



LSPA

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
CIÊNCIAS PSICOLÓGICAS, SOCIAIS E DA VIDA

Regulação do *Mate-Choice Copying* por
neurónios apetitivos ou neurónios aversivos de
dopamina em *Drosophila melanogaster*

JOANA PALMA MARCOS

Orientador de Dissertação:

SUSANA A. M. VARELA

Professor de Seminário de Dissertação:

RUI OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção

do grau de: MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

COGNITIVAS E COMPORTAMENTAIS

2019

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Susana Varela, apresentada no ISPA – Instituto Universitário para obtenção de grau de Mestre na especialidade de Neurociências Cognitivas e Comportamentais.

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, a Prof^ª Doutora Susana Varela, por me ter dado a oportunidade de integrar o seu projeto no domínio da mosca social, e cuja disponibilidade e dedicação foram indispensáveis para o sucesso desta investigação. Todas as reuniões, conselhos e sugestões contribuíram decisivamente para a minha aprendizagem e desenvolvimento como investigadora.

Quero também agradecer à minha companheira de laboratório e futura doutora, Carla Henriques, por me ter apoiado e transmitido todos os seus conhecimentos sempre com humor e que tanto me fizeram ganhar um carinho especial pelo projeto.

Agradeço também ao Prof^º Doutor Rui Oliveira por me ter proporcionado esta experiência de investigação no Instituto Gulbenkian de Ciência, assim como a toda a equipa do Oliveira Lab pelo apoio e companheirismo.

Estou ainda grata à Fundação para a Ciência e a Tecnologia por ter beneficiado de uma bolsa de investigação no âmbito do projeto da Social Fly: PTDC/BIA-COM/31887/2017, "A mosca social: arquitetura genética dos circuitos neurais associados à aprendizagem social em *Drosophila melanogaster*".

Quero agradecer muito a todos os meus amigos que me apoiaram e motivaram para concluir esta etapa, sempre interessados e muito intrigados com o meu projeto de investigação e com o que ia descobrir com ele. Obrigada por todas as perguntas bizarras e comentários hilariantes que sempre me fizeram rir e me obrigavam a desconstruir ideias pré-formatadas, o que para mim foi ótimo porque me ajudou muito a pensar de maneira diferente e a esclarecer-me a mim também.

E por fim, os maiores agradecimentos do mundo à minha família, ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão, à minha avó e ao meu namorado por terem estado comigo todos os dias a encorajar-me e a dar-me amor e carinho.

Considero que todas as pessoas que mencionei e muitas mais de alguma maneira me trouxeram até aqui, não é por acaso que me encontro a estudar neurociências e comportamento, acredito que todas as nossas vivências nos transformam e moldam o nosso caminho, por isso, se aqui estou é graças à minha família e amigos que, direta ou indiretamente, ao longo da vida, me fizeram ganhar o gosto por esta área, e por isso, considero que este pedaço de escrita científica é de todos eles, que estiveram sempre presentes. Apesar de pequeno, espero que seja um contributo para uma maior compreensão do tão misterioso mundo do cérebro.

Um enorme obrigada a todos.

Resumo

O presente estudo descreve o papel de neurónios específicos de dopamina na regulação da aprendizagem social, em contexto sexual, em *Drosophila melanogaster*.

A dopamina (DA) é um neuro-modulador que controla a formação de memórias associativas, com valência positiva (memórias apetitivas) ou negativa (memórias aversivas) durante o processo de aprendizagem associal, e a nossa pergunta é se o mesmo mecanismo também ocorre na aprendizagem social.

Como paradigma de aprendizagem social, utilizámos o *mate-choice copying* (MCC), que é uma forma de aprendizagem social por observação das interações sexuais entre conspecíficos, e que se sabe ser regulado pela dopamina. Como controlo, utilizámos o teste de *independent mate choice* (IMC), que avalia a preferência inata das fêmeas por machos com fenótipos distintos, neste caso fenótipos artificiais de cor azul e rosa.

Replicámos estes dois paradigmas comportamentais num grupo controlo (uma linha heterozigótica, a *Canton-Special*, ou CS), e em duas linhas transgénicas com neurónios dopaminérgicos desativados: a linha PAM para os neurónios apetitivos, e a linha PPL1 para os neurónios aversivos.

Os resultados mostram que a linha CS faz MCC, a linha PAM não faz e a PPL1 parece fazer, mas este último resultado não é conclusivo, provavelmente porque o tamanho da amostra é pequeno.

Sabendo que as memórias apetitivas são importantes nos processos motivacionais, incluindo a motivação para o acasalamento, a formação de memórias apetitivas durante o MCC é certamente um mecanismo adaptativo. Por essa razão, poderá haver um menor contributo das memórias aversivas, contudo, o nosso estudo deixa essa hipótese ainda em aberto.

Palavras-chave: *mate-choice copying* (MCC); aprendizagem social; preferências sexuais inatas; neurónios de dopamina (DA); memórias apetitivas (*cluster* PAM); memórias aversivas (*cluster* PPL1).

Abstract

The present study describes the role of dopamine-specific neurons in regulating social learning in a sexual context, in *Drosophila melanogaster*.

Dopamine (AD) is a neuro-modulator that controls the formation associative memories, with positive (appetitive) or negative (aversive) valence during the asocial learning process, and our question is whether the same mechanism also occurs in social learning.

