

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

Amanda Rodrigues Vieira

**MODULAÇÃO ESPECTRAL DA RESPOSTA FOTOTÁTICA DESENCADEADA
POR DUAS VIAS NEURAIS PARALELAS NO CÉREBRO DA ABELHA**

Belo Horizonte

2023

Amanda Rodrigues Vieira

**MODULAÇÃO ESPECTRAL DA RESPOSTA FOTOTÁTICA DESENCADEADA
POR DUAS VIAS NEURAIS PARALELAS NO CÉREBRO DA ABELHA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia.

Orientador: Theo Rolla Paula Mota

Co-Orientador: Jerome Baron

Belo Horizonte

2023

043 Vieira, Amanda Rodrigues.
Modulação espectral da resposta fototática desencadeada por duas vias neurais paralelas no cérebro da abelha [manuscrito] / Amanda Rodrigues Vieira. – 2023.
88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Theo Rolla Paula Mota. Co-Orientador: Jerome Baron.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Fototaxia. 3. Abelhas. 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO
Nº 380 DE AMANDA RODRIGUES VIEIRA**

Às 09:00 horas do dia 18 do mês de dezembro de 2023, na Plataforma Microsoft Teams: https://bit.ly/Tese_Amanda_Rodrigues-Vieira_FisFar, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Amanda Rodrigues Vieira**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Theo Rolla Paula Mota**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, Orientador, **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura**, USP, **Prof. Dr. Michael Hrcncir**, USP e o **Prof. Dr. Jerome Paul Armand Laurent Baron**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Modulação Espectral da Resposta Fototática Desencadeada por Duas Vias Neurais Paralelas no Cérebro da Abelha**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Andre Gustavo de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 25/01/2024, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 26/01/2024, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michael Hrcncir, Usuário Externo**, em 29/01/2024, às 08:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 05/02/2024, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jerome Paul Armand Laurent Baron, Professor do Magistério Superior**, em 05/02/2024, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dora Selma Fix Ventura, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2937096** e o código CRC **348F3FFE**.

AGRADECIMENTOS

A jornada até a conclusão desta tese foi desafiadora, mas também repleta de aprendizado e crescimento. Nada disso teria sido possível sem o apoio e incentivo de pessoas fundamentais em minha vida.

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Rose e Antônio, pelo amor incondicional, pelos valores que me transmitiram e pelo suporte em todos os momentos. À minha filha, Olga, que é minha maior motivação e inspiração, minha gratidão por sua paciência e carinho durante essa caminhada. Ao meu irmão, Leandro, e ao meu primo, Luis Carlos, por estarem sempre ao meu lado, oferecendo apoio e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis. Estendo meus agradecimentos a toda a minha família, que, de diferentes formas, contribuiu para que este sonho se tornasse realidade.

Ao meu orientador, Theo Mota, minha sincera gratidão pela orientação dedicada, pelas discussões enriquecedoras e pelo incentivo à pesquisa de qualidade. Ao meu coorientador, Jerome Baron, agradeço pelos insights valiosos e pelo olhar crítico que tanto contribuiu para o amadurecimento deste trabalho. Agradeço também a toda a equipe do laboratório, com quem compartilhei desafios, ideias e momentos de aprendizado.

Sou igualmente grata às agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro, que possibilitou o desenvolvimento deste estudo.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta trajetória, meu mais sincero obrigado!

RESUMO

A fototaxia positiva é uma resposta comportamental de orientação em direção à luz presente em diversos animais. Considerada um comportamento inato e geralmente estereotipado, pouco se sabe ainda sobre os processos neurais envolvidos nesta resposta. A abelha *Apis mellifera* apresenta forte fototaxia positiva, presente em situações como a saída da colmeia, o escape, a decolagem de flores e a navegação. Estudos demonstraram que as reações fototáticas da abelha são ativadas por luzes em uma ampla faixa do espectro compreendido entre o ultravioleta (UV) e o verde-amarelo. Diferente da visão de cores, que permite diferenciar comprimentos de onda independentemente de sua intensidade, a atração fototática de abelhas parece depender principalmente da intensidade luminosa, sem evidências claras de processamento cromático. Enquanto a ampla sensibilidade espectral da fototaxia positiva do UV ao verde sugere a participação dos três tipos de fotorreceptor de abelhas (S, M e L - com picos de absorção em ~350 nm, ~440nm e ~535nm), a aparente falta de processamento cromático levou alguns autores a sugerirem a possibilidade de que nem todos os fotorreceptores estejam envolvidos nesta resposta comportamental. Além disso, não sabemos como duas vias neurais paralelas originadas de dois tipos de órgão visual presentes em abelhas, os olhos compostos e os ocelos, participam e interagem nesta resposta visuomotora. Esta tese buscou preencher estas lacunas através de análises das trajetórias fototáticas desencadeadas por luzes monocromáticas seletivas para cada tipo de fotorreceptor (S, M ou L), apresentadas no escuro em diferentes níveis de irradiância para abelhas submetidas aos seguintes tratamentos: 1- olhos compostos ocluídos, 2- ocelos ocluídos, 3- nenhuma oclusão (controle). O espectro de cada estímulo foi calibrado de forma precisa por espectroradiometria. As imagens gravadas no escuro por câmera de infravermelho foram analisadas em MATLAB, sendo extraídas as seguintes métricas de cada trajetória realizada pela abelha em direção ao estímulo luminoso em uma arena circular: distância, tempo, ângulo de desvio/frame. Diferentes comprimentos de onda, estimulando diferentes canais fotorreceptores da abelha, modularam de forma distinta a resposta de fototaxia em cada grupo experimental. A irradiância luminosa também influenciou parâmetros motores da resposta fototática, sendo esta modulação significativamente diferente entre distintos comprimentos de onda. Além disso, ficou clara na análise de todos os parâmetros a participação diferenciada das vias Ocular e Óptica na orientação fototática positiva de abelhas. Também realizamos experimentos em labirinto Y utilizando estímulos luminosos

monocromáticos e policromáticos em testes de orientação fototática a fim de comparar o tipo de processamento fototático em cada via. Nossos resultados sugerem que a fototaxia em abelhas *Apis mellifera* apresenta processamento linear e não-linear, havendo particularidades no processamento neural de cada via visual. A via Óptica apresenta processamento linear e não-linear, sendo a faixa espectral relacionada ao tipo de processamento e a via Ocular apresenta majoritariamente processamento não-linear.

Palavras-chave: fototaxia, fotorreceptores, via Óptica, via Ocular, *Apis mellifera*

ABSTRACT

Positive phototaxis is a behavioral response of orientation towards light which is present in many animals. Considered an innate and usually stereotyped behavior, little is known about the neural processes underlying such response. The honeybee, *Apis mellifera*, presents strong positive phototaxis during situations such as leaving the hive, escaping, taking off from flowers and navigation. Previous studies have shown that the phototactic response of bees is activated by lights within a wide range of the spectrum between ultraviolet (UV) and yellow-green. Unlike color vision, which allows differentiating the wavelengths regardless of their intensities, the phototactic attraction of bees seems to depend mainly on light intensity, with unclear evidence for chromatic processing. While the broad spectral sensitivity of the positive phototaxis from UV to green suggests the participation of all three types of bee's photoreceptors (S, M and L - with absorption peaks at ~350nm, ~440nm and ~535nm), the apparent lack of chromatic processing has led some authors to suggest the possibility that not all photoreceptors are involved in this behavioral response. In addition, we do not know how two parallel neural pathways originating from two types of visual organs present in bees - the compound eyes and the ocelli - participate and interact in this visuomotor response. Our aim was to fill those gaps through analysis of the phototactic trajectories triggered by monochromatic lights selective for each type of photoreceptor (S, M or L), presented in the dark at different levels of irradiance to bees submitted to the following treatments: 1- compound eyes occluded, 2- ocelli occluded, 3- no occlusion (control). The spectrum of each stimulus was precisely calibrated by spectroradiometry. The images recorded in the dark by an infrared camera were analyzed in MATLAB, and the following metrics were extracted from each trajectory performed by the bees toward the light stimulus in a circular arena: distance, time, deviation angle/frame. Distinct wavelengths, stimulating different photoreceptor channels of the bees, differently modulated the phototactic response in each experimental group. Light irradiance also influenced some motor parameters of the phototactic responses and this modulation was significantly different between different wavelengths. We also performed Y-maze experiments using monochromatic and polychromatic light stimuli in phototactic orientation tests in order to compare the type of phototactic processing in each pathway. Our results suggest that phototaxis in *Apis mellifera* bees presents linear and non-linear processing, with particularities in the neural processing of each visual pathway. The optical pathway presents linear and non-linear processing, with the

spectral range related to the type of processing and the ocellar pathway mainly presents non-linear processing.

Keywords: phototaxis, photoreceptors, optical path, ocellar pathway, *Apis mellifera*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem ilustrativa dos olhos compostos e ocelos da abelha	17
Figura 2 – Sensibilidade espectral dos fotorreceptores dos ocelos	19
Figura 3 – O cérebro da abelha	21
Figura 4 – Neurônios Ocelares L	25
Figura 5 – Neurônios Ocelares L descendentes	26
Figura 6 – Diagrama esquemático das vias de cores sugeridas no cérebro da abelha	27
Figura 7 – Grupos experimentais	33
Figura 8 – Setup experimental	35
Figura 9 – Curva de irradiância absoluta dos LEDS	36
Figura 10 – Exemplos de trajetórias fototáticas	38
Figura 11 – Gráficos de distância percorrida e tempo gasto	41
Figura 12 – Gráfico de tortuosidade	44
Figura 13 – Comparação entre grupos	45
Figura 14 – Curvas de sensibilidade espectral dos fotorreceptores e calibração dos LEDS	47
Figura 15 – Diagrama esquemático do processamento neural linear e não-linear	57
Figura 16 – Labirinto em Y	59
Figura 17 – Orientação das abelhas entre estímulos monocromáticos UV, azul e verde no labirinto Y	63
Figura 18 – Latência de atração fototática entre estímulos monocromáticos	64
Figura 19 – Orientação das abelhas entre os estímulos monocromático UV e mistura de cores no labirinto Y	66

Figura 20 – Orientação das abelhas entre os estímulos monocromático azul e mistura de cores no labirinto Y	68
Figura 21 – Latência de atração fototática entre um componente azul versus mistura de cores	69
Figura 22 – Orientação das abelhas entre os estímulos monocromático verde e mistura de cores no labirinto Y	71
Figura 23 – Latência de atração fototática entre um componente azul versus mistura de cores	72

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 Percepção e orientação visuoespacial.....	11
1.2 Abelhas <i>Apis mellifera</i>	13
1.3 A fototaxia positiva.....	14
1.4 Morfologia dos olhos compostos.....	15
1.5 A fototransdução e os fotorreceptores.....	16
1.6 Morfologia dos ocelos.....	17
1.7 Vias neurais de processamento visual.....	19
1.7.1 Via Óptica.....	19
1.7.2 Via Ocelar.....	23
1.8 Interações entre vias Óptica e Ocelar.....	27
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
CAPÍTULO 1.....	30
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	31
2 METODOLOGIA.....	32
2.1 Animais.....	32
2.2 Grupos experimentais.....	32

2.3 Arena experimental.....	34
2.4 Estímulos visuais.....	35
2.5 Análise de imagem.....	37
2.6 Análise estatística.....	37
3 RESULTADOS.....	38
4 DISCUSSÃO.....	45
4.1 Estimulações monocromáticas específicas geram respostas fototáticas distintas em cada via de processamento visual.....	46
4.2 Diferentes níveis de irradiância promovem atrações fototáticas distintas.....	50
4.3 Processamento cromático e acromático em circuitos de fototaxia.....	51
CAPÍTULO 2.....	54
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	55
2 METODOLOGIA.....	58
2.1 Labirinto Y.....	58
2.2 Estímulos luminosos.....	59
2.3 Grupos e procedimentos experimentais.....	60
2.4 Análise estatística.....	61
3 RESULTADOS.....	61
3.1 Orientação fototática frente a pares de estímulos monocromáticos.....	61
3.2 Testando elemento monocromático contra misturas policromáticas.....	64
3.2.1 UV vs. mistura de cores.....	64
3.2.2 AZUL vs. mistura de cores.....	66
3.2.3 VERDE vs. mistura de cores.....	69
4 DISCUSSÃO.....	72

4.1 Estímulos monocromáticos são processados de maneira distinta pelas vias neurais conectadas aos olhos compostos (via Óptica) e aos ocelos (via Ocelar)?.....	73
4.2 O processamento fototático envolve somatório linear dos sinais de distintos fotorreceptores?.....	74
4.3 A linearidade do processamento fototático difere nas vias fototáticas Óptica e Ocelar?.....	76
5 REFERÊNCIAS	78

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Percepção e orientação visuoespacial

A orientação visuoespacial desempenha um papel crucial para a sobrevivência dos animais, auxiliando-os a navegar no meio ambiente, caçar, reproduzir e escapar de predadores. Muitos animais desenvolveram adaptações notáveis para aprimorar sua capacidade de perceber e compreender o ambiente ao seu redor (Able, 1980). Um exemplo é a migração de aves, um fenômeno que envolve uma notável orientação visuoespacial. As aves possuem mecanismos complexos para captar informações direcionais por meio do sol, estrelas, campos geomagnéticos e padrões de luz polarizada para traçar suas rotas por longas distâncias (Baker, 1984; Moore, 1987). Alguns peixes se orientam usando o e-vetor da luz linearmente polarizada (Forward e Waterman, 1973; Waterman e Aoki, 1974) e magnetopercepção (Putman et al., 2014, Bottesch et al., 2016; Mannino et al., 2023). Alguns insetos, como abelhas e formigas por exemplo, também se orientam no espaço por meio da magnetopercepção e padrões de luz polarizada (Von Frish, 1949, 1967; Duelli e Wehner, 1973, Walker e Bitterman, 1985, Mannino et al., 2023).

A orientação visuoespacial permite que os animais se relacionem com o mundo, de modo a desenvolver determinados comportamentos típicos para aprimoramento de suas capacidades para sobreviver. Os comportamentos visuais nos animais podem ser divididos em duas amplas categorias: inatos e aprendidos. Essas duas formas de comportamento desempenham papéis distintos na adaptação e sobrevivência das espécies. Comportamentos visuais inatos são aqueles que os animais realizam de maneira automática e sem a necessidade de aprendizado ou experiência prévia. Esses comportamentos muitas vezes são determinados geneticamente e estão presentes desde o nascimento (Anholt, 2020). Um exemplo clássico é o efeito “imprinting”, descrito por Konrad Lorenz em 1935, no qual pintinhos ao eclodirem dos ovos seguem o primeiro ser que se movimenta em seu campo de visão. Estímulos visuais podem causar fuga ou congelamento em vários animais, como por exemplo ratos (Yilmaz e Meister, 2013) e caranguejo (Tomsic et al., 2017). A motivação para a busca por recursos também é considerada um comportamento inato, sendo encontrado semelhança de estratégias de busca em vários animais, no entanto tal tarefa também envolve contextos de aprendizagem (Lopez et al., 2019).

Por outro lado, os comportamentos visuais aprendidos são aqueles que os animais adquirem ao longo de suas vidas por meio de experiência e interação com o ambiente. Esse tipo de comportamento é frequentemente flexível e adaptativo (Rampon e Tsien, 2000). Por exemplo, muitas espécies de pássaros jovens aprendem a reconhecer os cantos de seus pais, bem como reconhecer parceiros e encontrar alimentos (Thorpe, 1951; Kojima e Doupe, 2007). Animais sociais, como macacos e golfinhos, podem aprender a interpretar e usar sinais visuais para se comunicar com membros de seus grupos sociais (Herman et al., 1984; De Waal, 2003). Esses comportamentos visuais aprendidos permitem aos animais ajustar sua resposta com base em experiências anteriores e no ambiente em constante mudança. Em síntese, a combinação de comportamentos visuais inatos e aprendidos desempenha um papel fundamental na adaptação dos animais ao ambiente em constante mudança.

A forma como a percepção visual é processada também determina comportamentos visuais nos animais. Comportamentos que envolvem o processamento visual cromático e acromático atuam de maneira estratégica na adaptação dos animais ao meio ambiente. O processamento acromático envolve a percepção de tons de cinza e variações de luminosidade. Isso é particularmente importante em situações de baixa luminosidade, como a noite, onde a visão cromática é menos eficaz. Muitos animais noturnos, como corujas e gatos, utilizam da visão acromática para caçar presas ou detectar predadores, apresentando maior sensibilidade a luz, em detrimento à acuidade visual; melhorando a percepção do movimento em condições de pouca luz (Steinberg et al., 1973; Orłowski et al., 2012).

Quando se trata de comportamentos que envolvem o processamento cromático, a oposição de cores desempenha um papel crucial. Muitos animais utilizam essa capacidade para identificar alimentos, parceiros e potenciais ameaças. A oposição de cores é uma característica fundamental do sistema visual, no qual cores opostas do espectro, como o vermelho e o verde, o azul e o amarelo, são processadas de forma antagônica (Berthier e Provenzi, 2021). Esse mecanismo permite aos animais perceber e distinguir cores de maneira mais eficaz. Por exemplo, abelhas e borboletas utilizam da capacidade de enxergar cores para reconhecimento de flores no forrageamento, garantindo eficácia na busca por alimento (Giurfa, 2004; Takeuchi et al., 2006). Além disso, a oposição de cores também tem sua importância em processos evolutivos, influenciando na seleção natural e camuflagem dos animais. Muitos destes desenvolveram adaptações que exploram a oposição de cores para se mimetizar em seus ambientes, tornando-se menos visíveis para predadores ou presas (Pasteur, 1982). Assim, os comportamentos que envolvem os processamentos cromático e acromático são vitais para a

sobrevivência e a reprodução de animais em uma vasta gama de ambientes. A capacidade de discriminar cores e contrastes de luminosidade permite a eles se adaptar às demandas específicas de seus ecossistemas e interagir de maneira eficaz com o mundo ao seu redor.

1.2 Abelhas *Apis mellifera*

As abelhas exibem comportamentos visuais notáveis e sofisticados, processando diversos estímulos visuais para orientação, busca de alimento e comunicação em suas colônias. Estudos destacaram as aptidões visuais desses insetos, mostrando semelhanças psicofísicas impressionantes com os processos cognitivos de percepção visual em vertebrados, incluindo os seres humanos (Srinivasan et al., 2012). Em 1914, Karl Von Frisch evidenciou a verdadeira visão de cores nas abelhas, e estudos subsequentes, como os de Daumer (1956), revelaram que tal visão em abelhas é tricromática, organizada de maneira semelhante à dos humanos. No entanto, as abelhas enxergam uma faixa espectral diferente dos humanos. Enquanto os humanos possuem fotorreceptores que apresentam picos de absorção na faixa do azul, verde e vermelho, as abelhas possuem fotorreceptores que captam a luz com picos de absorção em UV, azul e verde (Wakakuwa et al., 2005; Spaethe et al., 2005). Assim, diversos experimentos comportamentais foram conduzidos para analisar a discriminação e a aprendizagem de cores nas abelhas (para revisão: Menzel et al., 1991; Dyer 2011; Avarguès-Weber e Mota, 2012). Frequentemente esses estudos apontaram para semelhanças entre abelhas e humanos em níveis perceptuais, como constância de cor e contrastes sucessivos e simultâneos de cores (Menzel et al., 1991; Dyer 2011; Avarguès-Weber e Mota, 2012). Além disso, as abelhas também demonstram capacidade de aprender e memorizar diversos atributos visuais, como formas, padrões, orientação, direção, contraste, intensidade luminosa, profundidade e movimento. Essa habilidade de aprendizado contribui para uma navegação eficiente e bom desempenho em tarefas motoras complexas, relacionadas à vida social diária da colmeia (Srinivasan et al., 1994; Collet 1994, 1996; Collet et al., 1997; Giurfa e Menzel, 1997). A detecção de luz polarizada permite às abelhas navegar com precisão. Elas usam a polarização da luz no céu para determinar a direção e a distância de seu ninho ou de uma fonte de alimento (Menzel e Snyder, 1974; Rossel e Wehner, 1986). O processamento de estímulos visuais também está envolvido na dança das abelhas, sendo esta uma forma de comunicação que as permite compartilhar informações sobre a localização de fontes de alimento com outras abelhas da colônia (Frisch, K. 1967).

1.3 A fototaxia positiva

A fototaxia é definida como uma resposta comportamental inata de orientação em relação à luz, sendo esta identificada em seres vivos de diversos grupos filogenéticos, especialmente nos animais invertebrados (Gross, 1913; Menzel, 1979). É considerado um comportamento estereotipado, e tem sido identificado em praticamente todos os insetos, 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) (Menzel, 1979; Reisenman e Lazzari, 1998; Booth et al., 2004; Yamaguchi e Heisenberg, 2011; van Grunsven et al., 2014). Abelhas da espécie *Apis mellifera* apresentam uma forte resposta de fototaxia positiva, identificada como componente dos comportamentos de saída da colmeia, escape, navegação e decolagem de flores (Menzel, 1979; Menzel & Greggers 1985). Embora esta resposta fototática positiva tenha sido analisada por diversos autores no nível comportamental, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na modulação da mesma.

Apesar da fototaxia positiva ser compreendida como uma resposta inata e estereotipada de orientação em relação à luz, estudos recentes sugerem plasticidade na resposta fototática ao comprimento de onda azul quando os animais são submetidos a um condicionamento aversivo com choque. Após o condicionamento, os animais evitam esse comprimento de onda (Kirkerud et al., 2017; Marchal et al., 2019; Nouvian e Galizia, 2020). Estes autores sugerem que a fototaxia apresenta especificidade por comprimento de onda em situações de condicionamento aversivo.

Com relação ao processamento fototático em abelhas, um estudo sugere que a fototaxia é processada de maneira puramente acromática, intermediada pelas células monopolares M1 que recebem o sinal de saída de todos os fotorreceptores de um omatídeo (Menzel e Greggers, 1985). Ou seja, esses pesquisadores sugerem que a fototaxia ocorra mediante soma linear de fluxos quânticos provenientes dos sinais enviados pelos omatídeos ao interneurônio M1 da lâmina. Embora muitos experimentos sugerem a participação dos três fotorreceptores na resposta fototática (Bertholf, 1931; Heintz, 1959; Sander, 1933; Kaiser et al., 1977; Menzel e Greggers, 1985), não existem estudos que relatem envolvimento de processamento cromático na resposta fototática em abelhas.

1.4 Morfologia dos olhos compostos

A maioria dos insetos adultos apresentam um par de olhos compostos, constituídos de várias unidades funcionais denominadas omatídeos (Figura 1) (Goldsmith e Bernard, 1974). 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 corneígena. Abaixo da córnea, há 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 rabdômero 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 rabdômero (Gribakin, 1975, Wakakuwa et al., 2005). Além dessas 8 células retinulares, na base do omatídeo há uma célula fotorreceptora denominada R9 cuja função exata ainda não está elucidada (Gribakin, 1975, Wakakuwa et al., 2005).

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). As opsinas são acopladas a cromóforos derivados da vitamina A sensíveis à luz. Assim, interações entre opsinas e seus respectivos cromóforos conduzem à sensibilidade do cromóforo para diferentes comprimentos de onda (Briscoe e Chittka, 2001). Dessa maneira, ocorre a conversão da luz em resposta elétrica, conhecida como fototransdução (Henze et al., 2012). 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, é abundantemente distribuída em todo o olho composto de operárias, constitui o fotorreceptor 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 (região 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 omatídeos 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.

1.5 A fototransdução e os fotorreceptores

As opsinas localizadas nos rabdômeros dos olhos compostos são responsáveis por capturar fótons e iniciar a fototransdução. Quando um fóton é capturado, o cromóforo da rodopsina sofre uma mudança conformacional, resultando na ativação da meta-rodopsina (Fain et al., 2010). Em insetos, a meta-rodopsina é estável, não ocorrendo separação da opsina e do cromóforo, e pode reverter-se ao estado de repouso após a absorção de fótons de diferentes comprimentos de onda (Kretzberg e Ernst, 2013). Essa conversão gera uma mudança nas propriedades espectrais das opsinas, sendo que a forma da rodopsina difere da meta-rodopsina quanto ao seu espectro de absorção (Stavenga, 1992; Warrant e Nilsson, 2006). A meta-rodopsina ativa uma cascata de sinalização que culmina na abertura de canais de cálcio e na despolarização do fotorreceptor (Hardie e Raghu, 2001; Borst, 2009).

Estudos de hibridização *in situ* demonstraram que os olhos compostos das abelhas apresentam três tipos de fotorreceptor (Figura 1; Peitsch et al., 1992; Wakakuwa et al., 2005; Spaethe et al., 2005), os quais apresentam picos de absorção em três regiões distintas do espectro de luz compreendido entre 300nm e 650nm (Figura 1). O fotorreceptor que capta a luz na faixa do verde possui um pico de absorção em 540nm aproximadamente (fotorreceptor L). O fotorreceptor M apresenta pico aproximado na faixa do azul 440nm e o fotorreceptor S possui pico aproximado na faixa do ultra-violeta 345nm (Autrum & von Zwehl, 1964; Menzel e Blackers, 1976). 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; Vasas, 2017). No entanto, a percepção de brilho (percepção de variação na intensidade de um estímulo) pode ser mediada pela soma de captura de fótons por todos os três fotorreceptores nas abelhas (Spaethe et al., 2001). A distribuição dos diferentes tipos de omatídeos é notavelmente homogênea, com exceção na região da borda dorsal dos

olhos compostos, onde há um maior percentual de receptores UV, e na região ventral anterior, onde há mais receptores azuis. Essa distribuição pode ser uma adaptação evolutiva para melhor lidar com as informações provenientes do céu, como a posição do sol e o padrão de luz polarizada, e do solo, onde as abelhas encontram flores coloridas e objetos com contrastes (Wakakuwa et al., 2005). Essa estratégia de distribuição dos receptores pode ser crucial para as abelhas em suas atividades diárias, como a busca por recursos florais (Wakakuwa et al., 2005).

