente modulado pela intensidade luminosa (Labhart, 1974; Menzel e Greggers, 1985, Erber *et al.,* 2006). Como este comportamento claramente interfere nas escolhas feitas por abelhas livres em vôo no labirinto Y, realizamos um experimento para calibrar a irradiância dos estímulos luminosos a um ponto de isoluminância perceptual usando a resposta fototática de abelhas *naïves*.

As abelhas tendem a perceber a luz verde com maior intensidade do que a luz azul, pois possuem uma quantidade muito maior de fotorreceptores verde nos olhos compostos em relação aos fotorreceptores azuis (Wakakua *et al.,* 2005). Além disso, a intensidade perceptiva total (q) do estímulo azul (q = 16), calculada como a somatória das excitações de todos os fotorreceptores da abelha por essa luz (Peitsch *et al.,* 1992; Giurfa *et al.,* 1996), foi 62 % da intensidade total do estímulo verde (q = 26). Assim, calibramos a intensidade do estímulo azul para um valor fixo de irradiância de 0,4 μW cm^{-2}, e variamos a irradiância do estímulo verde a partir desse valor para valores mais baixos, usando um potenciômetro linear (Fig. 2.D). Cinco grupos de vinte abelhas foram testados de forma independente para a sua orientação no labirinto Y apresentando um estímulo azul contra um estímulo de luz verde em diferentes proporções de irradiância (1: 1, 4: 3, 2: 1, 4: 1, 6: 1). Cada abelha foi primeiramente mantida uma hora na sala escura dentro de um pequeno frasco de vidro e depois liberada individualmente, uma única vez, na entrada do labirinto Y. A primeira escolha de cada abelha para a luz azul ou verde foi então registrada (Fig. 2.E). O ponto de isoluminância foi considerado como tendo sido atingido quando a proporção de abelhas orientando-se para o estímulo azul não foi significativamente diferente da proporção que voou em direção ao estímulo verde (Fig. 2.E). Depois de identificar

a faixa de isoluminância perceptual, decidimos utilizar para todos os experimentos apresentados nas Figuras 3 a 10, uma proporção de irradiância de 2:1 (azul:verde). Mais especificamente, o estímulo azul teve uma irradiância de 0,4 μW cm^{-2} a 455 nm e o estímulo verde apresentou uma irradiância de 0,2 μW cm^{-2} a 535 nm (Fig. 2.D, E).

2.2.4 Injeções farmacológicas

Com o objetivo de testar o efeito de antagonistas dos receptores dopaminérgicos e octopaminérgicos na aprendizagem visual por abelhas, os animais fixados receberam injeções farmacológicas 30 min antes do início do condicionamento visual clássico do PER. Experimentos anteriores realizados em abelhas mostraram que o efeito das injeções farmacológicas dos antagonistas aminérgicos utilizados em nosso estudo foram efetivos aproximadamente 30 min após a aplicação do fármaco (Vergoz *et al.,* 2007). Utilizamos o flupentixol como antagonista dopaminérgico e a mianserina ou a epinastina como antagonista octopaminérgico (Sigma-Aldrich, Brasil). O flupentixol apresenta alta afinidade e efeito antagonista significativo nos receptores dopaminérgicos AmDOP1 e AmDOP2 de abelhas (Blenau *et al.,* 1998, Mustard *et al.,* 2003). Tanto a mianserina como a epinastina se apresentaram como fortes antagonistas do receptor octopaminérgico AmOA1 de abelhas (Roeder *et al.,* 1998; Degen *et al.,* 2000). No entanto, decidimos testar o efeito desses dois antagonistas octopaminérgicos diferentes, porque em altas doses ambos podem apresentar também alguma afinidade com outros receptores aminérgicos, como os serotoninérgicos ou histaminérgicos (Roeder *et al.,* 1998; Degen *et al.,* 2000, Beggs *et al.,* 2011).

Os fármacos foram dissolvidos em solução Ringer para abelhas (NaCl 130 mM, KCl 6 mM, MgCl2 4 mM, CaCl2 5 mM, HEPES 10 mM, glucose 25 mM, sucrose 160 mM) nas seguintes concentrações: flupentixol 2 x 10^{-7} / 10^{-5} / 10^{-3} M, epinastina 4 x 10^{-7} / 10^{-5} / 10^{-3} M, mianserina 3.3 x 10^{-7} / 10^{-5} / 10^{-3} M. Injeções de 200nl de solução antagonista ou solução Ringer isolada (controle) foram realizadas no cérebro através do trato ocelar médio usando um nanoinjector (Nanoject II, Drummond Scientific). Durante a injeção, estabilizamos a cabeça da abelha fixando as mandíbulas no tubo de plástico usando uma fita adesiva. Após a injeção, as abelhas foram colocadas em uma sala escura durante 30 min e, em seguida, realizamos o condicionamento visual do PER seguido do teste de orientação no labirinto Y, usando os mesmos procedimentos descritos nas seções 2.2.1 e 2.2.2.

Como um primeiro experimento controle para testar se as injeções podem afetar a capacidade de voo da abelha ou sua orientação visual em relação ao par de estímulos usados, também realizamos testes de orientação em abelhas *naïves* 30 min após a injeção para cada tratamento farmacológico (Fig. 4.A). Testes de orientação em grupos controle de abelhas *naïves*, bem como em grupos de abelhas anteriormente submetidos ao condicionamento visual do PER, foram realizados como descrito em 2.2.2, usando-se estímulos azul e verde em uma proporção isoluminante de irradiância de 2: 1 (ver detalhes em 2.2.3).

Realizamos ainda alguns experimentos adicionais para avaliar se os efeitos de tratamentos farmacológicos em testes de orientação operante poderiam estar relacionados a interferências na retenção de memória. Grupos de abelhas fixadas injetadas com Ringer, flupentixol ou epinastina foram submetidos a testes de retenção do PER uma hora depois do condicionamento visual clássico (seção 2.2.1). Os testes de retenção consistiam em uma apresentação não recompensada do CS+ e do CS- com ITI de 10 min. A ordem de apresentação do CS + e do CS- (primeiro ou segundo) foi randomizada entre indivíduos em todos os grupos experimentais.

2.2.5 Análise estatística

A análise de variância de duas vias em modelo linear geral (*Two-way GLM ANOVA*) para medidas repetidas foi utilizada para analisar o desempenho de discriminação visual durante condicionamento visual do PER nos dois sentidos. O teste binomial exato foi utilizado para comparar a proporção de animais escolhendo cada braço do labirinto Y durante os testes de orientação. Para comparar o sucesso da discriminação entre diferentes grupos experimentais, utilizamos um índice de discriminação (DI). Para cada abelha, calculamos a diferença entre a somatória de suas respostas aos últimos cinco ensaios do CS + e de suas respostas aos últimos cinco ensaios do CS- [DI = (ΣCS +) - (ΣCS-)]. GLM ANOVA seguida de comparações múltiplas de Tukey foi usada para comparar os valores de DI entre os grupos experimentais submetidos a diferentes tratamentos. O teste de McNemar foi utilizado para comparar as respostas ao CS+ e ao CS- durante testes de retenção (memória) do PER. O nível alfa foi ajustado para 0.05 (nos dois sentidos) para todas as análises.

3 RESULTADOS

3.1 Orientação fototática no labirinto Y e a isoluminância dos estímulos cromáticos

A Figura 2.E mostra a porcentagem de primeiras escolhas de abelhas *naïves* livres em voo em um labirinto Y apresentando azul e verde em diferentes proporções de irradiância (Fig. 2.D). As proporções de irradiância azul: verde de 1: 1 ou 4: 3 levaram a uma porcentagem significativamente maior de abelhas escolhendo o estímulo verde (Fig. 2.E, teste binomial, p = 0,03 e p = 0,04, respectivamente). Por outro lado, observou-se uma porcentagem significativamente maior de abelhas que escolheram o estímulo azul quando a proporção de irradiância azul: verde era de 6: 1 (Fig. 2.E, teste binomial, p = 0,01). Não houve diferença significativa entre a porcentagem de abelhas que escolheram azul ou verde quando suas proporções de irradiância foram 2: 1 e 4: 1 (Fig. 2.E; teste binomial, p = 0,16 e p = 0,12, respectivamente). Nestes grupos experimentais, portanto, os estímulos azul e verde foram perceptualmente isoluminantes para as abelhas. Assim, decidimos usar a proporção azul: verde de 2: 1 para todos os próximos experimentos comportamentais realizadas no presente trabalho (Figuras 3 a 10).

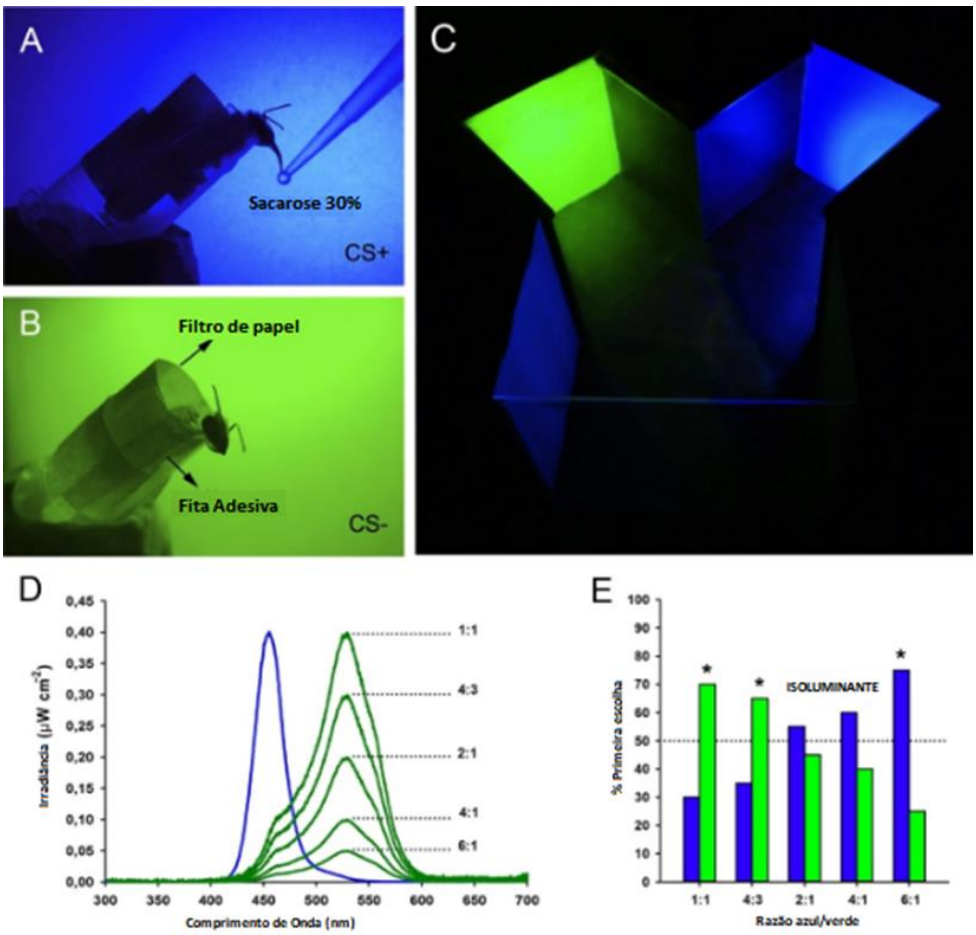

Figura 2. Procedimentos de condicionamento visual e calibração de estímulos para estudos de discriminação cromática em abelhas. A-B) Condicionamento visual diferencial do PER em abelhas usando uma luz azul como estímulo condicionado positivo CS + (A) e uma luz verde como estímulo condicionado negativo CS- (B). Durante ensaios recompensados, a apresentação do CS + foi pareada com 1 µl de solução de sacarose a 30% (US), fornecido

à abelha por meio de uma micropipeta (A). Para estes experimentos, as abelhas foram fixadas em tubos de plástico usando pedaços de fita crepe macia. As asas foram protegidas por um pedaço de papel de filtro (B). O tubo de plástico que segura a abelha foi inclinado a 45 ° e a estimulação visual foi apresentada lateralmente. C) Labirinto Y usado para realizar testes de orientação em abelhas livres em voo. O labirinto era composto de material acrílico preto opaco e sua entrada (28x20x20 cm, comprimento x largura x altura) levava a uma câmara de decisão na qual a abelha podia escolher entre dois braços (20x20x20 cm, comprimento x largura x altura) apresentando estímulos cromáticos distintos. O condicionamento visual clássico do PER (A-B) prévio ao teste de orientação foi realizado dentro de um dos braços deste labirinto em Y. D) Curvas espectrais dos estímulos azul e verde apresentados às abelhas *naïve* durante testes de orientação visando determinar a faixa de isoluminância. O de estímulos azuis e verdes foi apresentado às abelhas no labirinto em Y em cinco diferentes proporções de irradiância (1: 1, 4: 3, 2: 1, 4: 1, 6: 1) a partir de um valor máximo de 0,4 μW cm^{-2}. E) Porcentagem de primeira escolha de 20 abelhas testadas independentemente quanto à sua orientação no labirinto em Y apresentando o par de estímulos luminosos (azul versus verde) em diferentes proporções de irradiância. A porcentagem de abelhas que escolheram o estímulo azul não foi significativamente diferente daquela que escolheu o estímulo verde em grupos experimentais testados para proporções azul: verde de 2: 1 ou 4: 1. Assim, nestes grupos, azul e verde parecem ser perceptualmente isoluminantes para as abelhas em um contexto de orientação por fototaxia positiva. Os asteriscos indicam distribuições que são significativamente diferentes do aleatório (teste binomial).

3.2 Condicionamento visual diferencial do PER

Não houveram diferenças significativas entre as respostas condicionadas de PER do grupo de abelhas treinadas para o estímulo azul e aquelas treinadas para o estímulo verde como CS+, tanto para abelhas intactas quanto para as abelhas privadas de antenas (*grupo x estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; *Efeito grupo*; com antenas: $F_{1,37} = 2.81$, NS; sem antenas: $F_{1,38} = 0.43$, N.S). Portanto, os dados destes subgrupos foram agrupados na Fig. 3.A. Ambas as abelhas com e sem antenas foram capazes de discriminar entre o estímulo cromático reforçado (CS+) e o não-reforçado (CS-) em nossa abordagem experimental (Fig. 3.A, *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *Efeito interação*; com antenas: $F_{9,333} = 3.43$, $p<0.001$; sem antenas: $F_{9,342} = 3.28$, $p<0.001$).

3.3 Transferência de aprendizagem de um contexto clássico para um operante

A porcentagem de primeiras escolhas de abelhas intactas no teste de orientação em labirinto Y foi significativamente maior para o CS+ do que para o CS- usado na fase anterior de condicionamento (Fig. 3.B, teste binomial, p = 0,0002), indicando transferência de aprendizagem visual do contexto clássico para operante. Para avaliar em maior detalhe a relação entre os desempenhos individuais no condicionamento clássico e nos testes operantes subsequentes, calculamos um índice de discriminação para cada abelha. Este índice representou a diferença entre as respostas aos últimos cinco ensaios do CS + e os últimos cinco ensaios do CS- [DI = (ΣCS +) - (ΣCS-)]. Os valores deste índice podem variar de -5 a 5. Sempre que uma abelha individual respondeu pelo menos uma vez mais ao CS + do que ao CS- nos últimos cinco ensaios (DI ≥ 1), consideramos essas abelhas como ditas "*learners"* do condicionamento visual diferencial do PER. As abelhas que apresentaram valores de DI abaixo de um foram

consideradas como "*non learners*". Em seguida, analisamos a proporção de abelhas *"learners" e "non learners"* que apresentaram respostas corretas nos testes de orientação no labirinto Y (Fig. 3.C). No grupo *"*learners", 94% das abelhas escolheram o estímulo correto no labirinto Y, indicando claramente a transferência de aprendizagem a partir do contexto clássico (Fig. 3.C; Teste exato binômico, p = 0,0006). Além disso, 73% das abelhas do grupo *"non learners"* escolheram o estímulo correto no labirinto Y, o que significa que elas também escolheram significativamente mais o estímulo visual usado anteriormente como CS+ (Fig. 3.C; Teste binomial; p = 0,01). Este resultado indica que mesmo algumas das abelhas fixadas que não mostraram aprendizagem durante o condicionamento diferencial clássico foram capazes de aprender associações entre estímulos visuais e recompensas e transferi-las para um novo contexto operante.

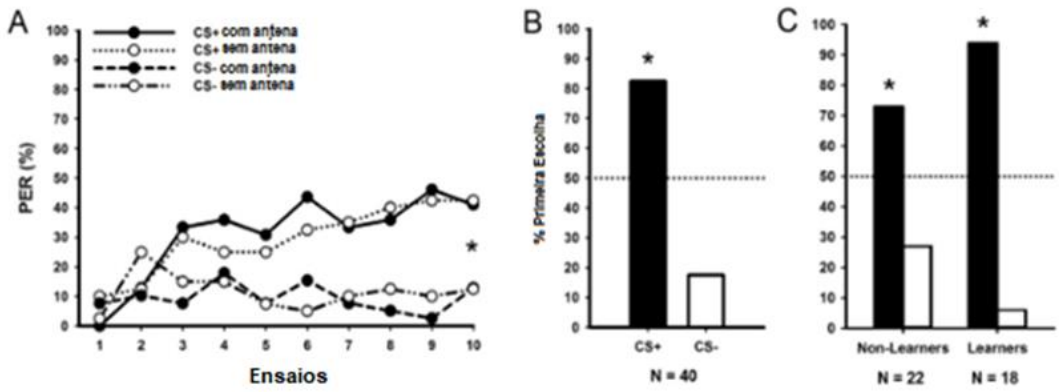

Figura 3. Condicionamento clássico do PER seguido por teste operante no labirinto Y. A) Porcentagem de respostas condicionadas de PER ao longo de 10 ensaios de apresentação do CS + e do CS- em abelhas fixadas com ou sem antenas (N = 40 abelhas por grupo). O asterisco indica que ambas as abelhas com e sem antenas foram capazes de discriminar o estímulo condicionado positivo (CS +) do negativo (CS-) (GLM ANOVA para medidas repetidas). Duas abelhas sem antenas e uma abelha com antena foram excluídas da análise devido ao comprometimento do PER durante o condicionamento. B) Porcentagem de abelhas com antenas intactas que voaram em direção ao CS + ou ao CS- durante o teste de orientação realizado 1 hora após o condicionamento clássico diferencial (N = 40 abelhas). A porcentagem das primeiras escolhas no labirinto Y foi significativamente maior para o CS + do que para o CS-, revelando transferência de aprendizagem de um contexto clássico para um novo contexto operante. C) Respostas em teste operante de retenção (orientação no labirinto Y) de abelhas classificadas como "*learners"* ou "*non learners*" de acordo com seus índices de discriminação durante o condicionamento clássico. Os asteriscos em B e C indicam distribuições significativamente diferentes do aleatório (teste binomial).

3.4 Efeito da dopamina e da octopamina na aprendizagem visual associativa

3.4.1 Experimentos controle

Para cada concentração de fármaco utilizada neste estudo, bem como para as abelhas injetadas puramente com solução Ringer, realizamos inicialmente um experimento controle para avaliar se a injeção poderia interferir com o comportamento de voo e / ou a escolha dos

estímulos visuais no labirinto Y (Fig. 4.A). Nenhum dos tratamentos alterou o comportamento das abelhas *naïves* injetadas, que foram capazes de voar para um dos braços do labirinto Y e apresentaram escolhas aleatórias para os estímulos isoluminantes utilizados em nosso estudo (Fig. 4.A; Teste binomial ; Ringer: $p = 0.16$; flupentixol 10^{-7}M: $p = 0.18$, flupentixol 10^{-5}M: $p = 0.16$; flupentixol 10^{-3}M: $p = 0.16$; epinastina 10^{-7}M: $p = 0.12$; epinastina 10^{-5}M: $p = 0.16$; epinastina 10^{-3}M: $p = 0.16$; mianserina 10^{-7}M: $p = 0.12$; mianserina 10^{-5}M: $p = 0.16$; mianserina 10^{-3}M: $p = 0.12$).

As abelhas do grupo controle injetadas com solução Ringer foram capazes de aprender a discriminação visual durante o condicionamento diferencial clássico, conforme demonstrado pela porcentagem significativamente maior de respostas condicionadas (PER) ao estímulo recompensado (CS+) ao longo dos ensaios (Fig. 4.B; *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; *Efeito interação*; $F_{9,342} = 4.46$, $p<0.001$). O desempenho de aprendizagem das abelhas injetadas com solução Ringer condicionadas para a cor verde como CS+ não diferiu daquele apresentado pelas abelhas condicionadas para a cor azul como CS+ (*grupo x estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; *Efeito grupo*; $F_{1,38} = 0.23$, NS), assim agrupamos os dados desses dois subgrupos na Fig. 4.B. Além disso, as abelhas injetadas com solução Ringer escolheram significativamente mais o estímulo utilizado como CS + do que o utilizado como CS - durante testes de orientação subseqüentes no labirinto Y (Fig. 4.C, teste exato Bimodal, $p = 0,0002$) .

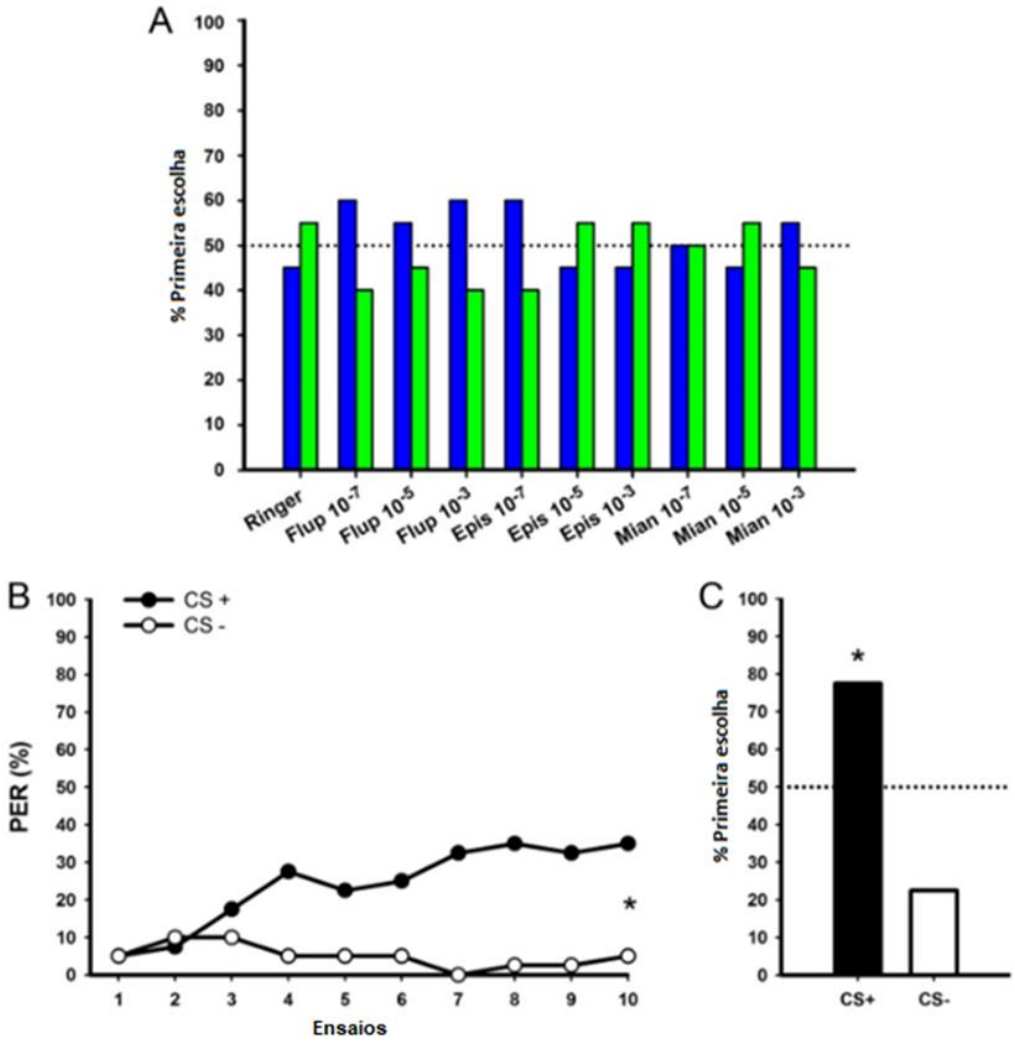

Figura 4. Experimentos controle para testar o efeito de antagonistas aminérgicos na discriminação visual. A) Testes de orientação para um par de estímulos cromáticos isoluminantes (azul versus verde) em grupos de 20 abelhas *naives* injetadas com solução Ringer ou diferentes concentrações dos antagonistas aminérgicos flupentixol (Flup), epinastina (Epis) e mianserina (Mian). Este experimento controle foi realizado para avaliar se as injeções farmacológicas poderiam interferir no comportamento de voo ou na escolha de estímulos cromáticos no labirinto em Y. B) Curvas de aprendizado de abelhas injetadas com solução Ringer durante o condicionamento diferencial visual do PER (N = 40 abelhas). C) Porcentagem de abelhas injetadas com Ringer que escolhem primeiro o estímulo previamente usado como CS + ou CS- durante o teste de orientação realizado 1 hora após o condicionamento clássico (N = 40 abelhas). Os asteriscos indicam discriminação significativa durante o condicionamento diferencial (GLM ANOVA para medidas repetidas) ou teste de orientação no labirinto Y (teste binomial). Uma abelha foi excluída da análise devido ao comprometimento do PER durante o condicionamento e três abelhas foram excluídas devido ao óbito entre o condicionamento clássico e o teste operante.

