



## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLE

DISEÑO DE APARATO AUTOMATIZADO PARA LA EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE CLÁSICO EN *Apis mellifera* var. *scutellata*Design of an Automated Apparatus for the Assessment of Classical Learning in *Apis mellifera* var. *scutellata*Brian NUMPAQUE<sup>1\*</sup>; Pedro RAVELO<sup>1b</sup>; Juan Carlos HERNÁNDEZ PEÑA<sup>2c</sup>; Marisol AMAYA-MÁRQUEZ<sup>2d</sup>; Germán GUTIÉRREZ<sup>1e</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Psicología, Facultad de Ciencias Humanas, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Carrera 30 Calle 45-05, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Carrera Carrera 30 Calle 45-05, Bogotá, Colombia.

\* For correspondence: [banumpaquep@unal.edu.co](mailto:banumpaquep@unal.edu.co)

**Recibido:** 21 de abril de 2021. **Revisado:** 13 de julio de 2022. **Aceptado:** 23 de noviembre de 2022

**Editor asociado:** Allan Smith

**Citation/ citar este artículo como:** Numpaque, B., Ravelo, P., Hernández Peña, J.C., Amaya-Márquez, M., y Gutiérrez, G. (2023). Diseño de aparato automatizado para la evaluación del aprendizaje clásico en *Apis mellifera* var. *scutellata*. *Acta Biol Colomb*, 28(3), 385-395. <https://doi.org/10.15446/abc.v28n3.95382>

## RESUMEN

La abeja de la miel, además de ser el polinizador más utilizado, es un insecto modelo para la investigación en ciencias del comportamiento. Con el propósito de facilitar e incentivar la investigación conductual en abejas en Colombia, se construyó un aparato experimental que utiliza la metodología de Respuesta de Extensión de Proboscide-PER para evaluar diversos fenómenos del aprendizaje, en este caso relacionados con el condicionamiento clásico. El diseño se basó en la versión de aparato elaborada por Smith y Burden (2014), rediseñando el sistema de control electrónico y el sistema de suministro de aire. Se realizaron tres experimentos que pusieron a prueba diferentes configuraciones del aparato y se evaluó la adquisición de respuesta condicionada, respuesta a control de aprendizaje específico y una prueba de retención. Los resultados mostraron que pequeñas modificaciones en diferentes elementos del aparato, así como distintos pasos simples no descritos en los protocolos más difundidos pueden tener implicaciones importantes en el desempeño de los individuos.

**Palabras clave:** Aprendizaje asociativo, Condicionamiento, Invertebrados, Automatización, PER

## ABSTRACT

The honeybee is not only the most used pollinator but an insect model for behavioral studies. With the purpose of facilitating and encouraging behavioral research in honeybees in Colombia, an experimental apparatus for using the Proboscis Extension Response methodology-PER was built. That apparatus allows the evaluation of numerous learning phenomena, mainly related to classical conditioning. The design is based on the Smith and Burden (2014) conditioning apparatus, modifying electronics, controls, and air supply systems. Three experiments were performed to test different configurations of the apparatus and acquisition of conditioned response, specific odor learning, and retention test. The results showed that both small modifications on different parts of the apparatus, as well as different steps not described in the most widespread protocols, may have important implications for the performance of individuals.

**Keywords:** Associative learning, Conditioning, Invertebrates, PER

## INTRODUCCIÓN

Ha transcurrido algo más de un siglo desde el descubrimiento del condicionamiento clásico; desde entonces, el número de herramientas y arreglos experimentales diseñados para entender este fenómeno ha crecido permanentemente. En el caso del número de especies investigadas, su número no ha crecido de manera considerable, sino que parece concentrarse en unos cuantos modelos animales.

Sólo una década después de las primeras publicaciones sobre condicionamiento clásico (Pavlov, 1927) usando cánidos, ya se encontraban estudios en invertebrados tales como artrópodos, moluscos, anélidos y cnidarios, entre otros (Razran, 1933). Sin embargo, los mamíferos resultaron siendo más usados y para la década de 1920 la mayoría de las investigaciones, tanto en condicionamiento clásico como en condicionamiento instrumental, se realizaron más con mamíferos que con todas las otras clases de animales combinadas. La tendencia para los años posteriores fue incluso aún más restrictiva y los estudios se centraron en unas pocas especies de mamíferos, especialmente en la rata albina (Beach, 1950). Distintas revisiones sugieren que el problema del número reducido de especies investigadas sigue presente en la psicología comparada, la cognición comparada o la neurociencia comportamental (Adkins-Regan, 1990; Dewsbury, 1998; Macrí y Richter, 2015; Shettleworth, 2009).

Una circunstancia que complica el uso de diversas especies es la dificultad de desarrollar técnicas y protocolos de trabajo para determinada especie, dado el costo temporal asociado al desarrollo y refinamiento de una tradición metodológica; además, algunas especies ofrecen dificultades para el trabajo de laboratorio y en otras no se logra establecer un protocolo consistente y repetible (Adkins-Regan, 1990). Debido a ello, existen solo algunos modelos para la investigación del aprendizaje asociativo que han logrado satisfacer las demandas de comparabilidad y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio. En el caso puntual del aprendizaje asociativo olfativo en invertebrados se cuentan como modelos exitosos el de la babosa (*Limax maximus*), la mosca de la fruta (*Drosophila* spp.) y la abeja melífera (*Apis mellifera*) (Gutiérrez, 1994).

Para el estudio del aprendizaje en abejas, el protocolo de Respuesta de Extensión de Probóscide (en adelante PER, por sus siglas en inglés) es una de las metodologías más exitosas para la investigación de la plasticidad conductual de los insectos y ha sido utilizada por más de 60 años en diferentes laboratorios a nivel mundial (Matsumoto et al., 2012). Si bien el protocolo PER introduce una metodología repetible y estructurada, no ha sido ajeno a modificaciones a lo largo de los años. Estas modificaciones han tenido diferentes causas: cambios en la instrumentación y materiales que obedecen a mejoras tecnológicas, cambios por efecto de disponibilidad de recursos, necesidades particulares de las investigaciones

que implican cambios en los arreglos procedimentales y/o cambios que surgen entre diferentes tradiciones de los laboratorios, entre otras. Estas variaciones procedimentales dificultan el uso de un protocolo común y se ha buscado unificar métodos y procedimientos para favorecer el análisis comparativo de las investigaciones (Matsumoto et al., 2012; Scheiner et al., 2013).