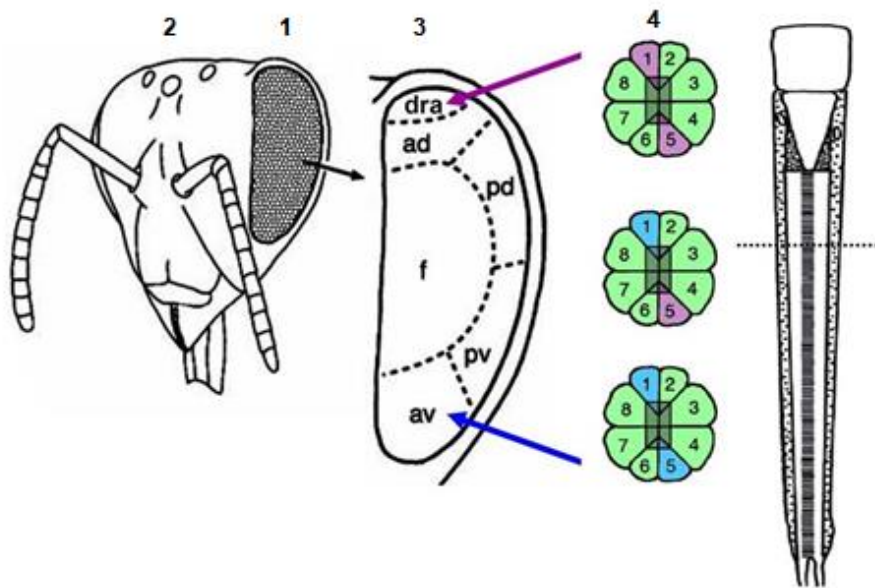


Figura 1. Imagem ilustrativa dos olhos compostos (1) e ocelos (2) da abelha. (3) exemplifica as regiões oculares do olho composto: ad, dorsal anterior; pd, dorsal posterior; f, frontal; av, ventral anterior; pv, ventral posterior. A representação das unidades formadoras dos olhos compostos (omatódeos) (4) e sua distribuição nas diferentes regiões desta estrutura visual, evidenciando os 3 tipos de omatódeos e a distribuição das células fotorreceptoras: Tipo 1 (fotorreceptores S, L e M, representado nas cores roxo, azul e verde), Tipo 2 (fotorreceptores S e L, representado nas cores roxo e verde) e Tipo 3 (fotorreceptores L e M, representado nas cores azul e verde). Modificado de: Wakakuwa et al., 2005 (imagem 1, 2 e 3), Spaethe e Briscoe 2005 (imagem 4).

1.6 Morfologia dos ocelos

Abelhas possuem três ocelos dorsais distribuídos de uma forma triangular na região posterior da cabeça e são responsáveis por detectar variações na intensidade de luz, desempenhando um papel crucial em contextos de navegação e orientação (Mizunami, 1995; Warrant et al., 2006). O ocelo medial está localizado na região central e os outros dois ocelos posicionados lateralmente ao medial, formando um triângulo (Ribi et al., 2011). A retina Ocular

é dividida em sub-retina dorsal e ventral. A sub-retina ventral é disposta em direção ao céu e a sub-retina dorsal é disposta para o horizonte (Ribi et al., 2011, Hung e Ibbotson 2014). Essa divisão anatômica e a construção e disposição dos rabdomas sugere que o ocelo está envolvido não apenas no controle da altitude, mas também no fornecimento de informações sensoriais da bússola de polarização da claraboia (Ribi et al., 2011). 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 rabdoma indica que esta região provavelmente seja sensível à polarização da luz (Kral, 1978; Ribi et al., 2011).

Acima de cada ocelo há 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. O ocelo mediano contém aproximadamente 1.350 fotorreceptores, enquanto cada ocelo lateral possui cerca de 1.100 fotorreceptores (Ogawa et al., 2017). Também são encontradas diferenças em relação ao plano focal dos ocelos mediano comparado aos ocelos laterais. Os ocelos laterais são fortemente subfocados, ou seja, o plano focal da lente da córnea fica atrás da retina. Já o ocelo mediano apresenta o plano focal na retina dorsal (Ribi et al., 2011).

Os ocelos das abelhas contêm apenas dois tipos de fotorreceptores, relatados por estudos de eletrofisiologia com picos de sensibilidade na faixa do verde (~ 500nm) e do UV (~ 360nm) (Goldsmith e Ruck 1958; Geiser e Labhart 1982; Mizunami e Takagi, 1994). Posteriormente, estudos de hibridização *in situ* revelaram que a opsina para comprimentos de onda longos (L) dos ocelos, 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). Os fotorreceptores UV apresentam maior sensibilidade à polarização comparado com os verdes (Ogawa et al., 2017). Os neurônios dos ocelos projetam-se em várias áreas do cérebro das abelhas, incluindo centros visuais de ordem superior e centros de controle motor nos gânglios torácicos (Pan e Goodman, 1977).

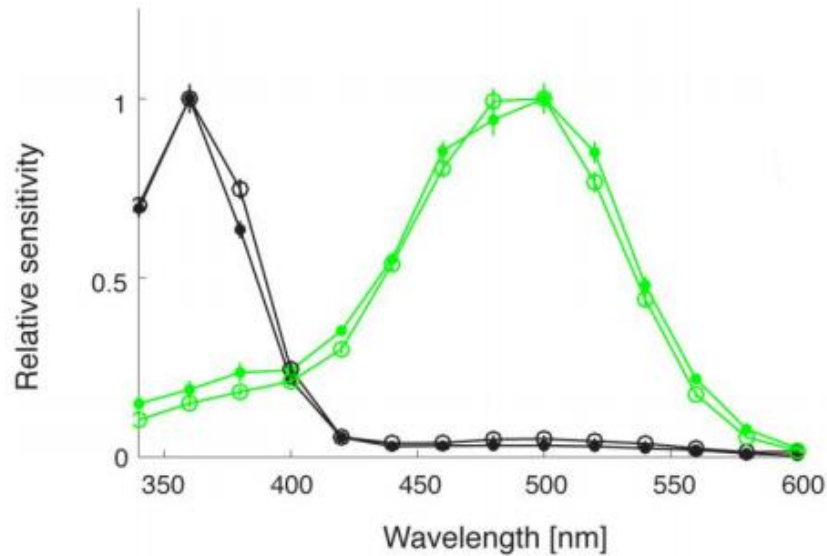


Figura 2. A imagem representa a curva de sensibilidade espectral dos dois fotorreceptores encontrados nos ocelos das abelhas por meio de registros intracelulares. Fotorreceptor UV com pico de sensibilidade espectral em 360nm (linhas pretas) e fotorreceptor verde com pico de sensibilidade espectral em 500nm (linhas verdes) estavam presentes nos ocelos mediano e laterais. Modificado de: Ogawa et al., 2017.

Um estudo recente mostrou que existe uma via direta que sai dos ocelos e projeta-se para regiões de processamento de cor, sendo para estes autores, o ocelo considerado como um elemento participante da constância da cor (Garcia et al., 2017). Além disso, os ocelos desempenham um papel na orientação direcional e na resposta à luz durante o voo das abelhas. Estudos mostraram que a oclusão dos ocelos resulta em uma perturbação maior no controle do curso de voo das abelhas quando expostas a flashes de iluminação lateral, o que sugere que os ocelos contribuem para o estado de alerta fototático (Kastberger, 1990).

1.7 Vias neurais de processamento visual

A seguir será discutido aspectos anatômicos e funcionais relacionados ao processamento visual da via Óptica e via Ocular.

1.7.1 Via Óptica

A via Óptica compreende as projeções enviadas a partir dos olhos compostos para as regiões cerebrais associadas a visão como lobos ópticos, corpos pedunculados, protocérebro lateral e complexo central (Dyer et al., 2011). A segregação do processamento cromático e

acromático é bem conhecida nesta via, e será abordada nos tópicos a seguir. Esta via começa nos olhos compostos. Os fotorreceptores projetam seus axônios para os lobos ópticos do cérebro. Os lobos ópticos possuem três neurópilas visuais: a lâmina, a medula e a lóbula (Figura 3). A partir dos lobos ópticos, as informações visuais são subseqüentemente encaminhadas para centros de processamento de ordem superior, como o complexo central e os corpos pedunculados (Dyer et al., 2011).

A lâmina é a primeira neurópila visual dos lobos ópticos. Ela recebe informação proveniente majoritariamente 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, Ribí 1975). As células monopolares existentes na lâmina constituem a principal via neural para transmissão das informações visuais dos fotorreceptores para a medula e lóbula. São relatados quatro tipos de células monopolares, sendo estas, L1, L2, L3 e L4. O tipo L1 recebe sinal dos fotorreceptores de fibras curtas (fotorreceptores azul e verde), bem como do fotorreceptor de fibra longa (UV), sendo que os sinais provindo de receptores UV fazem contato sináptico com as células monopolares, no entanto, continuam através do quiasma externo terminando nas camadas distais da medula junto com os axônios das células monopolares da lâmina (Ribí, 1981). O tipo L2 recebe sinal dos fotorreceptores azul e verde, sendo que para este tipo de célula monopolar foi relatada evidência indireta de oponência espectral (De Souza et al., 1992). O tipo L3 recebe entrada de apenas um tipo de fotorreceptor, provavelmente o verde. Por fim, o tipo L4 não aparenta receber entradas diretas dos receptores, no entanto estendem seus dendritos a cartuchos vizinhos, onde provavelmente captam entradas de outras células monopolares (De Souza et al., 1992, Menzel e Blakers 1976, Ribí, 1981) . Os autores De Souza et al., 1992 encontraram por meio de coloração e gravação simultânea, respostas com pico hiperpolarizantes e despolarizantes durante iluminação e deslocamento da luz nas células monopolares da lâmina. Assim, as LMC podem contribuir significativamente para o processamento de informações temporais, espaciais e espectrais.

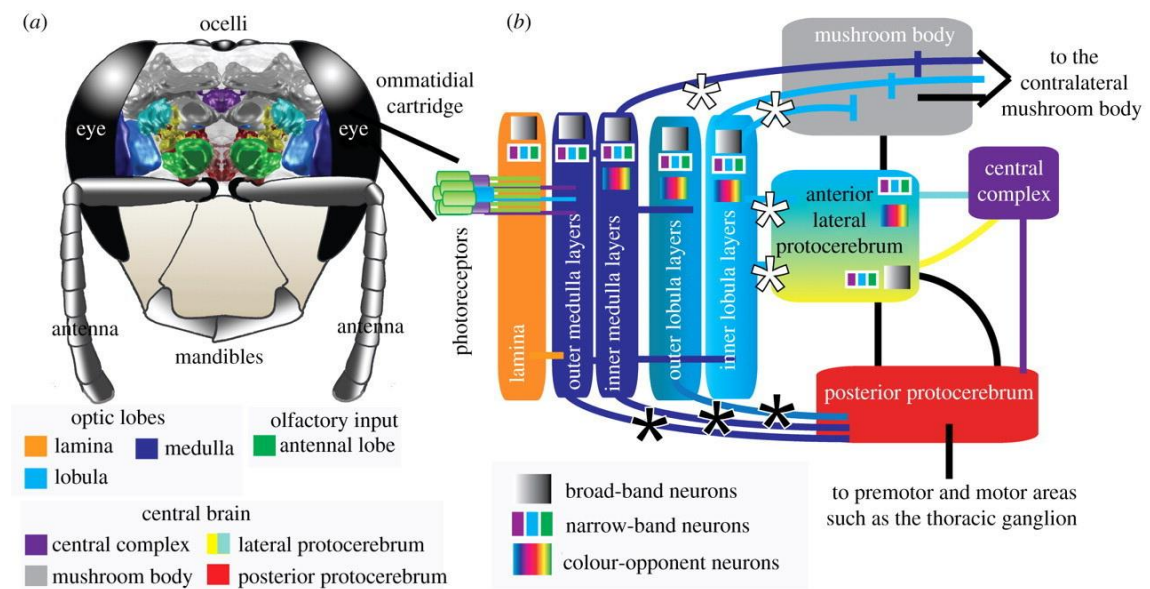


Figura 3. O cérebro da abelha (a) As regiões cerebrais (b) Regiões cerebrais relacionadas ao processamento visual cromático e acromático são indicadas. Modificado de Dyer et al., 2011.

A medula é a segunda neurópila visual, a qual recebe informações provenientes tanto das células monopolares da lâmina, quanto dos receptores S e M. Estudos realizados através de registros intracelulares de neurônios mostraram que nas camadas internas da medula ocorrem respostas neuronais com oposição cromática, indicando a primeira região de processamento cromático da via Óptica (Kien e Menzel, 1977; Dyer et al., 2011). Foram registrados pelo menos 10 tipos de oposição cromática em neurônios da medula, 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 1975; Bicker et al., 1987; Ehmer e Gronenberg 2002). As camadas externas da medula respondem principalmente a estímulos acromáticos, sendo esta região relacionada ao processamento de movimento (Paulk et al., 2009).

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 45° e inibição para 135°).

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; Menzel 1999; Ehmer e Gronenberg 2002; Giurfa 2007; Paulk e Gronenberg 2008).

Os corpos pedunculados são estruturas notáveis que ocupam uma parte significativa do cérebro. Estas estruturas estão relacionadas à integração sensorial e desempenham um papel crucial na aprendizagem olfativa, visual e na formação de memórias (Menzel, 1999; Giurfa e Sandoz, 2012). Notavelmente, esses corpos aumentam de tamanho em abelhas forrageadoras, uma variação associada às demandas impostas pela aprendizagem espacial e navegação (Withers et al., 1993).

Cada corpo pedunculado é dividido em duas subunidades de entrada: o cálice lateral e o cálice mediano. O cálice, por sua vez, é subdividido em três regiões, com cada região recebendo uma entrada sensorial específica (labelo para entrada olfativa, colar para entrada visual e anel basal para entrada olfativa e mecanossensorial) (Mobbs, 1982). Os neurônios de entrada visual que se conectam ao colar são segregados no cálice (Mobbs, 1984; Ehmer e Gronenberg, 2002). Em abelhas, os principais estímulos aferentes visuais recebidos pelos corpos pedunculados estão envolvidos em processamento cromático (Gronenberg 1986; Mauelshagen 1993; Ehmer e Gronenberg 2002; Menzel e Manz 2005; Paulk e Gronenberg 2008). As regiões de saída dos corpos pedunculados se encontram nos lobos alfa e beta, que surgem da fusão dos cálices mediano e lateral. Os neurônios de saída respondem a diversos tipos de estímulos sensoriais, sem mostrar preferência sensorial por região específica (Grünewald, 1999).

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., 2009; 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, 2009; 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 o complexo central (Homberg, 1985; Avarguès-Weber e Mota 2016).

O complexo central, uma área cerebral essencial, atua como um centro de integração para informações visuais. Desempenha o papel de uma bússola interna durante a navegação, especialmente em relação à luz polarizada presente no céu, embora ainda haja incertezas sobre como controla a orientação do animal durante a navegação (Homberg et al., 2011; Heinze, 2017). Além disso, processa informações visuais diretas e indiretas (Pfeiffer e Homberg, 2014). Assim, acredita-se que o complexo central esteja envolvido nas etapas finais de integração visual e visuo-motora.

1.7.2 Via Ocular

Os fotorreceptores existentes nas retinas Oculares (fotorreceptor S e L) enviam a informação visual para os neurônios que compõem a via Ocular. As entradas visuais recebidas pelos ocelos são projetadas pelos neurônios para regiões cerebrais como a lobos ópticos, protocérebro lateral, complexo central e centros motores torácicos. Esta via apresenta um sistema sensorial bem desenvolvido, sendo que os fotorreceptores dos ocelos são conectados a interneurônios, chamados de neurônios L e neurônios S (Pan, 1981). Os ocelos apresentam uma separação anatômica em sua retina, sendo que os axônios das células da retina dorsal e ventral se projetam em dois feixes nervosos anatomicamente separados à medida que passam pelo primeiro plexo sináptico, onde realizam contato com interneurônios (Pan e Goodman, 1977). Os interneurônios (neurônios S-small field) que se conectam aos axônios das células da retina ventral são pequenos e finos, porém numerosos. Já os interneurônios (neurônios L- large field) que se conectam a axônios das células receptoras provindas da retina dorsal são poucos, porém, estes interneurônios são grandes (Pan e Goodman, 1977). Estudos sugerem que nas abelhas há muito menos convergência de axônios fotorreceptores para interneurônios na retina Ocular ventral que olha para o céu, em comparação com a retina dorsal olhando para o horizonte

(Ribi et al., 2011). Estes interneurônios se projetam para várias neurópilas no cérebro central: alguns dos neurônios grandes se projetam para a vertente posterior, enquanto outros se conectam nos centros motores torácicos; enquanto os neurônios mais finos se projetam em uma série de outras neurópilas alvo, incluindo o complexo central (Pan e Goodman, 1977, Guy et al., 1979, Milde, 1984).

Os axônios de interneurônios L formam um feixe nervoso e entram na parte caudal da região medial do cérebro. Os neurônios L (interneurônios de primeira ordem) possuem grandes diâmetros axonais, sendo considerados os maiores interneurônios do cérebro das abelhas. Os neurônios L podem ser agrupados de acordo com sua localização, havendo os neurônios L mediano, laterais e descendentes (Figura 4). Registros intracelulares mostram que estes neurônios respondem a luz estacionária de campo amplo com padrões de atividade com ou sem pico. Os neurônios L descendentes são considerados neurônios com pico. Neurônios L mediano exibe padrões de resposta com pico e sem pico e os neurônios L laterais não obtiveram registros de descarga pura (Milde, 1987). Potenciais regenerativos foram encontrados em todos os tipos de neurônios L (Milde, 1984).

Os neurônios L possuem certas particularidades, uma vez que podem mudar seu potencial de membrana para valores mais negativos ou positivos, mesmo sem estimulação luminosa, indicando que as resposta com e sem pico podem estar presentes na mesma célula. No entanto, as propriedades de membrana destes neurônios ainda não são bem conhecidas. O padrão de resposta pode alterar inclusive se o estímulo for repetido, indicando que estes neurônios apresentam plasticidade, sendo mais complexo uma classificação tradicional deste tipo de neurônio (Milde 1984, 1987). Estudos sugerem que os neurônios L apresentam um mecanismo peculiar, que permite a uma célula nervosa transportar informações diferentes dependendo do estado em que ela se encontra (com pico ou sem pico), sugerindo que dependendo do tipo de sinal esta célula pode distribuir diferentes informações para diferentes alvos pós-sinápticos (Milde, 1987). Quando respondem a estimulações, apresentam sensibilidade espectral relativa com picos em 340 e 500nm, indicando características de neurônio de banda larga (Milde 1984), sendo assim, os neurônios L codificam informações acromáticas.

Uma das contribuições sugeridas relacionada a via Ocular é o seu papel no controle de atitude da cabeça em torno dos eixos de rotação e inclinação, fazendo uso das diferenças de intensidade de luz entre os hemisférios celeste e terrestre (Goodman, 1987). Durante o vôo, acredita-se que as rotações em torno do eixo do corpo (rolamento) sejam codificadas por mudanças no brilho da imagem experimentadas pelos ocelos laterais, enquanto as mudanças na

inclinação do eixo do corpo (inclinação) são codificadas pelo ocelo mediano (Goodman, 1987). A abelha possui 5 pares de interneurônios Ocelares de primeira ordem que vão diretamente da retina Ocular aos gânglios torácicos (Pan e Goodman, 1977; Milde, 1984, Goodman, 1981; Hung e Ibbotson, 2014). São neurônios relacionados a estabilidade do voo e a maioria de seus dendritos estão conectados às retinas dorsais dos ocelos laterais. Dos cinco neurônios L descendentes (Figura 5), quatro (LD1, LD2, LD4, LD5) estão conectados as retinas dorsais dos ocelos laterais e um envia ramos finos para a retina ventral dos ocelos laterais (DL3). LD1 também envia dendritos finos para a área limítrofe entre a retina ventral e dorsal do ocelo mediano (Hung e Ibbotson, 2014). Foi demonstrado que LD1, responde a outras entradas, incluindo a luz no olho composto e a uma variedade de estímulos mecanossensoriais (Milde, 1984), sendo esta conexão de neurônios associada ao controle do curso. O neurônio Ocelar LD2 é direcionalmente sensível ao movimento de campo amplo relacionado ao olho composto frontal (Goodman, 1987). Este neurônio, no ocelo esquerdo, mostrou estar sintonizado ao movimento vertical ascendente do olho composto lateral esquerdo, não havendo resposta ao movimento do olho composto direito (Goodman, 1987). Assim, este neurônio também é considerado um exemplo das configurações de estímulo extremamente precisas das fibras descendentes relacionadas a estabilização do curso em abelhas.

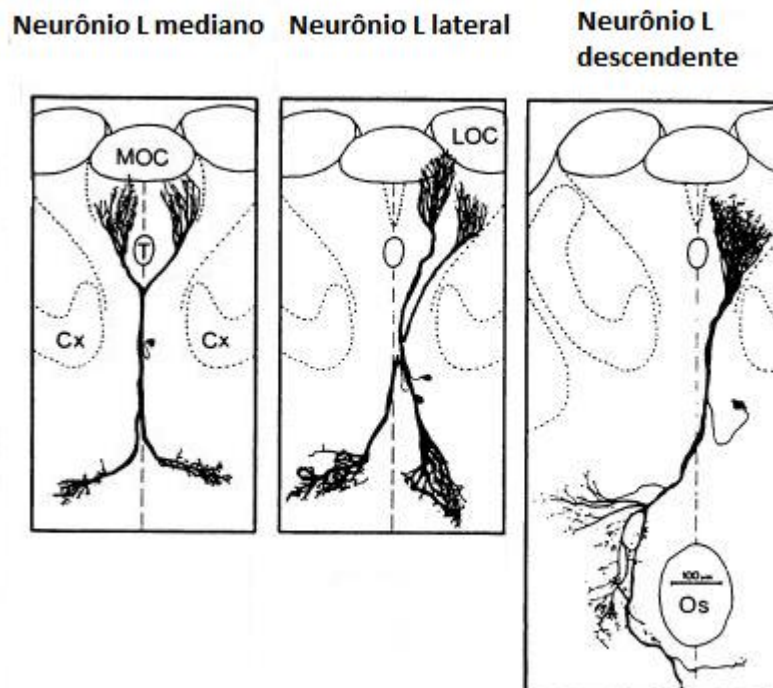


Figura 4. Neurônios Ocelares L. Representação dos tipos anatômicos de neurônios L encontrados nos ocelos, sendo mostrado os neurônios L mediano, laterais e descendentes. A ilustração omite os terminais dos neurônios no tórax. Cx = Cálice; LOC = ocelo esquerdo; MOC = ocelo mediano; Os = esôfago. Modificado de Milde, 1981.

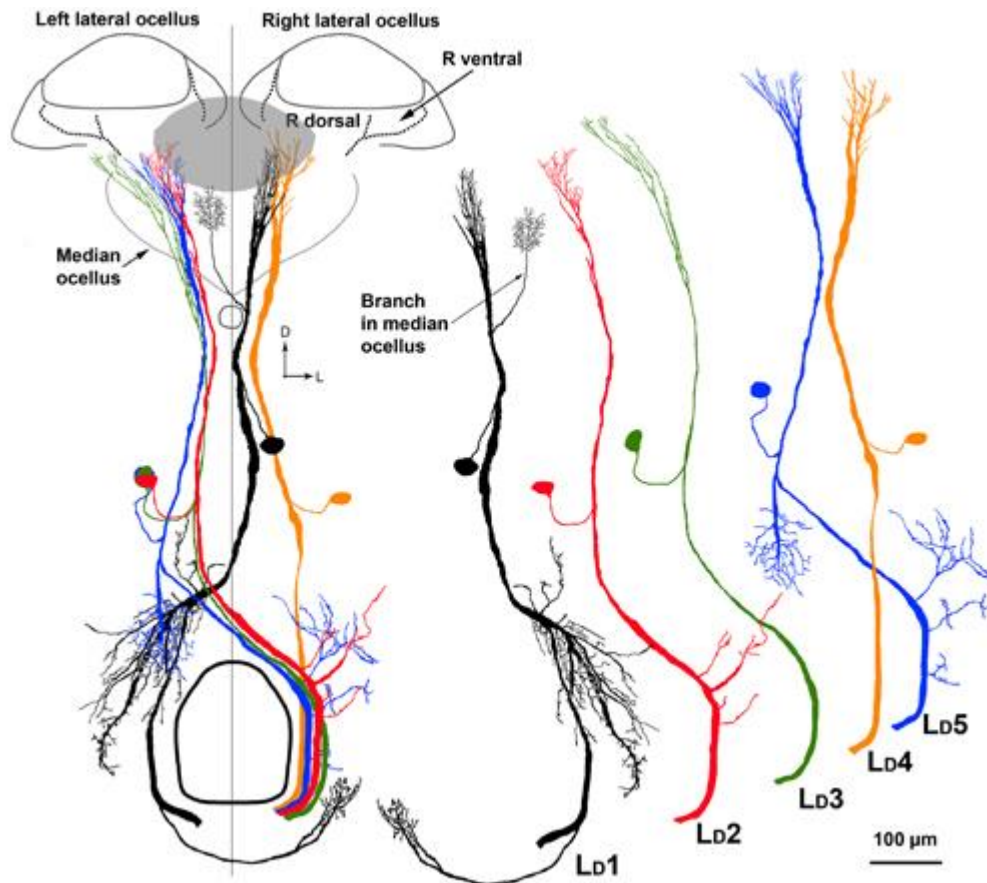


Figura 5. Neurônios Ocelares L descendentes. Ilustração mostrando a esquerda a relação entre os cinco neurônios LD em relação uns aos outros e às retinas Ocelares. A mancha cinza mostra a localização da retina dorsal do ocelo mediano. À direita estão desenhos individuais dos cinco tipos de células. Barra de escala = 100 µm. Modificado de Hung e Ibbotson, 2014.