3.4.2 Condicionamento clássico seguido de teste de transferência operante

Não encontramos diferença entre os desempenhos de abelhas treinadas para a cor verde ou azul como CS + para qualquer dos tratamentos farmacológicos usando antagonistas aminérgicos (*grupo x estímulo x tentativa* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito grupo*,

flupentixol 10^{-7}M: $F_{1,38} = 0.18$, NS; flupentixol 10^{-5}M: $F_{1,38} = 0.47$, NS; flupentixol 10^{-3}M: $F_{1,38} = 0.45$, NS; epinastina 10^{-7}M: $F_{1,38} = 0.44$, NS; epinastina 10^{-5}M: $F_{1,33} = 0.47$, NS; epinastina 10^{-3}M: $F_{1,29} = 1.63$, NS; mianserina 10^{-7}M: $F_{1,38} = 0.18$, NS; mianserina 10^{-5}M: $F_{1,38} = 1.41$, NS; mianserina 10^{-3}M: $F_{1,38} = 0.61$, NS). Desta forma, os dados desses dois grupos independentes foram agrupados para cada tratamento, conforme apresentado nas Figuras 5 a 7. A Figura 5 mostra as curvas de aprendizagem das abelhas no condicionamento visual diferencial do PER e suas escolhas seguintes nos testes de orientação em labirinto Y, quando aplicadas três diferentes concentrações de flupentixol. As abelhas injetadas com a menor concentração deste antagonista dopaminérgico foram capazes de discriminar significativamente o CS + e o CS- durante o condicionamento visual do PER (Fig. 5.A, *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito interação*, $F_{9,342} = 3.72$, $p<0.001$), bem como durante teste de transferência no labirinto Y (Fig. 4A, teste binomial, p = 0,005). A injeção da dose mediana de flupentixol no cérebro da abelha reduziu, mas não bloqueou completamente a capacidade das abelhas de discriminar entre o CS+ e o CS- durante o condicionamento diferencial do PER (Fig. 5.B; *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; *efeito estímulo*; $F_{1,38} = 6.90$, $p<0.05$; *efeito interação*; $F_{9,342} = 1.35$, NS). No entanto, as abelhas deste grupo experimental apresentaram escolhas aleatórias para o mesmo par de estímulos visuais durante o teste de orientação em labirinto Y (Fig. 5.B, Teste Binomial, p = 0,06). Por fim, a injeção de uma dose mais elevada de flupentixol no cérebro das abelhas prejudicou a discriminação visual tanto no condicionamento visual diferencial do PER (Fig. 5.C, *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito estímulo*, $F_{1,38} = 3.38$, NS, *efeito interação* $F_{9,342} = 1.44$, NS) quanto no teste de orientação em labirinto Y (teste binomial, p = 0,12), sugerindo um efeito dose-dependente do bloqueio dopaminérgico na aprendizagem associativa visual por abelhas. A figura 6 mostra os níveis de aprendizagem visual de abelhas injetadas com o antagonista octopaminérgico epinastina em três concentrações diferentes. As abelhas injetadas com a menor dose de epinastina foram capazes de realizar a discriminação visual durante o condicionamento diferencial do PER (Fig. 6.A, *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito estímulo*, $F_{1,38} = 0.91$, $p < 0.05$, *efeito interação*, $F_{9,342} = 2.05$, $p<0.05$), mas apresentou escolhas aleatórias no teste operante em labirinto Y (Fig. 6.A, teste exato binomial, p = 0,06). Tanto a injeção da concentração mediana, quanto da concentração maior de epinastina,no cérebro da abelha, inibiu completamente a discriminação visual durante o condicionamento do PER (*estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, Fig. 6.B; epinastina 10-5M: efeito do estímulo; epinastina 10^{-5}M: *efeito estímulo*; $F_{1,33} = 1.76$, NS; *efeito interação*: $F_{9,297} = 0.56$, NS; Fig. 5C; epinastina 10^{-3}M: *efeito estímulo*; $F_{1,29} = 0.03$, NS; *efeito interação*; $F_{9,261} = 0.51$, NS)

e também o teste de orientação subseqüente no labirinto Y (teste binomial, Fig. 6.B, epinastina 10^{-5}M: p = 0.09; Fig. 6.C, epinastina 10^{-3}M: p = 0.14). Também foi testado o efeito do antagonista octopaminérgico mianserina em experimentos de discriminação visual (Fig. 7). Nas três concentrações diferentes que foram injetadas, a mianserina inibiu completamente a discriminação visual durante o condicionamento diferencial do PER (Fig. 7A-C; *estímulos x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; para todas as três concentrações: *efeito estímulo*; $F_{1,38} < 0.04$, NS; *interação efeito* $F_{9,342} < 0.51$, NS) e nos testes de orientação em labirinto Y (Fig. 7.A-C, teste binomial, mianserina 10^{-7}M: p = 0.06, mianserina 10^{-5}M: p = 0.12; mianserina 10^{-3}M: p = 0.08). Estes resultados revelam um forte efeito do bloqueio octopaminérgico na aprendizagem visual apetitiva em abelhas.

Para comparar os desempenhos de aprendizagem visual entre abelhas de todos os grupos experimentais, calculamos os índices de discriminação (DI, ver detalhes em 2.2.5). Foram encontradas diferenças significativas entre os valores de DI obtidos em diferentes tratamentos farmacológicos (Fig. 8, *tratamento x índice de discriminação* GLM ANOVA, $F_{10,415} = 5.19$, $p < 0.0001$). Foi observado um claro efeito dose-dependente ao comparar os valores de DI obtidos para três concentrações diferentes de flupentixol (teste de Tukey, $p < 0,05$ para as três comparações), com uma diminuição significativa de DI seguindo cada aumento de concentração da droga (Fig. 8). Um efeito dose-dependente parcial foi observado para as diferentes concentrações de epinastina, com o DI significativamente maior para a menor concentração (teste de Tukey, 10^{-7}M *vs* 10^{-5}M e 10^{-7}M *vs* 10^{-3}M, $p < 0.05$ em ambos os casos) e valores equivalentes de DI para as outras duas concentrações (teste de Tukey, 10^{-5}M *vs* 10^{-3}M; p = 0.55, NS). A injeção de mianserina conduziu a valores equivalentes de muito baixo DI nas três concentrações testadas (teste de Tukey, $p > 0,74$, NS, para as três comparações).

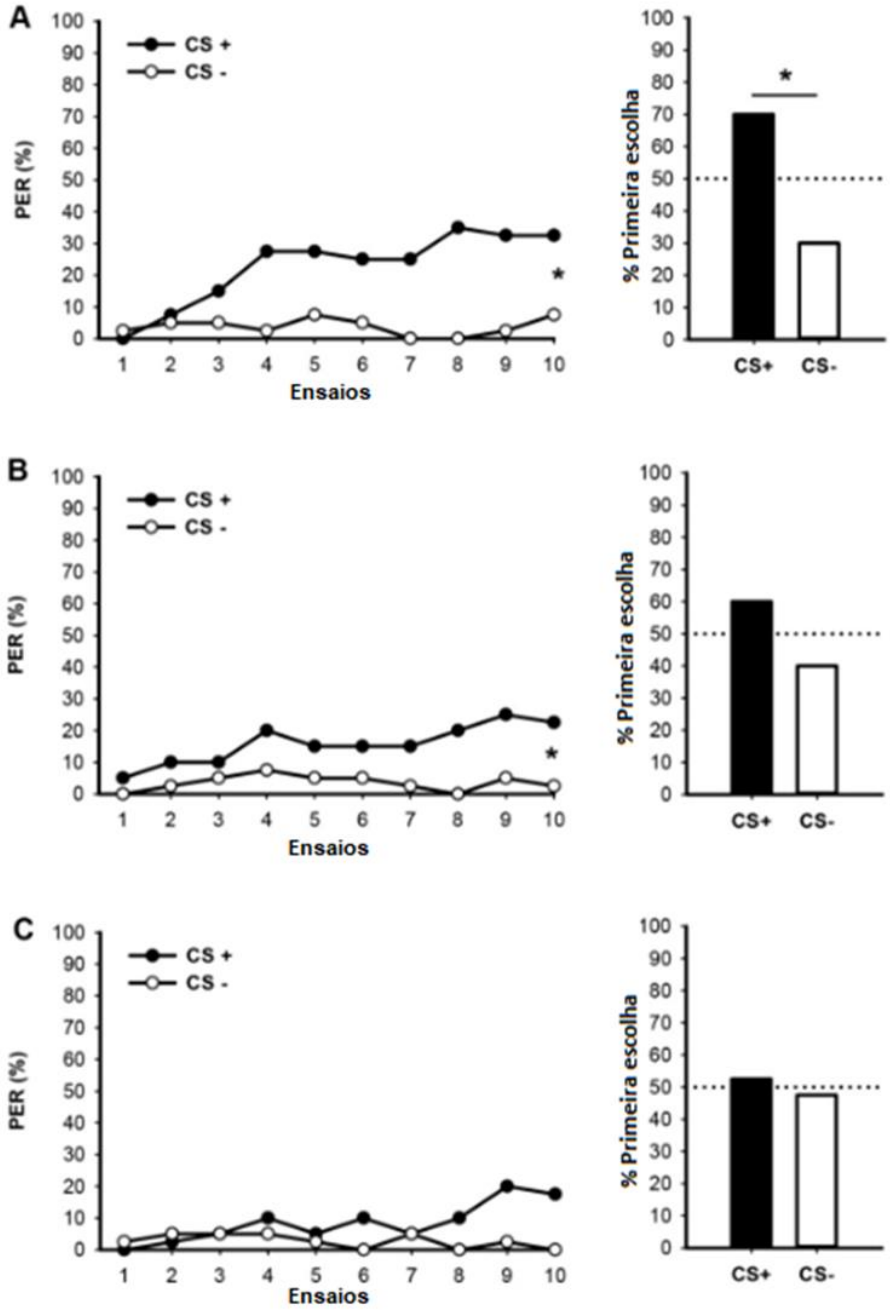

Figura 5. Curvas de aprendizagem durante condicionamento visual clássico e orientação em teste operante de abelhas injetadas com solução de flupentixol. A porcentagem de condicionamento do PER ao longo dos ensaios de condicionamento (esquerda) e as primeiras escolhas durante os testes de orientação no labirinto Y (direita) são mostrados para três concentrações crescentes: 2 x 10^{-7} M (A), 2 x 10^{-5} M (B) and 2 x 10^{-3} M (C). Os asteriscos indicam discriminação significativa durante o condicionamento clássico (GLM ANOVA para medidas repetidas) ou teste operante (teste binomial). N = 40 abelhas por concentração. N de abelhas excluídas da análise devido ao comprometimento do PER = dois em B, um em C. N de abelhas excluídas devido a morte entre condicionamento e teste = dois em A, dois em B, três em C.

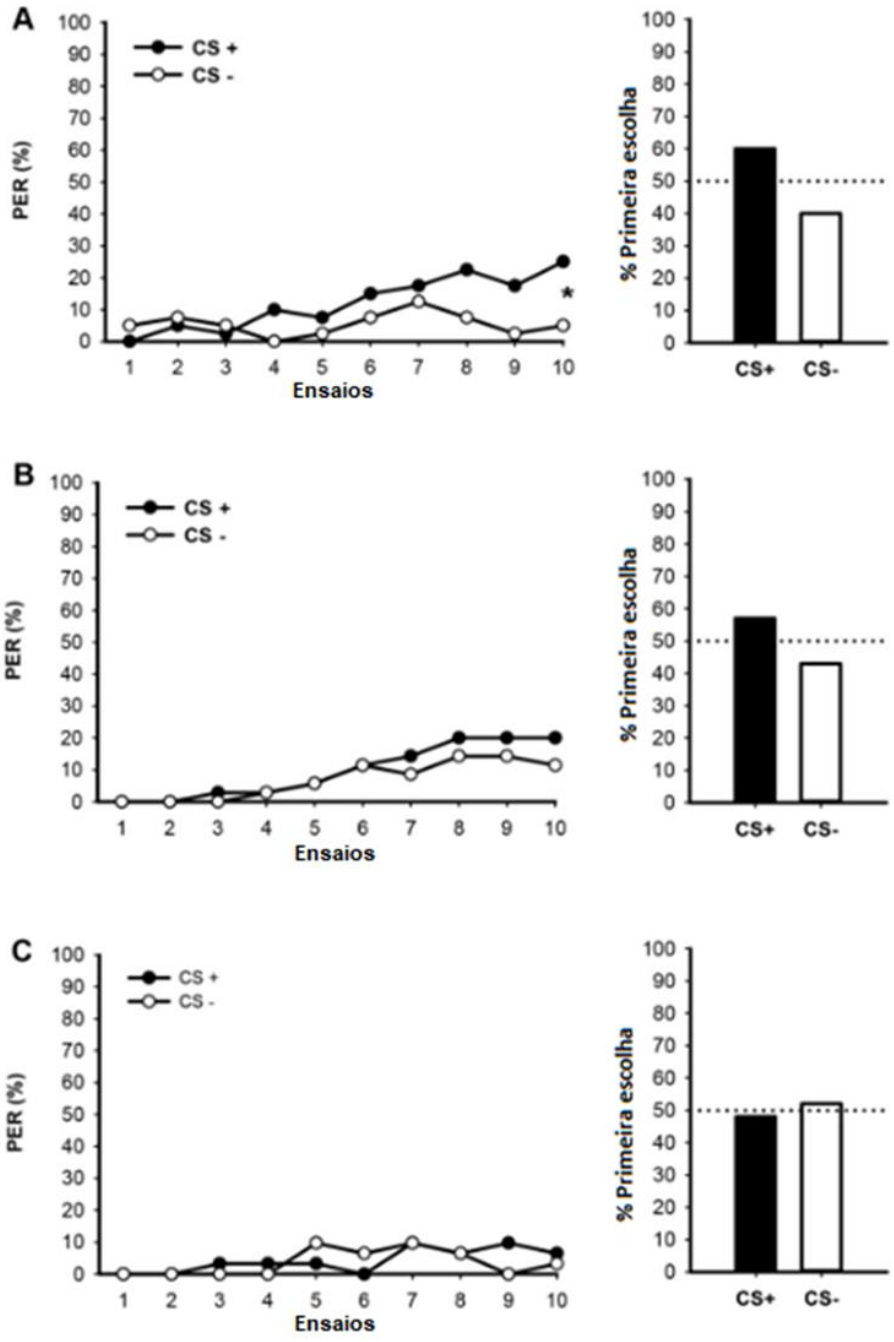

Figura 6. Desempenho durante condicionamento visual diferencial e teste de retenção operante em abelhas injetadas com solução de epinastina. A porcentagem de condicionamento do PER ao longo dos ensaios de condicionamento (esquerda) e as primeiras escolhas durante os testes de orientação no labirinto em Y (direita) são mostrados para três concentrações crescentes:: 4 x 10^{-7} M (A; N = 40), 4 x 10^{-5} M (B; N = 34) e 4 x 10^{-3} M (C; N = 36). O asterisco indica discriminação significativa durante condicionamento clássico (GLM ANOVA para medidas repetidas). N de abelhas excluídas da análise devido ao comprometimento do PER = um em A, um em C. N de abelhas excluídas devido a morte entre condicionamento e teste = dois em A, um em B, dois em C.

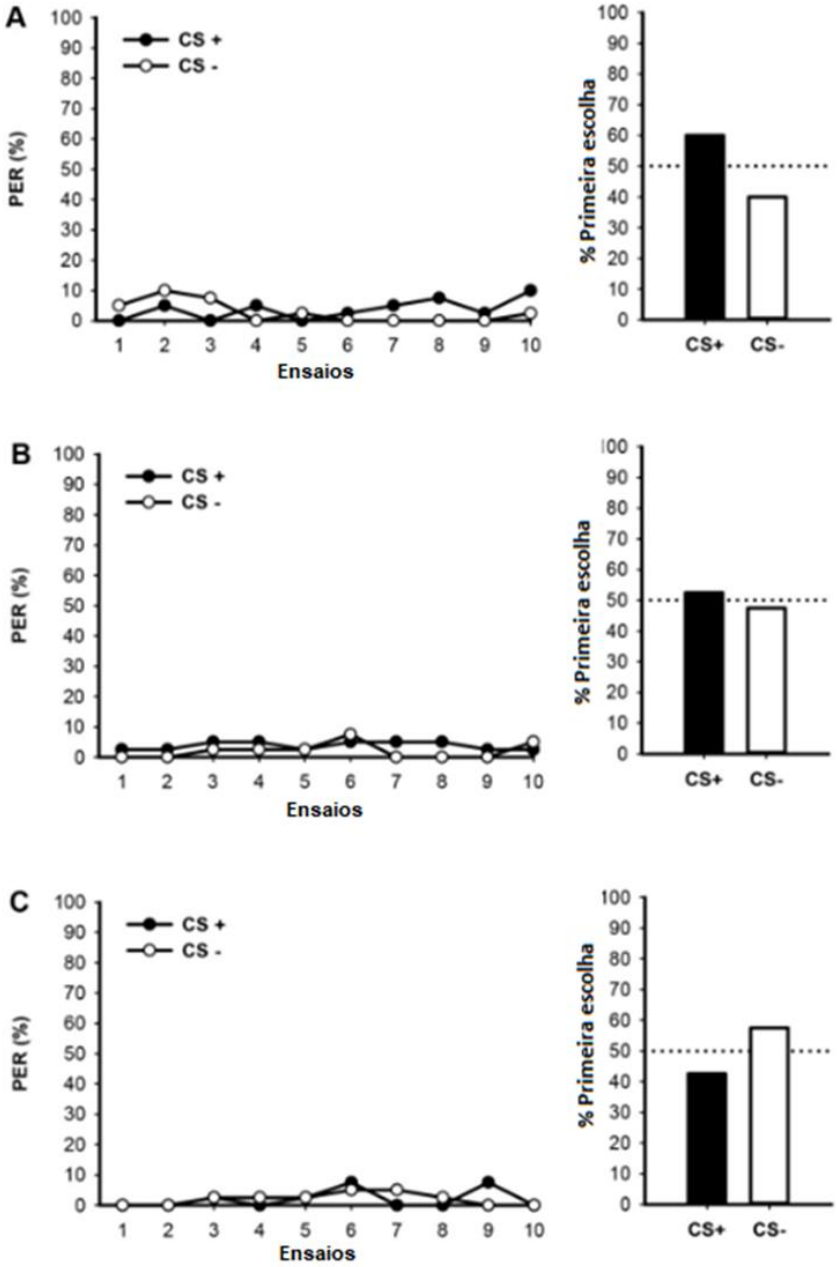

Figura 7. Desempenho durante condicionamento visual diferencial e teste de retenção operante em abelhas injetadas com solução de mianserina. A porcentagem de condicionamento PER ao longo dos ensaios de condicionamento (esquerda) e as primeiras escolhas durante os testes de orientação no labirinto Y (esquerda) são mostradas para três concentrações crescentes: 3.3 x 10^{-7} M (A), 3.3 x 10^{-5} M (B) e 3.3 x 10^{-3} M (C). N = 40 abelhas por concentração. N de abelhas excluídas da análise devido ao comprometimento do PER = um em A, um em B, dois em C. N de abelhas excluídas por morte entre condicionamento e teste = três em A, dois em B, três em C.

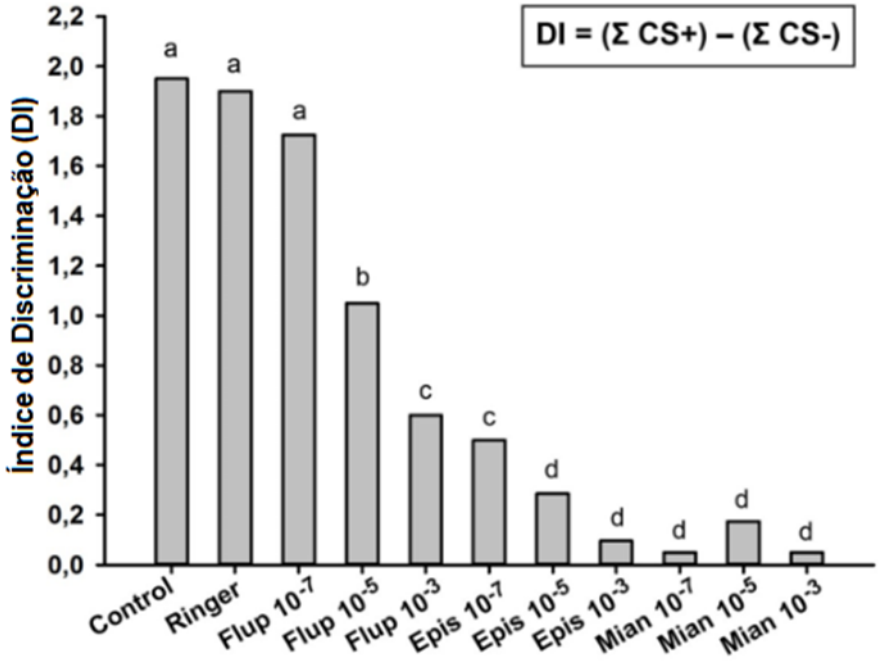

Figura 8. Índice de discriminação (DI) durante condicionamento visual clássico das abelhas injetadas com solução Ringer ou diferentes concentrações dos antagonistas aminérgicos flupentixol, epinastina e mianserina. Letras distintas representam diferenças estatísticas entre os DIs calculados para os diferentes grupos (GLM ANOVA).

3.4.3 Condicionamento clássico seguido de testes de retenção do PER

Estes experimentos foram realizados para analisar se os efeitos dos antagonistas aminérgicos nos testes de orientação operante (3.3.2.) estavam relacionados à interferência na retenção de memórias adquiridas durante condicionamento clássico do PER. Não foram encontradas diferenças entre as performances de abelhas treinadas para a cor verde ou azul como CS + para qualquer dos tratamentos (*grupo x estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito grupo*, Ringer: $F_{1,38} = 0.23$, NS; flupentixol 10^{-7}M: $F_{1,38} = 0.16$, NS; flupentixol 10^{-5}M: $F_{1,38} = 1.25$, NS; flupentixol 10^{-3}M: $F_{1,38} = 0.12$, NS; epinastina 10^{-7}M: $F_{1,38} = 0.67$, NS; epinastina 10^{-5}M: $F_{1,33} = 0.16$, NS; epinastina 10^{-3}M: $F_{1,29} = 1.15$, NS). Desta forma, agrupamos os dados desses dois subgrupos independentes para cada tratamento. Como esperado, as abelhas controle injetadas com a solução Ringer apresentaram uma diferença significativa entre respostas de PER condicionado para o CS + e o CS – , tanto durante o condicionamento (*estímulo x tentativa* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito de interação*, $F_{9,342} = 4.87$, $p<0.001$), quanto no teste de retenção (McNemar test; $\chi^2 = 7.7$, $P < 0.01$). Os animais injetados com a dose mais baixa e com a dose mediana do antagonista dopaminérgico flupentixol foram capazes de discriminar significativamente o CS + do CS- durante o condicionamento visual do

PER (Fig. 9.A-B; *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação*; flupentixol 10^{-7}M: $F_{9,342} = 3.24$, $p<0.001$; flupentixol 10^{-5}M: $F_{9,342} = 3.01$, $p<0.01$), bem como no teste de retenção (Fig. 9.A-B; teste McNemar; flupentixol 10^{-7}M: $\chi^2 = 5.8$, $P < 0.02$; flupentixol 10^{-5}M: $\chi^2 = 4.0$, $P < 0.05$). A injeção da concentração mais elevada de flupentixol comprometeu a discriminação visual tanto no condicionamento (Fig. 9.C, *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito interação*, $F_{9,342} = 1.23$, NS) como no teste de retenção (Fig. 9.C, teste de McNemar; $\chi^2 = 0.5$, NS). O grupo de abelhas tratadas com a menor dose do antagonista octopaminérgico epinastina alcançou discriminação visual significativa durante o condicionamento (Fig. 10.A, *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas, *efeito interação*, $F_{9,342} = 6.59$, $p<0.02$) e também no teste de retenção (Fig. 10.A, teste McNemar, $\chi^2 = 5.2$, $p < 0.05$). No entanto, as injeções na concentração mediana e na mais elevada de epinastina prejudicaram a discriminação visual, tanto durante o condicionamento do PER (Fig. 10.B-C; *estímulo x trial* GLM ANOVA para medidas repetidas; epinastina 10^{-5}M: *efeito interação*: $F_{9,342} = 1.55$, NS; Fig. 10.C; epinastina 10^{-3}M: *efeito interação*; $F_{9,342} = 1.19$, NS), quanto no teste de retenção (Fig. 10.B-C, teste de McNemar, epinastina 10^{-5}M: $\chi^2 = 1.4$, NS; epinastina 10^{-3}M: $\chi^2 = 0.1$, NS).