El primer protocolo PER fue creado por Takeda (1961) basado en un diseño orientado a evaluar los umbrales sensoriales de las abejas (Frings, 1944). Este protocolo fue mejorado por Bitterman et al. (1983), permitiendo evaluar fenómenos como adquisición, extinción, y roles del estímulo incondicionado, convirtiéndose en el protocolo más usado en años posteriores. A pesar de la trascendencia del protocolo de Bitterman, es común encontrar en la literatura numerosas variaciones procedimentales en diferentes experimentos, debidas a intentos por mejorar alguna característica del protocolo o por otros motivos (Abramson et al., 2011).

El primer intento de automatización del protocolo PER fue el aparato TestAutomat (Vareschi, 1971); sin embargo, el uso del aparato no se extendió por su complejidad técnica y elevado costo (Abramson y Boyd, 2001). En 2001, Abramson y Boyd desarrollaron un aparato para realizar pruebas PER que no requiriera el ensamblaje por una empresa especializada en electrónica. El aparato desarrollado tenía un costo cercano a USD 1000 y su complejidad era menor que la del TestAutomat. Quince años después, Smith y Burden (2014) desarrollaron una versión de aparato con algunos elementos comunes al modelo de Abramson (e.g., válvulas solenoidales), pero eliminando piezas como fotosensores que controlaban procesos. El prototipo de aparato de Smith y Burden estuvo orientado a su replicación en otros laboratorios.

La investigación conductual en abejas en Colombia es relativamente reciente, los trabajos publicados en áreas relacionadas con la conducta de estas especies son escasos. Las contribuciones abordan principalmente áreas como el forrajeo o la escogencia floral (Amaya-Márquez, 2009), aprendizaje al color con arenas experimentales de vuelo libre y condicionamiento instrumental en abejas *Apis mellifera* var. *scutellata* (Hernández, 2019) y sólo un estudio bajo el paradigma PER en abejas nativas sin aguijón *Melipona eburnea* Friese, 1900 (Amaya-Márquez et al., 2019). Los estudios geográficamente más cercanos sobre aprendizaje olfativo fueron realizados en Brasil (Abramson et al., 2006) o Panamá (Jernigan et al., 2014). En adición, los esfuerzos investigativos se encuentran principalmente en institutos o departamentos de biología, pero la apuesta por este tipo de investigaciones en laboratorios de psicología experimental hasta ahora muestra sus primeras iniciativas. Dichas iniciativas han evidenciado la dificultad de realizar algunas fases, como el suministro adecuado de los estímulos olfativos, la manipulación de animales pequeños, la

necesidad de suministro de cantidades precisas de sacarosa y fragancia, el control experimental de variables, entre otras.

El propósito de la presente investigación fue desarrollar una versión automatizada de un aparato para la evaluación del condicionamiento clásico en abejas *Apis mellifera* var. *scutellata* que disminuyera el número de procedimientos ejecutados por el experimentador comparado con las versiones más recientes de aparatos del mismo tipo encontrados en la literatura, con el propósito de disminuir el error inducido por el experimentador, disminuir el personal requerido para la tarea y aumentar el número de individuos sometidos en cada prueba. Para ello se realizaron un conjunto de experimentos con diferentes implementaciones tecnológicas que permitieran evaluar el desempeño de dichas implementaciones en función de la calidad de los datos obtenidos, buscando obtener una alta tasa de adquisición de respuesta condicionada con una baja respuesta en una prueba de control discriminativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres experimentos con tres versiones secuencialmente distintas basadas en el aparato de Smith y Burden (2014), poniendo a prueba las modificaciones consideradas más importantes y corrigiendo los errores asociados a dichas modificaciones. El Experimento 1 buscó realizar la primera prueba del aparato una vez éste se ensambló y su funcionamiento electrónico se mostró correcto. Puesto que se establecieron cambios en los materiales y mecanismos de funcionamiento del aparato, este experimento resultó siendo un banco de pruebas inicial para detectar anomalías en los datos obtenidos por el aparato. Dado que se observó una respuesta elevada en la prueba de control discriminativo (en adelante Prueba CD) por parte de los individuos en el Experimento 1, en el Experimento 2 se corrigieron posibles fuentes de contaminación en el aparato experimental inducidas por los cambios hechos en el aparato respecto a diseños anteriores, o debido a diferencias en la naturaleza de los materiales. Se buscaron fuentes de error adicionales que incidieran en la elevada respuesta a la fragancia de control. En el Experimento 3 se buscó descartar problemas asociados al reemplazo del sistema de bomba de acuario como fuente de aire usada por Smith y Burden, por un sistema de compresor industrial. También se buscó eliminar posibles problemas por la trayectoria de la corriente de aire. Los códigos fuente en lenguaje Java y Arduino, los planos y fotografías en detalle fueron alojados en un repositorio de Github <https://github.com/Banumpaquet/Automated-apparatus-for-assessment-of-classical-conditioning-learning-in-apis-mellifera-scutellataz>.

## SUJETOS

Se utilizaron 267 abejas (110 Experimento 1, 70 Experimento 2 y 87 Experimento 3) forrajeadoras adultas

de la especie *Apis mellifera scutellata*. Todos los sujetos fueron recolectados de la misma colmena, perteneciente al apiario ubicado en la unidad de producción animal, en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Se capturaron abejas que se encontraban saliendo de la colmena, en el área circundante a la piquera, entre las 8h00 a.m. y 11h00 a.m. horas. Las pruebas se realizaron siempre con abejas capturadas el mismo día. Las capturas de esta fase se realizaron en los meses de abril a julio de 2018.

## APARATO

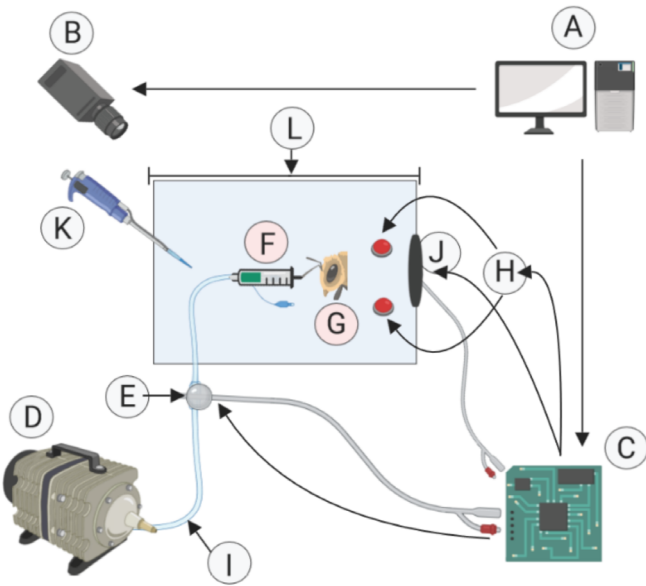
### EXPERIMENTO 1

Se desarrolló una versión modificada del instrumento diseñado por Brian Smith y Christina Burden (2014) con variaciones en diferentes aspectos, incluyendo el cambio o reemplazo de hardware por dispositivos equivalentes, con el objetivo de reducir los costos de fabricación del aparato sin pérdida de calidad e integrar partes más versátiles y modernas que proporcionen mayor flexibilidad técnica y tecnológica.