Os neurônios S possuem conexão entre a retina Ocelar com a medula e a lóbula (regiões dos lobos ópticos da via Óptica) (Goodman, 1981), com extensas especializações pré-sinápticas na região de saída da lóbula e da camada interna da medula. Nesta via (figura 6) as células descendem seus axônios até a ponte protocerebral, viram-se para fora através do protocérebro mediano e lateral, e projetam-se anteriormente ao redor da lóbula e na camada interna da medula (Garcia et al., 2017), uma região cerebral considerada um centro-chave de processamento de cores para adaptação de sinais neurais à entrada de estímulos (Paulk et al., 2009). Da mesma forma, o soma de um dos neurônios S foi encontrado posteriormente ao corpo central, outra região do cérebro relacionada ao processamento do sinal de cor nas abelhas (Garcia et al., 2017). Observações neuroanatômicas confirmam que os neurônios S recebem informações das retinas

Ocelares ventrais, que têm visão direta do céu, sugerindo sua capacidade de fornecer informações aos centros de processamento de cores. Os pesquisadores Garcia et al., 2017 sugerem, baseado em modelagem matemática, que a detecção de mudanças na proporção de radiação de comprimento de onda curto e longo, típica em condições comuns de luz do dia, é uma função fundamental dos ocelos. Assim, essa via contribuiria para a percepção da constância de cores (capacidade de perceber cor, independente das mudanças de intensidade luminosa no ambiente) (Chittka et al., 2014). Logo, é possível sugerir que possa haver modulação do processamento da informação juntamente à via Óptica.

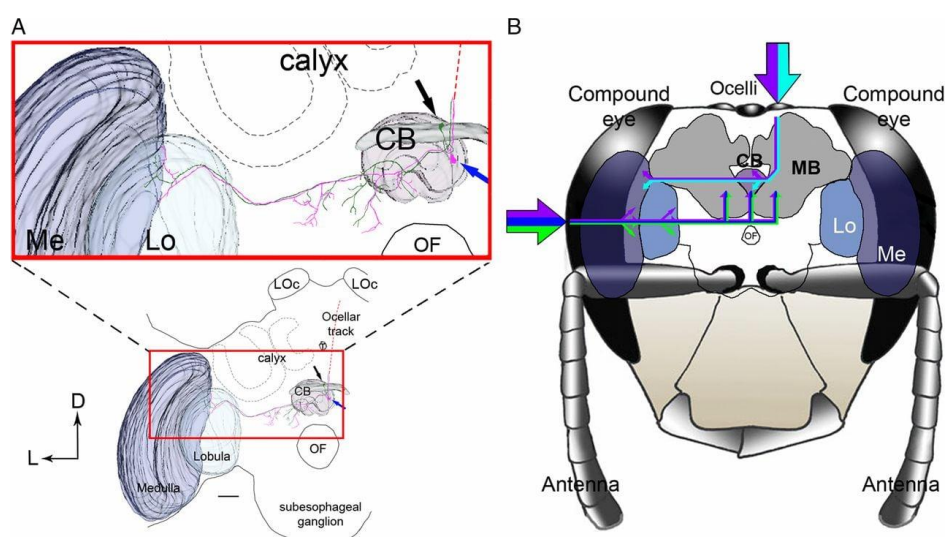


Figura 6. Diagrama esquemático das vias de cores sugeridas no cérebro da abelha. (A) Reconstruções 3D dos dois interneurônios Ocelares das abelhas melíferas (traços roxos e verdes; vista posterior) e dos centros de processamento de cores [medula (Me), lóbula (Lo), ocelo lateral (LOc), forame esofágico (OF), corpos pedunculados (MB) e o corpo central (CB)] no cérebro da abelha melífera. (B) A figura representa dois neurônios S que se projetam lateralmente aos lobos ópticos. Os neurônios S descem dentro da via Ocelar (linha tracejada vermelha) posteriormente ao CB e têm seus axônios colaterais no protocérebro mediano e lateral posterior, bem como na camada interna da Me. Modificado de Garcia et al., 2017.

1.8 Interações entre vias Óptica e Ocelar

O mesencéfalo posterior aparenta ser o local de interação das vias Óptica e Ocelar, apresentando comissuras ópticas que conectam as neurópilas visuais dos olhos compostos, bem como tratos ópticos que saem da lobula (Mobbs, 1984) aos neurônios L que arborizam o mesencéfalo posterior, local onde se originam os dendritos dos neurônios descendentes. Assim, é sugerido que neste local possa ocorrer contato sináptico entre as duas vias do sistema visual, de maneira direta ou indireta por meio de um interneurônio local. Estimulações realizadas neste

interneurônio local (Milde, 1987) mostram que esta célula responde a estimulações providas tanto dos olhos compostos, quanto dos ocelos. A interação de estimulações entre as vias Óptica e Ocelar mostram diferença no tempo de latência das respostas (Guy et al., 1987) onde o neurônio descendente responde primeiro ao sinal Ocelar, sugerindo posterior modulação da entrada do sinal proveniente da via Óptica. Os axônios dos interneurônios Ocelares se estendem também para centros de processamento de ordem superior, como o protocérebro e complexo central (Pan e Goodman, 1977).

Os experimentos realizados na presente tese pretendem esclarecer as funções das distintas estruturas visuais, dos diferentes fotorreceptores e de mecanismos neurais subjacentes às duas vias neurais paralelas neste comportamento visuomotor das abelhas.

2. OBJETIVOS

Os experimentos realizados na presente tese de doutorado têm como objetivo:

2.1. Objetivo geral

Avaliar a modulação da resposta de fototaxia positiva por distintos fotorreceptores em duas vias neurais paralelas associadas aos olhos compostos e ocelos da abelha *Apis mellifera*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar como estímulos visuais monocromáticos (UV, azul e verde) que excitavam o pico de absorção de cada tipo de fotorreceptor (S, M e L) presente nas estruturas visuais das abelhas modulam a fototaxia positiva das abelhas (Capítulo 1).
- Investigar como a intensidade luminosa modula a fototaxia para cada um dos estímulos visuais monocromáticos que ativam seletivamente o pico de cada receptor (Capítulo 1).
- Analisar como o comprimento de onda e a intensidade modulam a distância, o tempo, e a tortuosidade das trajetórias fototáticas desencadeadas pela via Óptica, pela via Ocelar ou pelas duas vias combinadas através de cada canal fotorreceptor (Capítulo 1).
- Testar a orientação fototática de abelhas em labirintos de dupla escolha apresentando pares de estímulos monocromáticos em abelhas submetidas à oclusão seletiva das vias Óptica ou Ocelar (Capítulo 2).

- Testar a orientação fototática de abelhas em labirintos de dupla escolha apresentando um estímulo monocromático contra misturas policromáticas contendo este elemento em abelhas submetidas à oclusão seletiva das vias Óptica ou Ocular (Capítulo 2).
- Avaliar a linearidade ou não-linearidade do processamento fototático ao combinar fótons absorvidos simultaneamente pelos distintos fotorreceptores em cada uma das vias neurais paralelas (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

**Sensibilidade espectral da fototaxia positiva desencadeada pelas
vias fototáticas Ocular e Óptica em *Apis mellifera***

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Respostas fototáticas são desencadeadas em abelhas quando expostas à luminosidade espectral compreendida entre o UV e o verde, sugerindo a participação dos três fotorreceptores (S, M e L). Os parâmetros de estímulo que influenciam a resposta são principalmente a intensidade de luz e o comprimento de onda ou composição espectral (Menzel e Greggers, 1985). Na literatura, há divergências com relação à contribuição dos fotorreceptores neste processo. 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 (Bertholf, 1931; Sander, 1933; Heintz, 1959; Kaiser et al., 1977).

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 fotorreceptor M. Os pesquisadores 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. Por outro lado, a maior resposta fototática observada para a luz UV em muitos estudos (Sander, 1933; Heintz, 1959; Kaiser et al., 1977) apenas poderia ser explicada pelo envolvimento de receptores S neste comportamento. 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). 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.

Estudos avaliando a associação entre a capacidade de resposta aos estímulos gustativos e a capacidade de resposta aos estímulos visuais (fototaxia) em uma arena circular (Erber et al., 2006) mostram que abelhas forrageadoras apresentam resposta fototática dependente da intensidade luminosa para o comprimento de onda verde (560nm). Estes pesquisadores relatam que quanto maior a intensidade luminosa apresentada, menor a distância percorrida, menor o tempo e maior a velocidade para as abelhas alcançarem os estímulos visuais. Este estudo não avaliou outros comprimentos de onda nos experimentos realizados.

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. Até o momento, nenhum estudo avaliou de maneira individual o papel de cada uma destas estruturas visuais.

Este estudo busca preencher estas lacunas examinando as contribuições dos fotorreceptores S, M e L por meio de estimulações com luzes monocromáticas correspondentes aos picos de absorção dos fotorreceptores da abelha. Além disso, avaliaremos o impacto do comprimento de onda e da intensidade luminosa nas respostas moduladas pelos fotorreceptores e circuitos subjacentes contidos na via Óptica e na via Ocular.

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 em caixas de madeira com boa ventilação disponibilizando água e solução de sacarose 30%. Os animais foram coletados às 8 horas da manhã durante 4 estações do ano subsequentes. Foram transportadas ao laboratório em caixas de isopor contendo papel toalha umedecido com água. Os animais descansaram por uma hora em uma câmara escura e úmida, contendo papel toalha umedecido. Logo após, cada abelha foi individualizada em um frasco de vidro e anestesiada até cessarem seus movimentos, colocando os frascos em gelo. Logo após este procedimento anestésico, as abelhas foram fixadas em tubos eppendorf e fixadas no mesmo com fita crepe inserida na região da nuca do animal para submissão aos tratamentos de oclusão de estruturas visuais, conforme descrito a seguir.

2.2 Grupos experimentais

As respostas de fototaxia positiva para diferentes luzes monocromáticas foram analisadas em três grupos experimentais independentes (Figura 7):

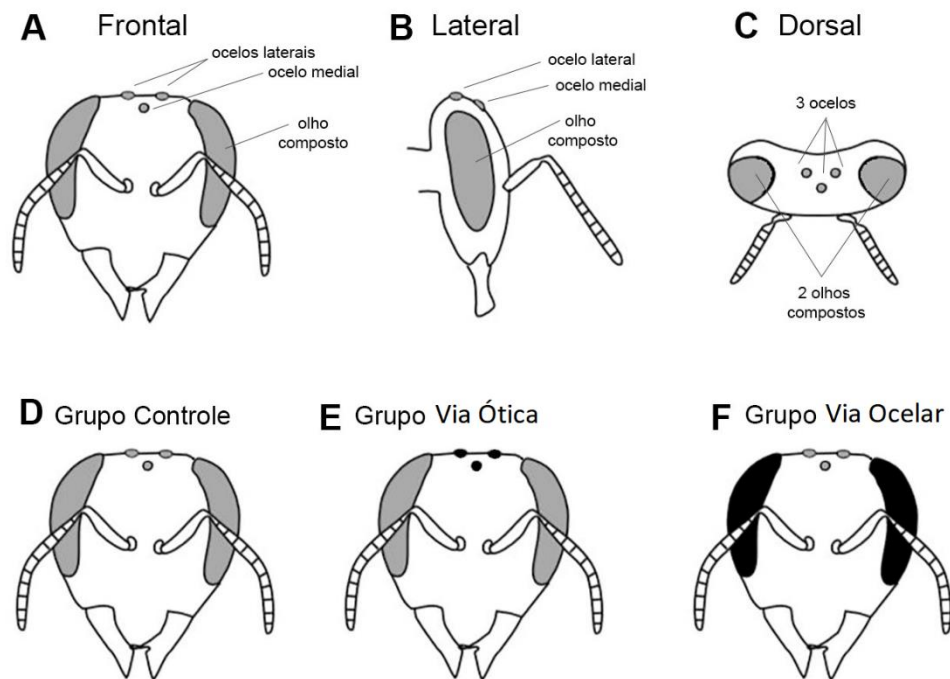


Figura 7. Grupos experimentais. Órgãos visuais periféricos da abelha *Apis mellifera* e grupos experimentais utilizados para estudo da função dos mesmos na resposta de fototaxia positiva. A) Vista frontal da cabeça. B) Vista lateral da cabeça. C) Vista dorsal da cabeça. Os dois olhos compostos e os três ocelos (dois laterais e um medial) estão destacados em cinza. D) Grupo controle: animais intactos, sem oclusão de nenhuma estrutura visual. E) Grupo Via Ótica: animais submetidos à oclusão dos três ocelos, mantendo os olhos compostos intactos. F) Grupo Via Ocular: animais submetidos à oclusão dos dois olhos compostos, mantendo os ocelos intactos. A oclusão de estruturas visuais está indicada em preto.

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 Via Ótica: animais anestesiados, fixados e submetidos à oclusão dos três ocelos dorsais.

c) Grupo Via Ocular: animais anestesiados, fixados e submetidos à oclusão dos dois olhos compostos.

A oclusão de órgãos visuais nos grupos b) e c) foi realizada com a tinta acrílica preta fosca (Hobby Acrylic Paint, HCF-06 Flat Black Basic) 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.

2.3 Arena experimental

Um dispositivo foi desenvolvido para medir a intensidade da resposta fototática em abelhas no laboratório, baseando-se nos trabalhos de Erber et al. (2006) e Scheiner (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. Parâmetros como a distância percorrida, tempo e velocidade da trajetória podem então ser utilizados como medida de intensidade da resposta fototática. Até o momento, apenas luzes de cor verde foram utilizadas neste tipo de dispositivo, demonstrando-se que quanto maior é a intensidade luminosa da luz verde, maior é a intensidade da resposta fototática (Erber et al., 2006).

A figura 8 ilustra a configuração geral do dispositivo. A arena possui diâmetro interno de 35 cm e altura de 1 cm; em suas paredes laterais há 12 orifícios para encaixe de LEDs monocromáticos. 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.

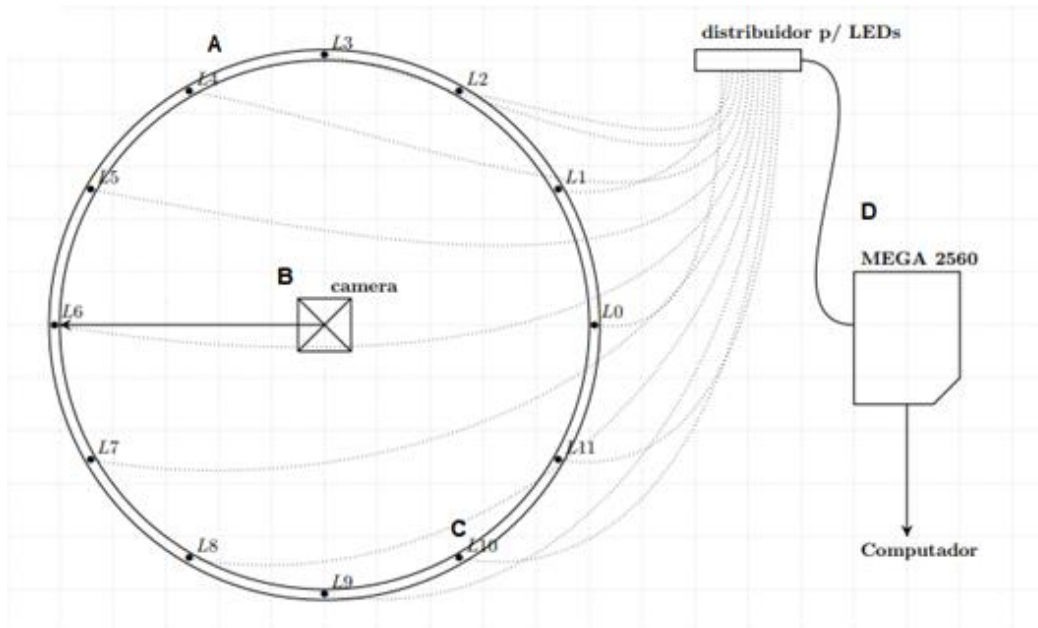


Figura 8. Setup experimental. (A) Arena circular, (B) Câmera filmadora, (C) Local de inserção dos LEDs monocromáticos (D) Arduino.

2.4 Estímulos visuais

Foram utilizados LEDs monocromáticos com picos de emissão (Figura 9) 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). 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 Óptica (QP600-2-UV-VIS, OceanOptics) acoplada a um corretor de coseno com material de difusão espectral (CC-3-UV-S, OceanOptics). O software SpectraSuite (OceanOptics) foi utilizado para aquisição e análise das curvas espectrais. Cada LED monocromático foi calibrado inicialmente a uma irradiância máxima de $12,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ (Figura 9). 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 à $0.4\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, $0.8\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, $1.5\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, $3\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$, $6\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$ e $12.5\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$,

respectivamente). O experimento foi realizado em uma sala escura. Para cada estímulo visual (UV, azul ou verde) o N experimental foi de 10 abelhas para cada grupo (controle, via Óptica e via Ocular), totalizando 90 animais.

Realizamos um grupo controle com a oclusão total das estruturas visuais (olhos compostos pintados e ocelos pintados) afim de averiguar se ocorria orientação fototática por meio de outros sistemas sensoriais que não fosse as estruturas visuais avaliadas, bem como para verificarmos se a tinta utilizada foi capaz de realizar a oclusão visual das abelhas com eficácia. Foram feitos testes pilotos na arena circular com N de 10 abelhas expostas aos 3 estímulos luminosos monocromáticos calibrados em duas intensidades distintas (1,5 e $6\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$). As abelhas apresentavam movimento locomotor, porém não demonstraram atração fototática em direção a luz. Estes dados não foram analisados por não apresentarem resposta fototática.

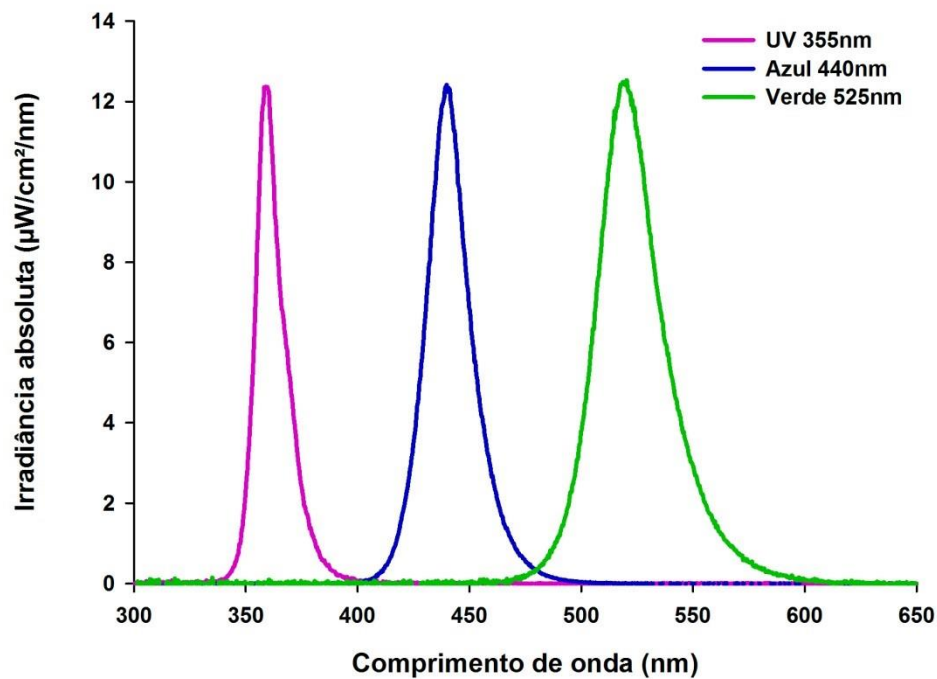


Figura 9. Curvas de irradiância absoluta dos três LEDs utilizados para medidas de resposta fototática em arena circular no escuro. A figura mostra os picos de emissão dos LEDs UV (355 nm), azul (440 nm) e verde (525 nm) calibrados na irradiância máxima testada (100% de intensidade- $12,5\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$).

2.5 Análise de imagem

As filmagens realizadas no escuro utilizando uma câmera de infravermelho (modelo SJCAM4000 + holofote IR) foram analisadas no MATLAB© (versão R2019b), utilizando a extensão *ZebTrack* (versão 2.6.1), desenvolvida por Pinheiro-da-Silva et al. (2017). Os parâmetros analisados nas trajetórias utilizando esta extensão foram a distância percorrida e o tempo de trajeto. Além disso, utilizamos um código complementar desenvolvido por nossa equipe em ambiente MATLAB para analisar o ângulo de desvio do animal em cada frame, em relação ao vetor linear traçado entre a cabeça da abelha e a posição do estímulo visual.

2.6 Análise estatística

Para entender como a intensidade e os comprimentos de onda da luz influenciavam o comportamento fototático das abelhas melíferas em diferentes grupos experimentais (controle, via Óptica e via Ocelar), construímos modelos lineares mistos (LMM). A distância (cm) e o tempo (s) dos trajetos fototáticos até o estímulo luminoso foram considerados variáveis resposta, enquanto a intensidade de luz e o comprimento de onda variáveis preditoras fixas. O id da abelha foi inserido nos modelos como variável aleatória.

Visando uma compreensão da dinâmica de tortuosidade das abelhas em suas trajetórias durante a orientação fototática em direção a estímulos espectrais distintos, desenvolvemos alguns LMM para avaliarmos os efeitos do comprimento de onda, intensidade e distância do estímulo luminoso em relação a tortuosidade do animal (ângulo de desvio em grau/frame) de um caminho reto. Para isso, consideramos como variável resposta o ângulo de desvio, como variável preditoras fixas o comprimento de onda, intensidade e distância da luz e o id das abelhas como variável aleatória.

Para avaliarmos a contribuição dos olhos e/ou ocelos no comportamento fototático, comparamos a distância e o tempo gasto por abelhas que foram submetidas aos diferentes tratamentos. Para essas comparações construímos modelos lineares (LM) comparando os diferentes grupos óticos (controle, Óptica e Ocelar) em uma mesma intensidade ($3 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$) para cada comprimento de onda. Para isso, usamos a distância e o tempo como variável resposta e os tratamentos como variável preditora.

Quando necessário, foi realizado comparações planejadas entre os tratamentos usando o pacote multcomp.

Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team 2018). Os pacotes lme4 (Bates et al., 2015) e multcomp (Hothorn et al., 2016) foram usados para desenvolver LMM, LM e comparações planejadas. As figuras foram produzidas no software R, utilizando o pacote ggplot2 (Wickham, 2011).

3 RESULTADOS

A figura 10 representa exemplos de uma única trajetória fototática em estimulações monocromáticas azul, UV ou verde. Trajetórias do grupo Controle representado em A, B e C; grupo Via Óptica D, E e F e grupo Via Ocular G, H e I. Pontos indicam a posição da abelha a cada 5 segundos.

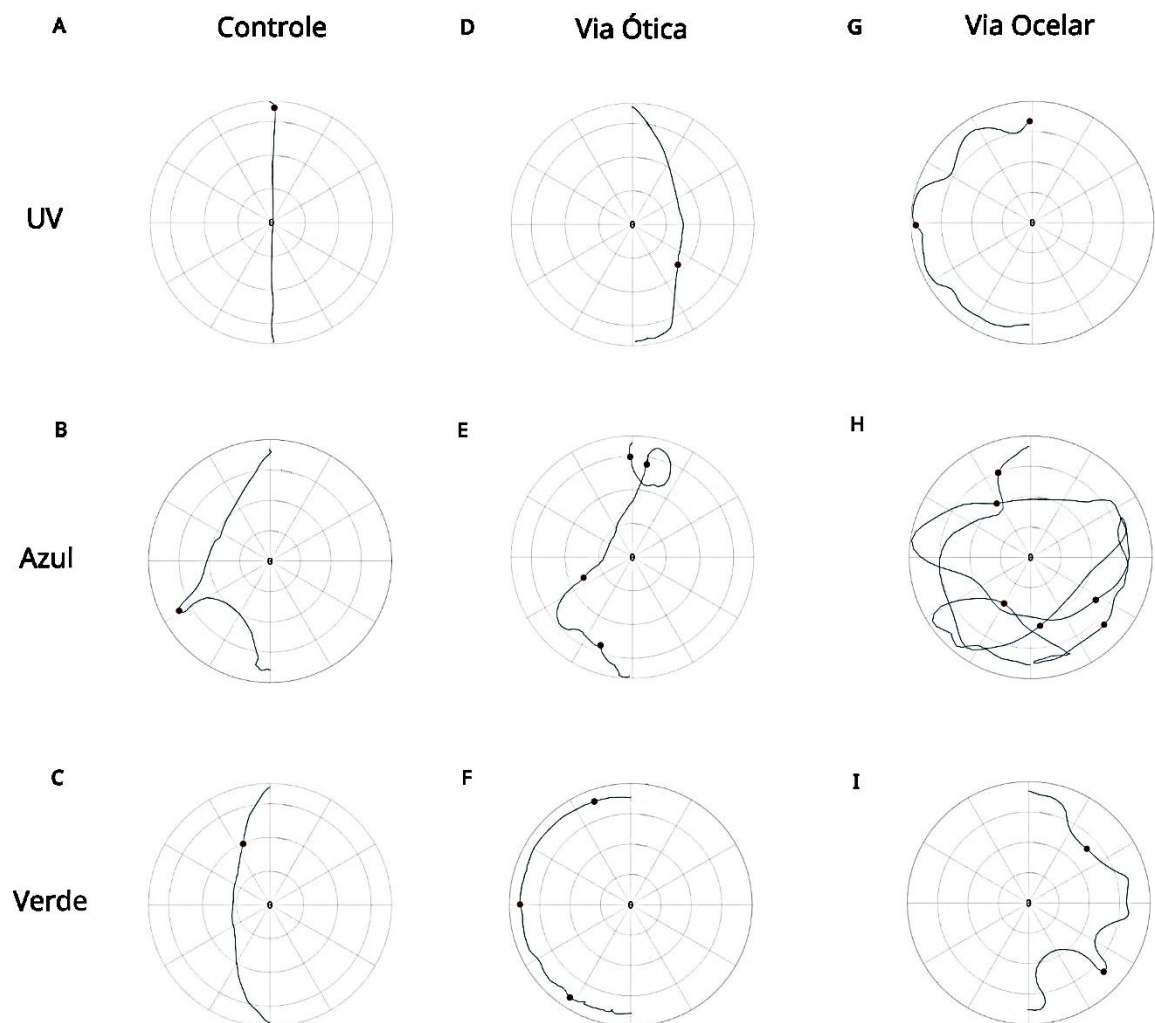


Figura 10. Exemplos de uma única trajetória para os estímulos monocromáticos UV (A, D e G), AZUL (B, E e H) e verde (C, F e I). Trajetórias do grupo controle representado em A, B e C; grupo Via Óptica D, E e F e grupo Via Ocular G, H e I. Pontos indicam a posição da abelha a cada 5 segundos.