As paradigm of social learning, we used mate-choice copying (MCC), which is a form of social learning by observing conspecific sexual interactions, and that is known to be regulated by dopamine. As a control, we used the independent mate choice (IMC) test, which assesses female innate preference for males with distinct phenotypes, in this case the artificial blue and pink phenotypes.

We replicated these two behavioural paradigms in a control group (a heterozygous line, Canton-Special, or CS), and in two transgenic lines with dopaminergic deactivated neurons: the PAM line for appetitive neurons and the PPL1 line for aversive neurons.

The results show that the CS line does MCC, the PAM line does not, and the PPL1 line seems to do, but the latter result is not conclusive, probably because the sample size is small.

Knowing that appetitive memories are important in motivational processes, including mating motivation, the formation of appetitive memories during MCC is certainly an adaptive mechanism. For this reason, there may be a minor contribution from aversive memories, however, our study leaves this hypothesis still open.

Keywords: mate-choice copying (MCC); social learning; innate mate preferences; dopamine (DA) neurons; appetitive memories (PAM cluster); aversive memories (cluster PPL1).

Índice

1. Introdução	1
Os vários comportamentos de escolha de parceiro sexual	4
Os mecanismos evolutivos da escolha inata de parceiros sexuais	5
Características físicas e comportamentais do macho importantes na escolha inata de parceiro sexual em <i>D. Melanogaster</i>	6
O valor adaptativo do comportamento de cópia de parceiro sexual	7
Neurobiologia da aprendizagem social e circuitos dopaminérgicos	8
Linhas transgênicas para a dopamina	10
Estrutura do <i>mushroom body</i> (MB) e a relação com a dopamina	12
2. Métodos	14
Manutenção das moscas	14
As linhas de transgênicas	16
Dispositivo experimental	17
Experiências comportamentais	19
Experiência 1: MCC	19
Experiência 2: preferências sexuais inatas	21
Procedimentos gerais	21
Análise da escolha de parceiro sexual	22
Análise do efeito das condições meteorológicas no comportamento	23
Nota relativa ao bem-estar animal	24
3. Resultados	25
Análise da escolha de parceiro sexual	25
MODELO 1: Interação entre Tratamento e Linha	26
MODELO 2A: Diferença entre linhas no tratamento IMC	27
MODELO 2B: Diferenças entre linhas no tratamento MCC	27
MODELO 3A: Diferenças entre tratamentos na linha CS	27
MODELO 3B: Diferenças entre tratamentos na linha PAM	28
MODELO 3C: Diferenças entre tratamentos na linha PPL1	28
Análise do efeito das condições meteorológicas no comportamento	28
4. Discussão	30
Considerações finais	33
Bibliografia	35

Lista de figuras:

Fig. 1. Esquema dos subdomínios do *Mushroom Body* (MB)

Fig. 2. Ilustração do Fluxo de informação pelos 15 compartimentos de *keylion cells* no MB

Fig. 3. Tubo de manutenção e garrafa de cruzamento.

Fig. 4. Conjuntos de neurónios de DA nas regiões cerebrais anterior (A) e posterior (B)

Fig. 5. O sistema GAL4 vs UAS-miR.

Fig. 6. Dispositivo experimental em esquema e em fotografia.

Fig. 7. Machos coloridos de azul e rosa antes dos testes

Fig. 8. Escolha de parceiro sexual das fêmeas controlo (*Canton-S*, CS), e das fêmeas transgênicas para os neurónios dopaminérgicos PAM e PPL1, nos tratamentos IMC (*Independent unconditioned Mate Choice*) e MCC (*Mate-Choice Copying*).

1. Introdução

Ao longo das suas vidas, os animais adquirem vários tipos de informações biologicamente importantes sobre o meio que os rodeia. Fazem-no não só através da interação direta e individual com o meio, mas também por observação das ações de outros animais, geralmente seus conspecíficos, e por interações com eles. Estes comportamentos constituem aprendizagem associal e social, respetivamente (Heyes, 2012), e contém informações valiosas que possibilitam tomar decisões adaptativas em diferentes domínios funcionais, tais como a escolha de parceiros sexuais, a deteção de predadores e a procura de alimento (Danchin et al. 2004; Taborsky & Oliveira 2012).

Pensa-se que a aprendizagem social, comparativamente à associal, constitui uma vantagem evolutiva uma vez que é frequentemente vantajoso copiar os comportamentos de conspecíficos, sobretudo se estes forem indivíduos mais velhos e, portanto, mais experientes. A aprendizagem individual, por tentativa e erro, requer sempre mais tempo e risco (Danchin et al. 2004, Varela et al. 2019). Assim, a aprendizagem social tem potencialmente um grande impacto sobre o *fitness* do animal e deve estar, conseqüentemente, sob a ação de uma força seletiva acentuada, com efeitos na evolução da cognição, favorecendo eventualmente a evolução de mecanismos de cognição social distintos dos da cognição associal (Varela et al. 2019). Compreender os mecanismos neurais subjacentes à aprendizagem social é, pois, necessário para uma melhor compreensão da evolução dos comportamentos sociais.

No nosso projeto escolhemos dedicar-nos ao estudo dos mecanismos neurais da aprendizagem social no contexto da escolha de parceiro sexual. As fêmeas podem escolher os seus parceiros com base nas suas preferências inatas ou com base nas observações das interações sexuais dos seus conspecíficos, o chamado *mate-choice copying* (MCC) (Westneat et al. 1999; Vakirtzis 2011; Witte et al., 2015). O MCC é uma estratégia reprodutiva baseada na aprendizagem social, em que as fêmeas extraem informação sobre o desempenho sexual dos machos por observação das suas interações sexuais com outras fêmeas, o que irá, por sua vez, influenciar a escolha futura das fêmeas observadoras. Esta estratégia reprodutiva foi já descrita em muitas espécies de

vertebrados (Vakirtzis 2011; Witte et al., 2015), mas também em *Drosophila melanogaster* (Mery et. al. 2009; Danchin et al. 2018).