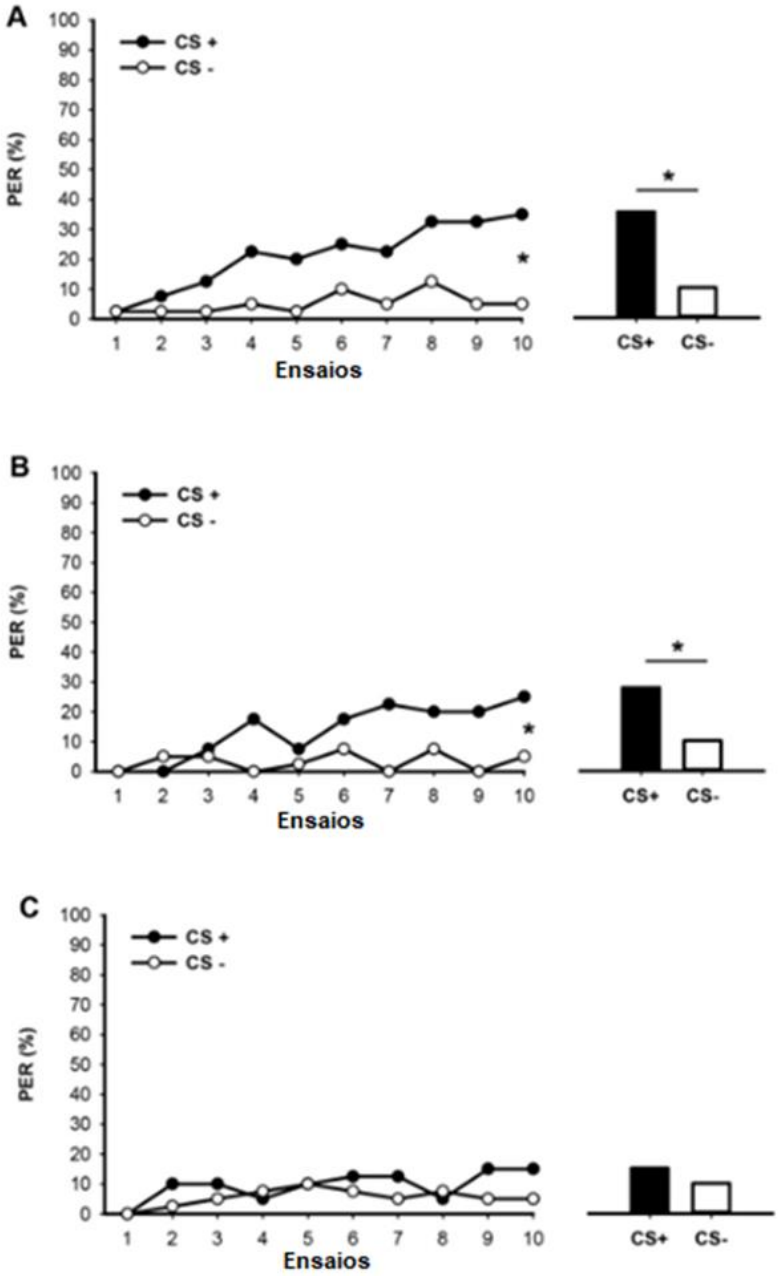

Figura 9. Condicionamento visual clássico seguido por testes de retenção do PER em abelhas injetadas com flupentixol. A porcentagem de PER condicionado em ensaios de condicionamento (esquerda) e no teste de retenção (direita) é mostrada para três concentrações crescentes: : 2 x 10^{-7} M (A), 2 x 10^{-5} M (B) and 2 x 10^{-3} M (C) Asteriscos indicam discriminação significativa durante o condicionamento (GLM ANOVA para medidas repetidas) ou testes de retenção (teste McNemar). N = 40 abelhas por concentração. N de abelhas excluídas da análise devido ao comprometimento de PER = um em A, dois em C. N de abelhas excluídas devido a morte entre condicionamento e teste = dois em B, dois em C.

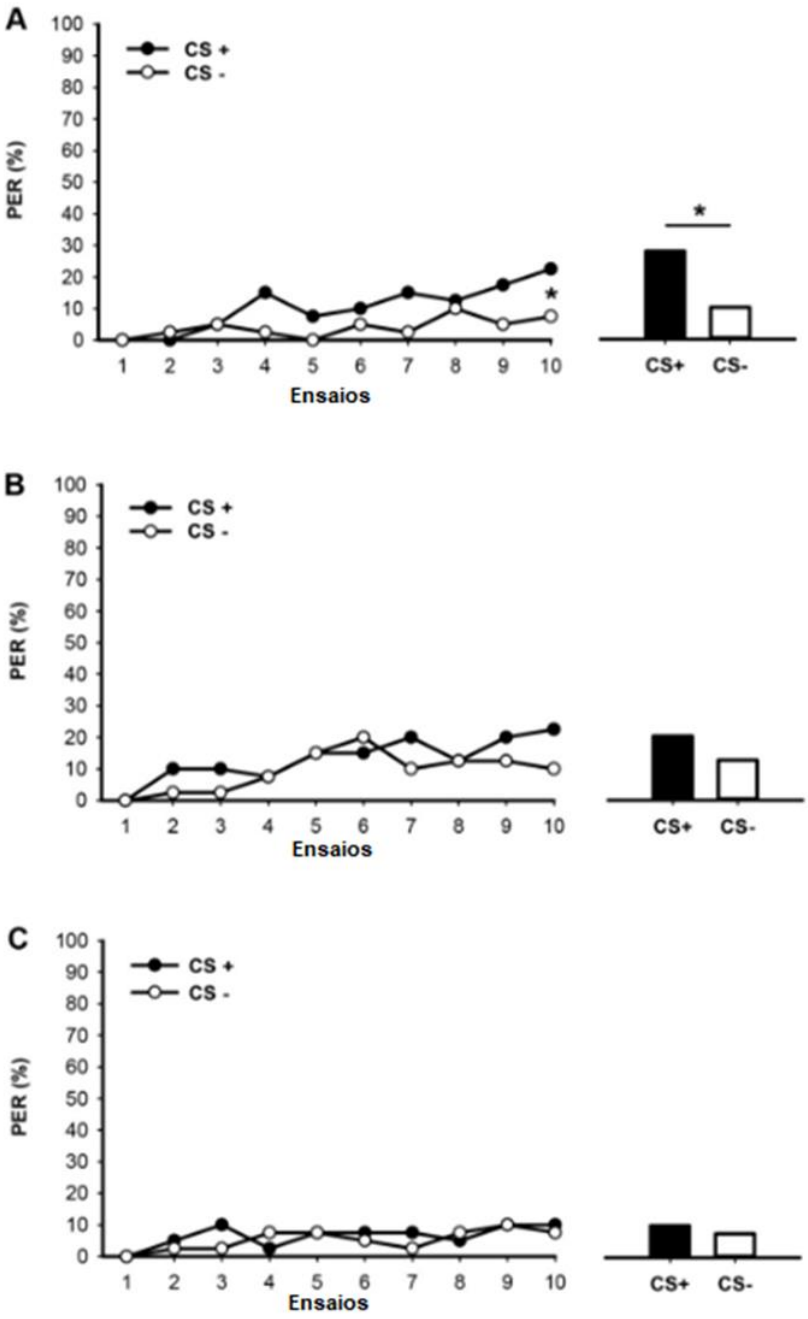

Figura 10. Condicionamento visual clássico seguido por testes de retenção do PER em abelhas injetadas com epinastina. A porcentagem de PER condicionado nos ensaios de condicionamento (esquerda) e no teste de retenção (direita) é mostrada para três concentrações crescentes:: 4 x 10^{-7} M (A), 4 x 10^{-5} M (B) and 4 x 10^{-3} M (C) Asteriscos indicam discriminação significativa durante o condicionamento (GLM ANOVA para medidas repetidas) ou testes de retenção (teste McNemar). N = 40 abelhas por concentração. N de abelhas excluídas da análise devido ao comprometimento do PER = um em A, dois em B, dois em C. N de abelhas excluídas por morte entre condicionamento e teste = dois em B, três em C.

4 DISCUSSÃO

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez que as abelhas são capazes de realizar uma transferência da informação visual adquirida na aprendizagem associativa clássica para um novo contexto operante durante teste de retenção. A injeção de antagonistas tanto dopaminérgicos quanto octopaminérgicos no cérebro das abelhas antes do condicionamento visual comprometeu a aprendizagem associativa, revelando que ambas estas monoaminas participam das vias de associação entre estímulo visual e recompensa apetitiva. Enquanto o efeito do antagonista dopaminérgico na aprendizagem visual apetitiva ocorreu claramente de forma dose-dependente, a injeção de antagonistas octopaminérgicos levou a uma forte inibição desta aprendizagem em praticamente todas as doses testadas. Estes resultados indicam que a octopamina pode ser um modulador mais forte do aprendizado visual apetitivo do que a dopamina.

4.1 Condicionamento visual apetitivo em abelhas fixadas

No presente estudo, desenvolvemos um protocolo de condicionamento visual apetitivo que permitiu que as abelhas fixadas discriminassem efetivamente dois estímulos cromáticos isoluminantes diferentes. Especialmente nas últimas décadas, o crescente interesse no desenvolvimento de protocolos de condicionamento visual efetivo em abelhas fixadas levou diferentes autores a adotarem diversos procedimentos de fixação dos animais, natureza e duração dos estímulos visuais, número de ensaios e intervalo entre ensaios de condicionamento (Avarguès-Weber e Mota, 2016). Em alguns desses estudos, a associação entre o estímulo visual e a recompensa só foi possível após a amputação das antenas das abelhas, fato intrigante cuja base neurobiológica permanece até agora desconhecida (Avarguès-Weber e Mota, 2016). A metodologia aqui utilizada mostrou-se igualmente efetiva no condicionamento de abelhas fixadas com antenas ou sem antenas em tarefa de discriminação visual clássica. Depois de adaptar diferentes protocolos publicados anteriormente para o condicionamento clássico de abelhas fixadas intactas a estímulos visuais luminosos (Dobrin e Fahrbach, 2012; Jernigan *et al.,* 2014; Balamurali *et al.,* 2015), acreditamos que alguns parâmetros foram importantes para alcançar esse objetivo em nosso laboratório: i- escuridão total do ambiente de condicionamento; ii- apresentação lateral dos estímulos visuais em tamanho grande; iii- inclinação do corpo da abelha em 45°. Embora estes procedimentos pareçam ser parâmetros importantes para o sucesso do nosso protocolo de condicionamento clássico, estudos adicionais controlados são

necessários para entender como e em que medida eles modulam o aprendizado visual apetitivo em abelhas fixadas.

4.2 Transferência de informação visual em abelhas

A capacidade das abelhas para transferir informação aprendida entre um contexto clássico e um operante tinha sido até agora apenas demonstrada para estímulos olfativos (Bakchine-Huber *et al.,* 1992; Gerber *et al.,* 1996; Sandoz *et al.,* 2000; Chaffiol *et al.,* 2005; Carcaud *et al.,* 2009), mas não ainda para estímulos visuais. O principal motivo para isso provavelmente está na dificuldade de estabelecer protocolos robustos e confiáveis para o condicionamento visual clássico de abelhas fixadas (Avarguès-Weber e Mota, 2016). Embora condicionamento visual do PER bem sucedido venha sendo recentemente relatado em abelhas fixadas, os níveis de aprendizagem alcançados são geralmente muito menores (30-50%) do que os relatados na extensa literatura sobre o condicionamento visual operante de abelhas voando livremente (80-100%). Esses dados sugerem que o aprendizado visual apetitivo das abelhas é mais efetivo em um contexto operante do que em um contexto clássico. Neste trabalho, testamos se abelhas fixadas condicionadas em um paradigma clássico seriam capazes de transferir a discriminação visual adquirida para um novo contexto operante, quando liberadas em um labirinto Y para um teste de retenção. Descobrimos que praticamente todas as abelhas (94%) bem sucedidas na tarefa de discriminação visual em contexto clássico (*learners*) escolheram o estímulo cromático correto durante os testes de orientação no labirinto Y, demonstrando que as memórias adquiridas por essas abelhas em um paradigma de condicionamento de PER são resistentes às mudanças de contexto ocorridas no teste operante de retenção. Surpreendentemente, 70% das abelhas que não obtiveram sucesso na tarefa de condicionamento visual clássico (*non learners*) também fizeram escolhas corretas no labirinto Y durante o teste de retenção. Este resultado indica que pelo menos uma parte dessas abelhas *non learners* adquiriu memórias associativas visuais durante o condicionamento visual clássico, ainda que tipicamente não apresentaram nenhuma resposta no condicionamento do PER. Esses resultados sustentam a teoria de que os resultados da aprendizagem visual associativa em abelhas são mais acessíveis em um contexto operante quando comparado a um contexto clássico. Portanto, testes operantes de retenção em labirinto Y após condicionamento visual clássico do PER representam uma abordagem promissora para melhor avaliar os níveis de aprendizagem e memória visual em abelhas.

É importante destacar a necessidade de realizar uma calibração precisa da irradiância dos estímulos visuais até um ponto de isoluminância perceptual das abelhas para a efetividade desta nova abordagem de condicionamento visual. A forte fototaxia positiva das abelhas em um ambiente escuro que apresenta estímulos de luz tende a orientá-las sempre para o lado perceptualmente mais luminoso do labirinto Y durante os testes de orientação. Este comportamento interferiu fortemente nas respostas das abelhas no labirinto Y durante o teste de retenção, independente do condicionamento visual clássico previamente efetuado. Na mosca *Drosophila*, a calibração da irradiância do estímulo a um ponto de isoluminância já foi efetivamente utilizada para estudar o processamento cromático sem interferência de outras pistas visuais acromáticas (Yamaguchi *et al.,* 2008; Melnattur *et al.,* 2014). Nestes estudos, a resposta optomotora das moscas em um simulador de voo foi utilizada para determinar um ponto de isoluminância para estímulos em movimento compostos por barras azul-verde com cores alternadas. Uma vez que o processamento de movimento em moscas depende do contraste acromático e é independente da visão cromática, a resposta optomotora é abolida quando as barras móveis azul-verde estão calibradas para um ponto de isoluminância. A resposta fototática positiva das abelhas em direção a uma fonte de luz é um comportamento que também parece depender exclusivamente de pistas acromáticas (Labhart, 1974; Menzel e Greggers, 1985; Erber *et al.,* 2006). Portanto, usamos esse comportamento para definir uma proporção de irradiância para um par de luzes azul e verde, na qual as abelhas não apresentavam preferência por um desses dois estímulos em um labirinto Y. Ao usar este par de estímulos isoluminantes, conseguimos não apenas excluir a influência do fototaxia positiva nos testes operantes de retenção visual, como também realizar um condicionamento visual diferencial nas abelhas fixadas que provavelmente envolveu visão de cores "verdadeira". Assim, o uso da fototaxia positiva para calibrar pares de estímulos espectrais a um ponto de isoluminância perceptual, embora trabalhoso, representa uma abordagem complementar promissora para estudar a aprendizagem cromática e seus correlatos neurais em abelhas.

4.3 O papel da dopamina e da octopamina na aprendizagem visual.

Diferente dos estudos de condicionamento olfativo em abelhas mostrando que a octopamina e a dopamina parecem ser moduladores exclusivos de associações tipo odor-recompensa e odor-punição, respectivamente (Vergoz *et al.,* 2007; Wright *et al.,* 2010), nossos resultados indicam que ambas estas aminas biogênicas modulam a aprendizagem visual apetitiva em abelhas. Uma diminuição significativa da discriminação visual apetitiva foi

encontrada quando ambos os antagonistas octopaminérgicos ou dopaminérgicos foram aplicados no cérebro da abelha. Parece, portanto, que o papel octopaminérgico na via de recompensa apetitiva é conservado em diferentes modalidades sensoriais em abelhas, enquanto que um papel dopaminérgico nesta via estaria principalmente relacionado à modalidade visual. Embora nenhum efeito da dopamina na aquisição de associações tipo odor-recompensa tenha sido observado até o momento, a aplicação desta amina bloqueou a memória apetitiva olfativa de longo prazo em abelhas, enquanto injeções de um antagonista dopaminérgico aumentaram-na (Klappenbach *et al.,* 2013). Estes resultados sugerem que componentes aversivos e apetitivos interagem durante a formação da memória olfativa no cérebro da abelha (Klappenbach *et al.,* 2013).

O envolvimento de dopamina e octopamina também foi descrito anteriormente em um paradigma de aprendizagem operante aversiva visuo-espacial em abelhas (Agarwel *et al.,* 2011). No entanto, contrariamente aos nossos resultados na aprendizagem visual apetitiva, essas aminas biogênicas apresentaram efeitos opostos nesta abordagem aversiva operante, com a dopamina aumentando e a octopamina diminuindo a aprendizagem (Agarwel *et al.,* 2011). Além do efeito destes antagonistas aminérgicos no condicionamento visual apetitivo, nosso trabalho sugere que esses antagonistas podem também interferir na capacidade das abelhas de transferir a informação visual de um contexto clássico para um operante. Abelhas injetadas com a dosagem mediana de flupentixol ou com a menor dose de epinastina tiveram sucesso em discriminar CS + e CS - durante o condicionamento clássico, mas não foram capazes de transferir a discriminação visual para um contexto operante (Figuras 5.B e 6.A). Uma possível razão para este efeito poderia ser uma interferência destes tratamentos antagonistas na consolidação ou retenção da memória visual, uma vez que uma hora após o condicionamento as abelhas não conseguiram mais discriminar os estímulos visuais. No entanto, encontramos que abelhas injetadas com a dose mediana de flupentixol ou com a menor dose de epinastina não apresentaram comprometimento da memória em um teste de retenção do PER realizado uma hora após o condicionamento (Figuras 9.A e 10.B). Dessa forma, concluímos que essas doses de antagonistas dopaminérgico e octopaminérgico prejudicaram a capacidade das abelhas de transferir a informação visual adquirida para um novo contexto.

Estudos de aprendizagem em grilos (*Gryllus bimaculatus*) encontraram a octopamina e a dopamina como moduladores exclusivos de reforço apetitivo e aversivo, respectivamente, tanto para estímulos olfativos como visuais (Unoki *et al.,* 2005, 2006; Mizunami *et al.,* 2009 Nakatani *et al.,* 2009; Matsumoto *et al.,* 2009; 2015). Enquanto uma modulação dopaminérgica da aprendizagem visual apetitiva aparentemente está ausente de grilos, neurônios

dopaminérgicos específicos envolvidos neste tipo de modulação foram recentemente descritos em moscas da espécie *Drosophila melanogaster* (Vogt *et al.,* 2014). O aprendizado apetitivo visual e olfativo em *Drosophila* mostrou-se dependente de neurônios dopaminérgicos dos corpos pedunculados que participam da via de reforço por açúcar (Kim *et al.,* 2007; Liu *et al.,* 2012; Vogt *et al.,* 2014). Ao mesmo tempo, outros neurônios dopaminérgicos além dos envolvidos na formação de associações apetitivas modulam a aprendizagem aversiva visual e olfativa em *Drosophila*. (Vogt *et al.,* 2014, 2016). Juntamente com nossos resultados, esses estudos em *Drosophila* desafiam a teoria sugerida por diferentes autores de que a dopamina é um modulador exclusivo de circuitos de reforço aversivo em insetos (Schwaerzel *et al.,* 2003; Unoki *et al.,* 2005, 2006; Vergoz *et al.,* 2007).

Enquanto a dopamina tem sido por muito tempo considerada o principal neurotransmissor relacionado à recompensa e motivação em mamíferos (Wise 2004), apenas recentemente estudos relataram o aparente papel desta amina nas vias de recompensa apetitiva em insetos (Kim *et al.,* 2007; Krashes *et al.,* 2009, Liu *et al.,* 2012; Burke *et al.,* 2012; Vogt *et al.,* 2014, 2016, presente estudo). Por outro lado, a octopamina tem sido historicamente considerada o principal sinalizador de recompensa apetitiva em diferentes modelos de insetos (Hammer *et al.,* 1993, 1998; Schwaerzel *et al.,* 2003; Unoki *et al.,* 2005; Vergoz *et al.,* 2007). Curiosamente, neurônios octopaminérgicos e dopaminérgicos interagem no cérebro de *Drosophila* durante a aprendizagem olfativa apetitiva para fornecer sinalização de recompensa e formação de memória (Liu *et al.,* 2012; Burke *et al.,* 2012). Foi demonstrado que a octopamina desencadeia um aumento no cálcio intracelular em um subconjunto específico de neurônios dopaminérgicos nos corpos pedunculados, cuja ativação direta pode substituir o açúcar para formar memória olfativa apetitiva em moscas (Burke *et al.,* 2012). Além disso, a sinalização de recompensa dependente de octopamina também requer uma interação com outros neurônios dopaminérgicos no cérebro da mosca que controlam a motivação apetitiva (Burke *et al.,* 2012). Nossos resultados em condicionamento visual apetitivo acoplado a injeções farmacológicas no cérebro da abelha também sugerem um papel sinérgico da octopamina e da dopamina na formação de associações entre estímulos visuais e recompensa. Estudos adicionais são ainda necessários para compreender quais neurônios e receptores octopaminérgicos e dopaminérgicos no cérebro da abelha estão envolvidos nesses processos cognitivos.

4.4 Possíveis substratos neurais da aprendizagem visual apetitiva em abelhas

As bases neurais da aprendizagem visual apetitiva permanecem até agora pouco compreendidas em qualquer modelo de inseto. Até o momento, praticamente todos os estudos destinados a identificar a arquitetura neural envolvida no reforço apetitivo no cérebro de insetos foram focados em substratos da aprendizagem olfativa. Em abelhas, um único neurônio chamado VUMmx1 fornece diferentes locais de convergência entre as vias olfativas e de processamento de sacarose no cérebro, incluindo os lobos antenais, o corno lateral e os corpos pedunculados. A estimulação eletrofisiológica ou farmacológica deste grande neurônio octopaminérgico foi capaz de substituir a função de recompensa da sacarose durante o condicionamento olfativo clássico (Hammer 1993; Hammer and Menzel, 1998), provando que este único neurônio é suficiente para a formação de associações tipo odor-recompensa no cérebro de abelhas. Estudos comportamentais de condicionamento bimodal do PER mostraram que os estímulos visuais podem modular a aprendizagem olfativa nas abelhas (Gerber e Smith 1998; Mota *et al.,* 2011; Hussaini *et al.,* 2013), sugerindo que os substratos neurais das associações tipo odor-recompensa podem receber informação direta ou indireta de regiões de processamento visual. Enquanto diferentes neurópilas olfativas são arborizadas pelo neurônio VUMmx1, as únicas regiões cerebrais que podem fornecer conexão entre áreas de processamento visual e este neurônio são o protocérebro lateral e o anel basal dos corpos pedunculados (Hammer 1993, 1997).

Um estudo anatômico de outros 11 neurônios medianos não pareados ventrais (VUM) possivelmente octopaminérgicos (Kreissl *et al.,* 1994) e envolvidos na aprendizagem apetitiva mostrou que nenhum deles apresenta conexões diretas com os lóbulos ópticos ou com o complexo central, sendo que mais de um tipo arboriza regiões protocerebrais laterais e mediais que poderiam fornecer informação visual (Schröter *et al.,* 2007). Curiosamente, registros eletrofisiológicos do VUMmx1 e da célula mediana ventral não pareada do neurômero mandibular 1 (VUMmd1), cujas arquiteturas neurais são muito semelhantes, mostraram que ambos estes neurônios respondem a estímulos visuais, olfativos e gustativos (Schröter *et al.,* 2007). Portanto, esses dois neurônios são fortes candidatos à participação na modulação octopaminérgica da aprendizagem visual apetitiva ou bimodal no cérebro da abelha. Estudos futuros devem tentar confirmar esta teoria, combinando registros eletrofisiológicos desses neurônios com condicionamento apetitivo visual ou bimodal em abelhas fixadas.