A distância percorrida (Figura 11A) e o tempo gasto (Figura 11D) pelas abelhas do Grupo Controle até os estímulos luminosos foram influenciados tanto pelo comprimento de onda (LMM; Distância: $\chi^2 = 27$, $gl=12$, $p=0,006$; Tempo: $\chi^2 = 26$, $gl=12$, $p=0,008$) como pela intensidade de luz (LMM; Distância: $\chi^2 = 48$, $gl=15$, $p= p<0,001$; Tempo: $\chi^2 = 43$, $gl=15$, $p<0,001$), havendo interação entre essas duas variáveis (LMM; Distância: $\chi^2 \lambda * \text{intensidade de luz} = 19$, $gl=10$, $p=0,03$; Tempo: $\chi^2 \lambda * \text{intensidade de luz} = 22$, $gl=10$, $p=0,01$). Dessa forma, ao se deslocarem para os estímulos UV e verde, as abelhas fizeram percursos mais curtos e em menor tempo do que quando elas caminham em direção ao estímulo azul (Teste de comparações planejadas; Figura 11 A e D; Distância: $p<0,001$ e $p=0,02$; Tempo: $p=0,001$ e $p=0,01$; respectivamente). Além disso, a distância percorrida e o tempo gasto pelas abelhas entre os pares de LEDs UV e verde não diferiram (Teste de comparações planejadas; Figura 11 A e D; $p=0,1$ e $p=0,4$; respectivamente). À medida que a intensidade luminosa aumentava, diminuía significativamente a distância de deslocamento até os estímulos UV e azul, mas não o estímulo verde (Teste de comparações planejadas; Figura 11 A; $p<0,05$ para ao menos um par de intensidades para estímulos UV e azul; $p=0,3$ para estímulo verde). Já o tempo de deslocamento diminuiu significativamente com o aumento da intensidade luminosa de todos os três estímulos monocromáticos (Teste de comparações planejadas; Figura 11D; $p<0,05$ para ao menos um par de intensidades para estímulos UV, azul e verde).

A distância (Figura 11B) e o tempo (Figura 11E) das trajetórias de abelhas do Grupo Via Óptica também foram influenciados tanto pelo comprimento de onda (LMM; Distância: $\chi^2 = 11$, $gl=2$, $p=0,003$; Tempo: $\chi^2 = 30$, $gl=12$, $p=0,002$) como pela intensidade de luz (LMM; Distância: $\chi^2 = 15$, $gl=5$, $p=0,009$; Tempo $\chi^2 = 44$, $gl=15$, $p<0,001$). Contudo, só houve interação entre essas duas variáveis quando analisamos o tempo, mas não a distância das trajetórias (LMM; Distância: $\chi^2 \lambda * \text{intensidade de luz} = 17$, $gl=10$, $p=0,07$; Tempo: $\chi^2 \lambda * \text{intensidade de luz} = 28$, $gl=10$, $p=0,001$). Ao se deslocar para a luz UV, as abelhas deste grupo experimental fizeram percursos mais curtos (Figura 11 B) do que quando se movem em direção às luzes azul e verde (Teste de comparações planejadas; $p=0,004$ e $p<0,001$; respectivamente). Por outro lado, a distância percorrida pelas abelhas em direção aos estímulos azul e verde não diferiu significativamente (Teste de comparações planejadas; Figura 11 B; $p=0,5$). Além disso, o tempo gasto pelas abelhas ao se deslocarem para as luzes UV, azul e verde (Figura 11 E) também não diferiu (Teste de comparações planejadas; $p>0,05$ em cada comparação par a par). Embora seja possível observarmos pelas inclinações das retas que à medida que a intensidade luminosa aumentava, diminuía a distância do percurso (Figura 11 B) e o tempo gasto pelas

abelhas (Figura 11 E) nas trajetórias fototáticas, esse efeito apenas foi significativo para o comprimento de onda UV 350 nm (LMM; Distância: $\chi^2 = 21$, gl=5, $p < 0,001$; Tempo: $\chi^2 = 26$, gl=5, $p < 0,001$).

Como descrito para os demais grupos, a distância percorrida (Figura 11 C) e o tempo gasto (Figura 11 F) pelas abelhas melíferas do Grupo Via Ocular até os estímulos luminosos também foram influenciados pelo comprimento de onda (LMM; Distância: $\chi^2 = 30$, gl=12, $p = 0,002$; Tempo: $\chi^2 = 29$, gl=12, $p = 0,003$) e pela intensidade de luz (LMM; Distância: $\chi^2 = 25$, gl=15, $p = 0,03$; Tempo: $\chi^2 = 31$, gl=15, $p = 0,008$), havendo interação entre essas duas variáveis (LMM; Distância: $\chi^2 \lambda * \text{intensidade de luz} = 21$, gl=10, $p = 0,01$; Tempo: $\chi^2 \lambda * \text{intensidade de luz} = 21$, gl=10, $p = 0,01$). Ao se deslocam para as luzes UV e verde, as abelhas deste grupo fazem percursos mais curtos (Figura 11 C) do que quando se movem em direção à luz azul (Teste de comparações planejadas; $p < 0,001$ em ambas as comparações). Além disso, as distâncias das trajetórias fototáticas (Figura 11 C) foram similares para as luzes UV e verde (Teste de comparações planejadas; $p = 0,3$). O tempo gasto pelas abelhas do Grupo Via Ocular (Figura 11 F) foi menor para as trajetórias em direção à luz verde, seguido pela luz azul e por fim, a luz UV (Teste de comparações planejadas; $p < 0,05$ em cada comparação par a par). Embora haja um efeito estatístico geral da intensidade luminosa na distância percorrida e tempo gasto pelas abelhas em direção a todos os estímulos luminosos, esse efeito não é significativo quando analisamos separadamente as inclinações da reta para os diferentes pares de LEDs (Figura 11 C e F).

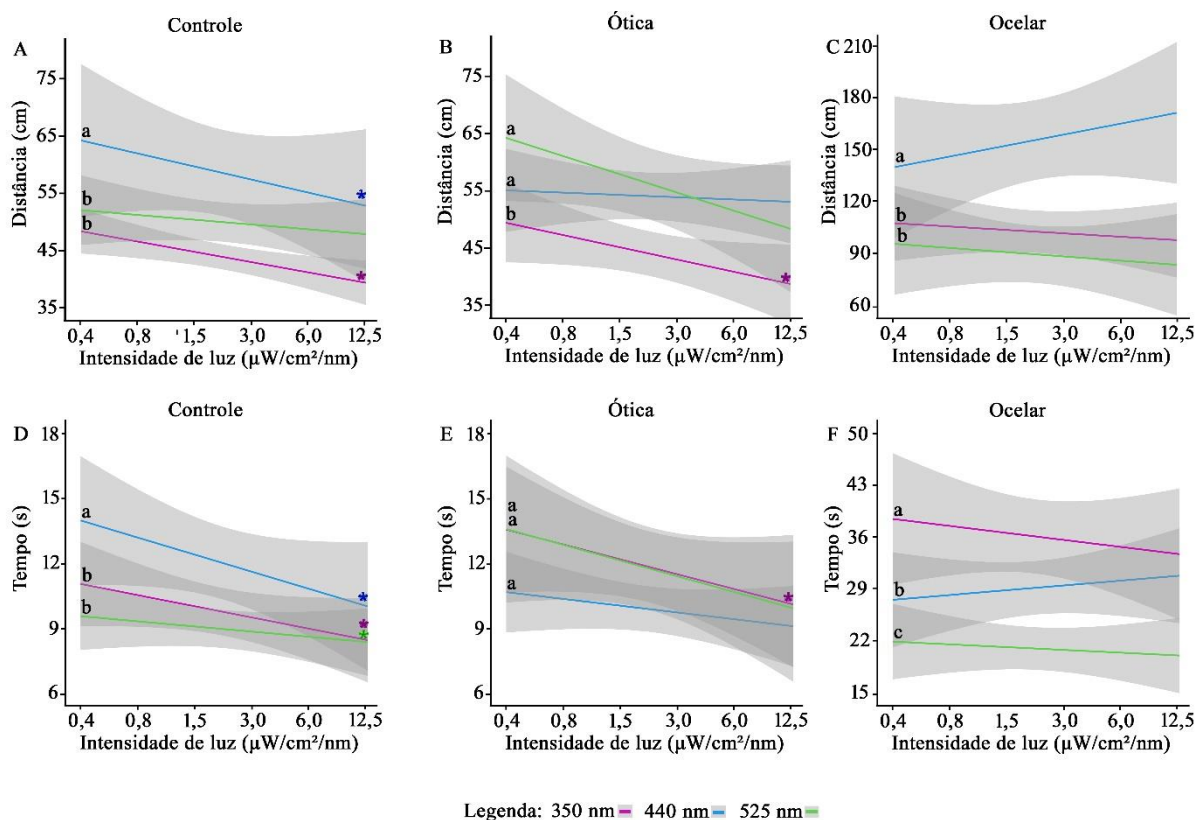


Figura 11. Distância percorrida e Tempo gasto por abelhas *A. mellifera* avaliando o efeito da intensidade da luz e do comprimento de onda em cada tratamento. (A) Distância percorrida para o grupo Controle. (D) Tempo gasto no trajeto para o grupo Controle. (B) Distância percorrida para o grupo Via Óptica. (E) Tempo gasto no trajeto para abelhas do grupo Via Óptica. (C) Distância percorrida para o grupo Via Ocular. (F) Tempo gasto pelas abelhas nos trajetos fototáticos do grupo Via Ocular. Linha roxa: 350 nm, linha azul: 440 nm, linha verde: 525 nm. As áreas sombreadas em cinza representam o desvio padrão da média. As letras indicam a diferença estatística entre os comprimentos de onda. Os asteriscos indicam quando há efeito significativo da intensidade de luz em um determinado comprimento de onda.

Nos três tratamentos óticos estudados, Controle (LMM; $\chi^2_{\text{cor}^* \text{distância}}=49$, gl=2, $p<0,001$), Via Óptica (LMM; $\chi^2_{\text{cor}^* \text{distância}}=21$, gl=2, $p<0,001$) e Via Ocular (LMM; $\chi^2_{\text{cor}^* \text{distância}}=11$, gl=2, $p=0,003$), o ângulo de desvio ao longo do percurso diminuiu à medida que as abelhas se aproximavam dos estímulos luminosos (Figura 12 A, C e E). O mesmo acontece nos três grupos quando a intensidade de luz aumenta, Controle (LMM; $\chi^2_{\text{cor}^* \text{distância}}=65$, gl=10, $p<0,001$), via Óptica (LMM; $\chi^2_{\text{cor}^* \text{distância}}=65$, gl=10, $p<0,001$) e via Ocular (LMM; $\chi^2_{\text{cor}^* \text{distância}}=129$, gl=10, $p<0,001$) (Figura 12 B, D, F). Abelhas dos grupos Controle (Figura 12 A) e Via Óptica (Figura 12 C) fizeram trajetórias fototáticas menos tortuosas quando se deslocaram em direção aos estímulos luminosos de cor UV do que azul e verde (Teste de comparações planejadas; Controle: $p<0,001$ para ambas as comparações; Via Óptica: $p<0,001$ para ambas as comparações). O mesmo padrão emergiu quando há um aumento de intensidade de luz (Figura

12 B e D). Não houve diferença na tortuosidade do percurso realizado pelas abelhas quando elas se deslocam para as luzes azul e verde (Teste de comparações planejadas; Figura 12 A e C; Controle: $p=0,99$; Via Óptica: $p=0,4$). Também não há diferença estatística entre abelhas que se deslocam para luzes azul e verde quando há aumento da intensidade luminosa (Teste de comparações planejadas; Figura 12 B e D; Controle: $p=0,4$; Via Óptica: $p=0,4$)

No grupo Via Ocular (Figura 12 E), as trajetórias foram menos tortuosas para a luz verde do que para a luz azul (Teste de comparações planejadas; $p=0,003$). Por outro lado, a tortuosidade do caminho feito pelas abelhas deste grupo (Figura 12 E) em direção à luz UV foi similar àquela observada para as luzes verde e azul (Teste de comparações planejadas; $p=0,12$ e $p=0,18$; respectivamente). À medida que a intensidade luminosa aumentava (Figura 12 F), o caminho feito pelas abelhas do grupo Via Ocular em direção à luz verde foi menos tortuoso do que em direção à luz azul (Teste de comparações planejadas; $p=0,003$). Por outro lado, a forma como a tortuosidade é modulada pelo aumento de intensidade luminosa (Figura 12 F) não diferiu significativamente entre as trajetórias em direção ao UV e aquelas dirigidas aos estímulos azul e verde (Teste de comparações planejadas; $p=0,12$ e $p=0,19$; respectivamente).

A Figura 13 compara a distância percorrida (A) e o tempo (B) das trajetórias fototáticas dos grupos Controle, Via Óptica e Via Ocular para os estímulos monocromáticos UV, azul e verde em uma mesma intensidade: $3 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. O tratamento ótico influenciou a distância percorrida (Figura 13 A) pelas abelhas em direção às luzes UV (LM; $F_{(2,26)}=17$, $p<0,001$), azul (LM; $F_{(2,25)}=4.5$, $p=0,02$) e verde (LM; $F_{(2,25)}=4.5$, $p=0,02$). As abelhas que pertenciam aos grupos Controle e Via Óptica fizeram percursos com menor distância em direção ao UV (Figura 13 A) do que as abelhas do grupo Via Ocular (Teste de comparações planejadas; $p=0,002$ e $p<0,001$; respectivamente). As distâncias percorridas pelas abelhas dos grupos Controle e Via Óptica em direção à luz UV foram similares (Teste de comparações planejadas; Figura 13 A; $p=0,5$). Resultados semelhantes foram observados nos trajetos das abelhas em direção à luz azul, com os grupos Controle e Via Óptica apresentando distâncias menores em relação ao grupo Via Ocular (Teste de comparações planejadas; Figura 13 A; $p<0,001$ para ambas as comparações), enquanto os grupos Controle e Via Óptica não diferiram (Teste de comparações planejadas; $p=0,8$). Abelhas do grupo Controle também fizeram trajetos mais curtos em direção à luz verde quando comparadas às abelhas do grupo Via Ocular (Teste de comparações planejadas; Figura 13; $p=0,008$). Contudo, a distância dos trajetos à luz verde (Figura 13 A) feitos por abelhas do grupo Via Óptica não diferiu daquela observada em trajetórias fototáticas

de abelhas dos grupos Controle e Via Ocular (Teste de comparações planejadas; $p=0,4$ e $p=0,06$; respectivamente).

O tratamento ótico também influenciou significativamente o tempo (Figura 13 B) que as abelhas gastam se deslocando em direção aos estímulos UV (LM; $F_{(2,28)}=11$, $p<0,001$), azul (LM; $F_{(2,26)}=10$, $p<0,001$) e verde (LM; $F_{(2,25)}=11$, $p<0,001$). Para todos esses três comprimentos de onda, as abelhas dos grupos Controle e Via Óptica se deslocaram com menor tempo até os estímulos luminosos (Figura 13 B) do que aquelas do Grupo Via Ocular (Teste de comparações planejadas; $p<0,05$ em todas as comparações). O tempo de deslocamento (Figura 13 B) não diferiu entre abelhas dos grupos Controle e Via Óptica para nenhum comprimento de onda (Teste de comparações planejadas; $p>0,05$ em todas as comparações).

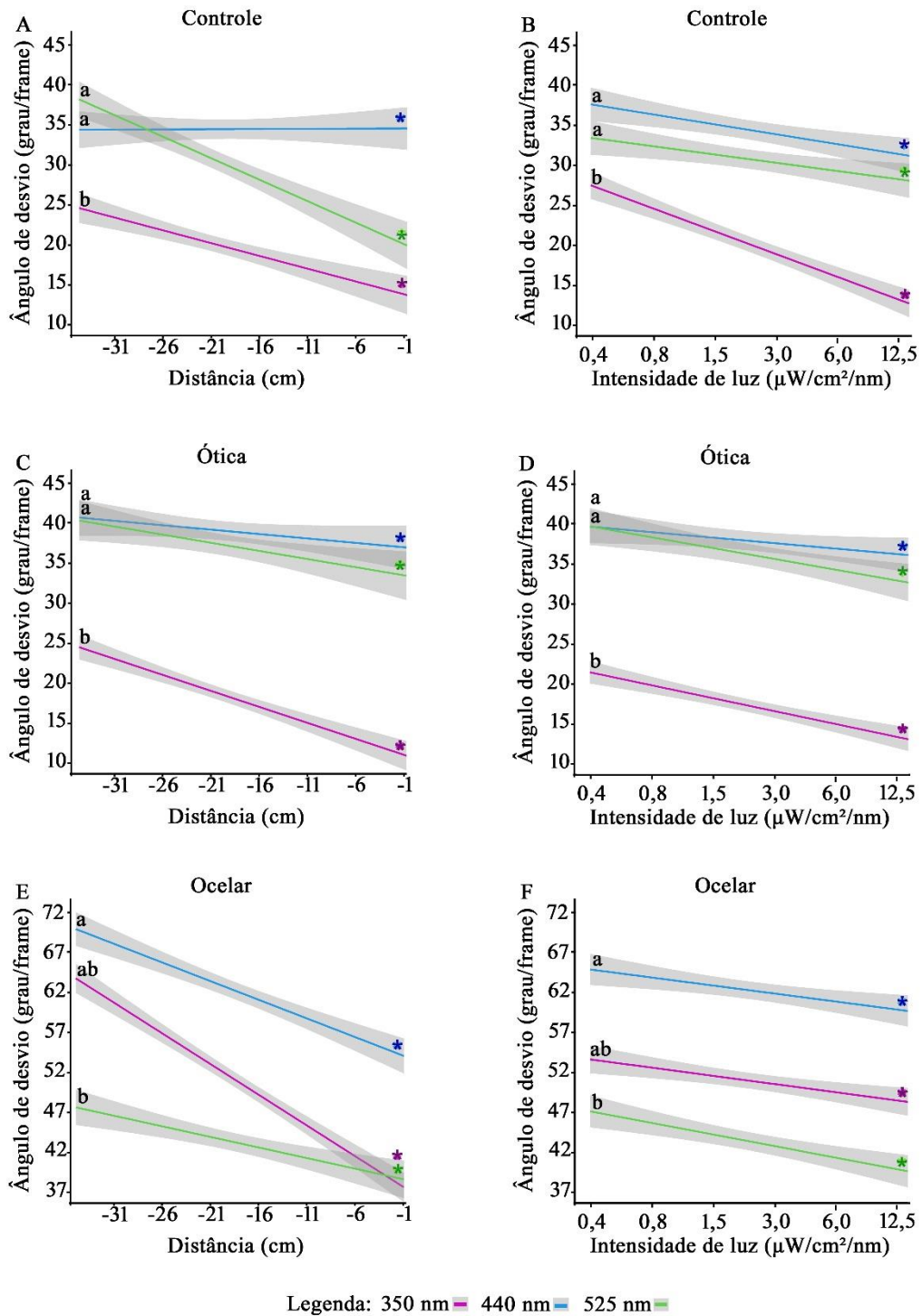


Figura 12. Dinâmica de tortuosidade dos animais em trajetórias fototáticas em direção aos estímulos monocromáticos UV, azul e verde apresentados em diferentes valores de irradiância absoluta. As figuras situadas a esquerda representam o ângulo de desvio entre o vetor velocidade e o vetor mais reto que aponta para o LED a diferentes distâncias (-35 a 0 cm) do estímulo luminoso, sendo (A) Grupo Controle, (C) Grupo Via Óptica e (E) Grupo Via Ocular. Figuras situadas a direita mostram o ângulo de desvio das abelhas durante o percurso em trajetórias fototáticas em direção a intensidades luminosas crescentes. (B) Grupo Controle (D) Grupo Via Óptica e (F) Grupo Via Ocular. Linha roxa: 350 nm, linha azul: 440 nm, linha verde: 525 nm. As áreas sombreadas em cinza representam o desvio padrão da média. Letras diferentes indicam a diferença estatística entre comprimentos

de onda. Os asteriscos indicam um efeito significativo da distância (A, C e E) ou intensidade da luz (B, D e F) em cada variável de resposta.

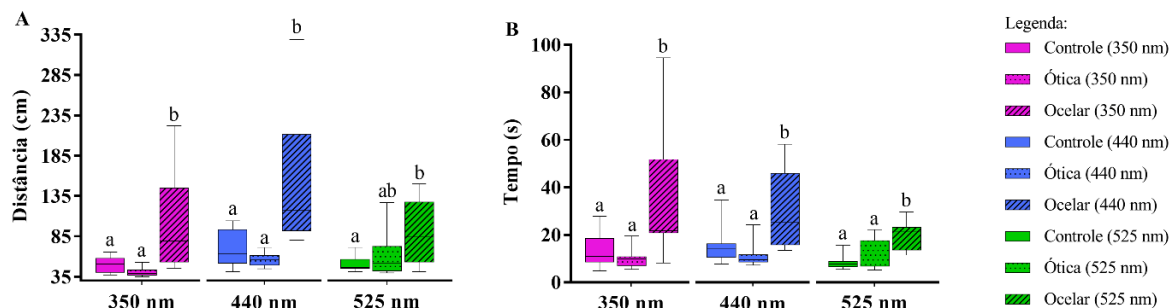


Figura 13. Distância percorrida e Tempo gasto para cada tratamento (Controle, via Óptica e via Ocular) quando exposto a diferentes comprimentos de onda durante as trajetórias fototáticas para uma mesma intensidade ($3 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$). (A) representa a Distância percorrida em trajetórias fototáticas e (B) o Tempo gasto pelas abelhas no percurso. Barra roxa: 350 nm, barra azul: 440 nm, barra verde: 525 nm. As letras representam as diferenças entre os grupos utilizados no tratamento.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que ambos os olhos compostos e os ocelos são capazes de guiar de forma independente a abelha até uma fonte de luz por fototaxia positiva. Nossos resultados sugerem a participação de todos os tipos de fotorreceptor (S, M e L) presentes nas estruturas visuais de abelhas *Apis mellifera* na modulação de suas respostas fototáticas, havendo diversas particularidades nas propriedades destas respostas visuomotoras em função do comprimento de onda, da intensidade luminosa, dos fotorreceptores e da via de processamento visual associada. Em geral, o grupo controle apresentou uma resposta fototática mais intensa para luzes que estimulam maximamente os fotorreceptores S e L, enquanto o grupo via Óptica apresentou fototaxia mais intensa para estimulação seletiva do fotorreceptor S. Em contrapartida, o grupo via Ocular apresentou respostas fototáticas mais intensas para estimulação seletiva do fotorreceptor L. Dessa forma, nossos dados indicam que os circuitos moduladores da fototaxia positiva de abelhas apresentam maior conexão a receptores tipo S na via Óptica, e maior conexão a receptores tipo L na via Ocular.

4.1 Estimulações monocromáticas específicas geram respostas fototáticas distintas em cada via de processamento visual

Neste 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 9), respectivamente (Peitsch et al., 1992). No grupo Controle, animais expostos à luz UV ou verde fizeram suas trajetórias fototáticas em distância e tempo menores do que animais expostos à luz azul (Figura 11A e 11D). Além disso, animais expostos à luz UV apresentaram menor grau de tortuosidade em suas trajetórias à medida que se aproximavam do LED, quando comparados aos animais expostos à luz azul ou verde (Figura 12A). Assim, animais do grupo Controle respondem a todas as estimulações monocromáticas testadas (UV, azul e verde), apresentando maior efetividade de atração fototática para as luzes UV e verde. Entretanto, é importante destacarmos que para o parâmetro tortuosidade, houve maior atração fototática para a estimulação monocromática UV. Estes resultados são coerentes com muitos autores que sugerem que ocorra participação de todos os fotorreceptores na resposta fototática de abelhas, porém o fotorreceptor tipo S que absorve luz na faixa do UV teria maior contribuição para tal resposta (Sander, 1933; Heintz, 1959; Kaiser et al., 1977). No entanto, como a distância percorrida e o tempo das respostas de animais expostos às luzes UV e verde não diferem estatisticamente, vemos que o fotorreceptor L também apresenta um papel importante na fototaxia de abelhas (Figura 11A e 11D). Esta constatação corrobora com Labhart (1974), o qual sugere que a resposta fototática de abelhas seja modulada apenas por fotorreceptores dos tipos S e L. Esta hipótese é plausível, se consideramos que o receptor L, e mesmo o S até certo ponto, podem ser estimulados de forma basal por luzes na faixa do azul (Figura 14), dependendo do comprimento de onda e largura de banda do estímulo.

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 14). Caso as respostas para a luz monocromática azul no nosso experimento fossem fruto apenas da estimulação de receptores L, as mesmas deveriam apresentar uma maior diferença em relação às respostas desencadeadas pela luz monocromática verde, a qual estimula de forma máxima estes receptores. Apesar disso, não encontramos diferenças significativas entre as respostas moduladas pela estimulação verde e azul no grupo Via Óptica (Figura 11B e 11E). Já para os parâmetros Distância percorrida e Tempo, encontramos diferenças significativas entre

estimulações verde e azul nos grupos Controle (Figura 11A e 11D) e Via Ocular (Figura 11C e 11 F). Estes resultados eram de certa forma esperados, pelo menos no grupo via Ocular, uma vez que não há fotorreceptores do tipo M para luz azul nos ocelos das abelhas (Goldsmith e Ruck 1958; Geiser e Labhart 1982; Hung e Ibbotson, 2014). A ausência de receptores do tipo M nos ocelos também deve ser a razão para as diferenças significativas na Tortuosidade das respostas fototáticas observadas para as luzes azul e verde no grupo Via Ocular (Fig; 12E e 12F), mas não nos demais grupos experimentais.