Una de las principales modificaciones fue la integración de un software de control computarizado a los dispositivos físicos, con capacidad de registro de los procedimientos, realización de anotaciones del ensayo y capacidad de exportar datos a Excel. También permitió controlar con libertad los Intervalos Entre Estímulos e Inter-Ensayo, ofreció control de un sistema de leds e indicaciones en pantalla que permitieron al investigador conocer el estado del proceso y los tiempos de puesta, retirada y suministro de solución de sacarosa de cada una de las abejas en la arena experimental. Dicho software controló el sistema de evacuación de aroma y el registro en vídeo del proceso. El software utilizó programación en lenguaje Java y fue montado en el entorno de desarrollo Netbeans IDE 8.1. La Figura 1 muestra un diagrama de conexiones que muestra la manera en que se conectan diferentes unidades o módulos, también permite identificar las partes o conexiones principales marcándolas con una letra (Fig.1).

Se realizó el cambio del sistema PLC o controlador lógico programable, de características enfocadas al control de procesos industriales, por una Unidad de Electrónica (C) compuesta de una plataforma Arduino Atmega 2560, un módulo de cuatro relés anclado a una tarjeta de conexiones UNL28003 y una fuente de poder de 110 V a 12 V para alimentar al sistema. Este cambio permitió establecer la conectividad entre el aparato experimental y la interfaz computarizada permitiendo el control del aparato desde la computadora (en el caso del diseño de Smith y Burden éste no se conecta a la computadora y tiene un sistema de accionamiento por pulsadores electromecánicos).

El sistema de distribución de fragancia también fue modificado: Se reemplazó la electroválvula serie LIF.042”



**Figura 1.** Diagrama de componentes y conexiones del aparato experimental. La computadora (A) se conecta con un circuito de vídeo (B) y con una Unidad de Electrónica (C) a través de un software dedicado. La UE (C) se compone de un módulo Arduino y unas tarjetas de relés que controlan diferentes dispositivos periféricos como una válvula (E), un extractor (J) y un sistema de luces LED (H). La válvula (E) controla el circuito de aire (I), que comunica al compresor (D) y al cartucho de olor (F). La abeja se ubica en una Zona (G) sobre la Arena Experimental (L), entre el cartucho de olor (F) y el ventilador (J). La sacarosa se suministra manualmente por medio de una micropipeta (K).

ID de configuración en “E”, por su elevado coste de importación, por una válvula local. En su reemplazo se utilizó una electroválvula (E) SPH 5/2- de diámetro de tubería ¼ NPT y alimentación tipo 12 V / DC de uso industrial. También se reemplazó el sistema generador de aire, que en Smith y Burden consiste en una de bomba de acuario por un compresor neumático convencional (D) con potencia nominal de 350 W y 8 bar. Se utilizó un filtro de aire de 0,05 micras para eliminar cualquier posible fuente de contaminación aromática por parte del compresor. El circuito de aire (I) que conecta el compresor (D), filtro de aire, válvula (E) y cartucho (F) consta de mangueras de poliuretano de 6 mm. Aunque en el diseño de Smith y Burden se utiliza un flujómetro, se prescindió de éste dado el coste del instrumento referenciado por ellos. Se utilizó un ventilador 12 V DC convencional, similar al utilizado por Smith y Burden. Las conexiones entre computadora (A), Unidad Electrónica (C) y arena experimental (L) se hicieron a través de cables de 1,5 m de longitud, permitiendo que cada módulo se pudiera ubicar separado, aislando el ruido producido por la electroválvula (E) de la arena experimental (L). Se consideró que el sistema tuviera una estructura robusta para uso ocasional en campo.

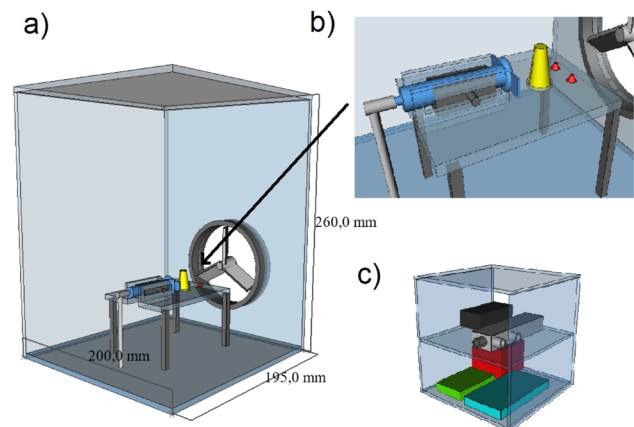
El aparato experimental está constituido por una caja elaborada en láminas de plexiglás transparente. En su interior se encuentra una platea o superficie horizontal llamada arena experimental (L), en donde se ubica el casquillo con la abeja inmobilizada. En esta zona la abeja queda orientada en dirección al cartucho de olor (F) que posee un papel filtro con una fragancia, la cual es disparada por el compresor en forma de una corriente de aire. Además, cuenta con un extractor (J) que recoge las partículas de aire con la fragancia y las dirige hacia otro espacio para evitar que la fragancia se mantenga en el lugar. También cuenta con dos luces LED (H); uno emite una luz verde mientras la fragancia está siendo expulsada por el cartucho de olor (F) y otro emite una luz roja para indicar el momento de proporcionar la solución de sacarosa al sujeto.

Los procesos son controlados por la computadora (A) a través de la interfaz de Java; esto incluye tanto los tiempos de cada ensayo, la emisión de la fragancia, el funcionamiento del extractor y de los bombillos. Sólo los procedimientos de colocación y alimentación de las abejas son controlados por el experimentador (Fig. 2).

## EXPERIMENTO 2

Se utilizó casi el mismo aparato que en el Experimento 1, con la adición de un flujómetro de rango 100 mL-1000 mL en el Circuito de Aire (I), y se instaló en el segmento comprendido entre la válvula solenoidal y el cartucho de olor.