Nosso estudo farmacológico mostra que não só a octopamina participa da modulação da aprendizagem visual apetitiva em abelhas, mas também a dopamina. Embora a dopamina

tenha sido encontrada como um importante modulador da aprendizagem olfativa aversiva em abelhas, nenhum estudo até agora descreveu as bases neurobiológicas dessa modulação associativa (Vergoz *et al.,* 2007; Tedjakumala e Giurfa, 2013). A caracterização imuno-histoquímica de neurônios dopaminérgicos no cérebro de abelhas mostrou arborizações neurais proeminentes na lobula, nos corpos pedunculados, no complexo central e no protocérebro lateral (Schürmann *et al.,* 1989; Schäfer e Rehder, 1989; Tedjakumala *et al.,* 2017), regiões cerebrais que poderiam contribuir para a modulação dopaminérgica da aprendizagem visual. Considerando que os neurônios envolvidos na aprendizagem e memória no cérebro de insetos tipicamente arborizam os corpos pedunculados, os aglomerados (*clusters*) dopaminérgicos C1, C2 e C3, que inervam fortemente esses centros de ordem superior no cérebro da abelha, representam bons candidatos (Tedjakumala *et al.,* 2017). A aprendizagem visual apetitiva em *Drosophila* envolve neurônios dopaminérgicos do cluster medial anterior pareado (PAM) (Vogt *et al.,* 2014), os quais compartilham notáveis semelhanças anatômicas com os neurônios dopaminérgicos dos clusters C1 e C2 do cérebro de abelhas (Tedjakumala *et al.,* 2017). Assim, estudos visando identificar as bases neurais da modulação dopaminérgica da aprendizagem visual apetitiva em abelhas deveriam provavelmente focar-se nesses substratos neurais. Nosso estudo representa um passo importante na compreensão dos mecanismos neurais subjacentes à aprendizagem e memória visual em abelhas.

CAPÍTULO 2

Análise da sensibilidade espectral da fototaxia positiva em *Apis mellifera*

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O comportamento de fototaxia é definido como uma resposta de orientação em relação à luz, sendo o mesmo identificado em seres vivos de diversos grupos filogenéticos, especialmente nos animais invertebrados (Gross, 1913; Menzel, 1979). Este comportamento tem sido identificado em praticamente todos os insetos (Booth *et al.,* 2004; Menzel, 1979; Reisenman e Lazzari, 1998; van Grunsven *et al.,* 2014; Yamaguchi e Heisenberg, 2011), sendo responsável por uma reação de atração à luz (fototaxia positiva) em algumas espécies (e.g. moscas, vespas e abelhas) ou repelência à luz (fototaxia negativa) em outras espécies (e.g. mosquitos, baratas e barbeiros hematófagos). Por se tratar de um comportamento estereotipado e muitas vezes identificado como uma resposta inata do animal, as vias neurais desde os fotorreceptores até os circuitos motores envolvidos na reação fototática são geralmente curtas e de alta velocidade de transmissão (Gong *et al.,* 2010; Hu e Stark, 1977; Insausti e Lazzari, 1996). Apesar disso, estes circuitos podem ser modulados por outras vias neurais superiores, sendo que a intensidade da resposta fototática pode variar conforme a fase do ciclo circadiano, o estado nutricional, os níveis individuais de certos neurotransmissores, dentre outros fatores (Erber *et al.,* 2006; Reisenman *et al.,* 1998; Sheiner, 2014; Song *et al.,* 2018).

Abelhas da espécie *Apis mellifera* apresentam uma forte resposta de fototaxia positiva, identificada como componente dos comportamentos de saída da colmeia, escape e navegação (Menzel, 1979). Embora esta resposta fototática positiva tenha sido analisada por diversos autores no nível comportamental, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos no acionamento e modulação da mesma. Estudos pioneiros demonstraram que tanto em abelhas (Bertholf, 1931), quanto em moscas da fruta (Bertholf, 1932), a faixa do espectro de luz que desencadeia reações fototáticas positivas se estende do ultravioleta (UV) ao verde. Apesar disso, Bertholf observou que a luz UV era mais eficaz em atrair estes insetos quando comparada a uma luz branca de intensidade luminosa semelhante. Devido a esta observação, este autor sugere que os fotorreceptores para comprimento de onda curtos (*S receptors*) provavelmente participam junto com os demais receptores (*M* e *L receptors*, para comprimentos de onda médios e longos, respectivamente) na resposta de fototaxia positiva da abelha *Apis mellifera*.

Os fotorreceptores tipo *S*, *M* e *L* (Figura 21) de abelhas apresentam picos de absorção de luz nas regiões do UV (~ 350 nm), azul (~ 440 nm) e verde (~ 535 nm), respectivamente (Peitsch *et al.,* 1992). Enquanto os receptores tipo *L* foram identificados como responsáveis pela grande

maioria do processamento visual acromático (e.g. contornos, contrastes, intensidade e movimento) (Chittka e Tautz, 2003; Kaiser, 1975; Spaethe *et al.,* 2001; Srinivasan e Braren, 1989; Srinivasan e Lehrer, 1988), a entrada sensorial proveniente dos três tipos de fotorreceptor é responsável pela visão de cores verdadeira (tricromática) em abelhas (Giurfa *et al.,* 1996; Giurfa e Menzel, 1997). Além disso, foi identificado um papel exclusivo dos receptores tipo *S* da região dorsal dos olhos compostos no processamento do E-vetor da luz polarizada no céu durante navegação (Menzel e Snyder, 1974, Rossel e Wehner, 1986). Nenhum estudo até o momento foi capaz de identificar com precisão quais são os tipos de fotorreceptor de abelhas envolvidos na resposta de fototaxia positiva, existindo contradições entre as hipóteses levantadas neste sentido por estudos comportamentais.

Assim como Bertholf (1931, 1932), diversos autores sugerem que todos os três tipos de fotorreceptor contribuem para a reação fototática de amplo espectro das abelhas, sendo que a maior atração à cor UV poderia indicar um papel majoritário dos receptores tipo *S* neste comportamento (Heintz, 1959; Kaiser *et al.,* 1977; Sander, 1933). Devido à observação de que as respostas fototáticas desencadeadas pela luz azul eram menos intensas que aquelas desencadeadas pelas luzes UV e verde, Labhart (1974) sugere que esta reação seja mediada por fotorreceptores *S* e *L*, mas não pelo receptor *M.* Menzel e Greggers (1985), por outro lado, sugerem que todos os três fotorreceptores estariam envolvidos na reação fototática de abelhas, porém os receptores *S* contribuiriam de uma forma menos efetiva que os receptores *M* e *L*, já que a atração à luz UV observada neste estudo foi menos intensa que para as luzes azul e verde.

A contradição presente nos resultados obtidos por todos estes estudos comportamentais poderia estar relacionada ao fato de que nem todos eles utilizaram estímulos visuais com intensidade de irradiância bem controlados e equilibrados para os diferentes comprimentos de onda (UV, azul e verde). Além disso, cabe ressaltar que na época em que estes estudos foram realizados ainda não se conhecia com precisão a curva de absorção espectral de cada tipo de fotorreceptor. Por exemplo, o fato de que fotorreceptores *L* absorvem luz não apenas na região do verde (pico de absorção), mas também em menor quantidade nas regiões do UV e azul (Peitsch *et al.,* 1992), não foi considerado nas hipóteses sobre o papel de fotorreceptores na reação fototática, inspiradas apenas nos níveis de fototaxia desencadeados por luzes de diferentes comprimentos de onda.

A descoberta de que a curva de absorção do receptor *L* abrange toda a região do espectro visível (Peitsch *et al.,* 1992), levou alguns autores a considerarem inclusive a possibilidade de que apenas este receptor estaria envolvido na fototaxia positiva (Erber *et al.,* 2006). Neste caso, espera-se que devido a uma maior absorção de luz na região do verde por este receptor, as respostas fototáticas sejam mais intensas para a luz verde do que para as luzes azul e UV, como observado por Menzel e Greggers (1985). Por outro lado, a maior resposta fototática observada para a luz UV em muitos estudos (Heintz, 1959; Kaiser *et al.,* 1977; Sander, 1933) apenas poderia ser explicada pelo envolvimento de receptores *S* neste comportamento. Vale ressaltar que diferentes metodologias foram utilizadas nestes estudos para medir a intensidade do comportamento de fototaxia positiva em abelhas, dificultando a comparação entre os resultados obtidos.

Um interessante dispositivo foi recentemente desenvolvido para medir a intensidade da resposta fototática em abelhas no laboratório (Erber *et al.,* 2006, Sheiner, 2014). Trata-se de uma arena circular fechada na qual as trajetórias de uma abelha que se desloca de uma fonte a outra de luz por fototaxia podem ser registradas numa sala escura. Parâmetros como a distância percorrida ou a velocidade da trajetória podem então ser utilizados como medida de intensidade da resposta fototática. Até o momento, apenas luzes de cor verde foram utilizadas deste dispositivo, demonstrando-se que quanto maior é a intensidade luminosa da luz verde, maior é a intensidade da resposta fototática (Erber *et al.,* 2006). Alem disso, demonstrou-se com o uso de ferramentas neurofarmacológicas que os neurotransmissores tiramina, octopamina e serotonina modulam de forma diferenciada a intensidade das respostas de fototaxia positiva à luz verde (Sheiner, 2014; Thamm *et al.,* 2010,). Entretanto, nenhum estudo foi realizado neste dispositivo para estudar aspectos comportamentais e/ou neurobiológicos envolvendo as respostas fototáticas de abelhas a luzes nas regiões do azul ou UV.

Outro aspecto ainda não esclarecido em relação à resposta de fototaxia positiva das abelhas é a contribuição dos três ocelos (olhos simples) e/ou dos dois olhos compostos na modulação deste comportamento. Em outros insetos, observa-se que ambos os ocelos e os olhos são responsáveis pela reação fototática (Lazzari *et al.,* 1998). Sugere-se que este seja também o caso em abelhas, mas nenhum estudo até o momento confirmou esta hipótese ou avaliou o papel destas estruturas visuais no comportamento de fototaxia positiva das abelhas. Estudos recentes demonstraram por hibridização *in situ* que os olhos compostos apresentam os três tipos de fotorreceptor, sendo o fotorreceptor *L* o mais abundante deles (Wakakuwa *et al.,* 2005). Por

outro lado, os ocelos apresentam quantidades similares de receptor tipo *S* e tipo *L*, não possuindo, entretanto, receptores tipo *M* (Velarde *et al.,* 2005; Wakakuwa *et al.,* 2005).

No presente trabalho, buscamos esclarecer a sensibilidade espectral da resposta de fototaxia positiva em abelhas forrageadoras utilizando luzes monocromáticas UV, azul e verde com curva espectral e irradiância (intensidade absoluta de fótons) controlados por espectroradiometria de precisão. Para avaliação da intensidade da resposta fototática, utilizamos o dispositivo desenvolvido por Erber *et al.,* (2006) para registro das trajetórias desencadeadas por luzes em diferentes níveis de irradiância. Além disso, avaliamos como os ocelos e os olhos compostos contribuem para a resposta fototática e a sensibilidade espectral da mesma, através de oclusão seletiva destas estruturas visuais. Os resultados deste estudo representam um importante passo na compreensão das bases biofísicas e neurofisiológicas da fototaxia positiva em abelhas.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Abelhas forrageadoras da espécie *Apis mellifera* foram coletadas no apiário mantido na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram coletados em pequenas caixas feitas de madeira e tela fina de metal (12 x 12 x 8 cm) e conduzidos ao laboratório sob o menor estresse possível. Após uma hora de descanso em uma câmara escura e úmida, os animais foram retirados um de cada vez da caixa através de um orifício e individualizadas em frascos de vidro. Em seguida, as abelhas foram anestesiadas até cessarem seus movimentos, colocando-se os frascos em gelo. Logo após este procedimento anestésico, as abelhas foram fixadas em tubos de plástico, com uma fita adesiva inserida entre o tórax e a cabeça. As asas foram protegidas por pedaços de papel de filtro e as antenas foram presas com fita adesiva na região dorsal da cabeça, a fim de auxiliar a pintura de estruturas visuais com tinta acrílica preta (Hobby Acrylic Paint, HCF-06 *Flat Black Basic*), conforme o grupo experimental (veja abaixo).

2.2 Grupos Experimentais

As respostas de fototaxia positiva para diferentes luzes monocromáticas foram analisadas em três grupos experimentais independentes (Figura 11):

a) *Grupo Controle:* animais submetidos apenas ao protocolo de anestesia em gelo e fixação no tubo de plástico, sem oclusão de nenhuma estrutura visual.
b) *Grupo Olhos Compostos*: animais anestesiados, fixados e submetidos à oclusão dos três ocelos dorsais.
c) *Grupo Ocelos:* animais anestesiados, fixados e submetidos à oclusão dos dois olhos compostos.

A oclusão de órgãos visuais nos grupos b) e c) foi realizada com auxílio de uma lupa, utilizando-se um pequeno palito de madeira coberto com a tinta acrílica preta fosca (não-tóxica) diluída em água na proporção 1:1 (Lazzari *et al.,* 1998). Após a secagem da tinta (cerca de 30s), os animais foram retirados cuidadosamente do tubo de plástico e liberados em um frasco de vidro. Uma vez livres dentro de frascos de vidro, animais dos três grupos experimentais foram mantidos por uma hora em uma câmara escura e úmida.

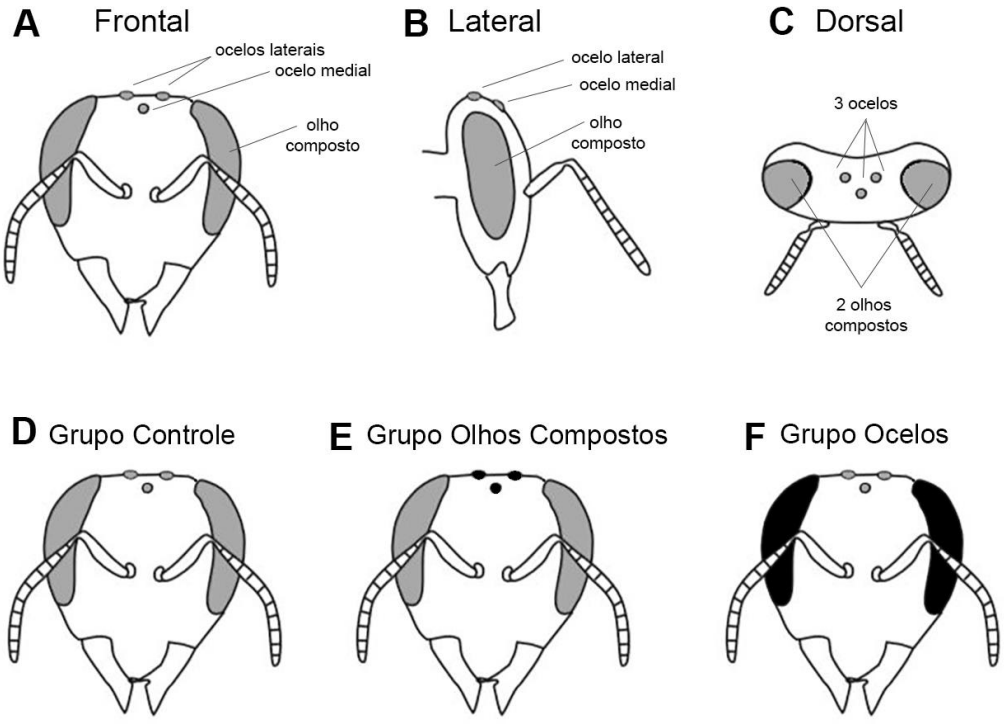

Figura 11. Órgãos visuais periféricos da abelha *Apis mellifera* e grupos experimentais utilizados para estudo da função dos mesmos na resposta de fototaxia positiva**. A)** Vista frontal da cabeça. **B)** Vista lateral da cabeça. **C)** Vista dorsal da cabeça. Os dois olhos compostos e os três ocelos (dois laterais e um medial) estão destacados em cinza. **D)** *Grupo controle:* animais intactos, sem oclusão de nenhuma estrutura visual. **E)** *Grupo olhos compostos:* animais submetidos à oclusão dos três ocelos, mantendo os olhos compostos intactos. **F)** *Grupo ocelos:* animais submetidos à oclusão dos dois olhos compostos, mantendo os ocelos intactos. A oclusão de estruturas visuais está indicada em preto.

2.3 Arena experimental

Para registro da resposta de fototaxia positiva, utilizamos uma arena experimental circular desenvolvida por Erber *et al.,* (2006). A arena circular de acrílico, com diâmetro interno de 35 cm e altura de1 cm, possuía fundo e laterais de cor preta fosca e cobertura de acrílico transparente, para permitir a filmagem do experimento com câmera de infravermelho (Figura 12). Nas paredes laterais da arena, 12 orifícios de 5 mm de diâmetro permitiam o encaixe dos LEDs monocromáticos, sendo que cada orifício estava posicionado a um ângulo de 30° em relação ao centro da arena. Além destes orifícios com LEDs, uma pequena porta de 2 cm de largura na lateral da arena permitia a liberação da abelha no interior da mesma. Todos os experimentos foram realizados dentro de uma sala escura, para evitar qualquer interferência visual aparte a estimulação com luzes monocromáticas apresentadas nas laterais da arena. Entre cada experimento, a arena de acrílico foi limpa com água para evitar o possível depósito de feromônios ou outras substâncias químicas no interior da mesma. O experimento foi filmado em uma sala escura, utilizando-se uma câmera (modelo SJCAM SJ4000-30 FPS, 1080 P) posicionada acima da arena com o auxílio de um suporte, a uma distância de 35cm. Para captura de imagem no escuro, removemos o filtro infravermelho de dentro da câmera e a arena foi iluminada com holofotes de LED infravermelho.

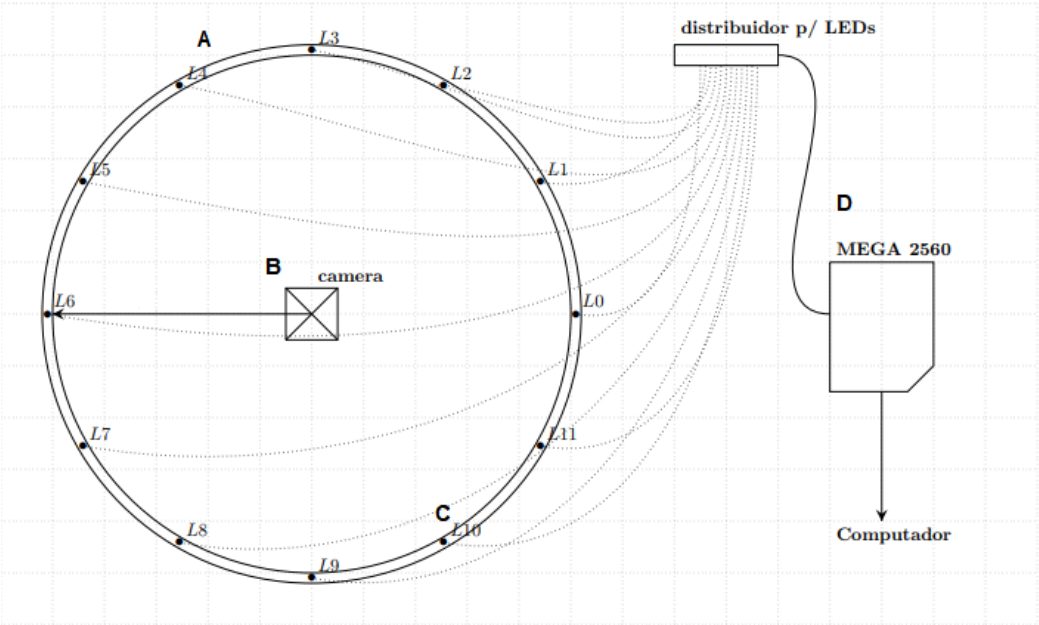

Figura 12: Imagem ilustrativa do setup desenvolvido para o experimento mostrando: (A)- arena com o posicionamento dos LEDs (C), a câmera filmadora (B) posicionada ao centro da arena e o Arduíno© (D)

2.4 Estímulos visuais

Foram utilizados LEDs monocromáticos com picos de emissão (Figura 13) em 355nm (Roithner Lasertechnik; XSL-355-5E-R6), 440nm (Roithner Lasertechnik, LED440-6-30) e 525nm (Roithner Lasertechnik; B5-433-B525), praticamente correspondendo aos picos de absorção dos fotorreceptores para luz UV, azul e verde de abelhas, respectivamente (Peitsch *et al.,* 1992). Cada LED foi conectado a uma porta de saída de sinal PWM (*Pulse WidthModulation*), permitindo controlar por Arduíno MEGA© o ciclo ativo do sinal e modular a intensidade da luz emitida. Um software foi desenvolvido pelo nosso grupo em ambiente *Phyton* para controlar a ordem, o tempo e a intensidade de apresentação dos LEDs na arena experimental.

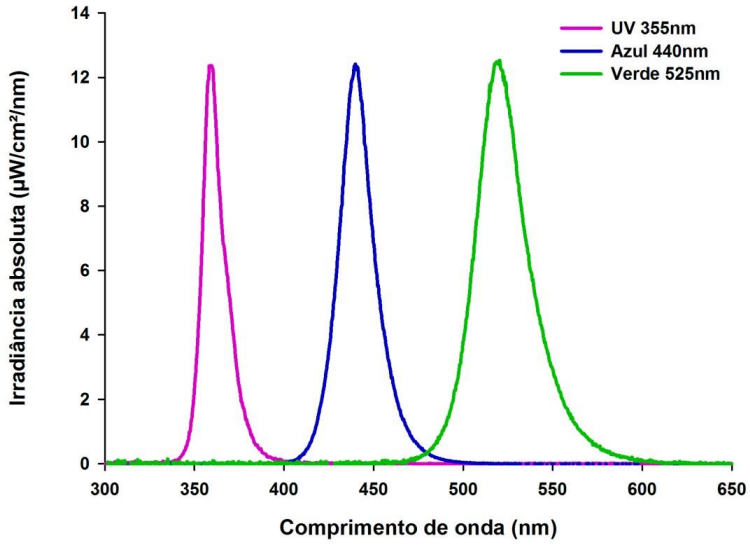

Fig. 13- Curvas de irradiância absoluta nos três LEDs utilizados para medidas de resposta fototática em arena circular no escuro. A figura mostra os picos de emissão dos LEDs UV (355 nm), azul (440 nm) e verde (525 nm) calibrados na irradiância máxima testada (100% de intensidade).

A fim de medir e calibrar a intensidade das luzes monocromáticas apresentadas na arena, utilizamos um espectrofotômetro (USB2000 + UV-VIS-ES, OceanOptics) calibrado radiometricamente com uma fonte de luz de deutério / tungstênio (DH-2000-BAL, 220- 1050 nm, OceanOptics). A irradiância absoluta foi medida usando-se uma fibra ótica (QP600-2-UV-VIS, OceanOptics) acoplada a um corretor de coseno com material de difusão espectral (CC-3-UV-S, OceanOptics) que foi fixado a 1 cm de distância do posicionamento do LED na arena. O software SpectraSuite (OceanOptics) foi utilizado para aquisição e análise das curvas espectrais.

Cada LED monocromático (UV, azul ou verde) foi calibrado inicialmente a uma irradiância máxima de 12,5 µW/cm²/nm (Figura 13). A partir deste valor de irradiância absoluta, cada LED podia ser apresentado na arena em seis diferentes intensidades na escala logarítmica: 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%,50%, 100% (correspondendo à0.4µW/cm²/nm,0.8 µW/cm²/nm, 1.5µW/cm²/nm,3 µW/cm²/nm, 6 µW/cm²/nm e 12.5 µW/cm²/nm, respectivamente).

2.5 Registro das respostas de fototaxia positiva

A fototaxia positiva de uma abelha individual (Labhart, 1974; Menzel e Greggers, 1985) foi analizada na arena a partir do registro de suas trajetórias em direção aos estímulos visuais apresentados, conforme descrito em por Erber *et al.,* (2006). Três grupos experimentais independentes foram estudados, tendo suas respostas de fototaxia registradas para as seis intensidades diferentes (3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50%, 100%) de umLED monocromático: Grupo Verde (LED 525nm), Grupo Azul (LED 440 nm) e Grupo UV (LED 355nm). Em cada ensaio, uma abelha foi liberada na arena experimental através da pequena porta lateral e mantida por 3 min em completa escuridão para ambientação. Ao início do teste, o primeiro LED era aceso, desencadeando uma resposta de fototaxia positiva que guiava a abelha em direção ao mesmo. Quando a abelha alcançava este LED, o mesmo era apagado e o LED localizado no lado oposto a 35 cm de distância era então aceso. Assim que o animal alcança o segundo LED aceso, o mesmo era apagado e o LED que anteriormente havia sido aceso era novamente aceso.

Este procedimento foi então repetido mais duas vezes para cada intensidade luminosa testada, totalizando três trajetórias da abelha (de um LED a outro) para cada intensidade. O trajeto inicial da abelha até o primeiro LED aceso de cada intensidade não foi considerado nas análises, visto que não corresponde à distância referência de 35 cm. Uma vez registradas as três trajetórias entre LEDs de uma intensidade, passava-se ao teste de outra intensidade, totalizando assim 18 trajetórias, sendo três para cada uma das seis intensidades testadas. A ordem de teste das diferentes intensidades foi pseudorandomizada em todos os experimentos. Animais que não completaram o percurso foram eliminados da análise.