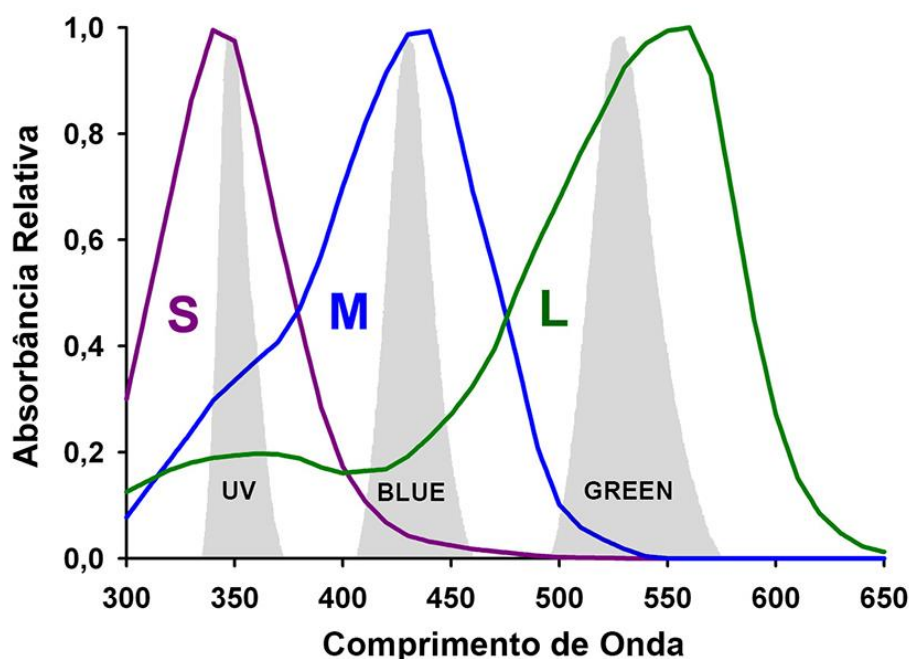


Figura 14: Curvas de sensibilidade espectral dos fotorreceptores e calibração dos LEDs. Curvas da sensibilidade espectral dos fotorreceptores da abelha (S, M e L) sobrepostas às curvas de calibração da irradiância absoluta dos LEDs utilizados no experimento (em cinza).

Os resultados encontrados neste trabalho também podem estar relacionados à proporção de fotorreceptores encontrados nas diferentes estruturas visuais das abelhas (Figura 1). Mais precisamente, três categorias de omatídeos nos 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; Spaethe e Briscoe 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 luz azul (M) é consideravelmente

menor nos órgãos visuais das abelhas, fato este que pode estar relacionado às respostas fototáticas significativamente menos pronunciadas para a luz azul em relação às luzes verde ou UV, observadas neste e em diferentes estudos anteriores (Heintz, 1959; Kaiser et al., 1977; Labhart, 1974; Vieira e colaboradores, 2018).

Nouvian e Galizia (2020) realizaram experimentos testando a fototaxia positiva de abelhas em um labirinto Y, a fim de investigar se este comportamento considerado a princípio inato poderia sofrer plasticidade em função de experiências associativas anteriores. Curiosamente, os autores mostraram que o condicionamento aversivo prévio, associando uma luz a um estímulo elétrico (choque), não influencia a atração fototática para a luz UV. No entanto, animais condicionados de forma aversiva à luz azul, demonstram certa plasticidade na resposta fototática, uma vez que se atraíram menos à luz azul em um contexto de condicionamento aversivo prévio. Este mesmo estudo também mostra que os animais expostos a testes de fototaxia em labirinto Y com apresentação simultânea de dois estímulos monocromáticos apresentam maior atração à luz UV, menor atração à luz azul e uma atração intermediária à luz verde, sendo estes resultados coerentes aos dados encontrados no presente estudo. Outro estudo (Marchal et al., 2019) também investigou a plasticidade fototática após a aquisição de associações de memória aversiva com a luz, e concluiu que estas associações apenas modificam a resposta fototática inata para o comprimento de onda azul. Em conclusão, estes estudos sugerem que as respostas fototáticas moduladas por receptor tipo M em abelhas são menos rígidas e mais lábeis do que aquelas moduladas pelos receptores S e L.

Ao compararmos as respostas fototáticas de animais que se orientam usando apenas os olhos compostos (grupo Via Óptica), as distâncias (Figura 11B) e as tortuosidades menores (Figura 12C) observadas nas trajetórias para a luz UV sugerem que o fotorreceptor S apresente uma contribuição majoritária na Via Óptica. Cabe ressaltar que os olhos compostos apresentam todos os três tipos de fotorreceptor e uma proporção muito maior de receptores tipo L do que tipo S (Wakakuwa et al., 2005; Spaethe e Briscoe 2005). Dessa forma, nossos resultados sugerem que nem todos os receptores tipo L dos olhos compostos das abelhas estão conectados aos circuitos de processamento visuomotor que comandam a fototaxia modulada pela Via Óptica, havendo pelo contrário, maior participação de receptores tipo S.

Estudos neuroanatômicos mostram que os fotorreceptores localizados na retina dos olhos compostos enviam projeções para regiões distintas dos lobos ópticos das abelhas (Srinivasan 2012). Fotorreceptores tipo L enviam suas projeções para a primeira neurópila visual, denominada lâmina, a qual está envolvida exclusivamente em processamento

acromático, como intensidade luminosa, contraste e movimento (Kaiser, 1975; Srinivasan e Lehrer, 1988; Srinivasan e Braren, 1989; Giurfa e Menzel, 1997; Spaethe et al., 2001; Chittka e Tautz, 2003). Já projeções axônicas dos fotorreceptores tipo S e M cruzam a lâmina e arborizam-se diretamente na segunda neurópila visual, denominada medula (Dyer et al., 2011). Esta estrutura, além de receber projeções da lâmina (processamento acromático), também apresenta neurônios com oposição espectral, sendo esta uma propriedade característica do processamento cromático (Kien e Menzel 1977; Hertel et al., 1978; Yang et al., 2004, Paulk et al., 2009). Nouvian e Galizia (2020) sugerem que as distintas respostas fototáticas a comprimentos de onda diferentes poderiam envolver vias paralelas para processamento acromático e cromático nos circuitos moduladores de fototaxia, mas deixam claro que mais experimentos são necessários para investigar melhor esta questão.

Animais que se orientavam apenas com os ocelos (grupo Via Ocelar) apresentaram trajetórias com menores tempos (Figura 11F) e tortuosidades (Figura 12E) para o estímulo verde, em relação aos demais estímulos monocromáticos. Assim, sugerimos que o fotorreceptor L possui maior contribuição na resposta fototática modulada pela Via Ocelar do que o fotorreceptor S. O fato da estimulação monocromática UV desencadear um maior tempo de trajeto em relação às outras luzes (Figura 11F) nos mostra que os animais foram mais lentos quando estimulados exclusivamente através dos fotorreceptores tipo S dos ocelos, indicando a existência de propriedades temporais distintas no processamento visual envolvendo este receptor. Uma vez que nos ocelos não existem fotorreceptores tipo M (Velarde et al., 2005), os resultados encontrados para estimulação com luz azul são fruto basicamente da estimulação basal dos fotorreceptores tipo L (Figura 14), o que é coerente com as respostas fototáticas menos intensas ao azul que ao verde no grupo Via Ocelar.

Comparando os diferentes grupos experimentais, o grupo Via Ocelar apresentou trajetórias fototáticas muito mais longas e duradouras do que os demais tratamentos, para todas as estimulações monocromáticas (Figura 13). Curiosamente, a única exceção ocorreu para estimulação com luz verde, a qual não desencadeou diferenças significativas nas distâncias dos trajetos fototáticos entre o grupo Via Óptica e o grupo Via Ocelar (Figura 13A). Estes resultados reforçam que a contribuição de receptores L para a resposta fototática mediada pelos ocelos é extremamente forte, pois a mesma não diferiu daquela mediada pelos receptores L dos olhos compostos, ainda que a área de fotorrecepção, a sensibilidade e a acuidade deste órgão visual sejam muito maiores que a dos pequenos ocelos.

4.2 Diferentes níveis de irradiância promovem atrações fototáticas distintas

A intensidade luminosa afetou significativamente as respostas fototáticas das abelhas, de forma que quanto maior é a intensidade da luz monocromática, maior tende a ser a magnitude desta resposta visuomotora. Este efeito fica especialmente nítido quando comparamos as Tortuosidades dos trajetos fototáticos para seis intensidades distintas, e vemos que para todas as três luzes (UV, azul e verde), em todos os grupos (Controle, Via Óptica e Via Ocular), a tortuosidade decai significativamente com o aumento da intensidade luminosa (Figura 12B, 12D e 12F). Além disso, o tempo gasto no trajeto se torna menor conforme o aumento da intensidade luminosa para todas as luzes monocromáticas testadas em abelhas do Grupo Controle (Figura 11D). Estudos prévios em *Apis mellifera* já haviam demonstrado o efeito da intensidade luminosa na fototaxia modulada por luz verde (Erber et al 2006), enquanto nosso estudo é o primeiro a estudar de forma bem controlada o efeito da irradiância luminosa na fototaxia mediada por luz UV ou azul. Assim, concluímos que a fototaxia de abelhas é fortemente modulada pela intensidade luminosa em todos os três canais fotorreceptores: S, M e L.

Experimentos usando misturas de cores sugerem que a visão de cores e a orientação fototática por preferência espectral são processos mediados por vias neurais independentes em abelhas (Menzel e Greggers, 1985). Estes autores buscaram testar essa hipótese usando não apenas luzes monocromáticas, mas também misturas policromáticas destas luzes em 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. Sugeriu-se que a magnitude deste comportamento para uma determinada luz seja mediada pelo somatório total dos fótons absorvidos por cada tipo de fotorreceptor estimulado, o que seria responsável por um claro efeito da intensidade total de luz na magnitude da atração fototática (Menzel e Greggers, 1985).

Como dito anteriormente, é sabido que o fotorreceptor L está majoritariamente envolvido no processamento de informações acromáticas. Seguindo esta linha, muitos estudos fototáticos testaram apenas comprimentos de onda verde ou branco em estudos sobre fototaxia de abelhas (Erber et al., 2006). Nossos resultados, junto com os de outros estudos recentes (Marchal et al., 2019; Nouvian e Galizia 2020), reforçam a participação de receptores S e M, juntamente aos receptores L, na fototaxia de abelhas. Mais estudos são ainda necessários para

avaliar se o processamento visual envolvendo a fototaxia é unicamente acromático, ou também poderia conversar com vias de processamento cromático.

4.3 Processamento cromático e acromático em circuitos de fototaxia

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 o presente trabalho, assim como diversos estudos, corrobore com a participação destes três tipos de fotorreceptor para resposta fototática de abelhas, ainda não está claro se ocorre envolvimento da visão de cores no comportamento fototático destes animais (Heintz, 1959; Kaiser et al., 1977; Menzel e Greggers, 1985; Nouvian e Galizia 2020). Na mosca *Drosophila*, experimentos de preferência espectral revelaram que a resposta fototática em relação ao UV é significativamente aumentada pela presença de luz visível, sugerindo um efeito de contraste de “cor” no comportamento de preferência espectral (Schümperli, 1973, Fischbach, 1979). Gao et al 2008 realizou experimentos em *Drosophila melanogaster*, onde indivíduos mutantes para *ort* (canal ionotrópico controlado por histamina) exibiram defeitos na detecção de movimento e tiveram a resposta fototática diminuída para estimulações UV ou verde comparado ao tipo selvagem. Semelhante aos resultados obtidos neste estudo, o grupo selvagem exibiu maior resposta fototática para estimulações UV do que verde, de forma dependente da intensidade.

Gao et al. (2008) sugerem que os canais cromáticos e acromáticos em *Drosophila* não são segregados, mas se convergem para os interneurônios de primeira/segunda ordem no início da via visual. Investigando a via cromática de processamento espectral UV, este grupo sugeriu duas vias de processamento da luz UV: a primeira envolve sinapses diretas de fotorreceptores R7s para neurônios de projeção Tm5; a segunda envolve uma via indireta de R7 para neurônios Dm8 e depois para Tm5. Esta segunda via foi identificada como responsável pela preferência à luz UV em ensaios fototáticos, onde neurônios Dm8 agem como detectores de luz UV de baixa intensidade em ambiente iluminado, e também como detector de movimento (processamento acromático). Em paralelo, a via direta para Tm5 seria responsável pelo processamento de luz UV de alta intensidade, responsável por integrar essa luz às vias cromáticas. A visão de cores tricromática das abelhas é sabidamente iniciada a partir de inputs de receptores S, M e L dos olhos compostos que se convergem na segunda neurópila visual, medula, a qual apresenta distintos circuitos de oposição espectral (Dyer et al. 2011). Visto que a resposta fototática de

abelhas parece também combinar input dos três fotorreceptores no nível da medula, porém não há indícios claros de oponência espectral nesta resposta visuomotora, sugere-se que uma via paralela de processamento acromático combinando input dos três canais também exista na medula (Menzel and Greggers, 1985). Enquanto essa hipótese não é confirmada, neurônios chamados de células monopolares da lâmina, os quais conectam inputs dos receptores L na lâmina aos inputs de receptores S e M na medula (Menzel, 1974), apresentam respostas lineares ao somatório de luzes provenientes dos três canais. Assim, estes neurônios são potenciais candidatos para a integração de informação em uma via acromática de processamento fototático (Menzel and Greggers, 1985).

Cabe ressaltar que, enquanto os olhos compostos se conectam a vias de processamento cromático, não existem estudos que comprovem a participação efetiva dos ocelos em vias de processamento cromático e talvez nem sequer sejam envolvidos em formação de imagem (Hung e Ibbotson, 2014). Logo, as respostas fototáticas observadas no grupo Via Ocelar, as quais são moduladas de forma mais intensa pela luz verde e pelo receptor L associado (e.g. Figura 12F), não envolvem a priori qualquer tipo de processamento cromático. Neste sentido, é importante ressaltar 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).

Hung et al. (2013) realizou um estudo de neurônios descendentes associado a via visuomotora, e concluiu que embora este processamento seja acromático, envolve a entrada de fotorreceptores S e L. Neste estudo o autor destaca que não descarta a possibilidade de que as respostas geradas por comprimento de onda curto (estimulações a 380nm) tenham sido fruto da estimulação basal do fotorreceptor L, no entanto, abre uma discussão a respeito do possível processamento visuomotor acromático envolvendo o fotorreceptor S. O autor ainda investiga o papel dos olhos compostos e ocelos na resposta visuomotora por meio da oclusão seletiva da via Ocelar, e conclui que os olhos compostos parecem fornecer entrada via fotorreceptores S e L, enquanto os ocelos fornecem uma contribuição prioritária dos fotorreceptores L, envolvidos na detecção de incrementos de brilho verde. Curiosamente, nosso estudo sobre orientação fototática também indica uma participação maior de fotorreceptores L do que de fotorreceptores S dos ocelos nesta resposta visuomotora.

Neste estudo, desenvolvemos metodologias eficazes para estudar no laboratório o comportamento de fototaxia positiva das abelhas a luzes de distintas composições espectrais,

bem como o papel de distintas vias neurais (Ocelar e Óptica). Estas metodologias poderão ser agora combinadas a técnicas de neurofarmacologia, neurofisiologia ou biologia molecular, a fim de aprofundarmos nossa compreensão sobre o papel de diferentes fotorreceptores, neurotransmissores e circuitos neurais específicos na modulação da fototaxia positiva em abelhas. 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 em abelhas (Thamm et al., 2010; Sheiner et al., 2014). Estudos futuros deverão avaliar melhor o papel e a localização destes neurotransmissores nas vias de processamento fototático de abelhas.

CAPÍTULO 2

Interação de distintos fotorreceptores e processamento de misturas cromáticas nas vias fototáticas Ocular e Óptica de *Apis mellifera*

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Conforme descrito no Capítulo anterior, o processamento fototático em abelhas envolve a interação de circuitos neurais conectados aos diferentes tipos de fotorreceptores presentes nos olhos compostos e ocelos destes animais. No entanto, o processamento neural dos circuitos conectados a fototaxia positiva ainda não são bem esclarecidos. No que diz respeito à codificação da resposta fototática em abelhas, encontramos na literatura apenas um estudo relacionado. Os autores Menzel e Greggers, 1985 realizaram um experimento para investigar se o processamento fototático envolvia processamento acromático ou cromático. Os autores concluíram que a resposta fototática ocorre de maneira puramente linear, ou seja, os animais são mais atraídos à processamentos que adicionam luminosidade ao ambiente do que a codificação de cores (processamento não-linear). No entanto estes autores não testaram todos os comprimentos de onda que as abelhas detectam na resposta fototática, avaliaram apenas estímulos monocromático verde versus mistura de cores. Em *Drosophila melanogaster* (Diptera) a resposta fototática envolve presença de contraste de cores, uma vez que as essas moscas são mais atraídas à luz monocromática UV do que a mistura de cores, indicando processamento cromático na fototaxia (Fischbach, 1979).

No que diz respeito a codificação da informação visual em abelhas nas vias Óptica e Ocular, poucos estudos investigaram o processamento espectral dos neurônios conectados aos fotorreceptores dos ocelos. Sabe-se que os neurônios Oculares L são neurônios de banda larga, logo processam informações acromáticas (Milde, 1984). No entanto, não existe estudos que investigaram a codificação neural da informação visual provinda dos neurônios Oculares S.

No que diz respeito a via Óptica, a codificação de cores e luminância é bem descrita em abelhas. Estudos eletrofisiológicos encontraram neurônios que codificam estímulos cromáticos e acromáticos, demonstrando que ocorre uma segregação do processamento visual em abelhas (Kien e Menzel, 1977; Dyer et al., 2011, Paulk et al., 2008, Yang e Hung, 2004). Estes estudos descreveram três tipos de neurônios relacionados a codificação da informação visual nos lobos ópticos das abelhas, encontrados principalmente na medula e na lobula. Os neurônios de banda larga respondem a luz de todo o espectro, sugerindo que recebem entrada de dois ou três tipos de neurônios. Os neurônios de banda estreita respondem a comprimentos de onda limitado a sensibilidade de um tipo de fotorreceptor. Os neurônios oponentes da cor são excitados por alguns comprimentos de onda e inibidos por outros (Yang e Hung, 2004). Estudos anteriores relacionam os neurônios de banda larga à codificação de informações acromáticas

(luminosidade) (Menzel, 1979; Menzel, 1985), enquanto os neurônios de banda estreita e oponentes de cor codificam sinais cromáticos (processam as cores) (Dyer et al., 2011).

No nível neural, diversos neurônios de oponência cromática já foram descritos na medula, lobula e áreas do protocérebro lateral (Dyer et al. 2011). Estes neurônios são excitados por uma faixa de comprimento de onda e inibidos por outra faixa (Menzel & Blakers, 1976; Hertel, 1982; Paulk et al. 2009), respondendo assim de forma não linear às combinações de faixas de comprimento antagônicas (Menzel & Blakers, 1976; Hertel, 1982; Paulk et al. 2009; Dyer et al. 2011; Mota et al. 2013). Na abelha *Bombus terrestris*, neurônios com oponência cromática registrados intracelularmente no protocérebro anterior ao serem estimuladas por uma mistura de cores contendo violeta, azul e verde, por exemplo, apresentam inibição da resposta neuronal em relação à resposta para a luz azul pura (Paulk et al., 2009). Em *Apis mellifera*, as respostas de circuitos do tubérculo ótico registradas por imaging de cálcio frente a apresentações de mistura de azul e verde mostraram efeitos hipoaditivos (equivalentes) ou supressivos (menores) em relação às respostas ao verde puro (Mota et al. 2013). Enquanto efeitos de oponência cromática já foram extensivamente estudados e modelizados em estudos psicofísicos e cognitivos sobre percepção de cores em abelhas (Backhaus 1991; Hempel de Ibarra et al. 2014), nosso estudo é o primeiro a demonstrar que abelhas podem apresentar respostas visuomotoras indicando efeitos de oponência no contexto de fototaxia positiva.

Afim de investigar o processamento fototático em abelhas, analisamos a orientação espectral destes animais, avaliando a ocorrência de processamento linear ou não-linear. Se as vias relacionadas a percepção fototática processam a informação visual de um elemento monocromático versus mistura de cores como um processamento elementar, cada componente é processado separadamente. O processamento elementar também pode ser chamado de processamento linear. Nesse caso, quanto maior a quantidade de fótons captada pelos fotorreceptores, maior a resposta fototática (sinergia). Assim, para situações nas quais os animais processam a intensidade luminosa, a mistura de cores se torna mais atrativa do que o único elemento monocromático. Estudos anteriores relacionam o processamento linear, no contexto da exposição de animais a estímulos visuais monocromático ou mistura de cores, como um processamento acromático, uma vez que a excitação de neurônios de banda larga (que processam a informação acromática) ocorre por meio da entrada de dois ou mais canais receptores (Fischbach, 1979; Coombe 1981; Menzel e Greggers, 1985; Mota et al., 2013). Os canais receptores podem se complementar, permitindo que as abelhas detectem com mais

eficácia a intensidade da luz em ambientes variados. Isso é particularmente útil para avaliar diferenças de luminância e ajustar seu comportamento.

Caso as vias relacionadas a visão codifiquem a informação fototática de exposição a mistura de cores como um elemento único, diferente da soma dos elementos, considera-se a percepção como processamento configuracional. Este também pode ser chamado de processamento não-linear. Assim, animais que são expostos a um elemento visual monocromático versus mistura de cores processam informação cromática ao apresentarem atração maior para o estímulo monocromático (supressão), ou quando não ocorre diferença de atração nesse contexto de exposição a dois estímulos visuais (hipoaditividade) (Fischbach, 1979; Coombe 1981; Menzel e Greggers, 1985; Mota et al., 2013). Considerando que a percepção cromática envolve processamento por neurônios oponentes da cor ou neurônios de banda estreita, o animal que percebe a cor apresenta padrão de resposta baseada em processamento não-linear ao perceber a mistura de cor como um elemento único. Esta pode ser uma estratégia adaptativa para otimizar a detecção de informações cruciais, uma vez que abelhas utilizam a visão de cores para detectar flores, memorizar cores e padrões de flores recompensadoras, bem como diferenciar flores menos recompensadoras (Chittka e Menzel 1992).

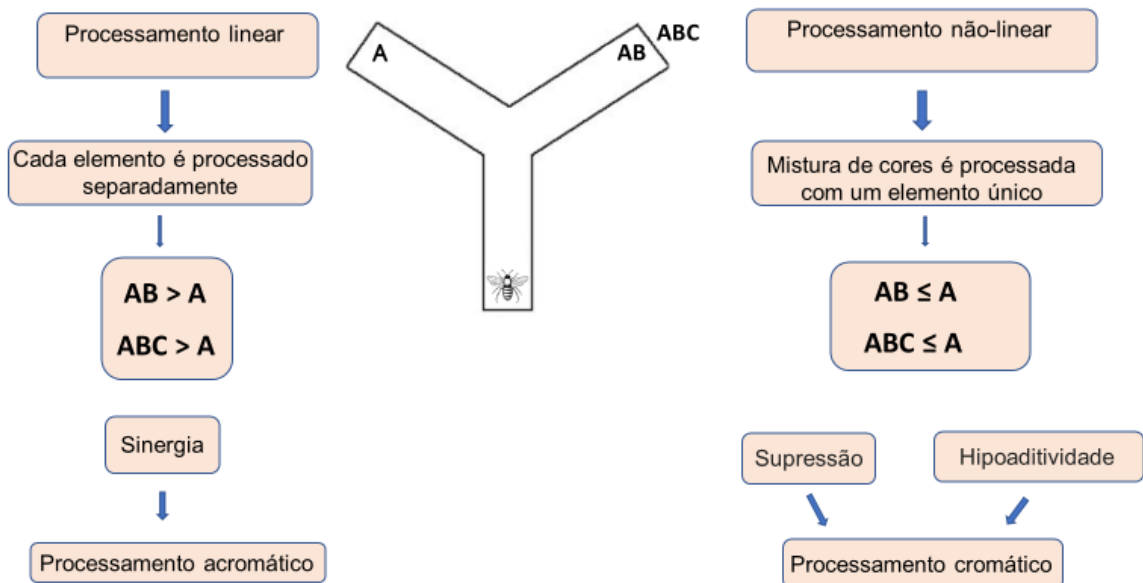


Figura 15. Diagrama esquemático representando o processamento neural linear (a esquerda) e não linear (a direita) em experimentos envolvendo pares de estímulos luminosos monocromáticos (A) e policromáticos (AB/ ABC). No processamento linear cada elemento é processado separadamente, dessa maneira animais que se orientam para o lado do braço do labirinto cuja exposição visual represente um elemento policromático indica que ocorreu processamento acromático da informação visual. Em contrapartida, no processamento não-linear o elemento policromático é processado como um único elemento, assim, animais que se orientam para o braço do labirinto cuja representação seja de um elemento monocromático (supressão) ou casos nos quais não há diferença significativa de orientação (hipoaditividade) entre os braços do labirinto representam o processamento cromático.

O presente trabalho investigou se a percepção da resposta fototática em abelhas envolve processamento linear (acromático) ou não linear (cromático) nos circuitos ligados a via Óptica e à Ocular. A participação dos canais receptores na orientação por estímulos fototáticos será avaliada utilizando estimulações monocromáticas e policromáticas. Assim, pretendemos avaliar se há evidência de possível existência de antagonismo espectral e processamento cromático em cada via neural, ou se a resposta fototática ocorre de maneira puramente sinérgica, com processamento acromático, nas distintas vias neurais. Também comparamos se ocorre diferença de atratividade fototática entre estímulos monocromáticos para cada via do sistema visual. Acreditamos que este trabalho poderá contribuir para o entendimento do processamento fototático nas distintas vias neurais envolvidas na fototaxia positiva em abelhas *Apis mellifera*.