El flujómetro permitió regularizar el caudal de aire proporcionado dado que el montaje utilizado en el Experimento 1 no permitía la regulación de caudales a un parámetro conocido. También se cambiaron las mangueras del Circuito de aire (I) en poliuretano, por mangueras de cánula nasal para el suministro de oxígeno medicinal en PVC. El cambio se realiza por la detección de contaminación



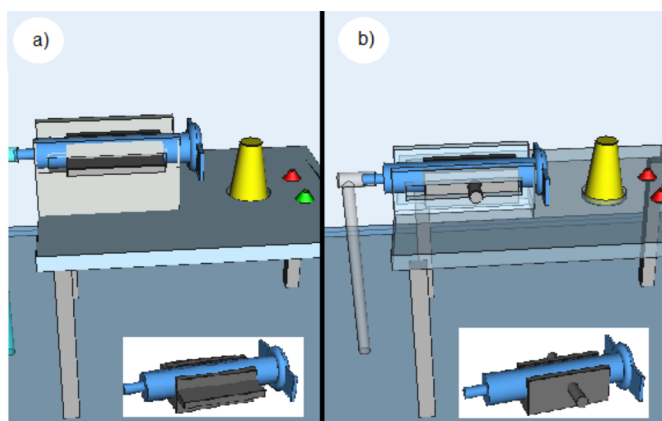
**Figura 2.** Planos y detalles del aparato experimental. a) Diagrama de la caja experimental, con sus dimensiones. b) Vista en detalle de la Arena Experimental (L). c) Caja de electrónica.

aromática del poliuretano al flujo de aire, el PVC elimina la contaminación aromática de los conductos.

### EXPERIMENTO 3

Se utilizó una versión modificada del aparato usado en el Experimento 2. Se reemplazó el compresor de aire debido a la detección de acumulación de olores en el sistema. Dado que el mecanismo interno del compresor está basado en pistones de aceite, el aire presentó la tendencia a almacenar compuestos volátiles de hidrocarburos. Se reemplazó por un compresor de aire odontológico sin aceite Shulz® de 745 W y 30 L. Se mantuvo el uso de un filtro de aire de partículas finas para el aire expulsado por el compresor. También se detectó que el diseño original de acople de cartucho de olor tenía una orientación fija del flujo de aire hacia la cabeza del animal, dicho flujo de aire puede realizar estimulación mecánica de las antenas y por tal motivo se redirigió. La nueva base del cartucho de olor se diseñó con una altura reducida y con un pivote para poder seleccionar el ángulo de eyección de aire.

También se modificaron las luces de señalización de procesos para el experimentador, que en los experimentos anteriores eran un par rojo-verde, por dos luces rojas idénticas. Se realiza el cambio porque el plexiglás puede reflejar alguna cantidad de luz verde la cual produce una mayor excitación visual en el espectro de visión de la abeja (532 nm). Aunque las mangueras de PVC se mostraron menos inductoras de olores, se detectó que eran contaminables por circulación invertida de aire desde el cartucho hacia el compresor; por tal motivo, se decidió que los 20 cm de manguera más cercanos al cartucho de olor se reemplacen con cada cambio de Cartucho (F). Se añadió un conector al Circuito (I) para facilitar esta tarea (Fig. 3).



**Figura 3.** Comparativa del diseño de base para cartucho de olor: a) El diseño utilizado en Experimento 1 es fijo y proporciona aire directo hacia la cabeza de la abeja. b) El diseño utilizado en los experimentos 2 y 3 tiene una altura menor y un pivote que permite cambiar la dirección del chorro de aire.

## ESTÍMULOS

### EXPERIMENTO 1

El conjunto de estímulos consta de una solución de sacarosa de concentración 1,4 M como Estímulo Incondicionado-EI, y el suministro de una corriente de aire impregnado con fragancia como Estímulo Condicionado-EC. El tiempo de presentación de los estímulos fue de 4 s para cada uno. Para el suministro del EC, se elaboraron unos cartuchos de olor idénticos a los descritos por Smith y Burden utilizando una jeringa de tuberculina de 1 mL y poniendo en su interior un papel filtro de 2 mm x 40 mm impregnado con 5 µL de fragancia de menta o canela. Se elaboraron cartuchos idénticos reemplazando la fragancia de menta o canela por fragancias como girasol o lavanda para ser utilizadas en la prueba de control. La selección de pares de fragancias (canela/menta - lavanda/girasol) se distribuyeron pseudo-aleatoriamente.

### EXPERIMENTO 2

Se utilizaron los mismos EC y EI con las mismas concentraciones y duraciones del Experimento 1, pero se redujo el número de fragancias empleadas. Para este experimento se pudo medir el volumen de aire suministrado: 1600 mL de aire impregnado con una fragancia de menta como EC. Para el caso de la fragancia de control correspondió únicamente a canela.

### EXPERIMENTO 3

Se utilizaron los mismos EC y EI del Experimento 2 con un cambio del tiempo de presentación de los estímulos a 5 s para cada uno. Se modificó el tiempo para evitar el subregistro de respuestas de extensión, dado que las abejas tuvieron la tendencia a demorar la respuesta en los primeros ensayos y algunas iniciaron la extensión justo en la finalización del anterior IEE (2 s transcurridos desde el inicio del EC), por lo que se extendió el IEE a 3 s.

## PROCEDIMIENTO

### EXPERIMENTO 1

El Protocolo de trabajo para la realización de pruebas de adquisición de respuesta condicionada fue el siguiente:

1. Se realizó la captura de las abejas en la colmena entre 8h00 a.m. y 11h00 a.m., y se trasladaron inmediatamente al laboratorio. Se capturaron abejas que se encontraron saliendo de la colmena empleando un vial de 2 x 4 cm.