Embora a escolha do parceiro sexual aconteça tanto em machos como fêmeas (Andersson & Simmons 2006), as fêmeas na maioria das espécies são aquelas que geralmente enfrentam maior investimento reprodutivo e, por isso, são consideradas *the choosier sex* (Trivers, 1972). O MCC feito por parte da fêmea pode diminuir a incerteza sobre a qualidade dos machos, contribuindo para escolhas mais adaptativas e evitando assim alguns dos custos associados à aquisição de informação individual por tentativa e erro, tais como a perda de tempo e/ou energia em tentativas de acasalamento infrutíferas, e a exposição a predadores (Kendal et al. 2018; Tang & Guo 2001; Witte et. al. 2015).

A escolha de parceiro sexual é um importante motor evolutivo, já que a rejeição ou preferência por determinados parceiros influencia o perfil genético das gerações futuras. O comportamento de MCC pode, por isso, ter implicações na evolução das espécies, já que tem o potencial de modificar as preferências sexuais e, assim, a força e direção da seleção sexual (Varela et al. 2018). Pensa-se, por exemplo, que as fêmeas, ao favorecerem por aprendizagem determinadas características nos machos em detrimento de outras, possam induzir o isolamento reprodutivo entre populações com tradições de MCC diferentes (Mery et. al. 2009; Varela et al. 2018; Danchin et al., 2019), ou facilitar o fluxo genético entre populações se estas tiverem tradições semelhantes (Varela et al. 2018). Por isso, o MCC tem sido encarado como um mecanismo de diversificação das espécies (Varela et al. 2018).

No que diz respeito aos mecanismos neurais subjacentes à aprendizagem social, uma pergunta em aberto é a da modulação das valências das memórias que são formadas, já que em muitas circunstâncias a aprendizagem social não envolve o acesso direto ou imediato a uma recompensa ou punição, ao contrário da aprendizagem associal. No caso do MCC, as valências das memórias que são formadas são, de facto, uma incógnita, já que as fêmeas que copiam aprendem por observação e não por interação direta com os machos, podendo vir a aceitar ou a rejeitar potenciais parceiros sexuais bastante tempo após o momento da aprendizagem. As memórias formadas poderão ser apetitivas se as fêmeas adquirirem preferências, ou seja, se aprenderem que devem acasalar com os machos que viram acasalar com sucesso com as fêmeas demonstradoras, ou aversivas se as fêmeas adquirirem aversões, ou seja, se aprenderem que devem rejeitar

os machos que viram ser rejeitados pelas fêmeas demonstradoras. Estes são processos cognitivos distintos que na aprendizagem associal atuam independentemente (Aso et al., 2012; Vogt et al., 2014, 2016), já que a experiência proveniente de um acasalamento bem-sucedido só pode formar memórias positivas, e a experiência proveniente de um acasalamento mal-sucedido só pode formar memórias negativas. Mas no MCC os dois tipos de informação estão frequentemente presentes em simultâneo (a do macho que acasala com a fêmea demonstradora e a do que é rejeitado por ela) e não é a fêmea observadora que está em interação direta com os machos. Por isso, os dois tipos de memória podem, em teoria, ser formados, mas não sabemos se é isso que acontece, ou se há ainda um mecanismo alternativo.

Para responder a esta pergunta, utilizámos como animal modelo a *Drosophila melanogaster* por ser a espécie com as melhores ferramentas e técnicas para estudar o sistema nervoso e uma vez que em estudos anteriores foi demonstrado ter aprendizagem social em diferentes contextos funcionais, tais como a localização de alimento (Foucaud et al. 2013), a localização de locais de oviposição (Battesti et al. 2012) e o próprio MCC (Mery et al. 2009; Danchin et al., 2018).

Dado que a dopamina (DA) é o neuro-modulador que controla as valências das memórias formadas durante os processos de aprendizagem, incluindo em *D. melanogaster* (e.g. Aso et al., 2012; Vogt et al., 2014, 2016), e tanto a nível da aprendizagem associal (Riemensperger et al. 2005; Liu et al. 2012), como da aprendizagem por MCC (Monier et al. 2019), utilizámos linhas transgênicas de drosófila que nos permitiram silenciar independentemente grupos específicos de neurónios de DA, uns responsáveis pela formação de memórias apetitivas (o *cluster protocerebral anterior median*, PAM) e outros pelas memórias aversivas (o *cluster protocerebral posterior lateral 1*, PPL1). O nosso objetivo foi distinguir o papel destes diferentes grupos de neurónios na formação das memórias por MCC. Se as memórias formadas forem sobretudo apetitivas, as moscas nas quais o cluster PAM foi silenciado devem demonstrar incapacidade para aprender, mas não as moscas PPL1. Se as memórias formadas forem sobretudo aversivas, deverão ser as moscas nas quais o cluster PPL1 foi silenciado a perder a capacidade de aprendizagem. Se ambos os grupos de neurónios forem funcionalmente importantes, ambas as linhas transgênicas devem perder o MCC comparativamente a uma linha controlo.