2 METODOLOGIA

Os procedimentos de coleta dos animais e os grupos experimentais foram os mesmos descritos nas seções 2.1 e 2.2 do Capítulo 1. A coleta dos animais foi realizada as 8 horas da manhã durante um outono e um inverno.

2.1 Labirinto Y

Os experimentos para avaliar a orientação fototática de abelhas frente a distintos pares de estímulos luminosos foram realizados em um labirinto Y, dispositivo amplamente utilizado em estudos de percepção e aprendizagem visual (Srinivasan & Lehrer, 1988; Giurfa et al., 1996; Ibarra et al., 2002). O labirinto utilizado (Figura 15) foi confeccionado em acrílico preto fosco, impedindo assim que o animal tenha visibilidade do ambiente ao redor e minimizando a refletância dos estímulos luminosos nas paredes do mesmo. Possuindo 3 cm de altura e 4 cm de largura em toda sua extensão, o labirinto possuía um corpo de entrada de 22 cm de comprimento, conectado a dois braços de 7 cm de comprimento. Cada braço possuía um ângulo de 135° em relação ao corpo de entrada do labirinto. A parte de cima do labirinto foi coberta por uma tampa acrílica transparente e removível, que permitia a visualização do trajeto realizado pelas abelhas. Uma pequena câmara móvel acoplada à entrada do labirinto permitia o confinamento prévio da abelha e adaptação da mesma ao ambiente escuro. Esta pequena câmara cúbica apresentava uma porta deslizante transparente, através da qual o animal era

liberado e exposto aos estímulos luminosos apresentados ao final em cada braço do labirinto. Todos os experimentos foram realizados em uma sala escura.

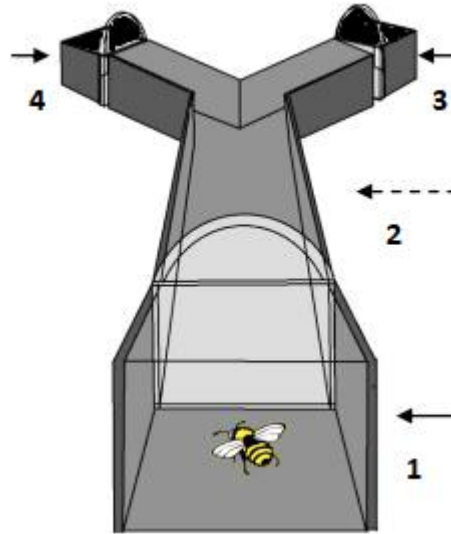


Figura 16. Labirinto em Y utilizado em testes de orientação fototática. A seta 1 indica a câmara cúbica na qual a abelha era confinada durante período de adaptação ao escuro. A seta 2 indica o corpo de entrada do labirinto. As setas 3 e 4 indicam as câmaras de apresentação dos estímulos luminosos através de um filtro difusor de vidro.

2.2 Estímulos luminosos

Foram utilizados três LEDs monocromáticos com os mesmos picos de emissão descritos na seção 2.3 do Capítulo 1 (Figura 9), coincidentes com os picos de absorção dos três tipos de fotorreceptor encontrados nas abelhas (Peitsch et al., 1992). Ao final de cada braço do labirinto foi acoplada uma pequena câmara escura de acrílico preto fosco (Figura 15), na qual os três LEDs monocromáticos (UV, azul e verde) podiam ser acesos individualmente ou simultaneamente. Um filtro difusor feito de vidro jateado foi posicionado em frente ao conjunto de três LEDs para permitir a apresentação de misturas cromáticas em uma área homogênea no final de cada braço do labirinto. Este filtro difusor capaz de transmitir luz na faixa do UV e visível foi ocluído nas periferias com fita isolante preta, de forma a produzir uma área central de 2 cm² na qual os estímulos visuais eram apresentados com homogeneidade perceptual para as misturas cromáticas. Cada estímulo visual apresentava um ângulo subtendido de 16,5 graus em relação à câmara de decisão, tanto na direção vertical como na horizontal, sendo assim capazes de recrutar as vias cromáticas do sistema visual de abelhas (Giurfa et al., 1996). Cada

LED foi conectado a uma porta de saída de sinal PWM (*Pulse Width Modulation*), para possibilitar seu controle através de um Arduíno MEGA©. Um software criado em ambiente Python foi utilizado para controlar combinação, ordem, tempo e intensidade de apresentação dos estímulos monocromáticos (Figura 9) ou policromáticos produzidos pelos LEDs. A intensidade luminosa de cada LED foi ajustada com um espectrofotômetro (USB2000 + UV-VIS-ES, OceanOptics) calibrado radiometricamente com uma fonte de luz de deutério / tungstênio (DH-2000-BAL, 220- 1050 nm, OceanOptics) para um mesmo valor de irradiância: $0,24 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Este mesmo valor de irradiância foi sempre utilizado na apresentação de cada LED, tanto em estímulos monocromáticas quanto em misturas policromáticas. Isso significa que todos os estímulos policromáticos possuíam uma maior irradiância total de fótons, quando comparadas aos estímulos monocromáticos.

2.3 Grupos e procedimentos experimentais

Os testes de orientação fototática no labirinto Y foram realizados em abelhas dos grupos controle (n=21), via Óptica (n=20) e via Ocular (n=22), conforme descrito no Capítulo 1 (Figura 7). Em cada grupo, foram testados 12 pares de estímulos visuais, sendo que a ordem de apresentação, bem como a posição dos mesmos nos braços do labirinto foi constantemente randomizada. Foram apresentados três pares de estímulo monocromático: UV vs. azul; UV vs. verde; azul vs. verde. Nove pares de estímulo contrapondo um elemento monocromático a uma mistura policromática contendo este elemento foram apresentados: UV vs. UV + azul; UV vs. UV + verde; UV vs. UV + azul + verde (série UV); azul vs. UV + azul; azul vs. azul + verde; azul vs. UV + azul + verde (série azul); verde vs. UV + verde; verde vs. azul + verde; verde vs. UV + azul + verde (série verde).

Antes de cada teste de orientação fototática, a abelha testada permaneceu por um minuto no escuro dentro da câmara de confinamento para adaptação visual e aclimatação (Menzel e Greggers, 1985). Ao início de cada exposição a um par de estímulos visuais, a porta da câmara era aberta e o animal liberado no corpo do labirinto simultaneamente à apresentação do par de estímulos nos braços do labirinto. Foi então registrada a orientação do animal, bem como cronometrado o tempo de chegada, a um dos estímulos visuais. Quando o animal tocava o filtro difusor onde se apresentava o estímulo luminoso, o cronometro era pausado, os estímulos visuais desligados e a abelha conduzida novamente à câmara de confinamento na entrada do labirinto. Foi utilizado um LED de luz branca para atrair o animal de volta à câmara de

confinamento, onde o mesmo permanecia por um minuto no escuro até a apresentação do par luminoso seguinte.

2.4 Análise estatística

Para cada par de estímulos visuais testado em cada grupo experimental, utilizamos o Teste Binomial para analisar se a frequência de orientação das abelhas a cada estímulo diferiu significativamente do aleatório. A variável dicotômica foi a orientação das abelhas a um dos estímulos luminosos e o parâmetro de probabilidade para ambas as respostas foi de 0,5.

Visando testar se a distribuição das respostas a cada par de estímulos diferiu significativamente entre os três grupos experimentais (controle, via Ocular e via Óptica) foi construído um GLMM com distribuição binomial. A variável preditora foi o grupo experimental (controle, Óptica, Ocular), a variável resposta foi a orientação das abelhas a um dos dois estímulos, e a variável aleatória foi o id das abelhas.

Considerando que o tempo de escolha de um estímulo em labirinto Y vem sendo utilizado como indicador do quão difícil (lenta) / fácil (rápida) é a decisão por um dos estímulos, ou do quão semelhante / diferente é o par de estímulos, decidimos avaliar se esta mesma relação existe no contexto de orientação fototática inata das abelhas. Para cada grupo experimental, foi construído um LMM com distribuição gaussiana para testar se o tempo gasto pelas abelhas para se orientar a um estímulo diferiu significativamente entre os pares de estímulos testados. Neste caso, a variável preditora foi o par de estímulos luminosos, a variável resposta foi o tempo de orientação da abelha ao estímulo, e a variável aleatória foi o id das abelhas.

Testes Binomiais foram realizados no software GraphPadPrism, enquanto as análises de GLMM e LMM foram desenvolvidas no Rstudio. Foram utilizados os pacotes lm4 (Bates et al., 2014), glme, afex, multcomp (Hothorn et al., 2015) e ggplot2 (Wickham, 2009).

3. RESULTADOS

3.1 Orientação fototática frente a pares de estímulos monocromáticos

Abelhas do grupo controle (N=21) submetidas aos testes de orientação fototática com pares de estímulos monocromáticos de mesma intensidade luminosa foram significamente mais atraídas pela luz UV do que pelas luzes azul (Figura 17a; Teste Binomial, $p = 0.02$) e verde

(Figura 17b; Teste Binomial, $p = 0.04$), e significativamente mais atraídas pelo verde que pelo azul (Figura 17c; Teste Binomial, $p = 0.04$). Animais submetidos à oclusão dos ocelos, os quais compõem o grupo via Óptica ($N=20$), também foram mais atraídas pela luz UV do que pela luz verde (Figura 17b; Teste Binomial, $p = 0.02$), porém se distribuíram de forma aleatória nos braços do labirinto quando confrontados aos pares de estímulo UV vs. azul (Figura 17a; Teste Binomial, NS) e azul vs. verde (Figura 17c; Teste Binomial, NS). Indivíduos submetidos à oclusão dos olhos compostos, os quais compõem o grupo via Ocelar ($N=22$), se distribuíram de forma aleatória nos braços do labirinto quando confrontadas aos três pares de estímulo testados (Teste Binomial, NS): UV vs. azul (Figura 17a), UV vs. verde (Figura 17b) e azul vs. verde (Figura 17c).

A comparação entre a distribuição das abelhas para cada par de estímulos monocromáticos em cada grupo experimental (controle, via Óptica e via Ocelar), identificou diferenças significativas entre os grupos para o par UV vs. azul (Figura 17a; GLMM, $\chi^2=6.4$, $gl=2$, $p=0.04$). As distribuições das abelhas para o par UV vs. azul diferiram entre os grupos controle e via Ocelar (Teste Post hoc; $p=0.03$). Não houve diferença para este par de estímulos entre os grupos controle e via Óptica (Teste Post hoc; NS), nem entre os grupos via Óptica e via Ocelar (Teste Post hoc; NS). A distribuição das abelhas para o par de estímulos UV vs. verde também diferiu significativamente entre os grupos experimentais (Figura 17b; GLMM, $\chi^2=7.3$, $gl=2$, $p=0.02$), havendo diferença entre o grupo via Ocelar e os grupos via Óptica (Teste Post hoc; $p=0.04$) e controle (Teste Post hoc; $p=0.03$). Não houve diferença nas respostas fototáticas das abelhas para este par de estímulos entre os grupos controle e via Óptica (Teste Post hoc; NS). Para o par de estímulos azul vs. verde (Figura 17c), não identificamos diferença significativa entre os três grupos experimentais (GLMM, $\chi^2=0.95$, $gl=2$, NS).

O tempo gasto pelos animais para se orientarem aos estímulos luminosos não difere estatisticamente para nenhum dos 3 pares testados nos grupos controle (LMM, $F_{2,40}=0.11$, NS) e via Óptica (LMM, $F_{2,38}=1.89$, NS). Embora os animais da via Ocelar não tenham apresentado diferença significativa na distribuição para nenhum dos três pares luminosos testados (Figura 18), o tempo gasto pelas abelhas para chegar até um dos estímulos variou entre os pares de estímulo testados (Figura 18, LMM, $F_{2,42}=3.8$, $p=0.02$). Mais precisamente, as abelhas do grupo via Ocelar gastaram mais tempo para se orientarem quando apresentadas ao par UV vs. azul em relação ao par UV vs. verde (Teste Post hoc, $p=0.01$). O tempo gasto pelas abelhas na orientação fototática não diferiu no grupo via Ocelar (Figura 18) entre os pares monocromáticos UV vs.

azul e azul vs. verde (Teste Post hoc, $p=0.05$) ou UV vs. verde e azul vs. verde (Teste Post hoc, NS).

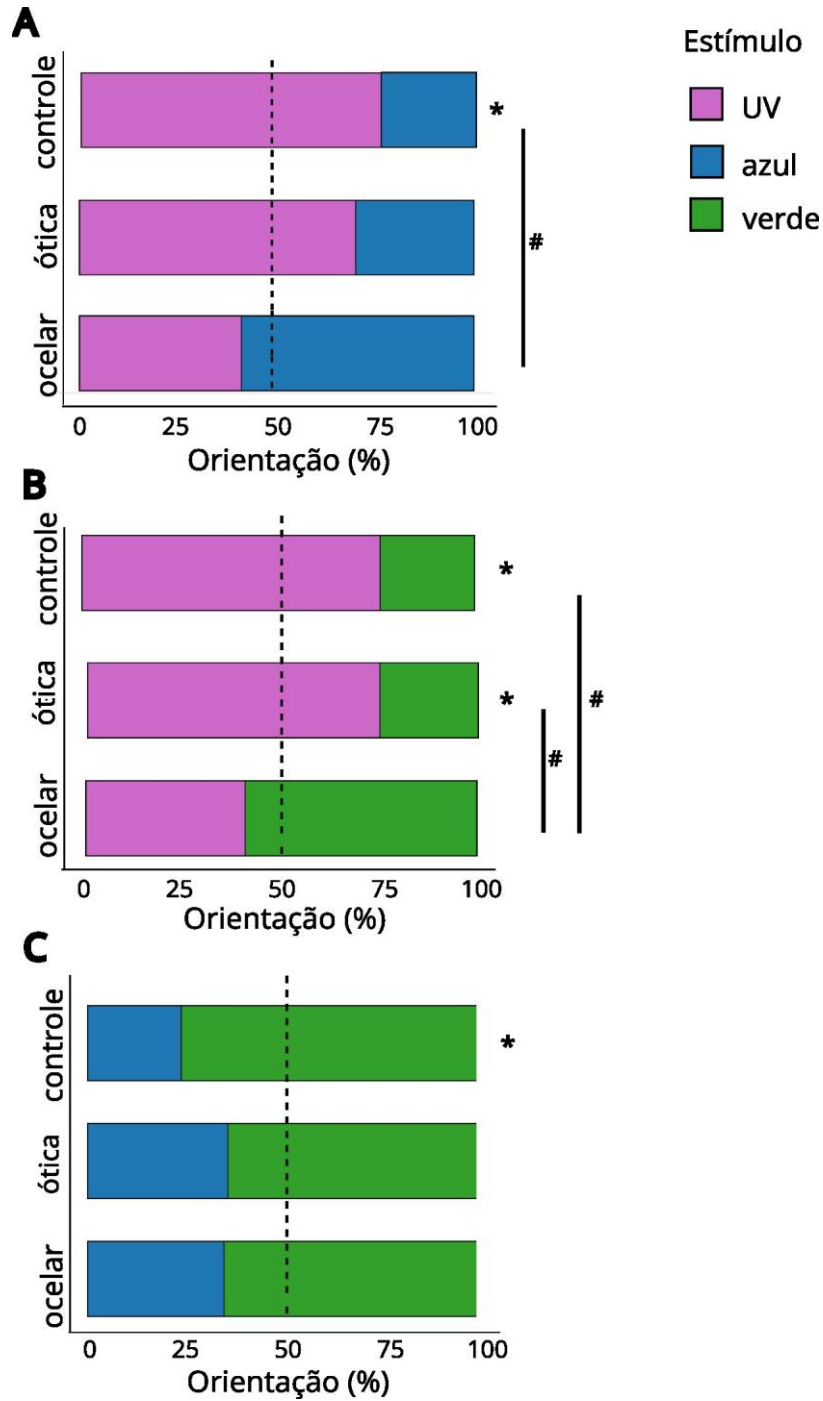


Figura 17. Orientação das abelhas entre estímulos monocromáticos UV, azul e verde no labirinto Y. Os * representam as diferenças na escolha do estímulo em cada grupo. Os # representam a diferença na orientação por estímulo comparando os 3 grupos, controle, Via Óptica e Via Ocular.

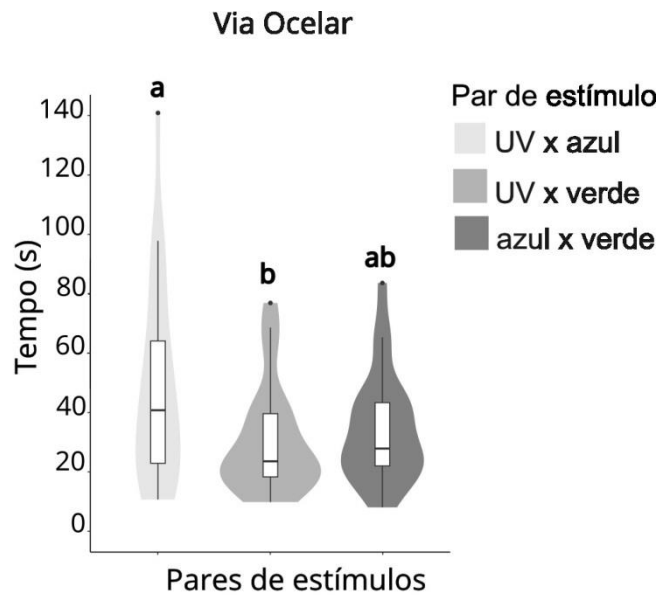


Figura 18. Latência de atração fototática entre estímulos monocromáticos. Tempo gasto pelas abelhas para realizarem a orientação fototática entre os estímulos visuais avaliados, sendo estes pares de estímulos monocromáticos. As letras indicam diferença significativa no tempo gasto pelos animais na atração fototática para diferentes pares de estímulos visuais.

3.2 Testando elemento monocromático contra misturas policromáticas

Nestes experimentos, testamos se as abelhas apresentam atração fototática maior para misturas policromáticas do que para os elementos monocromáticos que as compõem, conforme previsto pela teoria de que o processamento fototático envolveria somatório linear de fótons absorvidos em todos os fotorreceptores, num processamento puramente acromático (Menzel & Greggers 1985). Contrapondo essa expectativa, caso alguma mistura fosse igualmente ou menos atraente que um elemento monocromático, indicando processamento hipoaditivo ou supressivo, respectivamente, isso sugeriria a presença de processamento cromático nos circuitos fototáticos envolvidos.

3.2.1 UV vs. mistura de cores

As abelhas do grupo controle (N=21) submetidas aos testes de orientação fototática apresentando o estímulo monocromático UV simultaneamente a misturas cromáticas contendo este elemento apresentaram distribuição aleatória nos braços do labirinto nos testes com UV+azul (Figura 19a; Teste Binomial, NS) e UV+azul+verde (Figura 19c, Teste Binomial,

NS). Por outro lado, abelhas do grupo controle foram significamente mais atraídas para a mistura UV+verde do que para a luz monocromática UV (Figura 19b; Teste Binomial, $p = 0.04$). Animais do grupo via Óptica ($N=20$) apresentaram distribuição aleatória nos braços do labirinto para a mistura UV+azul (Figura 19a; teste Binomial, NS), mas foram significativamente mais atraídas para as misturas UV+verde (Figura 19b; Teste Binomial, $p=0.002$) e UV+azul+verde (Figura 19c; Teste Binomial, $p=0.04$) contrapostas à luz UV. Já o grupo via Ocular ($N=22$) se distribuiu de forma aleatória nos braços do labirinto quando a luz UV foi apresentada contra todas as misturas (Teste Binomial, NS): UV vs. UV+azul (Figura 19a), UV vs. UV+verde (Figura 19b) e UV vs. UV+azul+verde (Figura 19c).

A comparação da distribuição das abelhas para cada par de estímulos (contendo UV) entre os três grupos experimentais (controle, via Óptica e via Ocular) identificou diferenças significativas no caso do par UV vs. UV+azul (Figura 19a; GLMM, $\chi^2=8.96$, $gl=2$, $p=0.01$). As distribuições das abelhas para o par UV vs. UV+azul diferiram entre os grupos controle e via Ocular (Figura 19a; Teste Post hoc, $p=0.01$) e entre os grupos via Óptica e via Ocular (Figura 19a; Teste Post hoc, $p=0.02$). Não houve diferença para este par de estímulos entre os grupos controle e via Óptica (Figura 19a; Teste Post hoc, NS). Para os pares de estímulos UV vs. UV+verde (Figura 19b; GLMM, $\chi^2=3.74$, $gl=2$, NS) e UV vs. UV+azul+verde (Figura 19c; GLMM, $\chi^2=5.87$, $gl=2$, NS) não houve diferenças significativas entre os grupos nas respostas fototáticas das abelhas. O tempo gasto pelos animais para se orientarem aos estímulos luminosos não diferiu estatisticamente entre os três pares testados em nenhum dos grupos experimentais: controle (LMM, $F_{2,40}=1.05$, NS), via Óptica (LMM, $F_{2,38}=1.56$, NS) e via Ocular (LMM, $F_{2,42}=2.04$, NS).

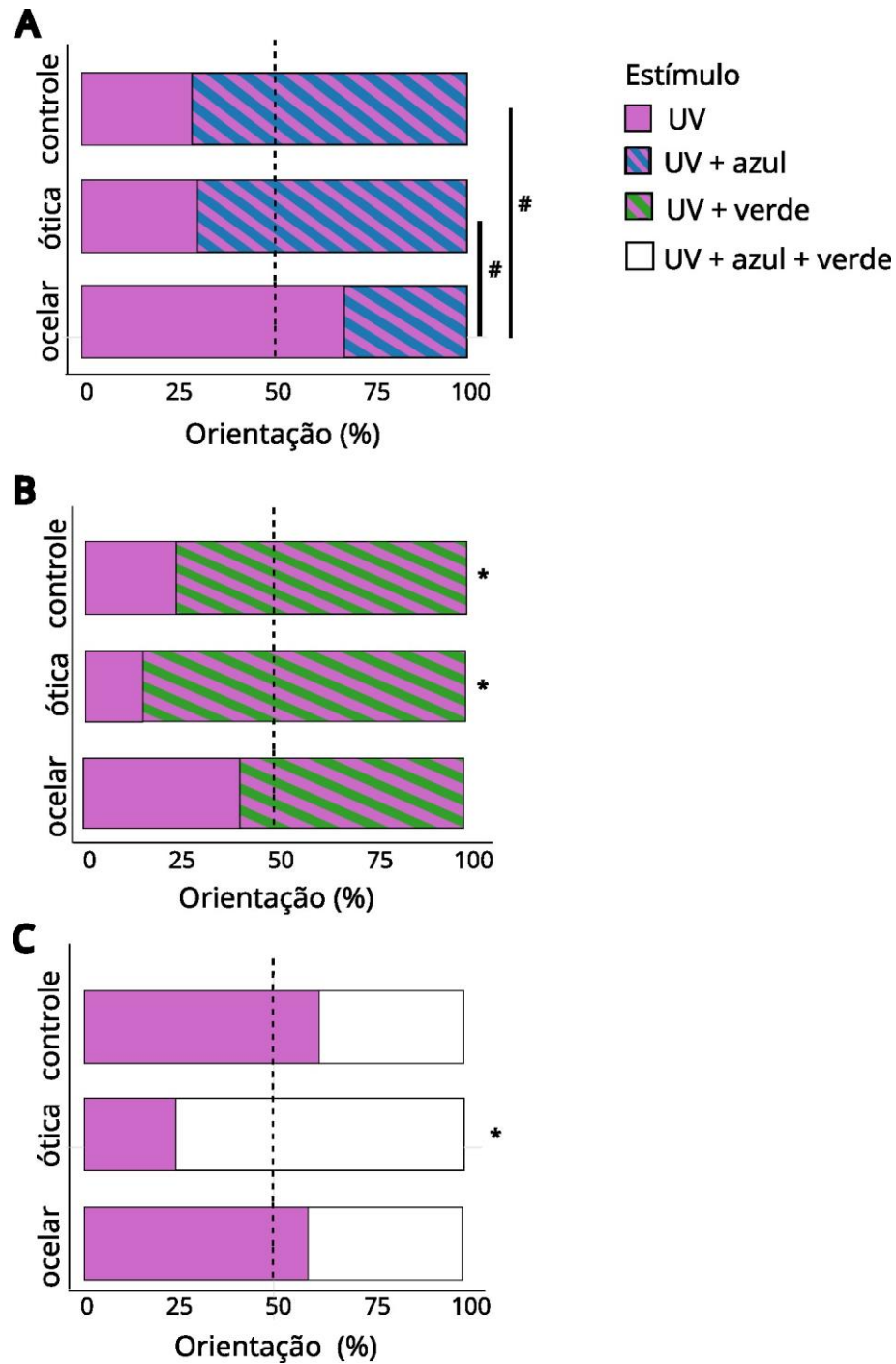


Figura 19. Orientação das abelhas entre os estímulos monocromático UV e mistura de cores no labirinto Y. Asteriscos (*) representam as diferenças na escolha do estímulo em cada grupo. Os # representam a diferença na orientação por estímulo comparando os 3 grupos, controle, via Óptica e via Ocular.

3.2.2 AZUL vs. mistura de cores

Os indivíduos do grupo controle (N=21) submetidas aos testes de orientação fototática apresentando luz monocromática azul simultaneamente a misturas cromáticas contendo este elemento foram significativamente mais atraídas para as misturas de cores UV+azul (Figura 20a;

Teste Binomial, $p=0.02$) e UV+azul+verde (Figura 20c; Teste Binomial, $p=0.004$). Por outro lado, estes animais apresentaram distribuição aleatória nos braços do labirinto para o par azul vs. azul+verde (Figura 20b; Teste Binomial, NS). Abelhas do grupo via Óptica ($N=20$) apresentaram distribuição aleatória nos braços do labirinto para a mistura UV+azul (Figura 20a; teste Binomial, NS) e azul+verde (Figura 20b; teste Binomial, NS), mas foram significativamente mais atraídas para a mistura UV+azul+verde contraposta à luz azul (Figura 20c; Teste Binomial, $p=0.007$). Indivíduos do grupo via Ocelar ($N=22$), se distribuíram de forma aleatória nos braços do labirinto para as misturas UV+azul (Figura 20a; Teste Binomial, NS) e UV+azul+verde (Figura 20c; Teste Binomial, NS) contrapostas ao azul puro, mas foram significativamente mais atraídos para a mistura azul+verde (Figura 20b; Teste Binomial, $p=0.01$).