2. Una vez las abejas estuvieron en el laboratorio se anestesiaron con hielo, se midieron los tiempos de anestesiado para el grupo de abejas buscando que el tiempo global de anestesiado fuera inferior a 20 minutos para todo el grupo. Para el anestesiado, se introduce una abeja a la vez cada dos minutos. El tiempo estimado de puesta en los arneses de restricción fue de poco menos de dos minutos.
3. Una vez se terminó de inmovilizar a todas las abejas se procedió con la alimentación a los 20 minutos de haber iniciado el anestesiado. Se mantuvieron los mismos tiempos desde el anestesiado para alimentar a cada abeja. El alimento suministrado consistió en 3  $\mu$ L de una solución de sacarosa de concentración 1,0 M. Esto toda vez que las pruebas se realizaron 3 horas después de la alimentación.
4. Una vez alimentada la última abeja, se contaron 3 horas para el inicio de la prueba de adquisición. El propósito de este tiempo consistió en proporcionar un periodo de habituación al arnés de restricción y, además, nivelar e incrementar la privación de alimento.
5. Transcurridas las 3 horas se inició la prueba. Se sometió a los individuos a una prueba de responsividad consistente en la estimulación de las antenas con una solución de sacarosa de concentración 1,4 M. Se descartaron de la prueba los individuos que no respondieron extendiendo su probóscide ante dicha estimulación (Smith y Burden, 2014).
6. Se ubicó al grupo de abejas lejos (60 cm) de la arena experimental; el computador estuvo conectado y listo para ejecutar las funciones preprogramadas de tiempo y número de ensayos.
7. Se insertó el cartucho de olor (F) en la base para cartucho dentro de la arena experimental (L). El cartucho se cargó con 5  $\mu$ L de la fragancia de prueba. En este caso se utilizaron fragancias de canela o de menta para el EC y fragancias de lavanda o girasol como fragancias de control. El cartucho quedó orientado hacia la cabeza de la abeja.
8. Se ubicó a la abeja en la zona (G) dentro de la arena experimental (L). Se ubicó a la abeja de tal manera que se produjeran el mínimo de vibraciones.
9. El arreglo convencional del programa permitió contar el tiempo desde que se puso la abeja dentro de la arena experimental (L) y luego de transcurridos 25 s el aroma fue liberado. Esto permitió reducir la disrupción causada por el traslado a la zona de condicionamiento y facilitó la contextualización con el nuevo ambiente en las abejas (Smith y Burden, 2014; Matsumoto et al., 2012). La fragancia tuvo un periodo de presentación de 4 s, momento en el que se encendió el extractor para evacuar la fragancia.
10. Transcurridos 2 s desde el inicio de la distribución de la fragancia, se encendió una luz que indicó al experimentador provocar la respuesta de extensión de probóscide vía estimulación antenal con una solución de sacarosa de 1,4 M. Se le permitió a la abeja libar 0,5  $\mu$ L de una solución de sacarosa por término de 4 s.
11. Después de presentar el estímulo incondicionado por 4 s, se esperó por 25 s para remover a la abeja, evitando efectos asociativos relacionados con el movimiento de la abeja.
12. En caso de que alguna abeja hubiese respondido a la presentación del EC en el primer ensayo, ésta se descartó de los análisis debido a la posible oferta de respuestas aleatorias no discriminativas.
13. Se preparó a la primera abeja para repetir el ensayo. Al utilizar 7 abejas y tardar un poco más de un minuto en el procedimiento, fue posible realizar el ensayo para el grupo completo de 7 abejas y disponer de un tiempo de margen de error, teniendo un Intervalo entre ensayos de 10 minutos.
14. Se inició un nuevo ensayo transcurridos 10 minutos desde la finalización del ensayo con la primera abeja, el procedimiento se repitió por cinco ensayos.
15. Luego del quinto ensayo de adquisición se esperó el transcurso de 1 hora para realizar un ensayo control donde se utiliza un cartucho de olor con la fragancia control (girasol o lavanda) sin presentar el EI. 10 minutos después se realizó una prueba de retención empleando la fragancia objetivo para los ensayos de adquisición (menta o canela).

## EXPERIMENTO 2

Se empleó el mismo protocolo que en el Experimento 1 sin modificaciones en alguno de los pasos. En este experimento los cambios se centraron en el aparato experimental.

## EXPERIMENTO 3

Se utilizó el protocolo del Experimento 1, realizando las siguientes modificaciones: el inicio de la presentación del EI se realizó desde el tercer segundo transcurrido luego del inicio de la presentación del EC (paso 10) y el periodo de presentación del EC pasó de 4 a 5 segundos (Paso 11). Las modificaciones entre experimentos se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Modificaciones y diferencias entre los experimentos

Experimento	N	EI-EC	Flujómetro	Sistema de aire
1	110	4s-4s IEE: 2s 4 EC	No	-Compresor industrial -Mangueras fijas

(Continúa)

Experimento	N	EI-EC	Flujómetro	Sistema de aire
2	70	4s-4s IEE: 2s 2EC	Si	-Compresor industrial -Mangueras fijas
3	87	5s-5s IEE: 3s 2EC	Si	-Compresor odontológico -Mangueras cambiadas junto con el cartucho

## RESULTADOS

### EXPERIMENTO 1

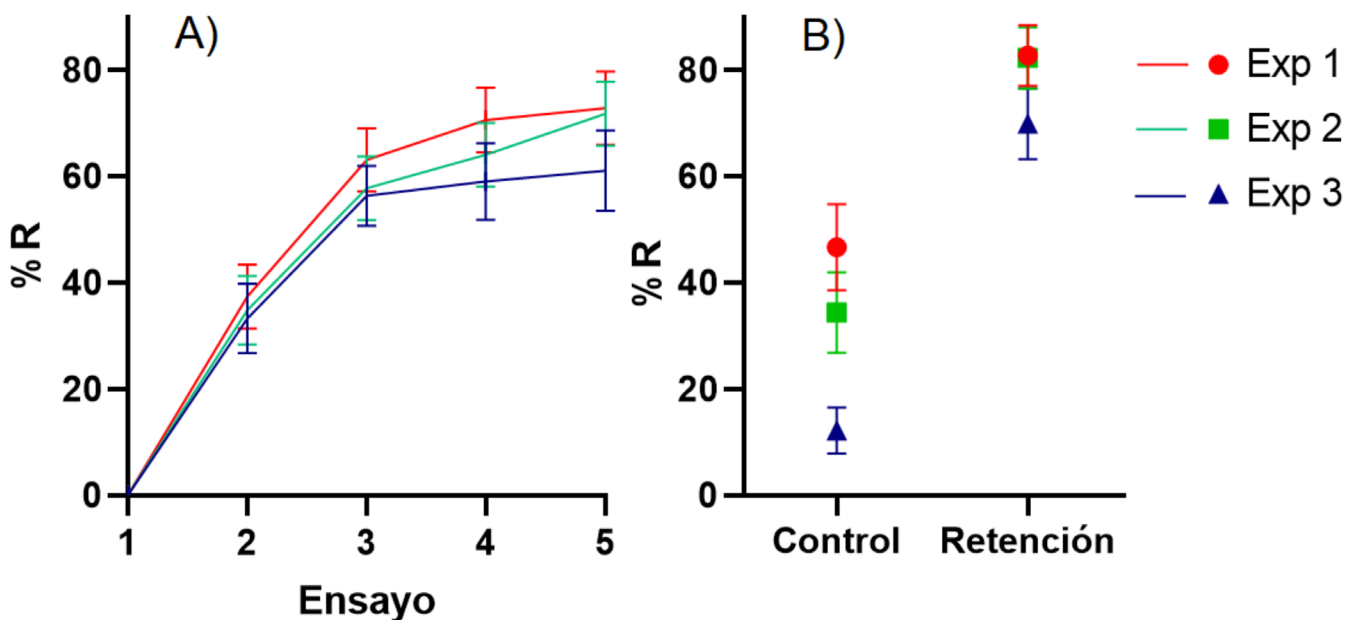
Se realizaron 22 pruebas, cada una con cinco individuos para un total de 110. Se descartaron 34 individuos que perecieron antes o durante la prueba de adquisición, o que no exhibieron respuesta de extensión durante la prueba de responsividad (paso número cinco del protocolo), también los que respondieron ante la presentación no contingente de fragancia (Paso 12 del protocolo). Los resultados (Fig. 4) están representados por la curva de color verde. Los resultados del Experimento 1 relacionan el porcentaje de respuesta grupal (la proporción de abejas que respondieron ante la presentación el EC durante su periodo de exposición) con el ensayo, mostrando los resultados respectivos de los cinco ensayos. También se muestran los resultados obtenidos en la prueba de control discriminativo y la prueba de retención. (La presentación de la fragancia EC). Los resultados obtenidos evidencian una curva de adquisición