Conhecer o mecanismo de modulação das valências das memórias sociais permitirá compreender melhor não só o mecanismo da aprendizagem social, como também a própria ecologia dos comportamentos sociais. Ou seja, de que modo o ambiente social das espécies tem efetivamente moldado a evolução da cognição e dos comportamentos sociais e, conseqüentemente, a forma como as espécies interagem com o seu meio e o modificam.

Nos capítulos seguintes irei desenvolver em maior detalhe os vários tópicos da problemática desta tese.

Os vários comportamentos de escolha de parceiro sexual

É importante que para a compreensão da aprendizagem social ao nível da escolha de parceiro se reflita também sobre outros fatores subjacentes a esse comportamento, neste caso, as preferências inatas.

Começemos, então, por definir comportamentos inatos. Estes são comportamentos totalmente isentos de aprendizagem, praticados por animais ingênuos, ou seja, sem qualquer experiência anterior, considerados como sendo unicamente capazes de basear as suas ações nas suas preferências genéticas, com modulação hormonal e de circuitos estereotipados rígidos, ou seja, as preferências independentes da escolha de parceiro constituem influências "genéticas" e conseqüentemente não sociais (Vakirtzis et al. 2011). Contrariamente, a aprendizagem, que é definida como a capacidade de mudar o comportamento com base numa experiência anterior, implica que existam circuitos neuronais mais flexíveis (Kendal et al. 2018). Essa aprendizagem pode ser individual (também chamada de associal), se baseada na experiência direta do indivíduo com o seu meio ambiente, ou social, se baseada nas observações dos comportamentos de outros indivíduos (Heyes 2012). Neste caso, a cópia da escolha de parceiro, porque reside na observação das escolhas sexuais de outros indivíduos, constitui uma influência social e conseqüentemente "não genética" (Vakirtzis et al. 2011).

Isto significa que tanto a aprendizagem social como a associal podem modificar as preferências inatas. Contudo, também as preferências inatas podem influenciar a forma como os organismos aprendem (Molina-garcía & Barrios, 2018). Ou seja, sabemos que as funções fisiológicas e cognitivas variam entre indivíduos e espécies e estas variações

resultam de pressões evolutivas diferentes (por exemplo, relacionadas com a abundância e distribuição de alimentos, com a relação predador-presa, com a complexidade do ambiente social, etc.) e daí também podem resultar diferenças motivacionais e cognitivas para a aprendizagem (Dukas, 2004; Molina-garcía & Barrios, 2018).

Concluindo, quando a escolha de parceiro é apenas baseada em informações inatas sem influência de terceiros nem de aprendizagem associativa, chamamos a esse comportamento “escolha de parceiro independente e incondicionada” ou independente unconditioned mate-choice. Quando a escolha de parceiro é baseada em aprendizagem associativa, chamamos a esse comportamento “escolha de parceiro independente e condicionada” ou independente conditioned mate-choice. E quando a escolha de parceiro é influenciada pela observação das escolhas sexuais de terceiros, chamamos a esse comportamento “escolha de parceiro dependente e condicionada” ou mate-choice choice copying (MCC) (Hebets & Beckers 2010).

No presente estudo, focámo-nos no estudo do MCC e fizemos comparações deste comportamento com as preferências sexuais inatas (o independente unconditioned mate-choice, ou IMC) de fêmeas drosófila ingênuas.

Os mecanismos evolutivos da escolha inata de parceiros sexuais

Já desde há muitos anos que se tem vindo a propor e a tentar explicar os mecanismos evolutivos da escolha inata de parceiros sexuais. Estes mecanismos têm sido até mais estudados do que os de aprendizagem como o MCC (Andersson & Simmons, 2006). Uma dessas teorias evolutivas é a dos *Direct Phenotypic Effects*, a qual propõe que as fêmeas tendem a escolher machos de acordo com as vantagens materiais que estes lhes podem proporcionar, tais como um território de qualidade, nutrição, cuidados parentais ou proteção (Andersson & Simmons, 2006). Outra teoria é a do *Fisherian Sexy Sons*, que propõe que as fêmeas escolhem machos com traços fenotípicos especialmente atrativos e que serão herdados pela sua prole. A teoria dos *Good Genes* explica, por seu lado, que as características dos machos podem refletir não apenas atratividade, mas também elevada qualidade genética, o que dá aos machos maior vigor e resistência a doenças, por exemplo. Por último, o mecanismo da *Genetic Compatibility* sugere que as fêmeas poderão também escolher machos com características diferentes das suas de forma a complementar o genoma e haver uma maior variabilidade genética (Andersson

& Simmons, 2006; Friberg & Arnqvist, 2003; Sharma et al. 2012).

Se pensarmos nas escolhas e nas preferências inatas das fêmeas baseadas na genética, é fácil concluirmos que estas informações codificadas no seu ADN são um produto da seleção que reflete as adaptações a longo-prazo, as quais variam dependendo das pressões seletivas a diferentes ambientes (Varela et al. 2018). As fêmeas, quando não têm oportunidade de aprender, estimam a qualidade dos machos através de várias características físicas e comportamentais relacionadas com um ou vários destes mecanismos (Andersson & Simmons, 2006). Em *D. melanogaster*, por exemplo, sabe-se que as fêmeas dão importância ao vigor da corte nupcial, à idade do macho e ao perfil bioquímico dos hidrocarbonetos da cutícula.