A comparação entre a distribuição das abelhas para cada par de estímulos (contendo azul) em cada grupo experimental (controle, via Óptica e via Ocelar) revelou diferenças significativas para o par UV vs. UV+azul (Figura 20a; GLMM, $\chi^2=8.30$, $gl=2$, $p=0.01$). As distribuições das abelhas para o par azul vs. UV+azul diferiram entre os grupos controle e via Ocelar (Figura 20a; Teste Post hoc, $p=0.01$) e entre os grupos via Óptica e via Ocelar (Figura 20a; Teste Post hoc, $p=0.04$). O par azul vs. azul + verde, (Figura 20b, GLMM, $\chi^2=7.75$, $gl=2$, $p=0.02$), apresenta diferença na orientação dos animais comparando os grupos controle, via Óptica e via Ocelar. Enquanto os animais do grupo via Ocelar se orientam mais frequentemente para a mistura azul+verde, animais do grupo controle (Figura 20b; Teste Post hoc, $p=0,03$) e via Óptica (Figura 20b; Teste Post hoc, $p=0,02$) se orientam com maior frequência para o estímulo azul monocromático. Não há diferença estatística na orientação fototática dos animais dos grupos controle e via Óptica (Figura 20b; Teste Post hoc, NS). Também houve diferenças significativas para a mistura UV+azul+verde contrapondo a luz azul (Figura 20c; GLMM, $\chi^2=7.95$, $gl=2$, $p=0.02$). As abelhas do grupo via Ocelar se orientam com maior frequência para o estímulo monocromático azul, enquanto as abelhas dos grupos controle (Figura 20c; Teste Post hoc, $p=0.03$) e via Óptica (Figura 20c; Teste Post hoc, $p=0.04$) se orientam majoritariamente para a mistura UV+azul+verde. Não há diferença de orientação fototática entre os grupos controle e via Óptica para este par de estímulo (Figura 20c, Teste Post hoc, NS).

O tempo gasto pelas abelhas para chegar até um dos estímulos variou entre os pares de estímulo testados nos grupos controle (Figura 21a; LMM, $F_{2,40}=5.58$, $p=0.007$) e via Ocelar (Figura 21b; LMM, $F_{2,42}=4.5$ $p=0.01$). Em ambos os grupos, as abelhas gastaram mais tempo para se orientarem ao par de estímulos azul vs. azul+verde comparado ao par azul vs. UV+azul

(grupo controle: Figura 21a; Teste Post hoc, $p=0.001$; grupo via Ocelar: Figura 21b; teste Post hoc, $p=0.004$). O tempo de orientação não diferiu entre os pares azul vs. azul+verde e azul vs. UV+azul+verde (controle: Figura 21a, via Óptica: Figura 21b; Teste Post hoc, NS), e azul vs. UV+azul e azul vs. UV+azul+verde (grupo controle, Figura 21a e via Óptica, Figura 21b; Teste Post hoc, NS). O tempo gasto pelos animais para se orientarem aos estímulos luminosos não diferiu estatisticamente entre os pares testados no grupo via Óptica (LMM, $F_{2,38}=0.65$, NS).

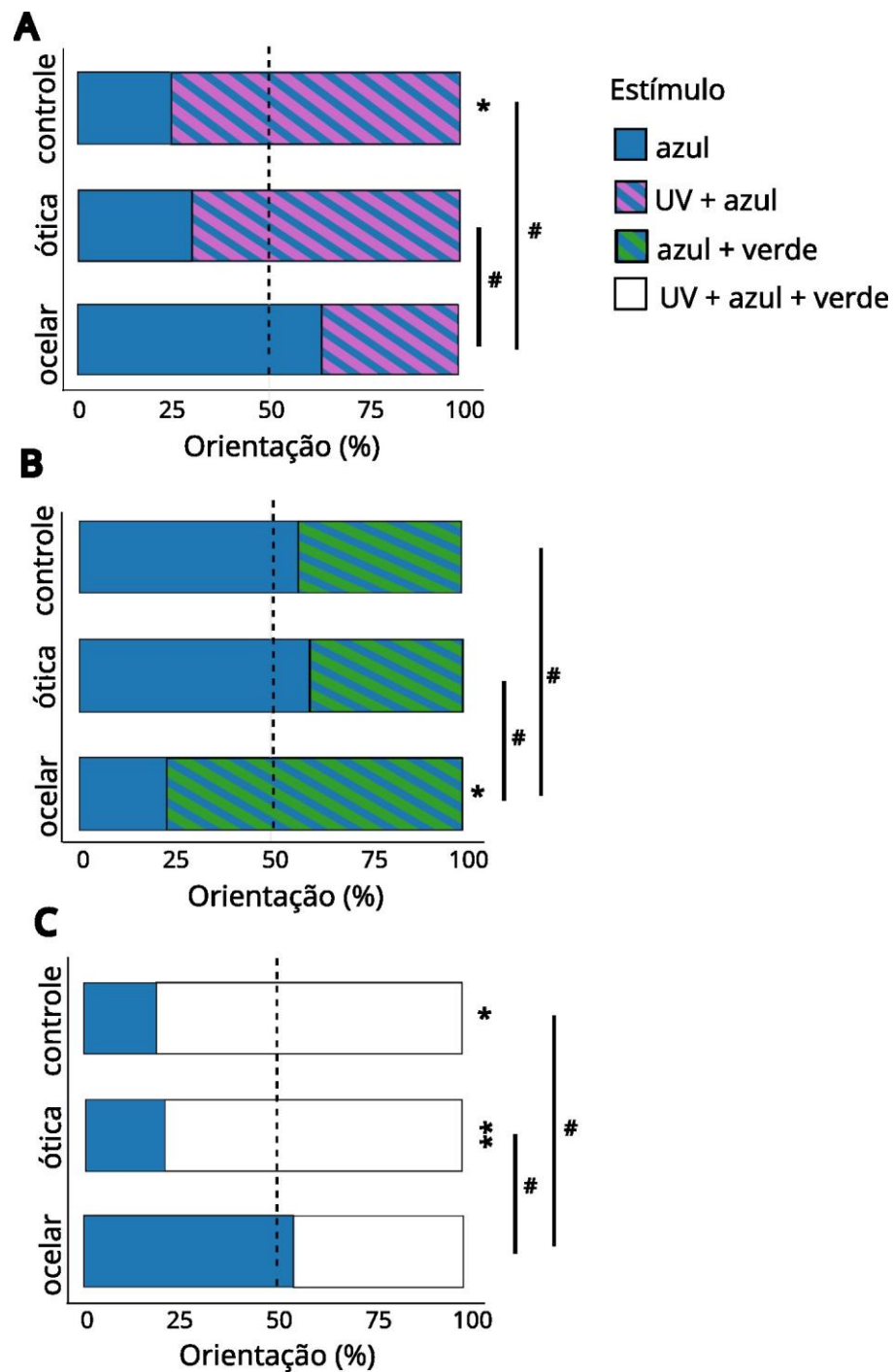


Figura 20. Orientação das abelhas entre os estímulos monocromático azul e mistura de cores no labirinto Y. Asteriscos (*) representam as diferenças na escolha do estímulo em cada grupo. Os # representam a diferença na orientação por estímulo comparando os 3 grupos, controle, via Óptica e via Ocular.

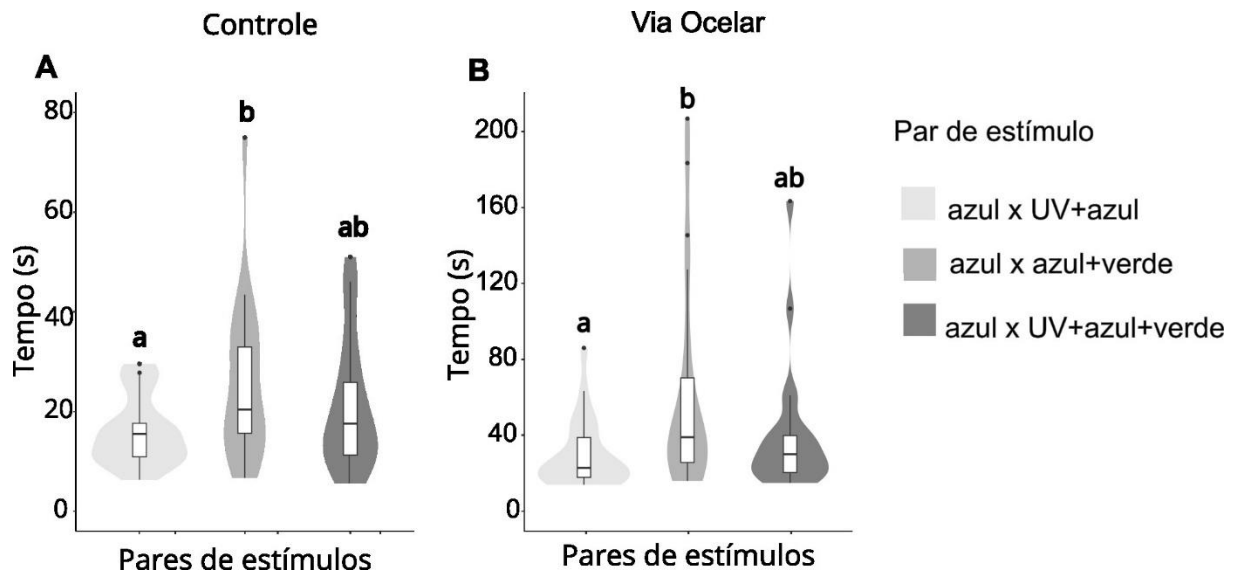


Figura 21. Latência de atração fototática entre um componente azul versus mistura de cores. Tempo gasto pelas abelhas para realizarem a orientação fototática entre os estímulos visuais avaliados, sendo estes pares de estímulo monocromático azul versus misturas de cores. As letras indicam diferença significativa no tempo gasto pelos animais na atração fototática para diferentes pares de estímulos visuais.

3.2.3 VERDE vs. mistura de cores

Abelhas do grupo controle (N=21) submetidas aos testes de orientação fototática apresentando luz monocromática verde simultaneamente a misturas cromáticas contendo este elemento apresentam distribuição aleatória nos braços do labirinto para as misturas UV+verde (Figura 22a; Teste Binomial, NS) e azul+verde (Figura 22b; Teste Binomial, NS). Por outro lado, estes indivíduos foram significativamente mais atraídos para a mistura UV+azul+verde do que para a luz verde pura (Figura 22c; Teste Binomial, $p=0.02$). No grupo via Óptica (N=20), as abelhas foram significativamente mais atraídas para as misturas UV+verde (Figura 22a; Teste Binomial, $p=0.002$) e UV+azul+verde (Figura 22c; Teste Binomial, $p=0.04$) do que para a luz verde. Os animais apresentam distribuição aleatória nos braços do labirinto para a mistura azul+verde contrapondo a luz verde (Figura 22b; teste Binomial, NS). No grupo via Ocular (N=22), os animais se distribuíram de forma aleatória nos braços do labirinto para todos os três

pares de estímulo (Teste Binomial, NS): verde vs. UV+verde (Figura 22a), verde vs. azul+verde (Figura 22b) e verde vs. UV+azul+verde (Figura 22c).

A comparação entre a distribuição das abelhas para cada par de estímulos (contendo verde) em cada grupo experimental (controle, via Óptica e via Ocelar) revelou diferenças significativas para o par verde vs. UV+azul+verde (Figura 21c; GLMM, $\chi^2=7.37$, $gl=2$, $p=0.02$). As distribuições das abelhas para este par diferiram entre os grupos controle e via Ocelar (Figura 22c; Teste Post hoc, $p=0.03$) e entre os grupos via Óptica e via Ocelar (Figura 22c; Teste Post hoc, $p=0.04$). Não houve diferença na orientação dos animais dos grupos controle e via Óptica em relação para este par de estímulos (Figura 22c; Teste Post hoc, NS). Para os demais pares de estímulo, não houve diferença de atração fototática (verde vs. uv + verde: Figura 22a; GLMM, $\chi^2=6,19$, $gl=2$, NS; verde vs. azul + verde: Figura 22b; GLMM, $\chi^2 = 0,05$, $gl = 2$, NS).

O tempo gasto pelos animais para se orientarem aos distintos pares de estímulos luminosos não diferiu estatisticamente nos grupos controle (LMM, $F_{2,40}=0.96$, NS) e via Ocelar (LMM, $F_{2,42}=0.17$, NS). Por outro lado, este tempo variou entre os pares de estímulo testados no grupo via Óptica (Figura 23; LMM, $F_{2,38}=8.4$, $p=0.0009$). As abelhas gastaram mais tempo para se orientarem ao par verde vs. azul+verde do que ao par verde vs. UV+azul+verde (Figura 23; Teste Post hoc, $p<0.001$), e ao par verde vs. azul+verde do que ao par verde vs. UV+verde (Figura 23; Teste Post hoc, $p=0.01$). Contudo, o tempo até o estímulo foi igual para os pares verde vs. UV+verde e verde vs. UV+azul+verde no grupo via Óptica (Figura 23; Teste Post hoc, NS).

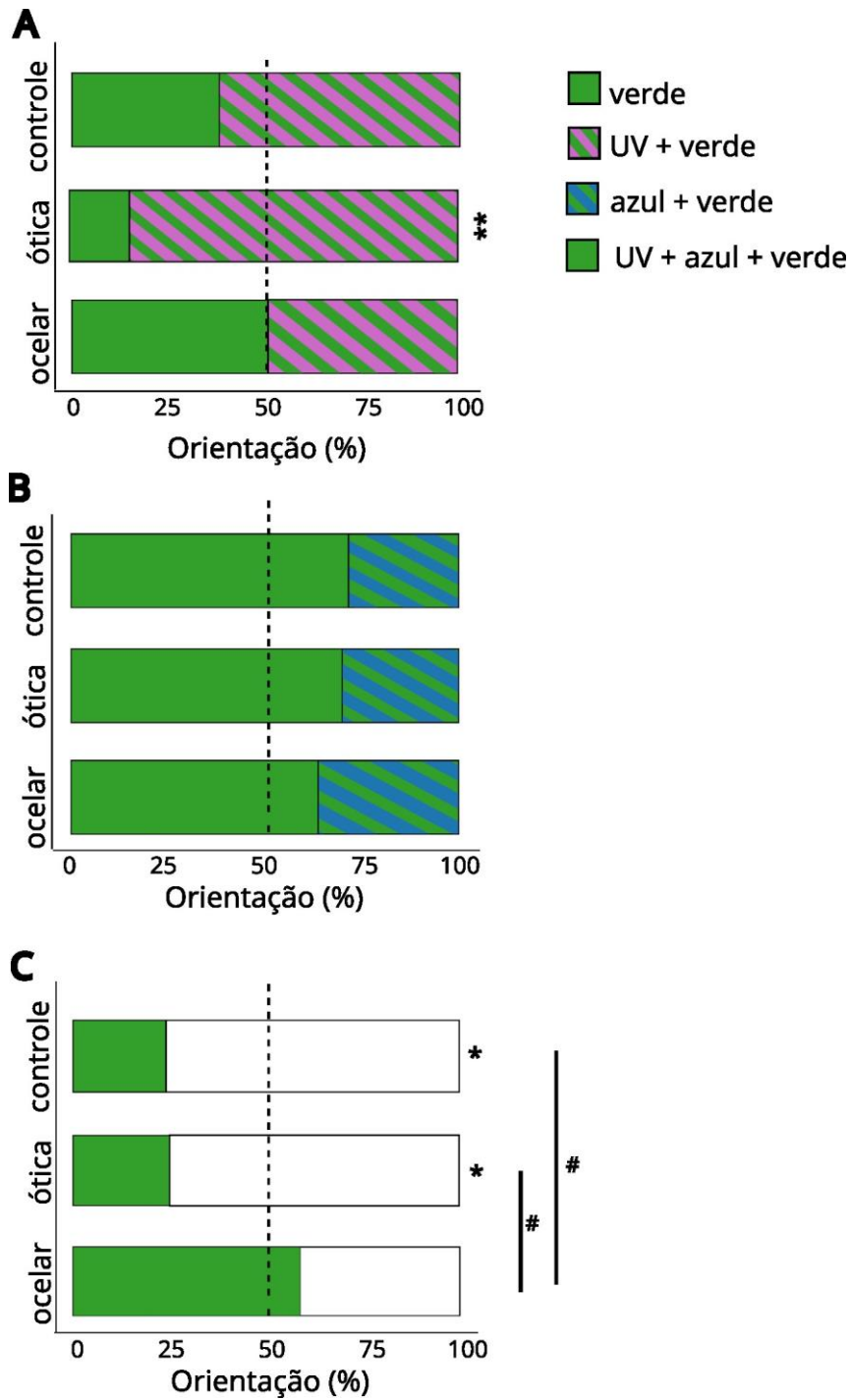


Figura 22. Orientação das abelhas entre os estímulos monocromático verde e mistura de cores no labirinto Y. Os * representam as diferenças na escolha do estímulo em cada grupo. Os # representam a diferença na orientação por estímulo comparando os 3 grupos, controle, via Óptica e via Ocular.

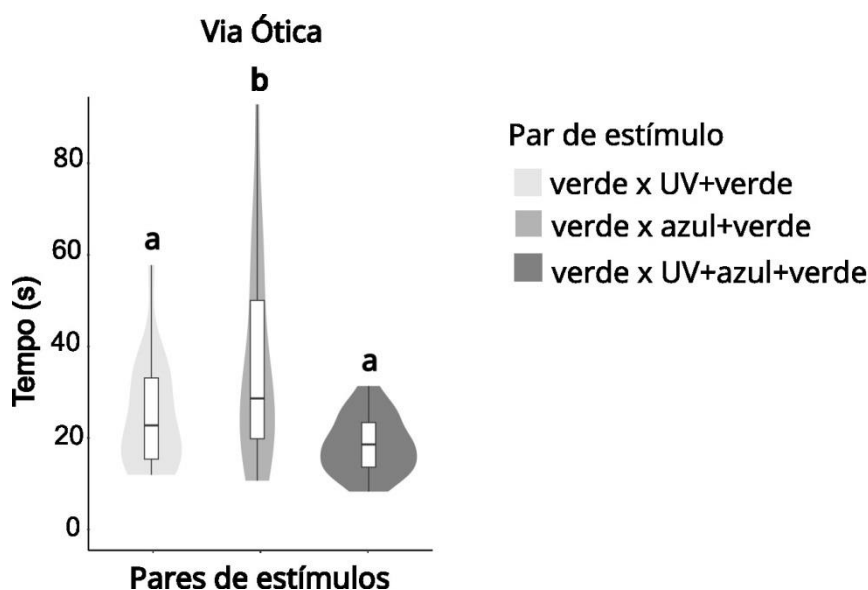


Figura 23. Latência de atração fototática entre um componente verde versus mistura de cores. Tempo gasto pelas abelhas para realizarem a orientação fototática entre os estímulos visuais avaliados, sendo estes pares de estímulo monocromático verde versus misturas de cores. As letras indicam diferença significativa no tempo gasto pelos animais na atração fototática para diferentes pares de estímulos visuais.

4 DISCUSSÃO

Ao analisarmos as respostas de fototaxia positiva de abelhas do grupo controle quando estimuladas simultaneamente no labirinto Y com duas fontes de luz monocromática de comprimentos de onda diferentes e mesma irradiância absoluta, percebemos que houve uma maior atração à luz UV, seguida por uma maior atração à luz verde. A luz azul foi a que gerou menor frequência de atração fototática positiva quando confrontada aos outros estímulos em abelhas controle, ou seja, sem nenhuma estrutura visual ocluída. Esses resultados estão em conformidade com estudos prévios sobre a sensibilidade espectral da fototaxia positiva, os quais também observaram uma maior atração para a luz UV e menor para a luz azul quando esses estímulos foram apresentados no escuro com intensidade física equivalente (Heintz, 1959; Kaiser et al., 1977; Labhart, 1974; Nouvian e Galizia et al., 2020). Junto aos nossos resultados do Capítulo 1, estes estudos indicam uma maior contribuição dos receptores tipo S (pico de absorção: UV 344 nm) nas respostas fototáticas de *Apis mellifera*. Além disso, os receptores tipo L (pico de absorção: verde 544 nm) parecem ter maior participação do que os receptores tipo M (azul 436 nm) nestas respostas (Peitsch et al., 1992).

4.1 Estímulos monocromáticos são processados de maneira distinta pelas vias neurais conectadas aos olhos compostos (via Óptica) e aos ocelos (via Ocelar)?

Assim como abelhas do grupo controle, abelhas do grupo via Óptica apresentaram maior atração fototática pelo estímulo monocromático UV do que pelo verde, mas para os demais pares de estímulos monocromáticos (UV vs. azul; azul vs. verde), não ocorre diferença na orientação fototática das abelhas. Estes resultados, somados ao fato de que existe uma quantidade muito maior de receptores L nos olhos das abelhas do que de receptores S ou M (Wakakuwa et al. 2005), demonstram que nos circuitos da via Óptica existe uma maior contribuição ou um maior peso dos sinais provenientes de fotorreceptores S do que L. Comparando estes resultados aos resultados do Capítulo 1, encontramos concordância com a distância percorrida e a tortuosidade das trajetórias fototáticas no grupo via Óptica, que são menores para luz UV monocromática do que para verde.

Curiosamente, animais do grupo via Ocelar não apresentaram maior ou menor atração por nenhum dos estímulos monocromáticos testados no labirinto Y. Apesar disso, o tempo gasto para chegar ao estímulo foi maior para o par UV vs. azul quando comparado ao par UV vs. verde. Isso sugere que o tempo de processamento/comparação dos estímulos pela via Ocelar é maior para UV vs. azul, ou seja, estes estímulos parecem mais ambíguos ou similares para a via Ocelar. Por outro lado, os estímulos UV e verde parecem ser mais discrepantes para esta via neural. Cabe ressaltar que nos ocelos apenas existem fotorreceptores dos tipos S e L (Goldsmith e Ruck 1958; Geiser e Labhart 1982; Mizunami e Takagi, 1994), o que contribui para uma maior segregação do processamento de sinais gerados por luz UV e verde. A luz azul no ocelo estimula parcialmente ambos os receptores S e L, mas a absorção de luz azul pelo fotorreceptor L dos ocelos é muito maior que nos receptores S. Isso acontece porque além de possuir uma largura de banda de absorção muito mais ampla que os receptores S, o tipo de opsina expressa nos receptores L dos ocelos possui pico de absorção em comprimentos de onda mais curtos do que o dos olhos compostos (Velarde et al., 2005, Figura 2). Também é válido ressaltar que as estimulações monocromáticas na via Ocelar favorecem a estimulação de receptores que estão dispostos em direção ao solo, e não em direção ao céu

Comparando as respostas fototáticas das abelhas aos pares de estímulo monocromático nos diferentes grupos experimentais, observamos que para o par UV vs. verde os animais do grupo Ocelar diferem daquelas dos grupos via Óptica e controle. Enquanto animais do grupo via Ocelar possuem maior atração pela luz verde, animais dos grupos via Óptica e controle são mais atraídos à luz UV. No Capítulo 1, demonstramos que animais do grupo via Ocelar realizam

trajetos fototáticos com menor tempo e maior linearidade para a luz verde do que para as luzes UV e azul. Junto aos resultados deste Capítulo, temos boas evidências de que a participação dos receptores L é maior na via Ocular, ao contrário do que ocorre na via Óptica, onde parece haver maior contribuição dos receptores S. Provavelmente por essa razão, animais do grupo via Óptica não formam mais atraídos por verde do que azul, enquanto animais do grupo controle foram. Ainda que os padrões de orientação fototática aos estímulos monocromáticos sejam similares nos grupos controle e via Óptica, indicando maior contribuição dos olhos compostos do que dos ocelos para este comportamento visuomotor, observamos que os sinais provenientes dos ocelos aumentam a atração fototática pela luz verde em animais controle.

4.2 O processamento fototático envolve somatório linear dos sinais de distintos fotorreceptores?

No presente estudo, realizamos testes de orientação fototática contrapondo um elemento monocromático a misturas policromáticas diversas visando testar se a fototaxia de abelhas pré-adaptadas ao escuro poderia envolver qualquer tipo de processamento cromático. Baseados na proposta de processamento linear oriunda do estudo de Menzel e Greggers (1985), esperávamos que as abelhas se orientassem com maior frequência em direção às misturas policromáticas, uma vez que todas essas misturas geram mais fótons absorvidos pelos três receptores do que o elemento monocromático contraposto às mesmas. No entanto, nossos resultados com abelhas do grupo controle mostram que para muitas combinações cromáticas o processamento não parece ser linear, visto que não houve maior atratividade das abelhas pela mistura policromática em relação ao elemento monocromático. Esse efeito de não-linearidade hipoaditiva ocorreu para 5 dos 9 pares de estímulo testados. Estes dados sugerem que mesmo possuindo um componente acromático nas respostas fototáticas, responsável pelo processamento da intensidade luminosa (ver Capítulo 1), parece haver também algum nível de processamento cromático. Em 1979, Fischbach mostrou que a mosca *Drosophila melanogaster* processa luz de uma forma espectralmente antagônica na fototaxia positiva, sugerindo visão de cores na resposta fototática. Neste estudo, as moscas foram mais atraídas para o estímulo monocromático UV do que para misturas de cores contendo UV.