pronunciada con tendencia asintótica en valores cercanos al 75 % de respuesta grupal, reflejando existencia de adquisición de respuesta condicionada.

### EXPERIMENTO 2

Se realizaron diez pruebas, cada una con siete individuos para un total de 70. Se descartaron 15 individuos que perecieron antes y durante la prueba de adquisición o que no exhibieron respuesta de extensión durante la prueba de responsividad (paso número 5 del protocolo), o que respondieron ante la presentación no contingente de fragancia (Paso 12 del protocolo). Los resultados (Fig. 4) están representados por la curva de color azul.

Los datos exhiben una pendiente de adquisición con una tendencia asintótica en el 73,2 %. La curva de adquisición del Experimento 2 refleja resultados similares a los obtenidos en el experimento 1, con una pendiente y valores más altos en la curva de adquisición, y con puntuaciones más bajas para la prueba de control comparadas con el Experimento 1. Para comparar si existieron cambios significativos entre los resultados obtenidos en la prueba de control comparados con los del experimento 1, se realizó un análisis de medida del efecto utilizando una prueba de U de Mann-Whitney, teniendo como hipótesis nula la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados porcentuales entre las pruebas del Experimento 1 y el Experimento 2. Se obtuvo que no fue posible rechazar la hipótesis nula dados los resultados de la prueba (U de Mann-Whitney: 117,00,  $p=0,389$ ).



**Figura 4.** A) Desempeño en 5 ensayos de adquisición de respuesta condicionada. B) Desempeños en el control y la prueba de retención de adquisición. Barras de error corresponden a error estándar.

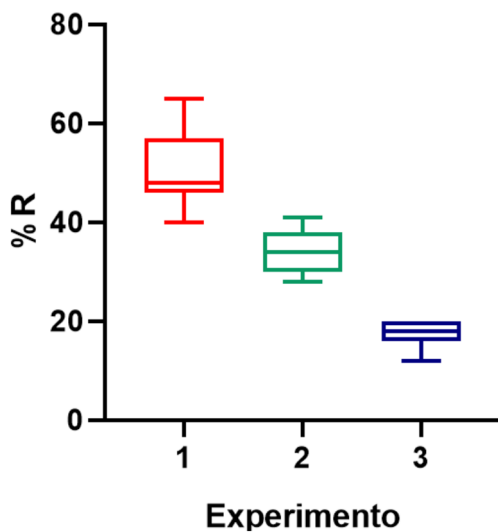


### EXPERIMENTO 3

Se realizaron diez pruebas cada una con cinco individuos y siete pruebas con seis individuos para un total de 87. Se descartaron siete individuos que perecieron antes, durante la prueba de adquisición o que no exhibieron respuesta de extensión durante la prueba de responsividad (paso número cinco del protocolo), o que respondieron ante la presentación no contingente de fragancia (Paso 12 del protocolo). Se realizó una prueba diaria por 17 días. Los resultados (Fig. 4) están representados por la curva de color amarillo.

Al igual que en los anteriores experimentos, los resultados del Experimento 3 relacionan el porcentaje de respuesta grupal con el ensayo, mostrando los resultados respectivos de los cinco ensayos. En adición, muestra los resultados obtenidos en la prueba de control (la presentación de una fragancia diferente de la fragancia EC) y la prueba de retención (La presentación de la fragancia EC). Los datos exhiben una pendiente de adquisición con una tendencia asintótica en el 60 %. Para el caso de los valores de la prueba de control, exhiben los valores más bajos presentados en los tres experimentos con un 13,8 % de respuesta a dicho estímulo.

Para identificar si existieron cambios relevantes entre los resultados obtenidos en las pruebas de control comparadas con las efectuadas en el Experimento 2, se realizó un análisis de medida del efecto utilizando una prueba de U de Mann-Whitney. Teniendo como hipótesis nula la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados porcentuales entre las pruebas del Experimento 2 y el Experimento 3, se encontró que no se rechaza la hipótesis nula y no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de los experimentos 2 y 3 (U de Mann-Whitney: 56.500,  $p=0,1$ ).



**Figura 5.** Comparativa de los porcentajes de respuesta grupal en las pruebas de control de respuesta a fragancia diferente.

### RESULTADOS GENERALES

Los resultados (Fig. 4) muestran líneas continuas entre los ensayos uno y cinco representando los desempeños grupales en la prueba de adquisición de respuesta condicionada para cada uno de los experimentos. Los desempeños en el ensayo de control y la prueba de retención (1h después de la finalización del ensayo cinco) se muestran indicando la media y el error estándar. Al realizar una comparación entre los resultados del porcentaje de respuesta al control de cada prueba de los experimentos se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos 1 y 3, mostrando que aunque no hubo una diferencia significativa secuencial, si existió una diferencia significativa acumulada con los cambios realizados en el aparato (U:83.500,  $p=0,01$ ).