Características físicas e comportamentais do macho importantes na escolha inata de parceiro sexual em *D. Melanogaster*

O comportamento de corte em drosófila é bastante complexo, mas está muito bem descrito (Hall, 1994). A fêmea pode aceitar, rejeitar ou retardar a decisão até que tenha obtido informações suficientes sobre o macho e só, então, decidir se acasalará com ele ou não. A corte começa com o macho a exibir alguns comportamentos estereotipados. Estes comportamentos incluem a extensão e vibração de uma das asas para produzir a chamada “canção de corte”, depois o macho começa a seguir a fêmea sempre em exibição e vai-se começando a aproximar e posicionando-se para a cópula, mexendo o abdómen para frente e para trás (Ribeiro et al. 2018). A canção produzida pelo batimento das asas é uma fase importantíssima da corte, porque é aqui que as fêmeas identificam os machos conspecíficos. O som é composto por sinos e pulsos em que o intervalo entre cada um deles (o interpulso, ou IPI) é próprio de cada espécie de drosófila (Bennet-Clark & Ewing, 1969 as cited in Cowling, 1980). Por exemplo, o IPI médio de *D. melanogaster* é de aproximadamente 33 mseg (Kawanishi & Watanabe, 1980 as cited in Gleason et al. 2002). O comportamento de resposta exibido pela fêmea é menos conspícuo, e também está menos estudado. A fêmea, tal como o macho, reage exibindo módulos comportamentais que variam em tipo e frequência, de acordo com o seu estado de recetividade. Por exemplo, se a fêmea rejeita o macho, afasta-se e empurra o macho com as patas, mas se aceita mantém-se mais quieta e posiciona o abdómen de modo a facilitar a cópula (Lasbleiz et al. 2006)

Relativamente à idade do macho, alguns estudos indicam que as fêmeas tendem a preferir machos mais jovens, uma vez que a cada ejaculação de um macho jovem são transferidas cerca de 200 tipos diferentes de *Seminal Fluid Proteins* (SFPs), também conhecidas por *Accessory Gland Proteins* (Acps), as quais são muito importantes no sucesso reprodutivo das fêmeas (Chapman, 2001; Simmons & Fitzpatrick, 2012 as cited in Koppik, M. et al. 2018). Os efeitos das SFPs têm sido amplamente estudados em *D. melanogaster* e são conhecidos por desempenharem um papel pós-copulatório muito importante, nomeadamente aumento da fertilidade da fêmea (Heifetz et al. 2000; Herndon & Wolfner, 1995 as cited in Koppik et al. 2018). Também participam na competição espermática, tornando menos viáveis os espermatozoides de acasalamentos anteriores. Com o envelhecimento dos machos, estas proteínas vão diminuindo de qualidade e quantidade e o sucesso reprodutivo desses machos diminui conseqüentemente (Koppik et al. 2018) (Civetta & Cantor, 2003).

Alguns estudos também apontam para a importância dos hidrocarbonetos cuticulares (*Cuticular Hydrocarbons*, CHCs) na superfície externa do corpo da drosófila. São responsáveis por desempenhar um papel importante no reconhecimento e preferência de parceiro sexual. São compostos não voláteis, detetados tanto por machos como por fêmeas, e mais facilmente detetados pelo toque/gustação, do que a longas distâncias (Laturney & Moehring, 2012). É a concentração de certos CHCs em machos que pode mudar a receptividade das fêmeas e o comportamento de acasalamento (Grillet et al. 2006). E é pela presença de determinados CHCs que os machos distinguem as fêmeas que já acasalaram das fêmeas virgens, direcionando-se preferencialmente para as virgens (Ejima et al. 2007, Keleman et al 2012 as cited in Nöbel et al. 2018). A deteção destes compostos é feita por recetores olfativos que enviam informações sobre os CHCs através dos neurónios sensoriais para o lobo da antena (Laturney & Moehring, 2012).

O valor adaptativo do comportamento de cópia de parceiro sexual

A visão clássica é a de que as fêmeas têm preferências inatas, e portanto genéticas, para certos fenótipos masculinos, as quais permanecem fixas durante toda a sua vida. Mas apesar de os mecanismos de escolha inata de parceiro sexual terem um forte valor adaptativo (Andersson & Simmons, 2006) por serem respostas evolutivas às condições ambientais do passado, é importante salientar que os erros nas decisões acontecem com

frequência e que se devem às condições ambientais do presente (Varela et al. 2018).

Deste modo, um número crescente de investigadores tem defendido que as fêmeas não podem selecionar somente os parceiros sexuais com base nas suas preferências inatas, sugerindo que as preferências das fêmeas dependem também do contexto. A qualidade dos machos é, de facto, um traço fenotípico complexo, que varia rapidamente entre gerações e durante a vida de um indivíduo devido às interações deste com o ambiente (interações genótipo-ambiente), com outros genes (interações gene-gene) e com outros genótipos (interações genótipo-genótipo) (Varela et al. 2018).

Desta maneira, as fêmeas também têm que ser capazes de avaliar o desempenho relativo dos machos em diferentes contextos, tendo de observar e identificar as condições ecológicas e sociais relevantes para adequar as suas escolhas às necessidades. No entanto, reunir essa quantidade de informação, aumentaria significativamente os gastos energéticos associados à escolha ideal do parceiro. O que poderia ser particularmente desafiador para fêmeas que não estivessem na melhor condição física (Wade, 2014), já que exigiria a rejeição de uma grande proporção de machos disponíveis.