2.6 Análise de imagem

Para registro das trajetórias dos animais na arena utilizamos um algoritmo denominado *mean-shift*. Este algorítmo registrou a posição da abelha em cada *frame* de vídeo, sendo assim responsável pela leitura dos trajetos de cada animal na arena experimental. Para sua

aplicabilidade em uma análise de vídeo, o *mean-shift* depende de um bom isolamento do objeto que está sendo rastreado, baseando-se para isso no centro de massa de um conjunto de pontos na imagem (região Q de abrangência). Para facilitação deste isolamento, utilizamos um filtro (*threshold*) que diferencia pontos luminosos em brancos (pixels) com intensidade máxima pré-determinada (representando o centro de massa, ou seja, a abelha) e pontos pretos que representam o fundo da arena escura.

Os dados obtidos a partir deste rastreamento são gerados em pixel, sendo 1080px correspondentes a 35 cm (diâmetro interno da arena), sendo possível calcular com exatidão quantos cm tem cada píxel. Um programa desenvolvido (Figura 14) em ambiente *Python* (por Lucas Resende – Graduando em Matemática Computacional) permitiu então o cálculo dos seguintes parâmetros nas trajetórias registradas: distância percorrida (obtido pela quantidade de pixels/cm do trajeto), tempo (tempo gasto pela abelha em segundos e milissegundos), velocidade (distância/tempo) e tortuosidade (comprimento da curva executada pela abelha/distância linear entre o ponto de origem e o ponto final - obtido através do cálculo do Teorema de Pitágoras).

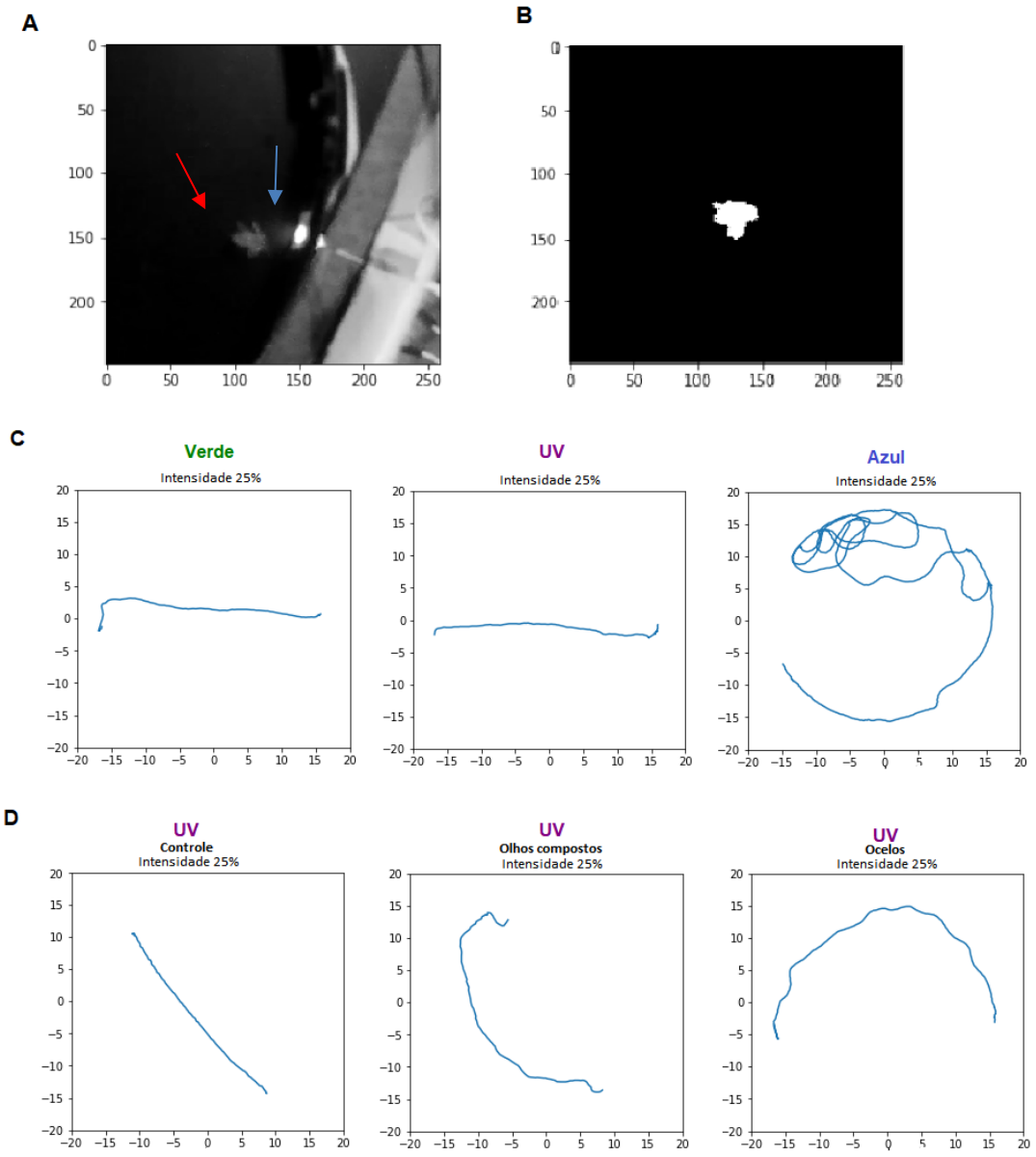

Figura 14: A- Foto da abelha (seta vermelha) chegando ao LED (seta azul) na arena escura utilizada no experimento. B- Imagem demonstrativa da detecção da abelha pelo software utilizado no experimento. C- Imagem do registro de trajetória pela análise de vídeo do software para grupo controle, comparando as três cores. D- Imagem do registro de trajetória pela análise de vídeo do software para os grupos controle, olhos compostos e ocelos na cor UV.

2.7 Análise estatística

Para analisar a correlação entre a intensidade de cada luz monocromática e os diferentes parâmetros medidos na resposta de fototaxia (distância percorrida, tortuosidade, tempo e velocidade) foi calculado o Coeficiente de Correlação de Postos de Spearman para cada parâmetro, conforme descrito em Erber *et al.,* (2006). A análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA) para medidas repetidas foi utilizada para comparar: a) as respostas de fototaxia

entre diferentes comprimentos de onda (grupo verde, grupo azul e grupo UV) nos grupos controle, olhos compostos ou ocelos; b) as respostas de fototaxia para um mesmo comprimento de onda (verde, azul ou UV) entre os grupos controle, olhos compostos e ocelos. Antes de realizar o teste de ANOVA, a normalidade dos dados foi analisada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Tukey foi utilizado como teste *post-hoc* para comparações múltiplas, permitindo avaliar o efeito do comprimento de onda (verde, azul e UV) e dos órgãos visuais (olhos e ocelos) na resposta de fototaxia. O nível alfa foi ajustado para 0.05 (nos dois sentidos) para todas as análises.

2.8 Normas Éticas

O presente trabalho atende a todas as normativas éticas brasileiras para estudos laboratoriais de comportamento e neurofisiologia em modelo animal inseto. Embora o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal do Brasil (CONCEA) não tenha regulamentado diretrizes obrigatórias para a experimentação com animais invertebrados, o presente estudo utiliza técnicas tradicionais de manuseio e anestesia de abelhas que minimizam o estresse e visam não causar possíveis dores nestes animais.

3 RESULTADOS

3.1 Comparação entre a resposta para diferentes cores em abelhas intactas

A primeira meta deste estudo foi testar se existem diferenças entre as respostas fototáticas de abelhas intactas (controle) para diferentes comprimentos de onda (cores), apresentados em diferentes intensidades. Inicialmente, o efeito da intensidade sobre distintos parâmetros medidos na resposta de fototaxia foi avaliado para cada cor testada (Fig.15). Foi observada uma correlação significativa entre a intensidade da luz verde e as distâncias percorridas (cm) por abelhas testadas com luz monocromática verde (Fig. 15.A; correlação de Spearman; *cor verde*: $r = -0.94$, $p < 0.05$). Quanto maior a intensidade de luz verde, menores foram as distâncias percorridas pelas abelhas na arena experimental para atingir a fonte de luz (Fig.15.A). Por outro lado, não foi observada correlação entre intensidade e distância percorrida para abelhas testadas com as luzes azul e UV (Fig. 15.A; correlação de Spearman; *cor azul*: $r = -0.49$, NS; *cor UV*: $r = 0.03$, NS). Não foi observada para nenhuma das cores testadas correlação significativa entre a intensidade da luz e os demais parâmetros medidos nas trajetórias das abelhas: tempo

(Fig.15B; correlação de Spearman; *cor verde*: r = −0.49; NS; *cor azul*: r = −0.20, NS; *cor UV*: r = −0.09, NS); tortuosidade (Fig.15.C; correlação de Spearman; *cor verde*: r = −0.83, NS; *cor azul*: r = −0.77, NS; *cor UV*: r = 0.09, NS); velocidade (Fig.15.D; correlação de Spearman; *cor verde*: r = 0.31, NS; *cor azul*: r = −0.29, NS; *cor UV*: r = 0.09, NS).

A comparação entre as distâncias percorridas para diferentes intensidades de luzes monocromáticas testadas (variável independente) no grupo controle revelou diferença significativa para o efeito cor (Fig. 15.A; *distância x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15} = 4.35$, $p<0.05$), mas não para o efeito interação (Fig. 15.A; *efeito interação:* $F_{10,75} = 1.56$, NS). As comparações *post hoc* entre diferentes cores revelaram que as distâncias médias percorridas para a cor azul foram significativamente maiores do que para a cor UV (Fig. 15.A; Teste de Tukey; verde vs. azul: NS; verde vs. UV: NS; azul vs. UV: $p<0.05$).

Também ocorreu diferença significativa para o efeito cor no parâmetro tortuosidade (Fig. 15.C; *tortuosidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15} = 4.33$, $p<0.05$), porém o efeito interação não foi significativo (Fig. 15.C; *efeito interação:* $F_{10,75} = 1.41$, NS). Observamos que a tortuosidade média das trajetórias foi significativamente maior para a cor azul do que para a cor UV, não variando nas demais comparações entre cores (Fig. 15.C; Teste de Tukey; verde vs. azul: NS; verde vs. UV: NS; azul vs. UV: $p<0.05$).

Não encontramos nenhuma diferença significativa entre o tempo (Fig. 15.B; *tempo x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15} = 0.33$, NS; *efeito interação*: $F_{10,75} = 0.78$, NS) ou a velocidade dos trajetos (Fig. 15.D; *velocidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15} = 2.31$, NS; *efeito interação:* $F_{10,75} = 0.16$, NS) para diferentes cores no grupo controle.

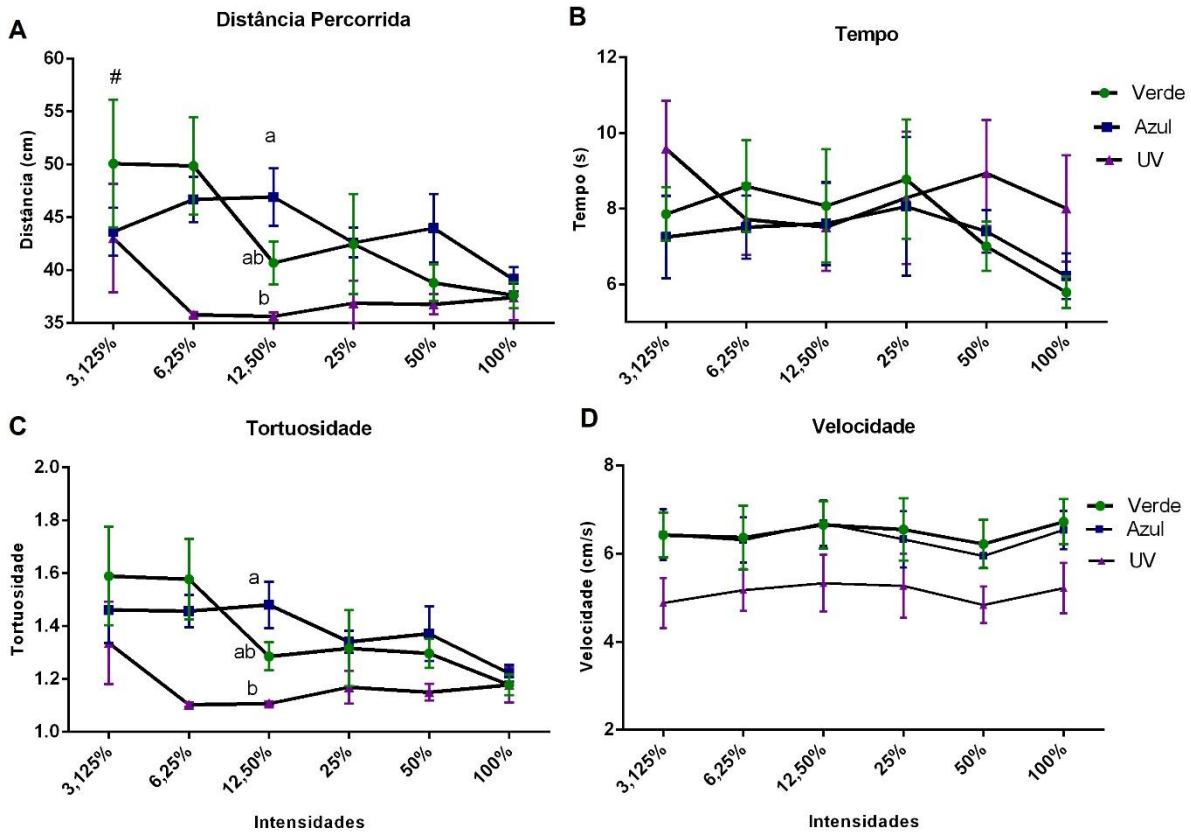

Fig 15. Parâmetros avaliados na resposta de fototaxia positiva de abelhas intactas (grupo controle) para diferentes intensidades de cada luz monocromática testada (verde, azul e UV). (A) Distância média percorrida (cm), sendo 35 cm a distância mínima percorrida entre um led e outro; **(B)** tempo médio gasto para atingir o outro led(s), **(C)** tortuosidade média do trajeto (dp/dl); **(D)** velocidade média (cm/s). N= 6 abelhas por luz monocromática. **#** representa correlação significativa para determinada cor. Letras representam diferença significativa para o efeito cor. Barras representam o erro padrão da média (SEM).

3.2 Comparação entre a resposta para diferentes cores em abelhas apenas com olhos compostos (ocelos cobertos)

Para avaliar a contribuição dos olhos compostos nas respostas fototáticas para diferentes comprimentos de onda (cores) apresentados em diferentes intensidades, foi avaliado o comportamento de fototaxia positiva em abelhas com oclusão dos ocelos (Fig. 11, grupo olhos compostos). Inicialmente, o efeito da intensidade sobre distintos parâmetros medidos na resposta de fototaxia foi avaliado para cada cor testada (Fig.16 A-D) por análise de correlação. Não houve correlação significativa para nenhuma das cores testadas entre a intensidade da luz e os parâmetros distância percorrida (Fig.16.A; correlação de Spearman; *cor verde*: r = −0.83, NS; *cor azul*: r = −0.83, NS; *cor UV*: r = −0.60, NS) ou velocidade do trajeto (Fig.16.D; correlação de Spearman; *cor verde*: r = −0.26, NS; *cor azul*: r = −0.66, NS; *cor UV*: r = 0.31, NS).

Foi observada uma correlação significativa entre a intensidade da luz verde e o tempo do trajeto em abelhas testadas com luz monocromática verde (Fig. 16.B; correlação de Spearman; *cor verde*: r = −0,94; p <0,05). Quanto maior a intensidade de luz verde, menor foi o tempo gasto nos trajetos das abelhas na arena experimental para atingir a fonte de luz (Fig. 16.B). Por outro lado, não foi observada correlação entre a intensidade da luz e o tempo gasto pelas abelhas testadas com as luzes azul e UV (Fig. 16.B; correlação de Spearman; *cor azul:* r = −0,60, NS; *cor UV*: r = 0.36, NS). Também foi constatada correlação significativa entre a intensidade da luz azul e a tortuosidade (dp/dl) das abelhas testadas para luz monocromática azul. (*cor azul*: correlação de postos de Spearman, r = −0,8857; p<0,05). Quanto maior a intensidade de luz azul, menor a tortuosidade dos trajetos desencadeados por fototaxia positiva (Fig.16.C). Entretanto, não foi observada correlação entre intensidade da luz e a tortuosidade do trajeto em abelhas testadas com as luzes verde e UV (Fig. 16.C; correlação de Spearman; *cor verde*: r = −0.83, NS; *cor UV*: r = −0.60, NS).

Não encontramos diferença significativa para os efeitos cor ou interação (*cor vs. intensidade*) nas comparações entre as distâncias percorridas (Fig. 16.A; *distância x cor x intensidade*) ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15}$ =0.37, NS; *efeito interação:* $F_{10,75}$ = 0.72, NS), o tempo (Fig. 16.B; *tempo x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15}$ = 2.33, NS; *efeito interação:* $F_{10,75}$ = 0.46, NS) e a tortuosidade dos trajetos (Fig. 16.C; *tortuosidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15}$ = 0.29, NS; *efeito interação:* $F_{10,75}$ = 0.87, NS) para diferentes intensidades de luzes monocromáticas testadas no grupo olhos compostos.

Houve diferença significativa no efeito cor para o parâmetro velocidade de trajeto medido no grupo olhos compostos (Fig. 16.D; *velocidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15}$ = 3.79, p<0.05), sendo a velocidade média significativamente menor para a cor azul do que para a cor verde (Fig 16.D; Teste de Tukey; verde vs. azul: p<0.05; verde vs. UV: NS; azul vs. UV: NS). O efeito interação não foi significativo para o parâmetro velocidade *(*Fig 16.D; *velocidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação:* $F_{10,75}$ = 0.42, NS).

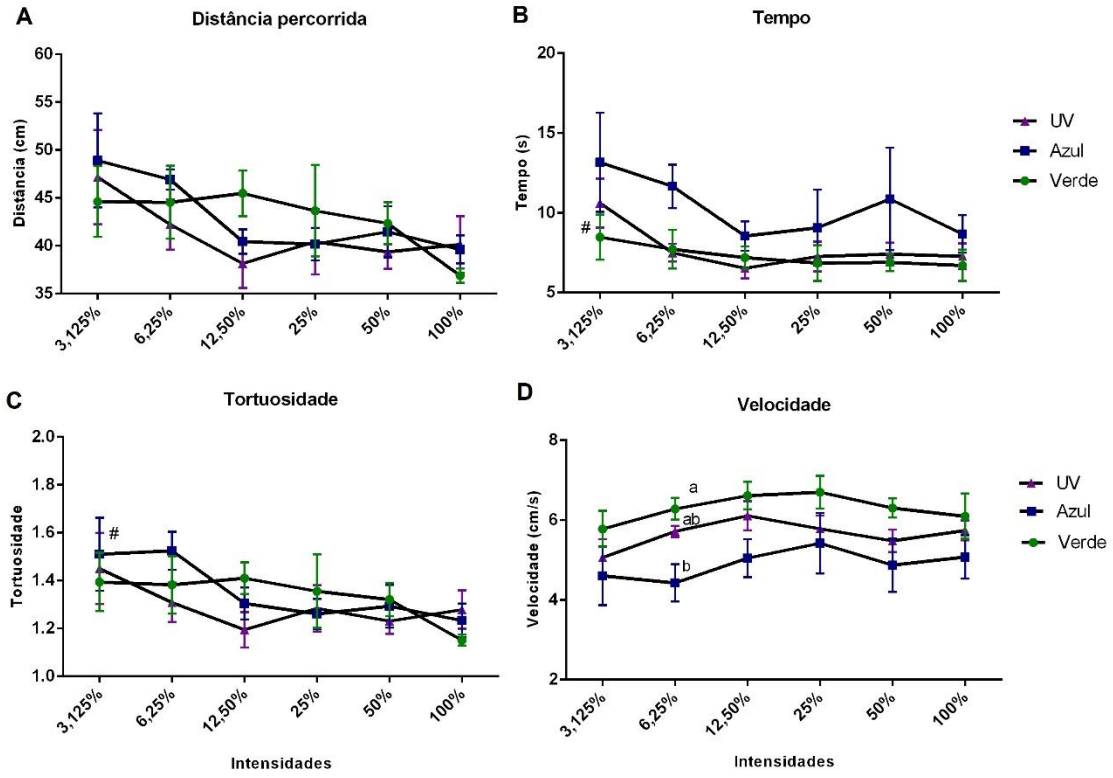

Fig 16. Parâmetros avaliados na resposta de fototaxia positiva de abelhas com ocelos cobertos (grupo olhos compostos) para diferentes intensidades de cada luz monocromática testada (verde, azul e UV**). (A)** Distância média percorrida (cm), sendo 35 cm a distância mínima percorrida entre um led e outro; **(B)** tempo médio gasto para atingir o outro led(s), **(C)** tortuosidade média do trajeto (dp/dl); **(D)** velocidade média (cm/s). N= 6 abelhas por luz monocromática. # representa correlação significativa para determinada cor. Letras representam diferença significativa para o efeito cor. Barras representam o erro padrão da média (SEM).

3.3 Comparação entre a resposta para diferentes cores em abelhas apenas com ocelos (olhos compostos cobertos)

Para avaliar a contribuição dos ocelos na fototaxia positiva testamos se existem diferenças entre as respostas fototáticas de abelhas com os olhos compostos ocluídos (Fig. 11 grupo ocelos) para diferentes comprimentos de onda (cores), apresentados em diferentes intensidades. Inicialmente, testamos a correlação entre a intensidade luminosa e os distintos parâmetros medidos na resposta de fototaxia para cada cor testada (Figura 17). Não foram observadas correlações significativas entre a intensidade luminosa e nenhum dos parâmetros medidos nas trajetórias das abelhas (distância percorrida, tempo, tortuosidade e velocidade) para nenhuma das três cores relacionadas ao experimento (Correlação de Spearman; Fig. 17.A: distância percorrida; *cor verde*: $r = -0.83$, NS; *cor azul*: $r = -0.26$, NS; *cor UV*: $r = -0.71$, NS; Fig. 17.B: tempo; *cor verde*: $r = -0.60$, NS; *cor azul*: $r = -0.37$, NS; *cor UV*: $r = -0.71$, NS; Fig. 17.C:

tortuosidade; *cor verde*: r = −0.83, NS; *cor azul*: r = −0.26, NS; *cor UV*: r = −0.77, NS; Fig. 17.D: velocidade; *cor verde*: r = −0.60, NS; *cor azul*: r = −0.37, NS; *cor UV*: r = −0.14, NS).

Identificamos diferenças significativas entre as distâncias percorridas para as diferentes luzes monocromáticas testadas no grupo ocelo (Fig. 17.A; *distância x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15} = 6.97$, $p<0.01$) sendo a distância percorrida significativamente maior para a luz azul do que para as luzes verde e UV (Fig. 17.A; Teste de Tukey: verde vs. azul: $p <0.01$; verde vs. UV: NS; azul vs. UV: $p <0.05$). No efeito interação para o parâmetro distância percorrida, encontramos diferença significativa na intensidade 50%, no qual a luz azul é estatisticamente diferente das demais cores testadas no experimento: Fig. 17.A; *distância x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação:* $F_{10,75} = 2.11$, $p <0.05$; Teste de Tukey (Fig.17.A: ver vs. UV: NS, verde vs. azul: $p <0.01$, UV vs. azul: $p <0.01$).

Para o parâmetro tortuosidade, também foram significativos os efeitos cor e interação no grupo ocelo (Fig. 17.C; *tortuosidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito cor:* $F_{2,15} = 6.70$, $p<0.01$); sendo a tortuosidade significativamente maior para a luz azul do que para as luzes verde e UV (Fig. 17.C; Teste de Tukey: verde vs. azul: $p <0.01$; verde vs. UV: NS; azul vs. UV: $p <0.05$). No efeito interação, encontrada diferença estatística para a intensidade de 50% onde a luz azul é estatisticamente diferente das luzes verde e UV (Fig. 17.C; *tortuosidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação:* $F_{10,75} = 2.18$, $p <0.05$; Teste de Tukey: verde vs. UV : NS, verde vs. azul: $p <0.01$, UV v.s azul: $p <0.05$).

Não foram identificadas diferenças significativas nos parâmetros tempo e velocidade medidos para as distintas luzes monocromáticas testadas no grupo ocelo (Fig. 17.B; *tempo x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas tempo; *efeito cor:* $F_{2,15} =1.67$, NS; *efeito interação:* $F_{10,75} = 1.89$, NS; Fig. 17D: *velocidade x cor x intensidade* ANOVA para medidas repetidas tempo; *efeito cor:* $F_{2,15} = 1.32$, NS; *efeito interação:* $F_{10,75} = 1.49$, NS).