### DISCUSIÓN

La curva obtenida en el Experimento 1 permite evidenciar la existencia de aprendizaje de tipo pavloviano utilizando el montaje elaborado. Los valores de curvas de adquisición de respuesta condicionada que se encuentran en la literatura son relativamente variables dependiendo del procedimiento, sin embargo, existen similitudes tanto en el valor asintótico como en el número de ensayos requeridos para llegar a la tendencia asintótica (Bitterman et al., 1983; Matsumoto et al., 2012; Scheiner et al., 2013; Smith et al., 1991; Smith y Burden, 2014; Takeda, 1961). Los valores exhibidos por la curva de adquisición de los experimentos realizados tienen una tendencia similar: valores asintóticos entre el 65 y 75 % de respuesta grupal y el inicio de la tendencia asintótica a partir del primer ensayo. Esto es similar a los resultados obtenidos por Smith al. (1991) en donde obtuvieron una tendencia asintótica alrededor del 65 % de respuesta desde el tercer ensayo, en el caso de los estudios de Bitterman et al. (1983) y Matsumoto et al. (2012) la tendencia asintótica fue cercana al 80 % desde el tercer ensayo. Los resultados también resultan similares a los obtenidos por Sandoz et al. (2002) en donde se realizó un procedimiento de condicionamiento estimulando una antena con ablación parcial. La literatura también ha mostrado modelos teóricos que simulan la adquisición de respuesta condicionada con una tendencia asintótica entre el 65 y 85 % desde el tercer ensayo. Respecto a la memoria específica del EC (el porcentaje de abejas que responden al EC y que no responden a la fragancia de control) los tres experimentos muestran desempeños más austeros que los mostrados por Matsumoto et al. (2012) que muestran valores superiores al 95 %, sin embargo, los desempeños pasaron a ser de cerca de la mitad en el experimento 1 a cercanos al 90 % en el experimento 3. Los ajustes secuenciales realizados a los aparatos incrementaron capacidad técnica para realizar el condicionamiento de los estímulos de olor, reflejado en un incremento en la respuesta de adquisición.



En el Experimento 2, el comportamiento de la curva de adquisición se mantuvo dentro de los valores esperados, con una pequeña reducción de los valores obtenidos en cada ensayo y con un techo asintótico menor. Respecto al valor de memoria específica del EC se obtiene una reducción del 46,1 % en el valor de respuesta al Control obtenido en el Experimento 1, a 34,5 % que, aunque no fue significativa, es muestra de que los ajustes marcaron una tendencia que ya en el tercer experimento es apreciable. Es posible que diferentes estímulos se presentaran en simultánea ante la presentación de dos fragancias y existiera un efecto de composición estimular: olores, señales luminosas y/o auditivas sirven de configuradores de ocasión que aumentan la probabilidad de emitir la respuesta en el ensayo de control y la sola modificación del flujómetro y las fragancias utilizadas no es suficiente para reducir la respuesta al control.

Para el caso del Experimento 3, se identifica que los cambios realizados en el aparato experimental permitieron reducir la respuesta al estímulo control comparado con el experimento 2 y dicha reducción fue significativa respecto al experimento 1. La reducción de respuesta a la prueba de control indica que el procedimiento y aparato del Experimento 3 resultan más efectivos para el establecimiento de condicionamiento olfativo específico a una fragancia. La comparación de los resultados del porcentaje de respuesta al control de cada prueba de los experimentos permitió identificar que ciertos elementos que suelen ser reportados sin mayor detalle en la literatura, pueden inducir efectos importantes en los resultados, en especial los relacionados con las características del sistema de distribución de aire y las fuentes de origen de dicho aire.

La propuesta de aparato inicial involucró la necesidad de rastrear posibles elementos que llevaban a resultados inusuales comparados con los exhibidos por la literatura. En adición, se identificó que algunos detalles escapan de las descripciones de los artículos y hacen parte del *saber hacer* de una tarea experimental, y que dichos detalles pueden tener consecuencias en los resultados. Se ha identificado que incluso el método de enfriamiento de las abejas, muchas veces omitido en los artículos, puede generar diferencias en las características de la adquisición, retención y responsividad de la respuesta condicionada (Frost et al., 2011). Sin embargo, se logró identificar algunas fuentes de error y éstas fueron corregidas a modo de permitir un protocolo funcional de adquisición de respuesta condicionada con abejas africanizadas colombianas alcanzando curvas de adquisición idóneas. Algunos estudios remarcan las características de generalización de estímulos en las variedades africanizadas en tareas de forrajeo, y unas curvas de adquisición de respuesta condicionada menos pronunciadas comparadas con sus contrapartes europeas (Abramson et al., 1997). En adición, resulta de interés la tendencia de la obtención de puntuaciones más altas en la prueba de retención comparada con los resultados

del quinto ensayo y la asíntota: en los tres experimentos se evidenció esta tendencia y en todos los casos hubo un incremento porcentual de al menos el 10 % de la respuesta comparado con el quinto ensayo. Es posible considerar que dicho incremento en la respuesta se deba a un efecto inercial del aprendizaje, en donde se mantiene la tendencia de crecimiento de la respuesta grupal a pesar de que en la prueba de retención no existe continuidad respecto al intervalo entre ensayos. Otro hallazgo de interés, que no es posible verlo en los análisis grupales, es la tendencia de algunos individuos a responder únicamente en la prueba de retención sin haber respondido en los ensayos, lo que parece mostrar que existe aprendizaje que no es exhibido en la curva de adquisición, pero que motiva la respuesta para un momento en el que las condiciones de privación han aumentado en el individuo.

## CONCLUSIONES

A diferencia de paradigmas experimentales como el de la rata de laboratorio, el uso del procedimiento PER presenta a lo largo de su historia diferentes aproximaciones instrumentales para la ejecución de procedimientos para evaluar aprendizaje, y diferentes intentos de automatización de los procesos. El trabajo de Smith y Burden (2014) ofrece una enorme ventaja respecto a otras propuestas al considerar la facilidad de replicación del aparato en otros laboratorios y a su vez ofrece una plataforma lo suficientemente flexible como para admitir modificaciones de componentes del aparato que en países como Colombia resultan inadecuados ya sea por la dificultad de consecución o por su elevado costo.

Como fue mencionado en la discusión, el aparato ofreció resultados similares a algunos procedimientos de la literatura. Las modificaciones realizadas al prototipo de aparato permitieron facilitar el registro de la información al utilizar un sencillo programa de computadora y también aumentaron la facilidad de modificar los intervalos de presentación de los estímulos, un aspecto que facilita evaluar diferentes fenómenos asociados a las características de distribución de los estímulos EI y EC, algo necesario en este tipo de investigaciones. El uso de una plataforma Arduino permite que el aparato pueda ser desarrollado para controlar más variables que los aparatos actuales reportados en la literatura no han logrado hacer de una forma efectiva y precisa al mismo tiempo.