Foi derivado destes fatores que o interesse da comunidade científica por estudar a aprendizagem social por MCC ganhou força, uma vez que este comportamento, como já vimos, tem a capacidade de reduzir tempo e energia na seleção de parceiro, aumentando a probabilidade de as fêmeas fazerem escolhas mais acertadas, já que estarão atualizadas relativamente ao contexto em que estiverem inseridas (Varela et al. 2018).

Neurobiologia da aprendizagem social e circuitos dopaminérgicos

Existem três tipos básicos de aprendizagem de acordo com o tipo de experiência a que os animais são expostos. Pode ser por exposição a um único estímulo (caracterizada na literatura como aprendizagem S, incluindo a habituação e a sensibilização), por relacionamento entre dois estímulos (caracterizada na literatura como aprendizagem associativa SS, ou condicionamento pavloviano ou observacional), ou ainda pela relação entre um estímulo e uma resposta (caracterizada na literatura como aprendizagem associativa SR, aprendizagem instrumental ou formação de hábitos) (Heyes, 1994). O MCC é um tipo de aprendizagem associativa uma vez que há um emparelhamento entre um estímulo condicional e um incondicional. O estímulo condicional é o fenótipo do

macho que está em cópula com a fêmea demonstradora, e o estímulo reforçador incondicional será a observação do sucesso ou insucesso da cópula.

O MCC é também um tipo de aprendizagem social, sendo que a aprendizagem social requer a aquisição de informações novas sobre o meio social (e.g. sobre interações sociais, como as interações de acasalamento) ou sobre como agir no meio associativo através de soluções sociais (e.g. sobre como procurar alimento) (Heyes, 2012). Para tal, os indivíduos têm que ter capacidade de avaliar, integrar e responder especificamente às informações sociais. Essas respostas rápidas envolvem uma variedade de mecanismos neurobiológicos associados ao comportamento e à cognição social, ainda que alguns autores defendam que os mecanismos das aprendizagens social e associativa sejam os mesmos (Heyes, 2012).

Na base destes mecanismos estão diversos neurotransmissores, em particular a dopamina (Sitaraman et al., 2008). A dopamina (DA) é um neuro-modulador bastante conservado na história evolutiva dos animais, tanto em mamíferos como em insetos, e muito importante para o controlo de uma enorme variedade de processos cognitivos, incluindo atenção, sono/vigília, controlo motor, aprendizagem, memória (Xie et al. 2018), motivação, atribuição de valência a estímulos (recompensa versus punição) (Riemensperger et al. 2005, 2011; Aso et al. 2012; Burke et al. 2012; Liu et al. 2012; Vogt et al. 2014, 2016), entre outros (Kavaliers & Choleris, 2017). Assim, o interesse em dissecar os circuitos neurais dopaminérgicos que regulam o comportamento e desvendar os mecanismos que estão subjacentes a estes circuitos, nomeadamente a sua interconectividade, tem vindo a aumentar.

É pela plasticidade dos sistemas neuromoduladores, tais como o da dopamina, que é possível haver um constante processamento e integração de informações novas em regiões específicas do cérebro e que por sua vez levem a um comportamento adaptativo (Weitekamp & Hofmann, 2014; Kendal, et al. 2018). Num ambiente em constante mudança, o ajuste da escolha comportamental por aprendizagem dependente da experiência é determinante na sobrevivência do animal. A aprendizagem associativa é uma forma simples de aprendizagem que é amplamente observada tanto em seres vivos mais simples como em seres humanos e para entender todo o processo de aprendizagem, precisamos de saber como é que a informação sensorial é representada e transformada no cérebro, e como é que ela é alterada pela experiência e como é que estas mudanças são refletidas em termos comportamentais (Hige, 2018).

O MCC foi recentemente associado à modulação dopaminérgica em *D. melanogaster* (Monier et al., 2019). Neste estudo, foi descoberto que moscas da fruta de fenótipo selvagem (da linha *Canton-S*), quando tratadas farmacologicamente com um inibidor da síntese de dopamina (3-iodotyrosine, 3-IY), perdiam a capacidade de aprender e assim de fazer o *copying*, mas que recuperavam essa capacidade quando tratadas de seguida com um precursor da dopamina (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA).

Este estudo esclarece, portanto, que a dopamina tem uma função na regulação da aprendizagem por MCC, mas deixa em aberto de que modo é feita a modulação da valência da informação que é aprendida. Sabendo que há neurónios específicos da dopamina, incluindo em *D. melanogaster*, que atribuem valências positivas às memórias provenientes da aprendizagem associativa (o mecanismo da recompensa) e neurónios específicos que atribuem valências negativas (o mecanismo da punição), qual será a contribuição relativa destes para a modulação das memórias provenientes do MCC? A aprendizagem por MCC implica a observação de machos a acasalarem com fêmeas demonstradoras e de outros machos a serem rejeitados por essas fêmeas. Qual é a informação que é mais adaptativa e, portanto, memorizada? Ou serão ambas? Esta pergunta é pertinente porque o MCC contém ambos os tipos de informação e porque a aprendizagem por MCC (assim como a aprendizagem social em geral) não é feita por contacto direto com o estímulo positivo (a recompensa da cópula com o macho preferido) ou com o estímulo negativo (a rejeição da cópula com o macho não preferido), mas sim por observação das experiências de outros. É, pois, pertinente perguntar como é que a dopamina modula a aprendizagem nestes casos.