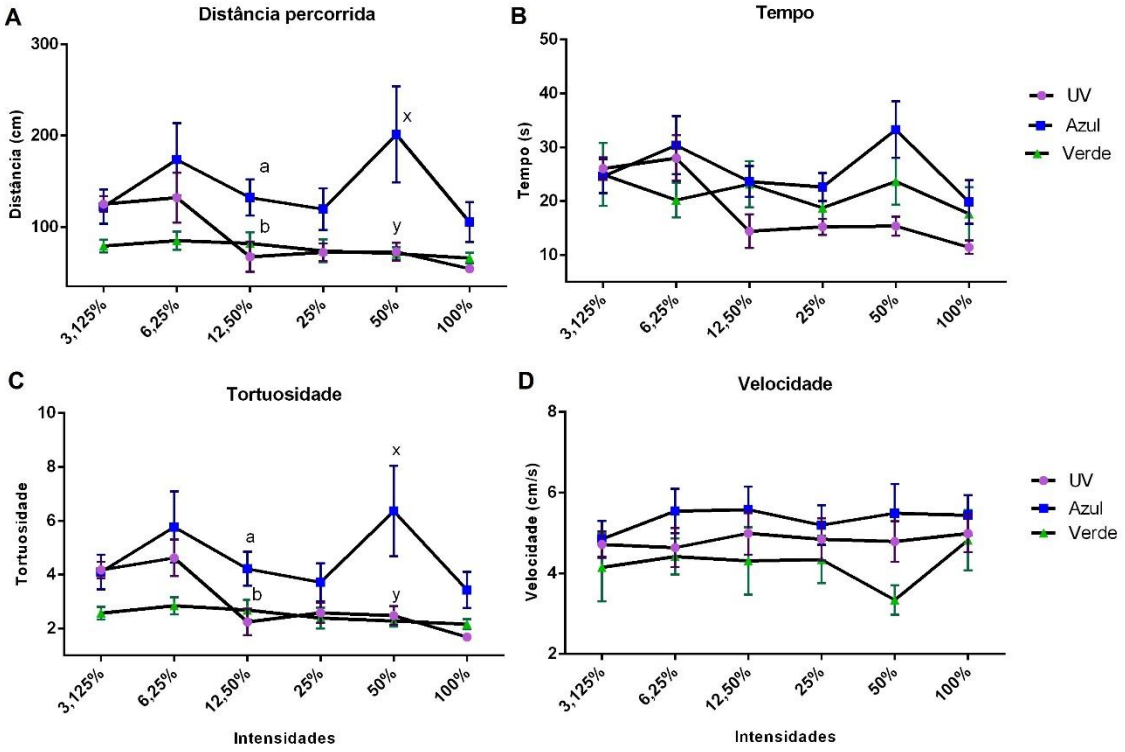

Fig 17. Parâmetros avaliados na resposta de fototaxia positiva de abelhas com olhos compostos cobertos (grupo ocelos) para diferentes intensidades de cada luz monocromática testada (verde, azul e UV). **(A)** distância percorrida (cm) pelo animal, sendo a distância mínima entre um led e outro de 35 cm; **(B)** tempo gasto (s), **(C)** nível de tortuosidade (dp/dl) e **(D)** velocidade (cm/s). N= 6 abelhas por luz monocromática. Letras representam diferença significativa para o efeito cor (a, b) ou interação (x, y). Barras representam o erro padrão da média (SEM).

3.4 Papel de diferentes estruturas visuais nas respostas fototáticas medidas para a luz verde

A Figura 18 compara os valores de distância, tempo, tortuosidade e velocidade dos trajetos percorridos por abelhas do grupo controle (intactas), grupo olhos compostos ou grupo ocelos testadas com a luz verde. Para todos os parâmetros medidos nas trajetórias de fototaxia das abelhas foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Fig. 18.A: *distância x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 36.22$, $p<0.0001$; Fig. 18.B; *tempo x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 15.28$, $p<0.001$; Fig, 18.C; *tortuosidade x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 50.315$, $p < 0,0001$; Fig. 18.D; *velocidade x grupo x intensidade* ANOVA $F_{2,15} = 6.3417$, $p<0.05$). Por outro lado, não houve diferença estatística no efeito interação grupo vs. intensidade para nenhum dos quatro parâmetros analisados (Fig. 18.A-D; *parâmetro x grupo x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação:* $F_{10,75} < 4.13$, NS para distância, tempo, tortuosidade e velocidade).

O *grupo ocelos* foi aquele que diferiu significativamente dos demais grupos experimentais (*controle* ou *olhos compostos*) para todos os parâmetros analisados (Teste de Tukey; Fig. 18.A: distância, Fig. 18.B: tempo, Fig. 18.C: tortuosidade; Para estes três parâmetros - *controle vs. olhos compostos*: NS; *controle vs. ocelos*: p <0.001; *olhos compostos vs. ocelos*: p <0.001; Fig. 18.D: velocidade - *controle vs. olhos compostos*: NS; *controle vs. ocelos*: p <0.05; *olhos compostos vs. ocelos*: p <0.05). Em resumo, as trajetórias de fototaxia do *grupo ocelos* para a luz monocromática verde apresentaram maiores valores de distância, tempo e tortuosidade (Fig 18.A-C), além de uma menor velocidade de execução (Fig. 18.D), em relação aos demais grupos experimentais.

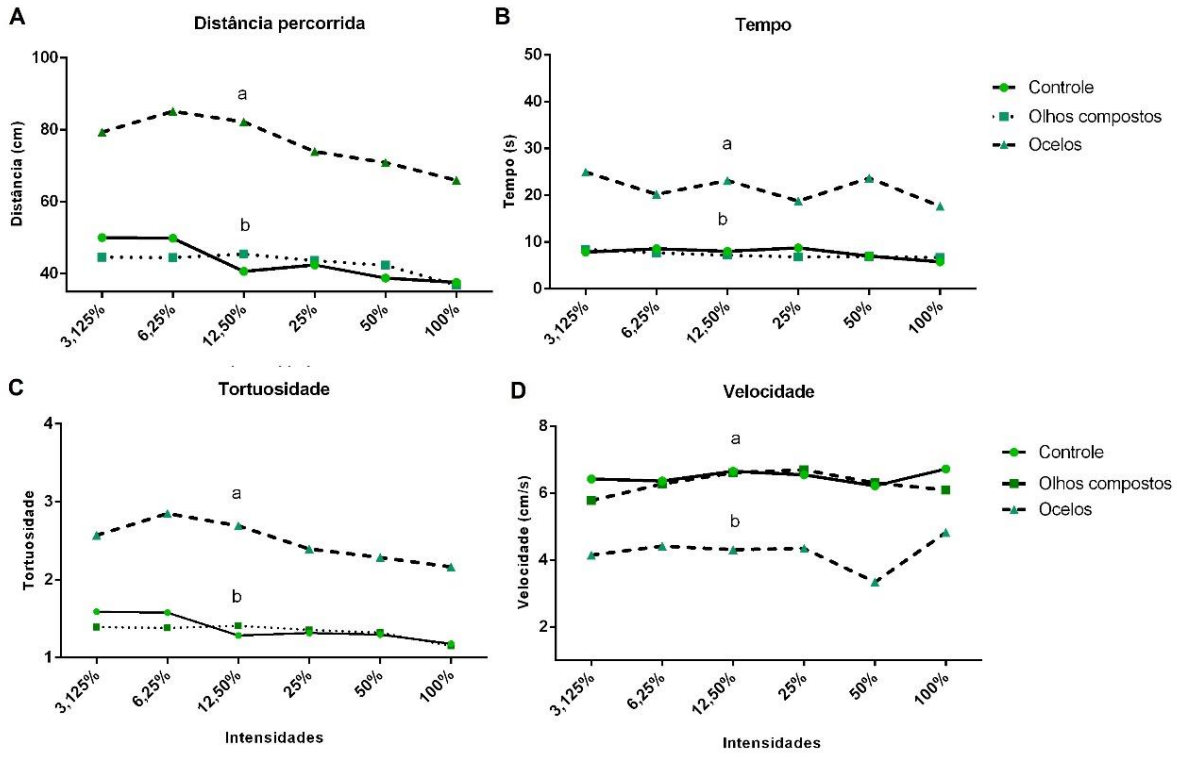

Fig 18. Comparação dos parâmetros medidos na resposta de fototaxia positiva de abelhas intactas (controle), apenas com olhos compostos ou apenas com ocelos testadas em diferentes intensidades da luz verde. **(A)** Distância média percorrida (cm), sendo 35 cm a distância mínima percorrida entre um led e outro; **(B)** tempo médio gasto para atingir o outro led(s), **(C)** tortuosidade média do trajeto (dp/dl) ; **(D)** velocidade média (cm/s). N= 6 abelhas por grupo. Letras representam diferença estatística para o efeito grupo. Barras representam o erro padrão da média (SEM).

3.5 Papel de diferentes estruturas visuais nas respostas fototáticas medidas para a luz azul

A Figura 19 mostra a comparação para os valores de distância, tempo, tortuosidade e velocidade dos trajetos percorridos por abelhas do grupo controle (intactas), grupo olhos compostos ou grupo ocelos testadas com a luz azul. Os parâmetros distância percorrida, tempo e

tortuosidade foram estatisticamente diferentes para o efeito grupo (Fig. 19.A: *distância x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15}$ = 21.172, p<0.0001; Fig. 19.B; *tempo x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15}$ = 30.672, p<0.00001; Fig, 19.C; *tortuosidade x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15}$ = 21.492, p<0.0001). Para o parâmetro velocidade não foi encontrada diferença estatística para o efeito grupo; Fig, 19.D; *velocidade x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15}$ = 2.289, NS. Quando avaliada o efeito interação, não houve diferença estatística no efeito interação grupo vs. intensidade para nenhum dos quatro parâmetros analisados (Fig. 19.A-D; *parâmetro x grupo x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação:* $F_{10,75}$ < 1.94, NS para distância, tempo, tortuosidade e velocidade).

O *grupo ocelos* foi aquele que diferiu significativamente dos demais grupos experimentais (*controle* ou *olhos compostos*) para os parâmetros estatisticamente significativos (Teste de Tukey; Fig. 19.A: distância, Fig. 19.B: tempo, Fig. 19.C: tortuosidade; Para estes três parâmetros - *controle vs. olhos compostos*: NS; *controle vs. ocelos*: p <0.001; *olhos compostos vs. ocelos*: p <0.001. Os resultados para a luz azul indicam que os animais com olhos compostos oclusos realizaram o percurso com maior distância percorrida, tempo e tortuosidade comparado aos demais grupos.

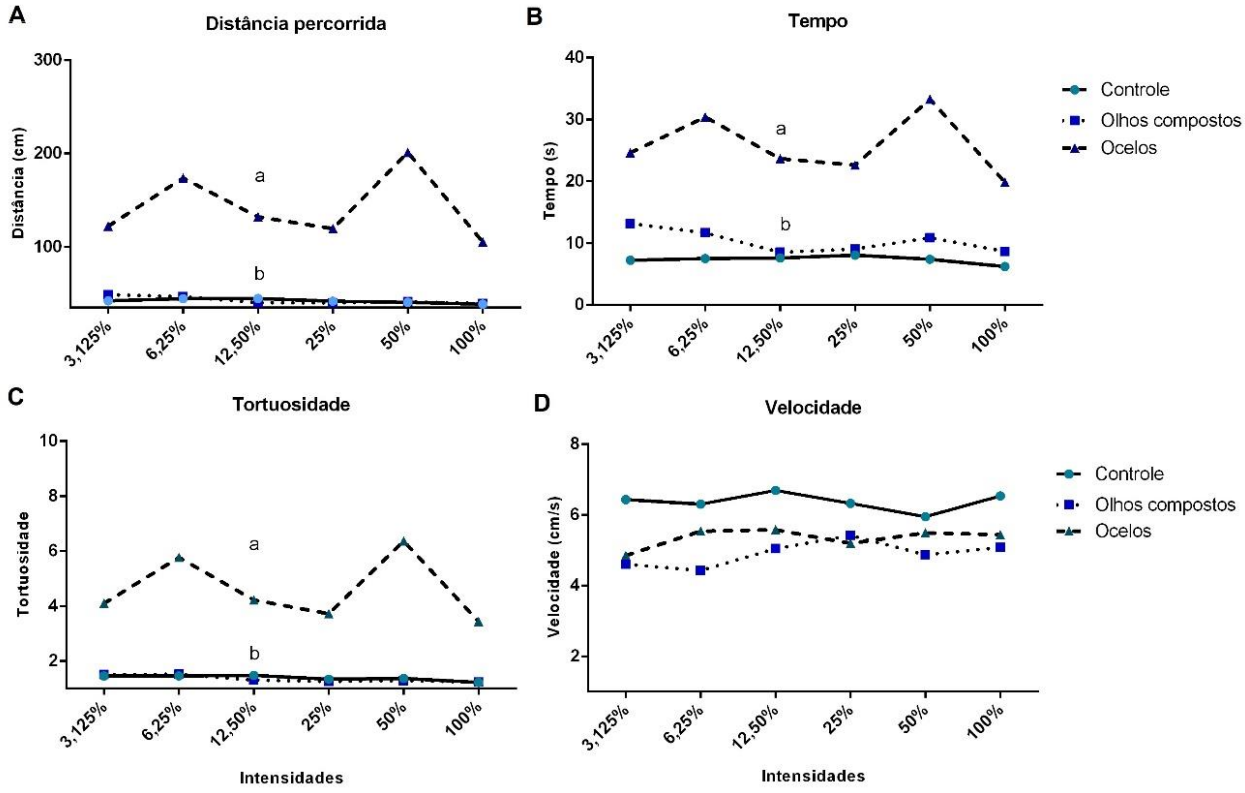

Fig 19. Comparação dos parâmetros medidos na resposta de fototaxia positiva de abelhas intactas (controle), apenas com olhos compostos ou apenas com ocelos testadas em diferentes intensidades da luz azul. **(A)** distância percorrida (cm) pelo animal, sendo a distância mínima entre um led e outro de 35 cm; **(B)** tempo gasto (s), **(C)** nível de tortuosidade (dp/dl) e **(D)** velocidade (cm/s). N= 6 abelhas por grupo. Letras representam diferença significativa para o efeito grupo. Barras representam o erro padrão da média (SEM).

3.6 Papel de diferentes estruturas visuais nas respostas fototáticas medidas para a luz UV

A Figura 20 compara os valores de distância, tempo, tortuosidade e velocidade dos trajetos percorridos por abelhas do grupo controle (intactas), grupo olhos compostos ou grupo ocelos testadas com a luz UV. Os parâmetros distância percorrida, tempo e tortuosidade foram estatisticamente diferentes para o efeito grupo (Fig. 20.A: *distância x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 37.107$, $p<0.00001$; Fig. 20.B; *tempo x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 48.008$, $p=0$; Fig, 20.C; *tortuosidade x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 52.106$, $p=0$). Para o parâmetro velocidade não foi encontrada diferença estatística para o efeito grupo; Fig, 20.D; *velocidade x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito grupo:* $F_{2,15} = 0.769$, NS. Quando avaliada o efeito interação, foram encontradas diferenças estatísticas para os parâmetros distância percorrida, tempo e velocidade (Fig. 20.A: *distância x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito interação:* $F_{10,75} = 4.772$, $p<0.0001$); Fig. 20.B; *tempo x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito interação:* $F_{10,75} = 6.161$, $p <0.00001$; Fig, 20.C; *tortuosidade x grupo x intensidade* ANOVA; *efeito interação:* $F_{10,75} = 8.0780$ $p=0$. Para o parâmetro velocidade, não houve diferença estatística (Fig. 20.D; *grupo x distância x intensidade* ANOVA para medidas repetidas; *efeito interação:* $F_{10,75} = 0.2650$, NS).

O teste *post hoc* de Tukey para o efeito grupo mostrou que o *grupo ocelos* foi aquele que diferiu significativamente dos demais grupos experimentais (*controle* ou *olhos compostos*) para os parâmetros distância percorrida, tempo e tortuosidade (Teste de Tukey; Fig. 20.A: distância, Fig. 20.B: tempo, Fig. 20.C: tortuosidade; para estes três parâmetros - *controle vs. olhos compostos*: NS; *controle vs. ocelos*: $p <0.001$; *olhos compostos vs. ocelos*: $p <0.001$). O *post hoc* de Tukey para o efeito interação mostrou diferença estatística na intensidade de 3,125% para o parâmetro distância percorrida (Fig. 20.A) entre o grupo ocelos e os demais grupos (teste de Tukey: *controle vs. olhos compostos*: NS, *grupo controle* vs. *ocelos*: $p<0.01$, *grupo olhos compostos* vs. *ocelos*: $p<0.01$), na intensidade 6,25% apenas entre os grupos olhos compostos e ocelos (teste de Tukey: *controle vs. olhos compostos*: NS, *grupo controle* vs. *ocelos*: NS, *olhos compostos* vs. *ocelos*: $p<0.01$). Para o parâmetro tempo (Fig. 20.B) o teste *post hoc* de Tukey mostrou diferenças estatística nas intensidade 3,125% e 6,25% no qual, em ambos, o grupo ocelos é estatisticamente diferente dos demais grupos (teste de Tukey: *controle vs. olhos*

compostos: NS, *controle* vs. *ocelos*: p<0.01, *olhos compostos* vs. *ocelos*: p<0.01); na intensidade 50% apenas entre os grupos olhos compostos e ocelos (teste de Tukey: *controle vs. olhos compostos*: NS, *controle* vs. *ocelos*: NS, *olhos compostos* vs. *ocelos*: p<0.05). O parâmetro tortuosidade (Fig.20.C) mostrou diferença estatística em quatro intensidades diferentes (3,125%, 6,25%, 25% e 50%) no *post hoc* para o efeito interação, dessa forma, de maneira interessante, sendo o parâmetro mais significativo para o efeito interação dentre os demais parâmetros analisados.

Para as intensidade 3,125%, 6,25% e 25% o grupo ocelos é estatisticamente diferente dos demais grupos: intensidades 3,125% e 6,25%- teste de Tukey: *controle vs. olhos compostos*: NS, *controle* vs. *ocelos*: p<0.01, *olhos compostos* vs. *ocelos*: p<0.01; intensidade 25%- *controle vs. olhos compostos*: NS, *controle* vs. *ocelos*: p<0.05, *olhos compostos* vs. *ocelos*: p<0.05. Na intensidade 50% houve diferença estatística apenas entre os grupos olhos compostos e ocelos (teste de Tukey: *controle vs. olhos compostos*: NS, *controle* vs. *ocelos*: NS, *olhos compostos* vs. *ocelos*: p<0.05.

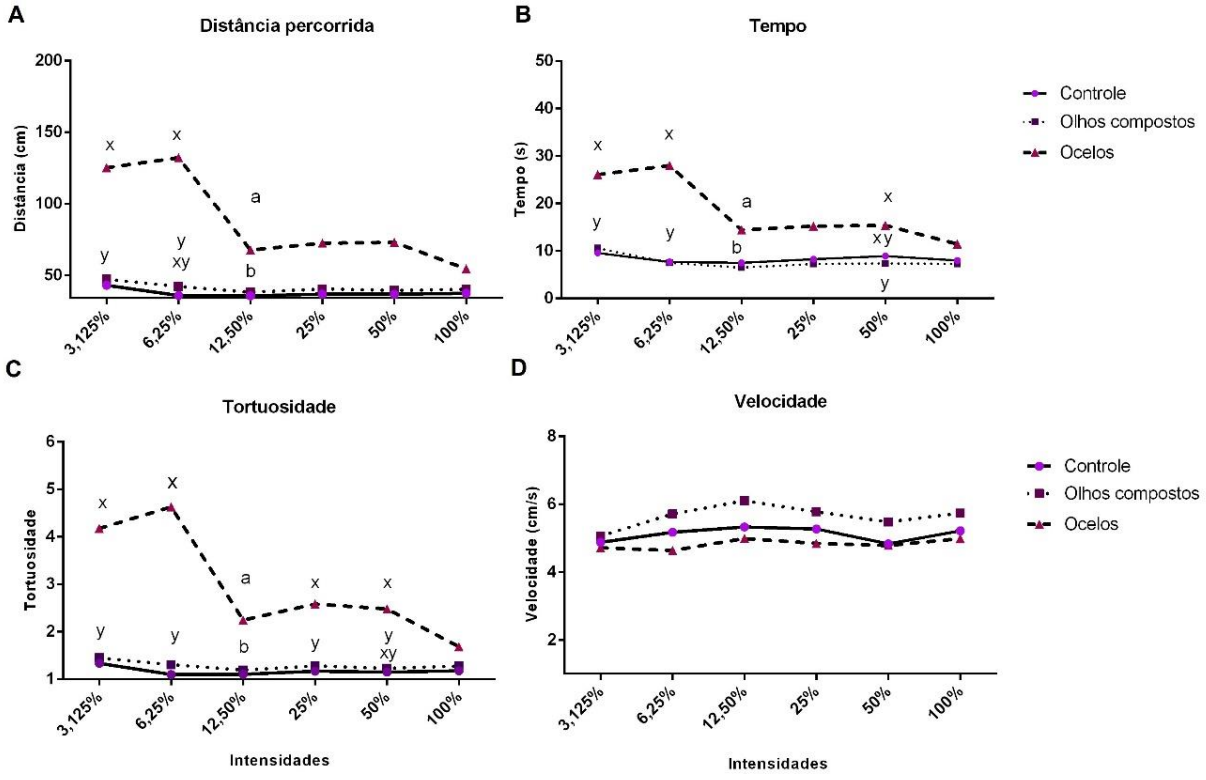

Fig 20. Comparação dos parâmetros medidos na resposta de fototaxia positiva de abelhas intactas (controle), apenas com olhos compostos ou apenas com ocelos testadas em diferentes intensidades da luz UV. **(A)** distância

percorrida (cm) pelo animal, sendo a distância mínima entre um led e outro de 35 cm; **(B)** tempo gasto (s), **(C)** nível de tortuosidade (dp/dl) e **(D)** velocidade (cm/s). N= 6 abelhas por grupo. Letras representam diferença significativa para o efeito grupo(a,b) ou efeito interação (x,y). Barras representam o erro padrão da média (SEM).

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos os padrões de resposta fototática de abelhas que se orientavam no escuro em direção a luzes monocromáticas UV, azul e verde, as quais estimulavam de forma máxima os fotorreceptores *S*, *M* e *L*, (Figura 21) respectivamente (Peitsch *et al.,* 1992). Assim como previamente descrito por Erber *et al.,* (2006), identificamos uma correlação inversa entre intensidade da luz verde a distância média das trajetórias de fototaxia percorridas pelas abelhas na arena. Por outro lado, não identificamos correlação entre as diferentes intensidades testadas da luz azul ou UV e a acuidade da resposta de fotototaxia.

Diversos estudos demonstram que o receptor *L* de abelhas, cujo pico de absorção coincide com a luz verde usada em nosso experimento, é o principal responsável pelo processamento visual acromático, o qual inclui a percepção de intensidade luminosa e de contrastes (Chittka e Tautz, 2003; Giurfa e Menzel, 1997; Kaiser, 1975; Spaethe *et al.,* 2001; Srinivasan e Braren, 1989; Srinivasan e Lehrer, 1988). Sugere-se inclusive que a percepção de intensidade da luz nas faixas do azul e UV, seja fruto da estimulação basal do receptor *L* nestas regiões do espectro (Giurfa *et al.,* 1996; Peitsch *et al.,* 1992; Spaethe *et al.,* 2001). Dessa forma, acreditamos que o efeito da irradiância nas respostas fototáticas desencadeadas pela luz verde sejam fruto de um maior envolvimento dos circuitos neurais conectados aos receptores *L* no processamento de intensidade luminosa. Por outro lado, as luzes monocromáticas azul e UV poderiam estar gerando níveis similares de ativação destes mesmos circuitos nas diferentes irradiâncias testadas, não sendo assim possível identificar para estas luzes um padrão de respostas significativamente dependente da intensidade luminosa.

Ao compararmos as respostas das abelhas às três luzes monocromáticas, observamos que as respostas fototáticas para as cores verde e UV não apresentam diferenças estatísticas para nenhum dos parâmetros avaliados (distância percorrida, tempo, tortuosidade, velocidade). Por outro lado, foi identificada diferença entre as respostas para as cores azul e UV, sendo a distância percorrida e a tortuosidade média dos trajetos maiores para a luz azul do que para a luz UV. Estes resultados sugerem que as luzes nas faixas do verde e do UV contribuem de uma maneira semelhante para a resposta fototática das abelhas, enquanto a luz na faixa do azul apresenta menor contribuição. Estudos anteriores obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que as luzes na faixa do verde e do UV se mostraram mais atrativas para as abelhas em testes de

fototoxia positiva do que luzes na faixa do azul (Heintz, 1959; Kaiser *et al.,* 1977; Sander, 1933). Estes autores sugerem que todos os três fotorreceptores participariam da resposta de fototaxia, porém existindo uma contribuição maior dos fotorreceptores *S* e *L* do que do receptor *M*.