Em 1985, Menzel e Greggers realizaram experimentos para testar se havia indícios de processamento cromático nas respostas fototáticas de *Apis mellifera*. Nos testes realizados em labirinto Y, um dos braços foi iluminado com uma luz monocromática verde (537nm) e o outro braço do labirinto iluminado com misturas de cores contendo o verde. Contrariamente aos

nossos resultados, estes autores encontraram apenas respostas relacionadas a processamento linear, ou seja, os animais sempre preferiam a mistura de cores, indicando processamento acromático. Cabe ressaltar que a situação experimental era muito diferente da nossa, uma vez que tal experimento foi realizado com animais que saíam da colmeia na luz ambiente, e estas foram treinadas a entrar num alimentador em uma caixa escura, para posteriormente fazerem a escolha do estímulo visual no labirinto. Nossos testes foram realizados em laboratório, em ambiente totalmente escuro, como no caso da maioria dos estudos de fototaxia em insetos. Além disso, exploramos uma faixa espectral maior do que os testes realizados por Menzel & Greggers (1985). Seria interessante repetir nossos experimentos com abelhas pré-adaptadas à luz solar para ver se esta é a razão deste estudo ter resultados tão discrepantes em relação ao nosso.

Muitos estudos sobre processamento cromático apoiam-se na ideia de que a percepção de cores é codificada de maneira independente do processamento acromático no cérebro de abelhas (Daumer, 1956; Menzel, 1967). Essa independência nunca havia sido avaliada no contexto da fototaxia em abelhas, uma vez que este comportamento visual foi até hoje considerado como fruto de processamento puramente acromático. Nosso estudo é o primeiro a mostrar evidências de processamento cromático na atração fototática de abelhas. Apesar disso, estudos prévios já haviam demonstrado que a depender do comprimento de onda, a fototaxia em abelhas poderia ser inibida por condicionamento aversivo. Nestes estudos, abelhas evitavam ir para a luz azul, mas não para as luzes UV e verde, quando estes estímulos visuais eram associados a choque (Kirkerud et al., 2017; Marchal et al., 2019; Nouvian e Galizia 2020). Estes experimentos realizados em labirinto Y indicam que apenas a fototaxia para o comprimento de onda azul pode sofrer plasticidade por aprendizagem aversiva. Os autores sugerem que a orientação fototática de abelhas inclui etapas de decisão na qual o animal precisa interpretar o comprimento de onda, ou seja, usar visão de cores.

Nossos resultados ainda não nos permitem concluir totalmente que a resposta fototática de *Apis mellifera* no escuro envolve visão de cores. Para isso, estudos complementares usando outras combinações de luzes monocromáticas, apresentadas em diferentes intensidades luminosas, seriam necessários. Ainda que tenhamos utilizado uma irradiância baixa em todos os estímulos visuais apresentados no labirinto Y, não podemos descartar totalmente efeitos de saturação dos fotorreceptores ou de adaptação dos circuitos associados, até porque nada sabemos ainda sobre a arquitetura neural e conectividade das vias neurais específicas envolvendo a fototaxia de abelhas.

4.3 A linearidade do processamento fototático difere nas vias fototáticas Óptica e Ocelar?

Tanto no grupo via Óptica quanto no grupo via Ocelar encontramos efeitos de processamento fototático ora sinérgicos ora hipoaditivos, a depender da combinação cromática testada. No grupo via Óptica, 4 dos 9 pares de estímulo testados desencadearam respostas hipoaditivas às misturas cromáticas, enquanto 5 geraram maior atração à mistura cromática, coerente com processamento linear. O tempo gasto pelas abelhas do grupo via Óptica nas orientações fototáticas foram maiores para o par verde vs. azul+ verde, quando comparado aos demais pares de estímulo contendo luz verde, sugerindo que estes estímulos são mais ambíguos/similares no processamento neural desta via. Embora nossa expectativa fosse de que indícios de processamento cromático pudessem existir apenas na via Óptica, as respostas de animais da via Ocelar a misturas cromáticas foram majoritariamente hipoaditivas. Apenas no caso do par de estímulos azul vs. azul+verde, as abelhas foram mais atraídas pela mistura policromática, enquanto processamento hipoaditivo foi observado para 8 das 9 misturas cromáticas.

Quando comparamos as distribuições nos distintos testes entre os grupos experimentais, nossos resultados mostram que nos casos em que há diferença entre os grupos, o grupo via Ocelar apresenta uma tendência a se orientar para o estímulo monocromático, enquanto os grupos controle e via Óptica são mais atraídos à mistura de cores. Tais evidências podem ser observadas nas Figuras 19, 20 e 22. Cabe ressaltar que quase não existem estudos sobre o tipo de processamento espectral que ocorre nos interneurônios conectados aos ocelos das abelhas. Sabe-se que os neurônios L da via Ocelar (interneurônios) são neurônios de banda larga, com picos de sensibilidade em 340 e 500nm (Milde, 1984), logo processam informações acromáticas recebendo sinais dos fotorreceptores S e L. Seguindo esta linha de pensamento, tais neurônios não seriam os responsáveis pelo processamento cromático sugerido no presente trabalho para a via Ocelar.

A retina dorsal do ocelo mediano recebe a parte mais focada e com maior resolução da imagem (Ribi et al., 2011), sendo o campo visual dos fotorreceptores da retina dorsal dos ocelos predominantemente sensível a luz polarizada que incide verticalmente (Ogawa et al., 2017), logo esta região seria capaz de processar frequências espaciais e contrastes relativamente altos (Berry et al., 2007). Nos ocelos laterais, quatro dos cinco grandes neurônios Ocelares L

descendentes projetam a maior parte de seus dendritos para a retina dorsal (Hung e Ibbotson, 2014), sugerindo que esta é a maior região de densidade de fotorreceptores nos ocelos. Em 1984, Milde sugeriu a possibilidade de haver um “especialista” espectral na via Ocelar que receberia informações de apenas um tipo de fotorreceptor, como relatado em gafanhotos por Wilson (1978). Ainda não existem trabalhos que confirmem a existência de neurônios de banda estreita ou neurônios com oponência cromática conectados à via Ocelar das abelhas, logo, as respostas espectrais hipoaditivas relatadas no presente estudo carecem de uma base neurofisiológica.

Curiosamente, Garcia et al. (2017) sugerem um modelo matemático no qual os neurônios S da via Ocelar forneceria informação espectral adicional para regiões de integração do processamento de cores, contribuindo para o fenômeno de constância cromática. As informações emitidas pelos neurônios S teriam como intuito fornecer medições instantâneas das características da luz ambiente, por meio das respostas dos dois tipos de fotorreceptor dos ocelos, sendo esta usada para permitir os mecanismos de adaptação para atingir a constância da cor. Os autores sugerem que essa contribuição ocelar para circuitos superiores de processamento visual permitiria a uma adaptação cromática eficaz e direta. Nossos dados também sugerem que a via Ocelar possa envolver algum tipo de processamento cromático, pelo menos no contexto de fototaxia.

O presente estudo sobre o papel de distintos fotorreceptores e vias neurais na fototaxia inata de abelhas demonstra que embora se trate de um comportamento inato e estereotipado, este tipo de orientação visuoespacial pode envolver fenômenos de dominância ou oponência espectral tanto na via Óptica quanto na via Ocelar. Estudos futuros serão necessários para desvendar a anatomia e a fisiologia dos neurônios responsáveis pelo processamento fototático em cada uma destas vias neurais, bem como os locais onde estas vias interagem no cérebro da abelha durante a fototaxia. Estudos comportamentais e psicofísicos complementares também seriam de grande valia para entendermos melhor a contribuição de cada uma destas vias para os processos de percepção visual durante fototaxia.

5 REFERÊNCIAS

- Able, K. P. (1980). Mechanisms of orientation, navigation and homing. *Animal migration, orientation and navigation*, 283-373.
- Anholt, R. R. (2020). Evolution of epistatic networks and the genetic basis of innate behaviors. *Trends in Genetics*, 36(1), 24-29.
- Autrum, H. (1964). Die spektrale empfindlichkeit einzelner Sehzellen des Bienenauges. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 48(4), 357-384.
- Avarguès-Weber, A., Mota, T., & Giurfa, M. (2012). New vistas on honey bee vision. *Apidologie*, 43, 244-268.
- Backhaus, W. (1991). Color opponent coding in the visual system of the honeybee. *Vision research*, 31(7-8), 1381-1397.
- Avarguès-Weber, A., & Mota, T. (2016). Advances and limitations of visual conditioning protocols in harnessed bees. *Journal of Physiology-Paris*, 110, 107–118
- Bates, D., Kliegl, R., Vasishth, S., & Baayen, H. (2015). Parsimonious mixed models. *arXiv preprint arXiv:1506.04967*.
- Baker, R. (1984). *Bird navigation: the solution of a mystery?*. CUP Archive.
- Berry, R. P., Stange, G., & Warrant, E. J. (2007). Form vision in the insect dorsal ocelli: an anatomical and optical analysis of the dragonfly median ocellus. *Vision research*, 47(10), 1394-1409.
- Berthier, M., & Provenzi, E. (2021). The quantum nature of color perception: Uncertainty relations for chromatic opposition. *Journal of Imaging*, 7(2), 40.
- Bertholf, L. M. (1931). Reactions of the honeybee to light. *Journal of Agricultural Research*, 42(7), 379.
- 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.
- Booth, L. H., Fisher, P., Heppelthwaite, V., & Eason, C. T. (2004). Risk of FeraCol baits to non-target invertebrates, native skinks, and weka. *Science for Conservation*, 239, 18.
- Borst, A. (2009). Drosophila's view on insect vision. *Current biology*, 19(1), R36-R47.
- Bottesch, M., Gerlach, G., Halbach, M., Bally, A., Kingsford, M. J., & Mouritsen, H. (2016). A magnetic compass that might help coral reef fish larvae return to their natal reef. *Current Biology*, 26(24), R1266-R1267.
- Brandt, R., & Vorobyev, M. (1997). Metric analysis of threshold spectral sensitivity in the honeybee. *Vision research*, 37(4), 425-439.
- Briscoe, A. D., & Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insects. *Annual review of entomology*, 46(1), 471-510.

- Brody, T., & Cravchik, A. (2000). *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *The Journal of cell biology*, *150*(2), F83-F88.
- Chittka, L., & Menzel, R. (1992). The evolutionary adaptation of flower colours and the insect pollinators' colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, *171*, 171-181.
- Chittka, L., & Tautz, J. (2003). The spectral input to honeybee visual odometry. *Journal of Experimental Biology*, *206*(14), 2393-2397.
- Chittka, L., Faruq, S., Skorupski, P., & Werner, A. (2014). Colour constancy in insects. *Journal of Comparative Physiology A*, *200*, 435-448.
- 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., & Baron, J. (1994). Biological compasses and the coordinate frame of landmark memories in honeybees. *Nature*, *368*(6467), 137.
- Coombe, P. E. (1981). Wavelength specific behaviour of the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Comparative Physiology*, *144*, 83-90.
- Daumer, K. (1956). Reizmetrische untersuchung des Farbensehens der Bienen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, *38*, 413-478.
- De Souza, J., Hertel, H., Ventura, D. F., & Menzel, R. (1992). Response properties of stained monopolar cells in the honeybee lamina. *Journal of Comparative Physiology A*, *170*, 267-274.
- De Waal, F. B. (2003). Darwin's legacy and the study of primate visual communication. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1000*(1), 7-31.
- Duelli, P., & Wehner, R. (1973). The spectral sensitivity of polarized light orientation in *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera). *Journal of Comparative Physiology A*, *86*, 37-53.
- 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 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.
- Fain, G. L., Hardie, R., & Laughlin, S. B. (2010). Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Current Biology*, *20*(3), R114-R124.
- Fischbach, K. F. (1979). Simultaneous and successive colour contrast expressed in "slow" phototactic behaviour of walking *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology*, *130*(2), 161-171.
- Forward, R. B., & Waterman, T. H. (1973). Evidence for e-vector and light intensity pattern discrimination by the teleost *Dermogenys*. *Journal of comparative physiology*, *87*, 189-202.
- Gao, S., Takemura, S. Y., Ting, C. Y., Huang, S., Lu, Z., Luan, H., ... & Lee, C. H. (2008). The neural substrate of spectral preference in *Drosophila*. *Neuron*, *60*(2), 328-342.

- Garcia, J. E., Hung, Y. S., Greentree, A. D., Rosa, M. G., Endler, J. A., & Dyer, A. G. (2017). Improved color constancy in honey bees enabled by parallel visual projections from dorsal ocelli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(29), 7713-7718.
- Geiser, F. X., & Labhart, T. (1982). Electrophysiological investigation on the ocellar retina of the honeybee (*Apis mellifera*). *Verhandlungen der Dtsch. Zool. Gesellschaft*, *75*, 307.
- 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). <https://doi.org/10.1007/bf00227381>
- Giurfa, M., & Menzel, R. (1997). Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems. *Current opinion in neurobiology*, *7*(4), 505-513.
- 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.
- Giurfa, M., & Vorobyev, M. (1998). The angular range of achromatic target detection by honey bees. *Journal of Comparative Physiology A*, *183*, 101-110.
- Giurfa, M. (2004). Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, *91*, 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., & 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.
- 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.
- Goldsmith, T. H., & Bernard, G. D. (1974). The visual system of insects. In *The physiology of insecta* (pp. 165-272). Academic Press.
- Goodman, L.J. (1981). Organization and physiology of the insect dorsal ocellar system. *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. VII 6C, ed. H. Autrum, pp. 201-286. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Goodman, L. J., Fletcher, W. A., Guy, R. G., Mobbs, P. G., & Pomfrett, C. D. (1987). Motion sensitive descending interneurons, ocellar LD neurons and neck motoneurons in the bee: a neural substrate for visual course control in *Apis mellifera*. In *Neurobiology and behavior of honeybees* (pp. 158-171). Springer Berlin Heidelberg.
- Gribakin, F. G. (1975). Functional morphology of the compound eye of the bee. *The compound eye and vision of insects*, 154, 176.
- 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). MATIC LIGHTS OF EQUAL INTENSITIES. *The Journal of Experimental Zoology*, *14*(3), 467.

Grünewald, B., 1999. Physiological properties and response modulations of mushroom body feedback neurons during olfactory learning in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* 185, 565–576.

Guy, R. G., Goodman, L. J., & Mobbs, P. G. (1979). Visual interneurons in the bee brain: synaptic organisation and transmission by graded potentials. *Journal of comparative physiology*, 134, 253-264.

Hardie, R. C., & Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, 413(6852), 186-193.

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

Heinze, S., 2017. Unraveling the neural basis of insect navigation. *Current opinion in insect science* 24, 58–67.

Hempel de Ibarra, N., Vorobyev, M., & Menzel, R. (2014). Mechanisms, functions and ecology of colour vision in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology. A, 25 Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 200(6), 411–433. <https://doi.org/10.1007/s00359-014-0915-1>

Henze, M. J., Dannenhauer, K., Kohler, M., Labhart, T., & Gesemann, M. (2012). Opsin evolution and expression in arthropod compound eyes and ocelli: insights from the cricket *Gryllus bimaculatus*. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 1-16.

Herman, L. M., Richards, D. G., & Wolz, J. P. (1984). Comprehension of sentences by bottlenosed dolphins. *Cognition*, 16(2), 129-219.

Hertel, W. (1978). ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM STOMATOGASTRISCHEN NERVEN-SYSTEM VON PERIPLANETA AMERICANA L.

Hertel, H. (1980). Chromatic properties of identified interneurons in the optic lobes of the bee. *Journal of comparative physiology*, 137, 215-231.

Hertel, H. (1982). The effect of spectral light deprivation on the spectral sensitivity of the honey bee. *Journal of Comparative Physiology ? A*, 147(3), 365–369. <https://doi.org/10.1007/bf00609670>

Hertel, H., & Maronde, U. (1987). Processing of visual information in the honeybee brain. In *Neurobiology and behavior of honeybees* (pp. 141-157). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

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

Homberg, U., Heinze, S., Pfeiffer, K., Kinoshita, M., El Jundi, B., 2011. Central neural coding of sky polarization in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366, 680–687.

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R. M., Schuetzenmeister, A., Scheibe, S., & Hothorn, M. T. (2016). Package ‘multcomp’. *Simultaneous inference in general parametric models. Project for Statistical Computing, Vienna, Austria*.

Hung, Y. S., van Kleef, J. P., & Ibbotson, M. R. (2011). Visual response properties of neck motor neurons in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 197(12), 1173-1187.

Hung, Y. S., van Kleef, J. P., Stange, G., & Ibbotson, M. R. (2013). Spectral inputs and ocellar contributions to a pitch-sensitive descending neuron in the honeybee. *Journal of Neurophysiology*, *109*(4), 1202-1213.

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

Ibarra, N. H. de, M., G., & M., V. (2002). Discrimination of coloured patterns by honeybees through chromatic and achromatic cues. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *188*(7), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0322-x>

Ibbotson, M. R. (1991). Wide-field motion-sensitive neurons tuned to horizontal movement in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A*, *168*(1), 91-102.

Kaiser, W. (1975). The relationship between visual movement detection and colour vision in insects. *The compound eye and vision of insects*, 359-377.

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*, *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.

Kirkerud, N. H., Schlegel, U., & Giovanni Galizia, C. (2017). Aversive learning of colored lights in walking honeybees. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *11*, 94.

Kojima, S., & Doupe, A. J. (2007). Song selectivity in the pallial-basal ganglia song circuit of zebra finches raised without tutor song exposure. *Journal of neurophysiology*, *98*(4), 2099-2109.

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

Kretzberg, J., Ernst, U. (2013). Vision. In: Galizia, C., Lledo, PM. (eds) *Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10769-6_18

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.

López-Cruz, A., Sordillo, A., Pokala, N., Liu, Q., McGrath, P. T., & Bargmann, C. I. (2019). Parallel multimodal circuits control an innate foraging behavior. *Neuron*, *102*(2), 407-419.

Lorenz, K. (1935). Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. Der Artgenosse als auslösendes Moment sozialer Verhaltensweisen. *Journal für Ornithologie. Beiblatt.(Leipzig)*.

- Mannino, G., Casacci, L. P., Bianco Dolino, G., Badolato, G., Maffei, M. E., & Barbero, F. (2023). The Geomagnetic Field (GMF) is necessary for black garden ant (*Lasius niger* L.) foraging and modulates orientation potentially through aminergic regulation and MagR Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5), 4387.
- Marchal, P., Villar, M. E., Geng, H., Arrufat, P., Combe, M., Viola, H., ... & Giurfa, M. (2019). Inhibitory learning of phototaxis by honeybees in a passive-avoidance task. *Learning & Memory*, *26*(10), 412-423.
- Mauelshagen, J. (1993). Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *Journal of neurophysiology*, *69*(2), 609-625.
- Menzel, R. (1967). Untersuchungen zum Erlernen von Spektralfarben durch die Honigbiene (*Apis mellifica*). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, *56*(1), 22-62.
- Menzel, R., & Snyder, A. W. (1974). Polarised light detection in the bee, *Apis mellifera*. *Journal of comparative physiology*, *88*, 247-270.
- Menzel, R., & Blakers, M. (1976). Colour receptors in the bee eye— Morphology and spectral sensitivity. *Journal of Comparative Physiology* ■ *A*, *108*(1), 11-13.
- Menzel, R., & Greggers, U. (1985). Natural phototaxis and its relationship to colour vision in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, *157*(3), 311-321.
- Menzel, R., & Backhaus, W. (1989). Color vision honey bees: Phenomena and physiological mechanisms. In *Facets of vision* (pp. 281-297). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Menzel, R., & Blakers, M. (1976). Colour receptors in the bee eye— Morphology and spectral sensitivity. *Journal of Comparative Physiology* ■ *A*, *108*(1), 11-13.
- Menzel, R. (1979). Spectral sensitivity and color vision in invertebrates. [W:] *Handbook of Sensory Physiology Vol 7/6/6A. Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates*. auTruM H.(red.).
- Menzel, R. (1985, June). Colour pathways and colour vision in the honeybee. In *Central and Peripheral Mechanisms of Colour Vision: Proceedings of an International Symposium Held at The Wenner-Gren Center Stockholm, June 14–15, 1984* (pp. 211-233). London: Palgrave Macmillan UK.
- 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. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, *185*(4), 323-340.
- Menzel, R., & Manz, G. (2005). Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *Journal of Experimental Biology*, *208*(22), 4317-4332.
- Milde, J. J. (1984). Ocellar interneurons in the honeybee: structure and signals of L-neurons. *Journal of Comparative Physiology A*, *154*, 683-693.
- Milde, J. J. (1987). The ocellar system of the honeybee. In *Neurobiology and behavior of honeybees* (pp. 191-200). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Mizunami, M. (1995). Functional diversity of neural organization in insect ocellar systems. *Vision Research*, 35(4), 443-452.
- 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. *J. Insect Physiol.* 30: 43-58.
- Moore, F. R. (1987). Sunset and the orientation behaviour of migrating birds. *Biological Reviews*, 62(1), 65-86.
- Mota, T., Yamagata, N., Giurfa, M., Gronenberg, W., & Sandoz, J. C. (2011). Neural organization and visual processing in the anterior optic tubercle of the honeybee brain. *Journal of Neuroscience*, 31(32), 11443-11456.
- 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.
- Nouvian, M., & Galizia, C. G. (2020). Complexity and plasticity in honey bee phototactic behaviour. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
- Orlowski, J., Harmening, W., & Wagner, H. (2012). Night vision in barn owls: visual acuity and contrast sensitivity under dark adaptation. *Journal of vision*, 12(13), 4-4.
- 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*, 220(9), 1701-1708.
- Pan, K. C., & Goodman, L. J. (1977). Ocellar projections within the central nervous system of the worker honey bee, *Apis mellifera*. *Cell and tissue research*, 176(4), 505-527.
- Pan K. C. (1981) The neural organization of the ocellar system and associated pathways in the central nervous system of the worker honeybee *Apis mellifera*. PhD Thesis, University of London.
- Pasteur, G. (1982). A classificatory review of mimicry systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13(1), 169-199.
- 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.
- 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.
- Pfeiffer, K., Homberg, U., 2014. Organization and functional roles of the central complex in the insect brain. *Annual review of entomology* 59, 165–184.
- Pinheiro-da-Silva, J., Silva, P. F., Nogueira, M. B., & Luchiari, A. C. (2017). Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*). *Animal cognition*, 20(2), 159-169.

- Putman, N. F., Scanlan, M. M., Billman, E. J., O'Neil, J. P., Couture, R. B., Quinn, T. P., ... & Noakes, D. L. (2014). An inherited magnetic map guides ocean navigation in juvenile Pacific salmon. *Current Biology*, 24(4), 446-450.
- Rampon, C., & Tsien, J. Z. (2000). Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity. *Hippocampus*, 10(5), 605-609.
- 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.
- 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.
- Rossel, S., & Wehner, R. (1986). Polarization vision in bees. *Nature*, 323(6084), 128.
- Sander, W. (1933). Phototaktische Reaktionen der Bienen auf Lichter verschiedener Wellenlänge. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 20(1), 267-286.
- 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.
- Schümperli, R. A. (1973). Evidence for colour vision in *Drosophila melanogaster* through spontaneous phototactic choice behaviour. *Journal of Comparative Physiology A*, 86(1), 77-94.
- 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.
- Spaethe, J., & Briscoe, A. D. (2005). Molecular characterization and expression of the UV opsin in bumblebees: three ommatidial subtypes in the retina and a new photoreceptor organ in the lamina. *Journal of Experimental Biology*, 208(12), 2347-2361.
- 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, R., & Braren, B. (1989). Ultraviolet laser ablation of organic polymers. *Chemical Reviews*, 89(6), 1303-1316.
- 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, M. V., Moore, R. J., Thurrowgood, S., Soccol, D., & Bland, D. (2012). From biology to engineering: insect vision and applications to robotics. *Frontiers in sensing*, 19-39.

- Stavenga, D. G. (1992). Eye regionalization and spectral tuning of retinal pigments in insects. *Trends in neurosciences*, 15(6), 213-218.
- Steinberg, R. H., Reid, M., & Lacy, P. L. (1973). The distribution of rods and cones in the retina of the cat (*Felis domesticus*). *Journal of Comparative Neurology*, 148(2), 229-248.
- Takeuchi, Y., Arikawa, K., & Kinoshita, M. (2006). Color discrimination at the spatial resolution limit in a swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology*, 209(15), 2873-2879.
- 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.
- Thorpe, W. H. (1951). THE LEARNING ABILITIES OF BIRDS. *Ibis*, 93(2), 252-296.
- Tomsic, D., Sztarker, J., Berón de Astrada, M., Oliva, D., & Lanza, E. (2017). The predator and prey behaviors of crabs: from ecology to neural adaptations. *Journal of experimental biology*, 220(13), 2318-2327.
- 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.
- Vieira, A. R., Salles, N., Borges, M., & Mota, T. (2018). Visual discrimination transfer and modulation by biogenic amines in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 221(9), jeb178830.
- Von Frisch, K. (1914). *Der farbensinn und formensinn der biene* (Vol. 1). Fischer.
- Von Frisch K (1949) Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzen der Bienen. *Experientia* (Basel) 5:142–148
- Von Frisch, K. (1967). The dance language and orientation of bees.
- Yamaguchi, S., & Heisenberg, M. (2011). Photoreceptors and neural circuitry underlying phototaxis in insects. *Fly*, 5(4), 333-336.
- 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.
- Yilmaz, M., & Meister, M. (2013). Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. *Current Biology*, 23(20), 2011-2015.
- Walker, M. M., & Bitterman, M. E. (1985). Conditioned responding to magnetic fields by honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 157(1), 67-71.

- Wakakuwa, M., Kurasawa, M., Giurfa, M., & Arikawa, K. (2005). Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften*, 92(10), 464-467.
- Warrant, E., & Nilsson, D. E. (Eds.). (2006). *Invertebrate vision*. Cambridge University Press.
- Warrant, E. J., Kelber, A., Wallén, R., & Wcislo, W. T. (2006). Ocellar optics in nocturnal and diurnal bees and wasps. *Arthropod structure & development*, 35(4), 293-305.
- Waterman, T. H., & Aoki, K. (1974). E-vector sensitivity patterns in the goldfish optic tectum. *Journal of comparative physiology*, 95, 13-27.
- Wickham, H. (2011) ggplot2 Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. 3, 180–185.
- Wilson, M. (1978). The functional organisation of locust ocelli. *Journal of comparative physiology*, 124, 297-316.
- Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E., 1993. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238–240.