Linhas transgénicas para a dopamina

Para responder a esta pergunta, os métodos farmacológicos não são suficientes. É preciso uma abordagem neurológica, que nos permita silenciar grupos alvo de neurónios para, então, determinar as relações causais entre neurónios e comportamento (Pavlou & Goodwin 2013). Para tal, as ferramentas de manipulação genética têm-se revelado extramente eficazes, especialmente em *D. melanogaster*, sendo que uma das técnicas mais versáteis é a das linhas transgénicas para o sistema GAL4-UAS, que é um fator de transcrição que controla a expressão de genes de interesse, nomeadamente através da sua desativação por RNAi (RNA de interferência). Em *Drosófila*, existem, por exemplo,

linhas transgênicas GAL4-UAS-RNAi às quais é possível inibir a sinalização da dopamina em pequenos subconjuntos de neurónios (ver mais detalhes da técnica nos métodos), incluindo o subconjunto que regula a formação de memórias apetitivas (o *cluster protocerebral anterior median*, PAM) e o que regula as memórias aversivas (o *cluster protocerebral posterior lateral 1*, PPL1) (Xie et al. 2018; Christopher et al. 2012).

Neste projeto, testámos duas linhas transgênicas de *D. melanogaster* que nos permitiram inibir especificamente a atividade dos *clusters* PAM e PPL1. Esta abordagem permitiu-nos fazer três previsões:

1. Se fêmeas focais transgênicas para o *cluster* PAM perderem a capacidade de copiar, prevemos que o MCC é modulado sobretudo por neurónios de DA que formam memórias apetitivas, relevando que a informação mais saliente no comportamento da fêmea demonstradora é a referente ao macho com quem esta decide acasalar.
2. Se fêmeas focais transgênicas para o *cluster* PPL1 perderem a capacidade de copiar, prevemos que o MCC é modulado por neurónios de DA que formam memórias aversivas, relevando que a informação mais saliente no comportamento da fêmea demonstradora é a referente ao macho com quem esta decide não acasalar.
3. Se ambos os tipos de fêmeas focais transgênicas perderem a capacidade de copiar, prevemos que o MCC é igualmente modulado por neurónios de DA que formam memórias apetitivas e aversivas, revelando que as informações sobre os dois tipos de machos são igualmente salientes e, portanto, adaptativas.

Esta abordagem permite conhecer o circuito dopaminérgico geral que modula a aprendizagem social e o MCC em particular. Existem linhas transgênicas de drosófila que permitiriam silenciar sub-grupos de neurónios PAM ou PPL1, para assim identificar com maior precisão o circuito dopaminérgico específico do MCC. No entanto, essa análise mais fina fica fora do âmbito desta tese, assim como o circuito não-dopaminérgico da aprendizagem associativa, ou seja, o circuito onde se processa a associação entre estímulos e a formação de memórias. Em *D. melanogaster* e nos insetos em geral, esse circuito localiza-se ao nível do *mushroom body* (MB), e sabe-se que os diferentes neurónios de dopamina inervam zonas específicas do MB para então

atribuírem valência às memórias que são formadas. No capítulo seguinte irei falar um pouco mais sobre o MB dos insetos e a sua modulação por dopamina, dois temas que têm vindo a ser amplamente estudados nos dias que correm.

Estrutura do *mushroom body* (MB) e a relação com a dopamina

O MB corresponde ao sistema nervoso central dos insetos e é nele que reside o mecanismo neural da aprendizagem associativa (Aso et al. 2014). O MB atua como um dispositivo de recodificação que converte informações sensoriais em informações úteis, sendo por isso um alvo fundamental para aquisição, estabilização e recuperação da memória (Guo et al. 2017; Menzel, 2012). Por exemplo, a ablação química do MB suprime a aprendizagem olfativa e a memória a longo prazo (Heisenberg et al. 1985; Pascual, 2001 as cited in Tanaka et al. 2008).

O MB da *D. melanogaster* é formado estruturalmente por neurónios intrínsecos denominados de células de *Kenyon*, as quais se dividem em três partes morfológicas principais: cálice, pedúnculo e lóbulos. São as projeções do corpo celular dos neurónios *Kenyon* que se projetam para a zona anterior, construindo ramos dendríticos que formam o cálice e que convergem para formar o pedúnculo (ver Fig. 1). Na extremidade anterior do pedúnculo, os axónios bifurcam-se dorsal e medialmente para formar os lóbulos dorsais e mediais respetivamente. O lobo vertical é constituído pelos lobos α & α' , enquanto o lobo medial pode ser dividido em lobos β , β' & γ (Tanaka et al. 2008). Os neurónios γ inervam apenas o lobo γ , os neurónios α' & β' bifurcam-se na extremidade anterior do pedúnculo e projetam-se respetivamente para os lóbulos α' & β' , da mesma forma os neurónios α & β formam dois ramos que terminam nos lóbulos α & β . Cada uma das células *kenyon* é gerada em momentos diferentes do desenvolvimento: os neurónios γ são os primeiros a serem gerados, até ao estágio médio-larval, depois formam-se os neurónios α' & β' , durante os estádios larvares tardios, e por último os neurónios α & β , durante os estágios precoces e tardios da pupa (Tanaka et al. 2008).

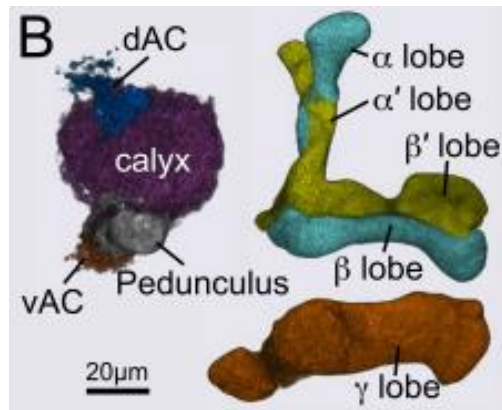


Figura 1. Esquema dos subdomínios do *Mushroom Body* (MB) (Aso et al. 2014).