Contrariamente a esta hipótese, Labhart (1974), ao encontrar resultados comportamentais similares, sugeriu que apenas os receptores *L* e *S* participariam da resposta de fototaxia das abelhas, não havendo contribuição do fotorreceptor *M*. Esta hipótese é plausível, se consideramos que o receptor *L*, e mesmo o *S* até certo ponto, podem ser estimulados por luzes na faixa do azul, dependendo do comprimento de onda e largura de banda do azul. No nosso experimento, a luz de LED monocromático azul praticamente não estimula o receptor *S*, porém estimula de forma basal o receptor tipo *L* (Figura 21). Caso as respostas para a luz monocromática azul no nosso experimento fossem fruto apenas da estimulação de receptores *L* as mesmas deveriam apresentar maior diferença em relação às respostas desencadeadas pela luz monocromática verde, a qual estimula de forma máxima estes receptores. Entretanto, não identificamos diferenças entre as respostas para a luz azul e a luz verde, o que nos leva a acreditar que todos os três tipos de fotorreceptor (*S*, *M* e *L*) estão envolvidos nestas respostas.

Os níveis equivalentes das respostas fototáticas para luzes UV e verde também invalidam a hipótese levantada sobre um possível envolvimento exclusivo do receptor *L* na fototaxia positiva das abelhas (Erber *et al.,* 2006).

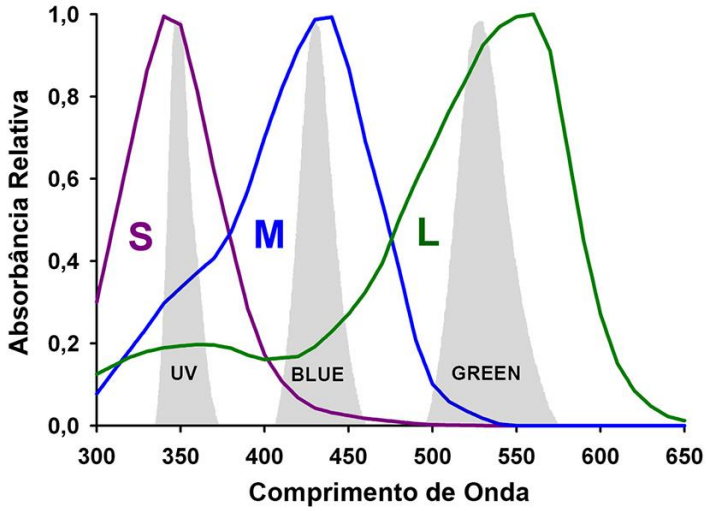

Figura 21: Curvas da sensibilidade espectral dos fotorreceptores da abelha (S, M e L) sobrespostas às curvas de calibração da irradiância absoluta dos LEDs utilizados no experimento (em cinza).

Ao contrário dos estudos que identificaram respostas de fototaxia mais pronunciadas para

o UV e o verde (Heintz, 1959; Kaiser *et al.,* 1977; Labhart, 1974; Sander, 1933; presente estudo), Menzel e Greggers (1985) observaram uma menor intensidade das respostas fototáticas de escape de uma caixa escura para a luz UV do que para as luzes azul e verde. Devido a isso, estes autores sugerem que, embora existissem evidências nos seus resultados para uma participação dos três tipos de receptor nas respostas fototáticas, o receptor *S* parecia contribuir de uma maneira menor para esta resposta fototática. Vale ressaltar, entretanto, que nestes experimentos as abelhas eram alimentadas na caixa escura antes de fazer a escolha de uma luz monocromática indicando a saída da caixa. Neste contexto, a abelha, que visitava esta caixa escura repetidas vezes, provavelmente aprendia a associar a luz à recompensa açucarada oferecida.

Dessa forma, o comportamento em direção à luz poderia ser desencadeado não apenas por fototaxia, mas também por aprendizagem associativa apetitiva. Curiosamente, estudos sobre aprendizagem apetitiva de luzes monocromáticas por abelhas em sala escura observaram maiores níveis de aprendizagem para luzes azul e verde, do que para a luz UV (Hori *et al.,* 2006; Mota *et al.,* 2011), fato que talvez explique os resultados contraditórios no estudo de Menzel e Greggers (1985).

Sabe-se que em abelhas as entradas sensoriais combinadas dos receptores *S*, *M* e *L* são responsáveis pelo processamento da informação cromática (Backhaus, 1991; Giurfa *et al.,* 1996; Giurfa e Menzel, 1997; Spaethe *et al.,* 2001). Embora diversos estudos corroborem com a participação destes três tipos de fotorreceptor para resposta fototática de abelhas (Heintz, 1959; Kaiser *et al.,* 1977; Labhart, 1974; Menzel e Greggers, 1985; Sander, 1933; presente estudo), ainda não está claro se ocorre envolvimento da visão de cores no comportamento fototático destes animais. Menzel e Greggers (1985) buscaram testar essa possibilidade usando não apenas luzes monocromáticas, mas também misturas cromáticas nos testes de fototaxia, uma metodologia que visa identificar fenômenos de oposição cromática característicos da visão de cores (Backhaus, 1991). Embora os resultados deste estudo não sejam conclusivos, indicam que muito provavelmente não exista envolvimento de visão cromática na fototaxia positiva de abelhas, pois não foram encontradas evidências de oposição cromática. Sugeriu-se que a intensidade deste comportamento para uma determinada luz seja mediada pelo somatório total dos fótons absorvidos por cada tipo de receptor estimulado (Menzel e Greggers, 1985).

Em relação à resposta de fototaxia menos pronunciada para a luz azul observada em diversos estudos (Heintz, 1959; Kaiser *et al.,* 1977; Labhart, 1974; Sander, 1933; presente estudo), cabe ressaltar que os omatídeos dos olhos compostos das abelhas apresentam proporções diferenciadas dos três tipos de célula fotorreceptora: 44% apresenta uma proporção de 6:1:1 (*L, S* e *M*), 46% apresenta proporção de 6:2 (*L* e *S*) e apenas 10% apresenta proporção de 6:2 (*L* e *M*)

(Wakakuwa *et al.,* 2005). Além disso, os três ocelos da abelha apresentam apenas receptores *S* e *L*, mas não possuem receptores *M* (Velarde *et al.,* 2005). Dessa forma, a quantidade total de receptores para luzes na faixa do azul (*M*) é consideravelmente menor nos órgãos visuais das abelhas, fato este que poderia explicar as diferenças significativas nas respostas obtidas em testes de fototaxia com a luz azul. É interessante notar, entretanto, que mesmo os receptores *S* estando em menor quantidade que os receptores *L* nos órgãos visuais, as respostas de fototaxia para a luz UV (estimulando maximamente o receptor *S*) não foram menos pronunciadas que aquelas para a luz verde (estimulando maximamente o receptor *L*). Talvez o fato de que a luz UV estimule não apenas o receptor *S*, mas também o receptor *L* em nível basal (Peitsch *et al.,* 1992), compense a diferença na proporção dos fotorreceptores, igualando a intensidade da resposta comportamental para luzes UV e verde.

Estudos sobre a sensibilidade espectral da fototaxia positiva em moscas da fruta (*Drosophila*) identificaram uma maior atração ao UV do que ao azul e ao verde (Yamaguchi e Heisenberg, 2011). Outros estudos que compararam luz UV monocromática e luz UV misturada com luz verde em mesma intensidade, também demonstraram maior atração pela luz UV monocromática em *Drosophila* (Fischbach, 1979; Heinsenberg e Buchner, 1977). Desta forma, sugere-se que nestes insetos a luz UV e os receptores específicos para a mesma sejam os principais componentes da resposta de fototaxia positiva. Em abelhas, além da contribuição dos receptores para a luz UV (tipo *S*) na resposta fototática, nossos dados sugerem também um papel importante dos receptores para a luz verde (tipo *L*).

No presente trabalho, também estudamos a contribuição diferenciada dos três ocelos (olhos simples) e dos olhos compostos para a sensibilidade espectral e intensidade da resposta fototática de abelhas. Para isso, os dados obtidos em animais intactos (*grupo controle*), foram comparados àqueles obtidos em animais com ocelos oclusos (*grupo olhos compostos*) e animais com olhos compostos oclusos (*grupo ocelos*). Quando avaliamos as respostas nestes três grupos experimentais para a luz monocromática verde, observamos no *grupo olhos compostos*, mas não no *grupo ocelos*, um efeito da intensidade luminosa similar àquele observado no *grupo controle*, ou seja, quanto maior a intensidade desta luz, mais precisas foram as respostas fototáticas. No caso do grupo *olhos compostos*, este efeito foi encontrado para o parâmetro tempo, enquanto no *grupo controle* para o parâmetro distância percorrida. Estes resultados sugerem que o efeito da intensidade sobre as respostas ao verde observadas no *grupo controle* tenham maior contribuição dos receptores *L* presentes nos olhos composto do que daqueles presentes nos ocelos das abelhas.

Neste sentido, é interessante notar que, embora os receptores *L* presentes nos olhos

compostos e ocelos tenham sensibilidade espectral similar, os mesmos são codificados por genes distintos (*AmLop1* e *AmLop2*), possuindo provavelmente propriedades distintas de resposta (Velarde *et al.,* 2005; Wakakua *et al.,* 2005). No grupo *olhos compostos*, observamos uma velocidade significativamente maior nas respostas de fototaxia para a luz verde, efeito este não identificado nos demais grupos experimentais (*controle* e *ocelos*). Este resultado também poderia estar relacionado a diferenças nas propriedades fisiológicas dos receptores *L* presentes nos olhos compostos e nos ocelos de abelhas.

Ao compararmos as respostas fototáticas para as cores UV, azul e verde em cada grupo experimental, observamos valores significativamente mais altos de distância percorrida, e tortuosidade nas respostas para a luz azul em abelhas do *grupo ocelos*. Este efeito, similar ao observado no *grupo controle*, não ocorreu no *grupo olhos compostos*. Dessa forma, concluímos que as respostas menos pronunciadas à luz azul observadas no *grupo controle* são desencadeadas pela contribuição dos ocelos na fototaxia positiva, e provavelmente estão relacionadas à ausência de receptores tipo *M* nestes órgãos visuais (Ogawa *et al.,* 2017; Velarde *et al.,* 2005). Assim como no *grupo controle*, as respostas fototáticas dos grupos *olhos compostos* e *ocelo* para as luzes verde e UV não apresentaram diferença estatística para nenhum dos parâmetros avaliados, reforçando a hipótese de que receptores *S* e *L* de ambas as estruturas participam na modulação deste comportamento.

Para todas as três luzes monocromáticas testadas, abelhas do *grupo ocelo* apresentaram respostas de fototaxia significativamente menos precisas do que aquelas do *grupo olhos compostos* ou do *grupo controle*, caracterizadas por maior distância percorrida, tortuosidade e tempo de trajeto. Além disso, a velocidade da trajetória de fototaxia para o verde (mas não para as demais cores) foi significativamente menor no *grupo ocelo* em relação aos outros grupos. Estes resultados demonstram claramente que a contribuição dos olhos compostos é bem maior do que aquela dos ocelos na precisão das respostas de fototaxia positiva. Apesar disso, nossos resultados demonstram que ambas estas estruturas são capazes de guiar de forma independente a abelha até uma fonte de luz por fototaxia positiva, sendo que uma participação combinada das mesmas parece modular este comportamento estereotipado. Resultado similar foi anteriormente demonstrado na resposta de fototaxia negativa do barbeiro *Triatoma infestans*, mediada pela ação combinada dos ocelos e dos olhos, ainda que cada estrutura seja capaz de desencadear este comportamento de forma independente (Lazzari *et al.,* 1998).

Embora o papel individual do ocelo na fototaxia nunca tenha sido anteriormente estudado de forma controlada em abelhas, Kastberger (1990) testou o efeito dos ocelos em abelhas treinadas a voar em direção a um alimentador enquanto eram expostas a flashes laterais de luz.

Abelhas intactas reagiam rapidamente, mudando seu curso de voo em direção à luz. Já abelhas com os ocelos oclusos apresentaram um padrão de voo perturbado e uma resposta bastante mais lenta de fototaxia positiva às luzes laterais. Este autor sugere que os ocelos teriam um papel no controle fino do voo e na modulação da resposta fototática positiva, conforme demonstrado em nosso estudo.

Neste estudo desenvolvemos metodologias eficazes para estudar no laboratório o comportamento de fototaxia positiva das abelhas a diferentes luzes monocromáticas, bem como o papel de distintas estruturas visuais periféricas neste comportamento. Estas metodologias poderão servir como ponto de partida para estudar também o papel de distintos fotorreceptores, neurotransmissores ou circuitos neurais na modulação da fototaxia positiva em abelhas, através do uso de técnicas de biologia molecular, farmacologia ou neurofisiologia. Estudos recentes demonstraram, por exemplo, um papel importante das aminas biogênicas tiramina, octopamina e serotonina na modulação das respostas de fototaxia positiva à luz verde (Sheiner, 2014; Thamm *et al.,* 2010). Estudos futuros deverão avaliar o papel destes e de outros neurotransmissores nas respostas de fototaxia positiva às luzes UV e azul, assim como os possíveis substratos neurais subjacentes.

5 CONCLUSÕES FINAIS

. Abelhas são capazes de transferir a informação visual aprendida em condicionamento clássico do reflexo de extensão da prosbócide para um novo contexto operante no labirinto Y.

. Para evitar que a fototaxia inata de abelhas gere maior atração a um estímulo luminoso verde em relação a um estímulo luminoso azul no labirinto Y, pode-se calibrar a irradiância destas luzes a um ponto de isoluminância perceptual. Esta metodologia pode ser de grande valia em estudos de aprendizagem cromática que visem isolar o efeito da intensidade luminosa.

. Tanto a dopamina quanto a octopamina modulam a aprendizagem visual apetitiva em abelhas, sendo o efeito inibitório de antagonistas octopaminérgicos sobre esta aprendizagem mais proeminente em relação àquele causado por antagonistas dopaminérgicos.

. Em relação à sensibilidade espectral da resposta de fototaxia positiva em abelhas, nossos resultados confirmam que luzes nas faixas do UV, azul e verde são capazes de desencadear este comportamento. Apesar disso, as luzes UV e verde desencadeiam respostas mais proeminentes do que aquelas observadas para a luz azul.

. Tanto os olhos compostos, quanto os ocelos estão envolvidos na resposta fototática das abelhas, sendo capazes de promover de forma independente a orientação da abelha a uma fonte de luz

(UV, azul ou verde). Apesar disso, as respostas fototáticas mediadas apenas pelos ocelos são consideravelmente menos precisas do que aquelas envolvendo apenas os olhos compostos.
. A menor atração à luz azul em relação às luzes verde e UV parece estar relacionada ao processo de transdução visual no ocelo, o qual não envolve receptores específicos para a luz na faixa do azul.

6 REFERÊNCIAS

Agarwal, M., Guzmán, M. G., Morales-Matos, C., Díaz, R. A. D. V., Abramson, C. I., & Giray, T. (2011). Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay. *PloS one*, *6*(9), e25371.

Avarguès-Weber, A., & Giurfa, M. (2013). Conceptual learning by miniature brains. *Proc. R. Soc. B*, *280*(1772), 20131907.

Avarguès-Weber, A., & Mota, T. (2016). Advances and limitations of visual conditioning protocols in harnessed bees. Journal of Physiology-Paris, 110, 107–118

Avarguès-Weber, A., Mota, T., & Giurfa, M. (2012). New vistas on honey bee vision. *Apidologie*, *43*(3), 244-268.

Avarguès-Weber, A., Portelli, G., Benard, J., Dyer, A., & Giurfa, M. (2010). Configural processing enables discrimination and categorization of face-like stimuli in honeybees. Journal of Experimental Biology, 213(4), 593-601.g

Backhaus, W. (1991). Color opponent coding in the visual system of the honeybee. *Vision research*, *31*(7-8), 1381-1397.

Backhaus, W. (1993). Color vision and color choice behavior of the honey bee. *Apidologie*, *24*(3), 309-331.

Bakchine-Huber, E., Marion-Poll, F., Pham-Delegue, M. H., Masson, C., & Soussaline, F. (1992). Real-time detection and analysis of the exploratory behavior of small animals. *Naturwissenschaften*, *79*(1), 39-42.

Balamurali, G. S., Somanathan, H., & De Ibarra, N. H. (2015). Motion cues improve the performance of harnessed bees in a colour learning task. *Journal of Comparative Physiology A*, *201*(5), 505-511.

Balsam P.D., Tomie A. (Eds.). (1985). The function of context in learning and performances. Context and Learning. Hillsdale, L. Erlbaum, New Jersey, pp. 1–22

Barron, A. B., Søvik, E., & Cornish, J. L. (2010). The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *4*, 163.

Barron, A., Schulz, D., & Robinson, G. (2002). Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (Apis mellifera). *Journal of Comparative Physiology A*, *188*(8), 603-610.

Beggs, J. R., Brockerhoff, E. G., Corley, J. C., Kenis, M., Masciocchi, M., Muller, F., ... & Villemant, C. (2011). Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *BioControl*, *56*(4), 505-526.

Bertholf, L. M. (1931). *Reactions of the honeybee to light...* John Hopkins University.

Bertholf, L. M. (1932). The extent of the spectrum for Drosophila and the distribution of stimulative efficiency in it. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, *18*(1), 32-64.

Bickers, N. E., Cox, D. L., & Wilkins, J. W. (1987). Self-consistent large-N expansion for normal-state properties of dilute magnetic alloys. *Physical Review B*, *36*(4), 2036.

Blenau, W., Erber, J., & Baumann, A. (1998). Characterization of a dopamine D1 receptor from Apis mellifera: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *Journal of neurochemistry*, *70*(1), 15-23.

Booth, L. H., Fisher, P., Heppelthwaite, V., & Eason, C. T. (2004). Risk of Feracol baits to non-target invertebrates, native skinks, and weta. *Science for Conservation*, *239*, 18.

Bouton, M. E. (2004). Context and behavioral processes in extinction. Learning & memory, 11(5), 485-494.

Brandt, R., & Vorobyev, M. (1997). Metric analysis of threshold spectral sensitivity in the honeybee. *Vision research*, *37*(4), 425-439.

Burke, C. J., Huetteroth, W., Owald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., ... & Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in Drosophila. *Nature*, *492*(7429), 433.

Carcaud, J., Roussel, E., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2009). Odour aversion after olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, *212*(5), 620-626.

Chaffiol, A., Laloi, D., & Pham-Delègue, M. H. (2005). Prior classical olfactory conditioning improves odour-cued flight orientation of honey bees in a wind tunnel. *Journal of experimental biology*, *208*(19), 3731-3737.

Chittka, L. (1992). The colour hexagon: a chromaticity diagram based on photoreceptor excitations as a generalized representation of colour opponency. *Journal of Comparative Physiology A*, *170*(5), 533-543.

Chittka, L., & Tautz, J. (2003). The spectral input to honeybee visual odometry. *Journal of Experimental Biology*, *206*(14), 2393-2397.

Chittka, L., Thomson, J. D., & Waser, N. M. (1999). Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften*, *86*(8), 361-377.

Collett, T. S. (1996). Insect navigation en route to the goal: multiple strategies for the use of landmarks. *Journal of Experimental Biology*, *199*(1), 227-235.

Collett, T. S. (2003). Invertebrate perception: Measuring depth intervals through path integration and vision. *Current biology*, *13*(7), R276-R278.

Collett, T. S., & Baron, J. (1994). Biological compasses and the coordinate frame of landmark memories in honeybees. *Nature*, *368*(6467), 137.

Collett, T. S., & Collett, M. (2002). Memory use in insect visual navigation. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(7), 542.

Collett, T. S., Fauria, K., Dale, K., & Baron, J. (1997). Places and patterns—a study of context learning in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, *181*(4), 343-353.

Daumer, K. (1956). Reizmetrische untersuchung des Farbensehens der Bienen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, *38*(5), 413-478.

Degen, J., Gewecke, M., & Roeder, T. (2000). Octopamine receptors in the honey bee and locust nervous system: pharmacological similarities between homologous receptors of distantly related species. *British journal of pharmacology*, *130*(3), 587-594.

Dobrin, S. E., & Fahrbach, S. E. (2012). Visual associative learning in restrained honey bees with intact antennae. *Plos One*, *7*(6), e37666.

Dyer, A. G., Paulk, A. C., & Reser, D. H. (2011). Colour processing in complex environments: insights

from the visual system of bees. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *278*(1707), 952-959.

Ehmer, B., & Gronenberg, W. (2002). Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honeybee (Apis mellifera). *Journal of Comparative Neurology*, *451*(4), 362-373.

Erber, J., Hoormann, J., & Scheiner, R. (2006). Phototactic behaviour correlates with gustatory responsiveness in honey bees (Apis mellifera L.). *Behavioural brain research*, *174*(1), 174-180.

Erber, J., Kloppenburg, P., & Scheidler, A. (1993). Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia*, *49*(12), 1073-1083.

Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H., & Smith, B. H. (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *Journal of Neuroscience*, *23*(12), 5370-5380.

Fischbach, K. F. (1979). Simultaneous and successive colour contrast expressed in “slow” phototactic behaviour of walkingDrosophila melanogaster. *Journal of comparative physiology*, *130*(2), 161-171.

Geiser, F. X., & Labhart, T. (1982). Electrophysiological investigations on the ocellar retina of the honeybee (Apis mellifera). *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, *75*, 307.

Gerber, B., & Smith, B. H. (1998). Visual modulation of olfactory learning in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, *201*(14), 2213-2217.

Gerber, B., Geberzahn, N., Hellstern, F., Klein, J., Kowalksy, O., Wüstenberg, D., & Menzel, R. (1996). Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Animal Behaviour*, *52*(6), 1079-1085.

Giurfa, M. (2003). Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Current opinion in neurobiology*, *13*(6), 726-735.

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

Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A*, *193*(8), 801-824.

Giurfa, M., & Menzel, R. (1997). Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems. *Current opinion in neurobiology*, *7*(4), 505-513.

Giurfa, M., & Menzel, R. (1997). Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems. *Current opinion in neurobiology*, *7*(4), 505-513.

Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2012). Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & memory*, *19*(2), 54-66.

Giurfa, M., Vorobyev, M., Kevan, P., & Menzel, R. (1996). Detection of coloured stimuli by honeybees: minimum visual angles and receptor specific contrasts. *Journal of Comparative Physiology A*, *178*(5), 699-709.

Goldsmith, T. H., & Ruck, P. R. (1958). The spectral sensitivities of the dorsal ocelli of cockroaches and honeybees: an electrophysiological study. *The Journal of general physiology*, *41*(6), 1171-1185.

Gong, Z., Liu, J., Guo, C., Zhou, Y., Teng, Y., & Liu, L. (2010). Two pairs of neurons in the central

brain control Drosophila innate light preference. *Science*, *330*(6003), 499-502.

Grant, V. (1950). The flower constancy of bees. *The Botanical Review*, *16*(7), 379-398.

Gribakin, F. G. (1975). Functional morphology of the compound eye of the bee. *The compound eye and vision of insects*, *154*, 176.

Gribakin, F. G., & Govardovskii, V. I. (1975). The role of the photoreceptor membrane in photoreceptor optics. In *Photoreceptor optics* (pp. 215-236). Springer, Berlin, Heidelberg.

Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, P. R., Strünker, T., & Baumann, A. (2003). Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (Apis mellifera) brain. *Journal of neurochemistry*, *86*(3), 725-735.

Gronenberg, W. (1986). Physiological and anatomical properties of optical input-fibres to the mushroom body in the bee brain. *Journal of insect physiology*, *32*(8), 695-704.

Gross, A. O. (1913). The reactions of arthropods to monochromatic lights of equal intensities. *Journal of Experimental Zoology*, *14*(4), 467-514.

Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, *366*(6450), 59.

Hammer, M. (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends in neurosciences*, *20*(6), 245-252.

Hammer, M., & Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning & memory*, *5*(1), 146-156.

Heintz, E. (1959). La question de la sensibilité des abeilles à l'ultra-violet. *Insectes sociaux*, *6*(3), 223-229.

Heisenberg, M., & Buchner, E. (1977). The role of retinula cell types in visual behavior ofDrosophila melanogaster. *Journal of comparative physiology*, *117*(2), 127-162.

Hertel, H., & Maronde, U. (1987). The physiology and morphology of centrally projecting visual interneurones in the honeybee brain. *Journal of Experimental Biology*, *133*(1), 301-315.

Hertel, W. (1978). Elektrophysiologiche Untersuchungen am stomatogastrischen Nervensystem von Periplaneta americana L. *Zoologische Jahrbücher*.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (2008). *The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. WW Norton & Company.Homberg U (1985) Interneurones of the central complex in the bee brain (Apis mellifera, L.). J Insect Physiol 31(3):251–264

Homberg, U. (1985). Interneurones of the central complex in the bee brain (Apis mellifera, L.). *Journal of insect physiology*, *31*(3), 251-264.