El conjunto de experimentos mostró que la automatización del procedimiento para el estudio de PER requiere un ajuste cuidadoso, tanto en los aspectos de instrumentación, como en los parámetros utilizados en la metodología, a fin de obtener respuestas confiables que permitan el uso del modelo experimental para la exploración de fenómenos otros fenómenos de naturaleza pavloviana. La versión adaptada del instrumento propuesto y descrito por Smith y Burden (2014) es muestra de que dicho procedimiento tiene

el potencial de ser adaptado a las necesidades de la variedad africanizada de la abeja de la miel, que es la variedad más numerosa en Colombia.

## PARTICIPACIÓN DE AUTORES

BN: recolección de datos, diseño y elaboración del aparato experimental, diseño experimental, elaboración del manuscrito, discusión de los resultados, análisis de datos. PR: recolección de datos, diseño y elaboración del aparato experimental, diseño experimental, discusión de los avances del proyecto y resultados. JCH: elaboración del aparato experimental, discusión de los avances del proyecto y resultados. MA: diseño experimental, discusión de los avances del proyecto y resultados, elaboración del manuscrito. GG: diseño experimental, discusión de los avances del proyecto y resultados, elaboración del manuscrito.

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación es el resultado del proyecto “Evaluación y caracterización de los procesos de aprendizaje, comportamiento y cognición en abejas de Colombia”, financiado por la Facultad de Ciencias Humanas de la Universidad Nacional de Colombia mediante la convocatoria de investigación Orlando Fals Borda. El Laboratorio de Fábrica Experimental del Departamento de Ingeniería Mecatrónica, dirigido por el Profesor Ing. Ernesto Córdoba, contribuyó con el desarrollo del aparato experimental. Agradecemos a Martín Hilario, estudiante de la Maestría en procesos industriales, por sus aportes y soluciones a los problemas emergentes. Nuestro agradecimiento al Profesor Jorge E. Tello, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, por facilitar el uso de sujetos de la colmena a su cargo.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Abramson, C. I., Aquino, I. S., Silva, M. C. y Price, J. M. (1997). Learning in the Africanized Honey Bee: *Apis mellifera* L. *Physiology & Behavior*, 62(3), 657-674. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00194-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00194-7)
- Abramson, C. I. y Boyd, B. J. (2001). An Automated Apparatus for Conditioning Proboscis Extension in Honey Bees, *Apis mellifera* L. *Journal of Entomological Science*, 36(1), 78-92. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-36.1.78>
- Abramson, C. I., Singleton, J. B., Wilson, M. K., Wanderley, P. A., Ramalho, F. S. y Michaluk, L. M. (2006). The Effect of an Organic Pesticide on Mortality and Learning in Africanized Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in Brasil. *American Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 33-40. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2006.33.40>
- Abramson, C. I., Sokolowski, M. y Wells, H. (2011). Issues in the study of proboscis conditioning. *Social Insects: Structure, Function, and Behavior*, 25-50.
- Adkins-Regan, E. (1990). Is the snark still a boojum? The comparative approach to reproductive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14(2), 243-252. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80224-6)
- Amaya-Márquez, M. (2009). Memoria y aprendizaje en la escogencia floral de las abejas. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2), 125-136. <https://doi.org/10.15446/abc>
- Amaya-Márquez, M., Tusso, S., Hernández, J. C., Jiménez, J. D., Wells, H. y Abramson, C. I. (2019). Olfactory Learning in the Stingless Bee *Melipona eburnea* Friese (Apidae: Meliponini). *Insects*, 10(11), 412-418. doi:10.3390/insects10110412
- Beach, F. A. (1950). The snark was a boojum. *American Psychologist*, 5(4), 115-124. <https://doi.org/10.1037/h0056510>
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A. y Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107-119. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.97.2.107>
- Dewsbury, D. A. (1998). Animal psychology in journals, 1911-1927: Another look at the snark. *Journal of Comparative Psychology*, 112(4), 400-405. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.4.400>
- Frings, H. (1944). The loci of olfactory end-organs in the honey-bee, *Apis mellifera* Linn. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 97(2), 95-124. <https://doi.org/10.1002/jez.1400970203>
- Frost, E. H., Shutler, D. y Hillier, N. K. (2011). Effects of cold immobilization and recovery period on honeybee learning, memory, and responsiveness to sucrose. *Journal of Insect Physiology*, 57(10), 1385-1390. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.001>
- Gutiérrez, G. (1994). Neurobiological Studies of Classical Conditioning in Invertebrates. *Boletín-ALAMOC*, 17, 9-14.
- Hernández, J. C. (2019). Efecto de las señales visuales y la calidad del néctar en la toma de decisiones económicas en *Apis mellifera*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76017>
- Jernigan, C. M., Roubik, D. W., Wcislo, W. T. & Riveros, A. J. (2014). Color-dependent learning in restrained Africanized honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 217(3), 337-343. <https://doi.org/10.1242/jeb.091355>

- Macri, S. y Richter, S. (2015). The Snark was a Boojum - reloaded. *Frontiers in Zoology*, 12(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-12-S1-S20>
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J. C. & Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: A step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.08.018>
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Dover Publications.
- Razran, G. H. S. (1933). Conditioned responses in animals other than dogs. *Psychological Bulletin*, 30(4), 261-324. <https://doi.org/10.1037/h0021468>
- Sandoz, J. C., Hammer, M. y Menzel, R. (2002). Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learning and Memory*, 9(5), 337-348. <https://doi.org/10.1101/lm.50502>
- Scheiner, R., Abramson, C. I., Brodschneider, R., Crailsheim, K., Farina, W. M, Fuchs, S. Grünewald, B., Hahshold, S., Karrer, M., Koeniger, G., Koeniger, N., Randolph, M., Mujagic, S., Radspieler, G., Schmickl, T., Schneider, C., Siegel, A. J., Szopek, M. y Thenius, R. (2013). Standard methods for behavioural studies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-58. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.04>
- Shettleworth, S. J. (2009). The evolution of comparative cognition: Is the snark still a boojum? *Behavioural Processes*, 80(3), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2008.09.001>
- Smith, B. H., Abramson, C. I. y Tobin, T. R. (1991). Conditional withholding of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*) during discriminative punishment. *Journal of Comparative Psychology*, 105(4), 345-356. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.105.4.345>
- Smith, B. H. & Burden, C. M. (2014). A Proboscis Extension Response Protocol for Investigating Behavioral Plasticity in Insects: Application to Basic, Biomedical, and Agricultural Research. *Journal of Visualized Experiments, JoVE* (91). <https://doi.org/10.3791/51057>
- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3), 168-179. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(61\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(61)90060-9)
- Vareschi, E. (1971). Duftunterscheidung bei der Honigbiene— Einzelzell-Ableitungen und Verhaltensreaktionen. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 75(2), 143-173. <https://doi.org/10.1007/BF00335260>