Hori, S., Takeuchi, H., Arikawa, K., Kinoshita, M., Ichikawa, N., Sasaki, M., & Kubo, T. (2006). Associative visual learning, color discrimination, and chromatic adaptation in the harnessed honeybee Apis mellifera L. *Journal of Comparative Physiology A*, *192*(7), 691-700.

Hu, K. G., & Stark, W. S. (1977). Specific receptor input into spectral preference inDrosophila. *Journal of comparative physiology*, *121*(2), 241-252.

Huang, Z. Y., & Robinson, G. E. (1996). Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *39*(3), 147-158.

Humphries, M. A., Müller, U., Fondrk, M. K., & Page, R. E. (2003). PKA and PKC content in the honey bee central brain differs in genotypic strains with distinct foraging behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, *189*(7), 555-562.

Hung, Y. S., & Ibbotson, M. R. (2014). Ocellar structure and neural innervation in the honeybee. *Frontiers in neuroanatomy*, *8*, 6.

Hussaini, S. A., & Menzel, R. (2013). Mushroom body extrinsic neurons in the honeybee brain encode cues and contexts differently. *Journal of Neuroscience*, *33*(17), 7154-7164.

Insausti, T. C., & Lazzari, C. R. (1996). Central projections of first-order ocellar interneurons in the bug Triatoma infestans (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of morphology*, *229*(2), 161-169

Jernigan, C. M., Roubik, D. W., Wcislo, W. T., & Riveros, A. J. (2013). Color dependent learning in restrained Africanized honey bees. *Journal of Experimental Biology*, jeb-091355.

Kaiser, W. (1975). The relationship between visual movement detection and colour vision in insects. *The compound eye and vision of insects. Clarendon: Oxford*, 358-377.

Kaiser, W., Seidl, R., & Vollmar, J. (1977). The participation of all three colour receptors in the phototactic behaviour of fixed walking honeybees. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *122*(1), 27-44.

Kastberger, G. (1990). The role of the median and the lateral Ocelli of free-flying honeybees in yaming and course control. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, *94*(3), 345-361.

Kien, J., & Menzel, R. (1977). Chromatic properties of interneurons in the optic lobes of the bee. *Journal of comparative physiology*, *113*(1), 17-34.

Kim, Y. C., Lee, H. G., & Han, K. A. (2007). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, *27*(29), 7640-7647.

Klappenbach, M., Kaczer, L., & Locatelli, F. (2013). Dopamine interferes with appetitive long-term memory formation in honey bees. *Neurobiology of learning and memory*, *106*, 230-237.

Kral, K. (1978). Orientierung der Rhabdome in den Ocellen der Honigbiene Apis mellifica carnica Pollm. und der Erdwespe Vespa vulgaris L. *Zoologische Jahrbucher. Abteilung fur allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*.

Krashes, M. J., DasGupta, S., Vreede, A., White, B., Armstrong, J. D., & Waddell, S. (2009). A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in Drosophila. *Cell*, *139*(2), 416-427.

Kreissl, S., Eichmüller, S., Bicker, G., Rapus, J., & Eckert, M. (1994). Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, *348*(4), 583-595.

Kurshan, P. T., Hamilton, I. S., Mustard, J. A., & Mercer, A. R. (2003). Developmental changes in expression patterns of two dopamine receptor genes in mushroom bodies of the honeybee, Apis

mellifera. *Journal of Comparative Neurology*, *466*(1), 91-103.

Kuwabara, M. (1957). Bildung des bedingten reflexes von Pavlovs typus bei der honigbiene, Apis mellifica (mit 1 textabbildung). *JOURNAL OF THE FACULTY OF SCIENCE HOKKAIDO UNIVERSITY Series VI. ZOOLOGY*, *13*(1-4), 458-464.

Labhart, T. (1974). Behavioral analysis of light intensity discrimination and spectral sensitivity in the honey bee, Apis mellifera. *Journal of comparative physiology*, *95*(3), 203-216.

Lazzari, C. R., Reiseman, C. E., & Insausti, T. C. (1998). The role of the ocelli in the phototactic behaviour of the haematophagous bug Triatoma infestans. *Journal of insect physiology*, *44*(12), 1159-1162.

Libersat, F., & Pflueger, H. J. (2004). Monoamines and the orchestration of behavior. *AIBS Bulletin*, *54*(1), 17-25.

Liu, C., Plaçais, P. Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B. D., Aso, Y., Friedrich, A. B., ... & Tanimoto, H. (2012). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in Drosophila. *Nature*, *488*(7412), 512.

Macmillan, C. S., & Mercer, A. R. (1987). An investigation of the role of dopamine in the antennal lobes of the honeybee, Apis mellifera. *Journal of Comparative Physiology A*, *160*(3), 359-366.

Matsumoto, R., Suzuki, S., Tsogtbaatar, K., & Evans, S. E. (2009). New material of the enigmatic reptile Khurendukhosaurus (Diapsida: Choristodera) from Mongolia. *Naturwissenschaften*, *96*(2), 233-242.

Matsumoto, Y., Matsumoto, C. S., Wakuda, R., Ichihara, S., & Mizunami, M. (2015). Roles of octopamine and dopamine in appetitive and aversive memory acquisition studied in olfactory conditioning of maxillary palpi extension response in crickets. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *9*, 230.

Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: a step toward standardized procedures. *Journal of neuroscience methods*, *211*(1), 159-167.

Mauelshagen, J. (1993). Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *Journal of neurophysiology*, *69*(2), 609-625.

Melnattur, K. V., Pursley, R., Lin, T. Y., Ting, C. Y., Smith, P. D., Pohida, T., & Lee, C. H. (2014). Multiple redundant medulla projection neurons mediate color vision in Drosophila. *Journal of neurogenetics*, *28*(3-4), 374-388.

Menzel R, Hammer M, Braun G, Mauelshagen J, Sugawa M (1991) Neurobiology of learning and memory in honeybees.The Behaviour and Physiology of Bees, 323-353

Menzel, R. (1979). Spectral sensitivity and color vision in invertebrates. In *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates* (pp. 503-580). Springer, Berlin, Heidelberg.

Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, *185*(4), 323-340.

Menzel, R. (2012). The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(11), 758.

Menzel, R., & Greggers, U. (1985). Natural phototaxis and its relationship to colour vision in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *157*(3), 311-321.

Menzel, R., & Greggers, U. (1985). Natural phototaxis and its relationship to colour vision in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *157*(3), 311-321.

Menzel, R., & Manz, G. (2005). Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *Journal of Experimental Biology*, *208*(22), 4317-4332.

Menzel, R., & Müller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annual review of neuroscience*, *19*(1), 379-404.

Menzel, R., & Snyder, A. W. (1974). Polarised light detection in the bee, Apis mellifera. *Journal of comparative physiology*, *88*(3), 247-270.

Menzel, R., Erber, J., & Masuhr, T. H. (1974). Learning and memory in the honeybee. In *Experimental analysis of insect behaviour* (pp. 195-217). Springer, Berlin, Heidelberg.

Mercer, A. R., & Menzel, R. (1982). The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybeeApis mellifera. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *145*(3), 363-368.

Michelsen, V. (1988). A world revision of Strobilomyia gen. n.: the anthomyiid seed pests of conifers (Diptera: Anthomyiidae). *Systematic Entomology*, *13*(3), 271-314.

Mizunami, M., Unoki, S., Mori, Y., Hirashima, D., Hatano, A., & Matsumoto, Y. (2009). Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. *BMC biology*, *7*(1), 46.

Mizunami, T., & Takagi, K. (1994). Wavelength dependence of two-photon absorption properties of silica optical fibers. *Optics letters*, *19*(7), 463-465.

Mobbs, P. G. (1982). The brain of the honeybee Apis mellifera. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, *298*(1091), 309-354.

Mobbs, P. G. (1984). Neural networks in the mushroom bodies of the honeybee. *Journal of insect physiology*, *30*(1), 43-58.

Mota, T., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2011). Color modulates olfactory learning in honeybees by an occasion-setting mechanism. *Learning & Memory*, *18*(3), 144-155.

Mota, T., Gronenberg, W., Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2013). Chromatic processing in the anterior optic tubercle of the honey bee brain. *Journal of Neuroscience*, *33*(1), 4-16.

Mota, T., Kreissl, S., Carrasco Durán, A., Lefer, D., Galizia, G., & Giurfa, M. (2016). Synaptic organization of microglomerular clusters in the lateral and medial bulbs of the honeybee brain. *Frontiers in neuroanatomy*, *10*, 103.

Mustard, J. A., Beggs, K. T., & Mercer, A. R. (2005). Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 59(3), 103-117.

Mustard, J. A., Blenau, W., Hamilton, I. S., Ward, V. K., Ebert, P. R., & Mercer, A. R. (2003). Analysis of two D1-like dopamine receptors from the honey bee Apis mellifera reveals agonist-independent activity. *Molecular Brain Research*, *113*(1-2), 67-77.

Nakatani, Y., Matsumoto, Y., Mori, Y., Hirashima, D., Nishino, H., Arikawa, K., & Mizunami, M. (2009).

Why the carrot is more effective than the stick: different dynamics of punishment memory and reward memory and its possible biological basis. *Neurobiology of learning and memory*, *92*(3), 370-380.

Nakatani, Y., Matsumoto, Y., Mori, Y., Hirashima, D., Nishino, H., Arikawa, K., & Mizunami, M. (2009). Why the carrot is more effective than the stick: different dynamics of punishment memory and reward memory and its possible biological basis. Neurobiology of learning and memory, 92(3), 370-380.

Ogawa, Y., Ribi, W., Zeil, J., & Hemmi, J. M. (2017). Regional differences in the preferred e-vector orientation of honeybee ocellar photoreceptors. *Journal of Experimental Biology*, jeb-156109.

Paulk, A. C., & Gronenberg, W. (2008). Higher order visual input to the mushroom bodies in the bee, Bombus impatiens. Arthropod structure & development, 37(6), 443-458.

Paulk, A. C., Dacks, A. M., Phillips-Portillo, J., Fellous, J. M., & Gronenberg, W. (2009). Visual processing in the central bee brain. *Journal of Neuroscience*, *29*(32), 9987-9999.

Pavlov, I. P. (1927). Conditional reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.

Pearce, J. M. (1987). A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. Psychological review, 94(1), 61.

Pearce, J. M., & Bouton, M. E. (2001). Theories of associative learning in animals. *Annual review of psychology*, *52*(1), 111-139.

Peitsch, D., Fietz, A., Hertel, H., de Souza, J., Ventura, D. F., & Menzel, R. (1992). The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, *170*(1), 23-40.

Perry, C. J., & Barron, A. B. (2013). Honey bees selectively avoid difficult choices. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(47), 19155-19159.

Reinhard, J., Srinivasan, M. V., & Zhang, S. (2006). Complex memories in honeybees: can there be more than two?. Journal of Comparative Physiology A, 192(4), 409-416.

Reinhard, J., Srinivasan, M. V., Guez, D., & Zhang, S. W. (2004). Floral scents induce recall of navigational and visual memories in honeybees. Journal of Experimental Biology, 207(25), 4371-4381.

Reisenman, C. E., Lazzari, C. R., & Giurfa, M. (1998). Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug Triatoma infestans. *Journal of Comparative Physiology A*, *183*(4), 533-541.

Rescorla, R. A. (1988). Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, *43*(3), 151.

Rescorla, R. A., Durlach, P. J., & Grau, J. W. (1985). Contextual learning in Pavlovian conditioning. *Context and learning*, 23-56.

Ribi, W. A. (1975). The first optic ganglion of the bee. *Cell and tissue research*, *165*(1), 103-111.

Ribi, W. A., & Scheel, M. (1981). The second and third optic ganglia of the worker bee. *Cell and tissue research*, *221*(1), 17-43.

Ribi, W., Warrant, E., & Zeil, J. (2011). The organization of honeybee ocelli: regional specializations and rhabdom arrangements. *Arthropod structure & development*, *40*(6), 509-520.

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

Roeder, T. (2005). Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu. Rev. Entomol.*, *50*, 447-477.

Roeder, T., Degen, J., & Gewecke, M. (1998). Epinastine, a highly specific antagonist of insect neuronal octopamine receptors. European Journal of Pharmacology, 349(2-3), 171-177

Rossel, S., & Wehner, R. (1986). Polarization vision in bees. *Nature*, *323*(6084), 128.

Sander, W. (1933). Phototaktische Reaktionen der Bienen auf Lichter verschiedener Wellenlänge. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *20*(1), 267-286.

Sandoz J. C., Laloi, D., Odoux, J.F., Pham-Delègue, M. H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. Anim Behav, 59: 1024–1034.

Schäfer, S., Rehder, V. (1989). Dopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. Journal of Comparative Neurology, 280 , pp. 43-58

Scheiner, R., Baumann, A., & Blenau, W. (2006). Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. Current neuropharmacology, 4(4), 259-276.

Scheiner, R., Plückhahn, S., Öney, B., Blenau, W., & Erber, J. (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. Behavioural brain research, 136(2), 545-553.

Scheiner, R., Toteva, A., Reim, T., Søvik, E., & Barron, A. B. (2014). Differences in the phototaxis of pollen and nectar foraging honey bees are related to their octopamine brain titers. Frontiers in physiology, 5,116.

Schröter, U., Malun, D., & Menzel, R. (2007). Innervation pattern of suboesophageal ventral unpaired median neurones in the honeybee brain. Cell Tissue Res, 327(647-667).

Schulz, D. J., Barron, A. B., & Robinson, G. E. (2002). A role for octopamine in honey bee division of labor. *Brain, behavior and evolution*, *60*(6), 350-359.

Schürmann, F. W., Elekes, K., & Geffard, M. (1989). Dopamine-like immunoreactivity in the bee brain. Cell and tissue research, 256(2), 399-410.

Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., & Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in Drosophila. Journal of Neuroscience, 23(33), 10495-10502.

Selcho, M., Pauls, D., Han, K. A., Stocker, R. F., & Thum, A. S. (2009). The role of dopamine in Drosophila larval classical olfactory conditioning. PloS one, 4(6), e5897.

Sheiner, N. (2014). DES and a Proposed Theory of Enterprise Liability. *Fordham L. Rev.*, *83*, 5.

Skinner, B. F. (1938). The behavior of organisms: an experimental analysis. Appleton-Century. New York.

Song, B. M., & Lee, C. H. (2018). Toward a Mechanistic Understanding of Color Vision in Insects. *Frontiers in neural circuits*, *12*, 16.

Spaethe, J., Tautz, J., & Chittka, L. (2001). Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(7), 3898-3903.

Srinivasan, M. V. (2010). Honey bees as a model for vision, perception, and cognition. Ann Rev Entomol, 55(1), 267-284.

Srinivasan, M. V., & Lehrer, M. (1988). Spatial acuity of honeybee vision and its spectral properties. *Journal of Comparative Physiology A*, *162*(2), 159-172.

Srinivasan, M. V., Moore, R. J., Thurrowgood, S., Soccol, D., & Bland, D. (2012). From biology to engineering: insect vision and applications to robotics. In Frontiers in sensing (pp. 19-39). Springer, Vienna.

Srinivasan, M. V., Zhang, S. W., & Witney, K. (1994). Visual discrimination of pattern orientation by honeybees: performance and implications for'cortical'processing. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 343(1304), 199-210.

Srinivasan, R., & Braren, B. (1989). Ultraviolet laser ablation of organic polymers. *Chemical Reviews*, *89*(6), 1303-1316.

Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. J Ins Physiol, 6, 168-179.

Tedjakumala, S. R., & Giurfa, M. (2013). Rules and mechanisms of punishment learning in honey bees: the aversive conditioning of the sting extension response. J Exp Biol, 216(16), 2985-2997.

Tedjakumala, S.R., Jacques Rouquette, J., Boizeau, M., Mesce K.A., Lucie Hotier, L., Massou, L., Giurfa, M. (2017). A Tyrosine-Hydroxylase Characterization of Dopaminergic Neurons in the Honey Bee Brain. Front Syst Neurosci. doi: 10.3389/fnsys.2017.00047

Thamm, M., Balfanz, S., Scheiner, R., Baumann, A., & Blenau, W. (2010). Characterization of the 5-HT1A receptor of the honeybee (Apis mellifera) and involvement of serotonin in phototactic behavior. *Cellular and molecular life sciences*, *67*(14), 2467-2479.

Unoki, S., Matsumoto, Y., & Mizunami, M. (2005). Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. Eur J Neurosci, 22(6), 1409-1416.

Unoki, S., Matsumoto, Y., & Mizunami, M. (2006). Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in insect visual learning. Eur J Neurosci, 24(7), 2031-2038.

van Grunsven, R. H., Donners, M., Boekee, K., Tichelaar, I., Van Geffen, K. G., Groenendijk, D., ... & Veenendaal, E. M. (2014). Spectral composition of light sources and insect phototaxis, with an evaluation of existing spectral response models. *Journal of insect conservation*, *18*(2), 225-231.

Varela, F. G., & Porter, K. R. (1969). Fine structure of the visual system of the honeybee (Apis mellifera): I. The retina. *Journal of ultrastructure research*, *29*(3-4), 236-259.

Vasas, V., Hanley, D., Kevan, P. G., & Chittka, L. (2017). Multispectral images of flowers reveal the adaptive significance of using long-wavelength-sensitive receptors for edge detection in bees. Journal of Comparative Physiology A, 203(4), 301-311.

Velarde, R. A., Sauer, C. D., Walden, K. K., Fahrbach, S. E., & Robertson, H. M. (2005). Pteropsin: a vertebrate-like non-visual opsin expressed in the honey bee brain. Insect biochemistry and molecular

biology, 35(12), 1367-1377.

Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. (2007). Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. PLoS ONE, 2(3), e288.

Vogt, K., Aso, Y., Hige, T., Knapek, S., Ichinose, T., Friedrich, A. B., *et al.,* (2016). Direct neural pathways convey distinct visual information to Drosophila mushroom bodies. eLife, 5, e14009

Vogt, K., Schnaitmann, C., Dylla, K. V., Knapek, S., Aso, Y., Rubin, G. M., *et al.,* (2014). Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in Drosophila. eLife, 3, e02395.

Von Frisch, K. (1914). *Der farbensinn und formensinn der biene*. Рипол Классик.

Von Frisch, K. (1967). The dance language and orientation of bees.

Wakakuwa, M., Kurasawa, M., Giurfa, M., & Arikawa, K. (2005). Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften*, *92*(10), 464-467.

Wehner, R., & Bernard, G. D. (1993). Photoreceptor twist: a solution to the false-color problem. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(9), 4132-4135.

Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. Nat Rev Neurosci., 5:483–494

Wright, G. A., Mustard, J. A., Simcock, N. K., Ross-Taylor, A. A., McNicholas, L. D., Popescu, A., *et al.,* (2010). Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. Current Biology, 20(24), 2234-2240.

Yamaguchi, S., & Heisenberg, M. (2011). Photoreceptors and neural circuitry underlying phototaxis in insects. *Fly*, *5*(4), 333-336.

Yamaguchi, S., Desplan, C., & Heisenberg, M. (2010). Contribution of photoreceptor subtypes to spectral wavelength preference in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(12), 5634-5639.

Yamaguchi, S., Wolf, R., Desplan, C., Heisenberg, M. (2008). Motion vision is independent of color in Drosophila Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 pp. 4910-4915

Yang, E. C., Lin, H. C., & Hung, Y. S. (2004). Patterns of chromatic information processing in the lobula of the honeybee, Apis mellifera L. Journal of Insect Physiology, 50(10), 913-925.

Zeil, J., Ribi, W. A., & Narendra, A. (2014). Polarisation vision in ants, bees and wasps. In Polarized light and polarization vision in animal sciences (pp. 41-60). Springer, Berlin, Heidelberg.

Zhang, S., Si, A., Pahl, M. (2012). Visually guided decision making in foraging honeybees. Front. Neurosci. 6:88. doi:10.3389/fnins.2012.00088

7 ANEXOS

© 2018. Published by The Company of Biologists Ltd | Journal of Experimental Biology (2018) 221, jeb178830. doi:10.1242/jeb.178830

RESEARCH ARTICLE

Visual discrimination transfer and modulation by biogenic amines in honeybees

Amanda Rodrigues Vieira[1,2], Nayara Salles[1], Marco Borges[1] and Theo Mota[1,2,*]

ABSTRACT

For more than a century, visual learning and memory have been studied in the honeybee *Apis mellifera* using operant appetitive conditioning. Although honeybees show impressive visual learning capacities in this well-established protocol, operant training of free-flying animals cannot be combined with invasive protocols for studying the neurobiological basis of visual learning. In view of this, different attempts have been made to develop new classical conditioning protocols for studying visual learning in harnessed honeybees, though learning performance remains considerably poorer than that for free-flying animals. Here, we investigated the ability of honeybees to use visual information acquired during classical conditioning in a new operant context. We performed differential visual conditioning of the proboscis extension reflex (PER) followed by visual orientation tests in a Y-maze. Classical conditioning and Y-maze retention tests were performed using the same pair of perceptually isoluminant chromatic stimuli, to avoid the influence of phototaxis during free-flying orientation. Visual discrimination transfer was clearly observed, with pre-trained honeybees significantly orienting their flights towards the former positive conditioned stimulus (CS+), thus showing that visual memories acquired by honeybees are resistant to context changes between conditioning and the retention test. We combined this visual discrimination approach with selective pharmacological injections to evaluate the effect of dopamine and octopamine in appetitive visual learning. Both octopaminergic and dopaminergic antagonists impaired visual discrimination performance, suggesting that both these biogenic amines modulate appetitive visual learning in honeybees. Our study brings new insight into cognitive and neurobiological mechanisms underlying visual learning in honeybees.

KEY WORDS: Visual learning, Classical conditioning, Learning transfer, Dopamine, Octopamine, *Apis mellifera*

INTRODUCTION

The forager honeybee *Apis mellifera* is a well-established model for studies of visual learning and memory. At the behavioral level, much knowledge has been acquired about the ability of honeybees to learn colors, shapes, patterns and motion stimuli, among other visual attributes present in their rich visual environment (Giurfa and Menzel, 1997; Srinivasan, 2010; Zhang et al., 2012). Furthermore, bees possess impressive cognitive abilities in solving higher-level visual problems such as conceptual categorization and rule learning (Avarguès-Weber et al., 2012; Avarguès-Weber and Giurfa, 2013). Virtually all these studies about visual learning in honeybees have so far been performed using appetitive operant conditioning of free-flying animals, a very effective protocol that unfortunately cannot be combined with invasive techniques for studying the underlying neurobiological mechanisms (Avarguès-Weber et al., 2012).

An efficient classical conditioning protocol for training harnessed bees with olfactory cues has been combined with diverse pharmacological and physiological invasive methods for studying the neural basis of olfactory learning and memory (Giurfa and Sandoz, 2012; Matsumoto et al., 2012; Menzel, 2012). However, the so-called classical conditioning of the proboscis extension reflex (PER) (Kuwabara, 1957; Takeda, 1961), which proved to be very efficient in training harnessed bees to learn odor–reward associations (Giurfa and Sandoz, 2012), does not present the same robustness when visual cues are used as conditioned stimuli. In recent decades, attempts have been made to develop protocols of classical visual conditioning of the PER in harnessed bees, but learning performance has always remained poorer than that obtained with olfactory PER conditioning (Avarguès-Weber and Mota, 2016). Curiously, some authors reported that antennae amputation was essential for visual stimulus–reward association to occur in harnessed bees, whereas others showed that such a drastic procedure was not always necessary (Avarguès-Weber and Mota, 2016). Independent of being intact or deprived of their antennae, harnessed honeybees conditioned in a classical appetitive context never presented the same high levels of visual learning usually acquired in operant visual conditioning studies (Avarguès-Weber and Mota, 2016). Considering that the use of visual cues by bees predominates when they are foraging or navigating in flight, an operant free-flying context indeed seems much more natural for associative visual learning than the harnessed situation imposed in classical visual conditioning.

Learning and memory performance does not simply depend on the relevant stimuli used for conditioning – it is also strongly influenced by contextual cues that the animal experiences during these processes (Rescorla et al., 1985). In this framework, the capacity to transfer information learnt in one context to another context is part of the adaptive mechanisms that improve the use of established memories by animals (Balsam, 1985). A fascinating example of information transfer in honeybees is their ability to find food resources during foraging using information gained inside the hive from a returning forager (von Frisch, 1967). This and other complex behaviors displayed by honeybees probably involve transfer of information from classical to operant associative contexts, but the neural basis of these processes remains so far unknown. Previous behavioral studies have shown that honeybees can transfer olfactory information between classical and operant contexts (Bakchine-Huber et al., 1992; Gerber et al., 1996; Sandoz et al., 2000; Chaffiol et al., 2005; Carcaud et al., 2009) but no study

[1]Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil. [2]Postgraduate Program in Neurosciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil.

*Author for correspondence (theo@icb.ufmg.br)

A.R., 0000-0002-8051-038X; N.S., 0000-0001-7971-1128; M.B., 0000-0002-3800-3499; T.M., 0000-0001-9485-5410

Received 4 February 2018; Accepted 12 March 2018