Os investigadores Aso et al. (2014) identificaram cada um dos neurónios que formam o MB da *D. melanogaster*, elaborando um mapa descritivo das suas principais conexões, e a partir do qual foi possível inferir, através de uma abordagem funcional (por perda de função com linhas transgênicas específicas), os substratos anatómicos subjacentes à aprendizagem associativa e à memória. Este estudo revelou existirem aproximadamente 2200 neurónios no MB, que incluem sete tipos de células *Kenyon*, 21 tipos de células de *output* e 20 tipos de neurónios da dopamina. Concluíram também que o MB pode ser subdividido em 15 compartimentos anatómicos, cada um definido pela presença de um conjunto específico de células de *output* e de neurónios dopaminérgicos, sugerindo que esses compartimentos anatómicos podem ser unidades de processamento de informação semiautónomas (ver Fig. 2).

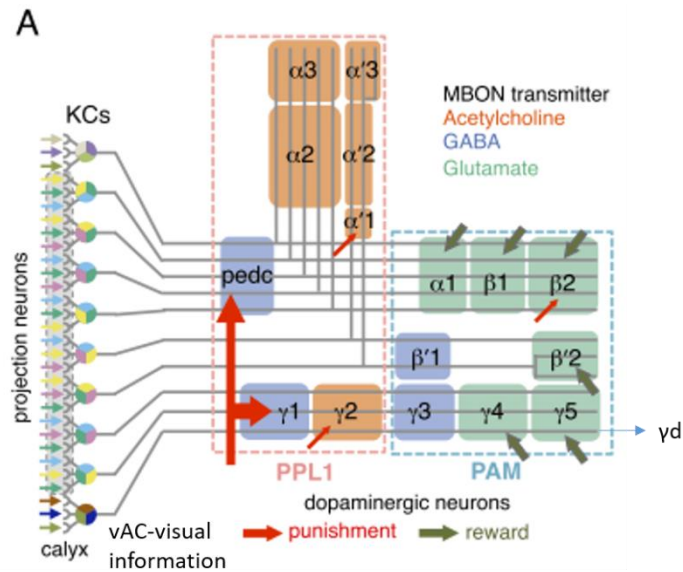


Figura 2. Ilustração do Fluxo de informação pelos 15 compartimentos de *keylion cells* no MB e localização dos compartimentos que são diferencialmente inervados por neurónios dopaminérgicos to tipo PAM e PPL1 (Aso et al. 2014).

Os neurónios recetores que se ligam aos neurónios projetores e estes às células Kenyon para transmitir informação de estímulos ambientais são, na sua maioria, recetores olfativos. Ainda não se sabe com detalhe como é que a informação visual é transmitida e representada no MB da mosca da fruta. Mas num estudo feito por Vogt et al. (2016), demonstrou-se a existência de, pelo menos, dois neurónios de projeção visual, localizados no cálice central acessório (*ventral accessory calyx*, vAC), que conectam diretamente os lobos óticos à camada dorsal do lobo γ (γd) do MB (Figs. 1 e 2).

Este circuito de informação visual é também inervado por neurónios dopaminérgicos dos *clusters* PAM e PPL1 (Fig. 2). Dado que o MCC envolve sobretudo a aquisição de informação visual (e que o protocolo experimental utilizado nesta tese envolve apenas informação visual), sabemos de antemão e com alguma precisão que zona do MB estamos a atingir quando testamos o MCC com as linhas transgénicas PAM e PPL1.

2. Métodos

Manutenção das moscas

Três linhas de *D. melanogaster* foram mantidas em laboratório em condições idênticas: moscas *wild-type* da linha *Canton-S* e moscas transgênicas para o controle da expressão da dopamina nos *clusters* PAM e PPL1 do sistema nervoso central, o MB.

As moscas foram criadas em garrafas de cruzamento de 10 x 5 cm, com cerca de 8 mL de *smart food*. Este meio nutritivo é semelhante à comida padrão (feita à base de açúcar, farinha de milho, extrato de levedura e agar), mas sem açúcares adicionados (não contém melaço, nem açúcar granulado) e mais rica em proteínas (através de uma maior proporção de extrato de levedura e da adição de granulado de levedura viva) e vitaminas (através a adição de um complexo multivitamínico próprio para insetos), o que melhora o desempenho de aprendizagem (Xia et al. 1997).

Para a manutenção das populações, colocávamos cerca de 100 casais em garrafas de cruzamento durante aproximadamente 24 horas, para que acasalassem e colocassem ovos. Depois deste período, removíamos os adultos e após 9 a 10 dias de desenvolvimento recolhíamos a nova geração, parte para novas garrafas de cruzamento, e parte para as experiências. Durante o desenvolvimento, as moscas eram mantidas em estufas com luz, temperatura e humidade controladas: ciclos de 12:12 horas de luz e noite, temperatura de $25 \pm 1,5$ °C, e humidade a $60 \pm 7\%$.

Para as experiências, 3 a 4h após a eclosão separávamos as moscas com anestesia suave por CO₂ e colocávamo-las em tubos de manutenção, de cerca de 5 cm, e em grupos unissexo de sensivelmente 10 indivíduos por tubo, garantindo assim que as fêmeas eram virgens.

As experiências decorreram entre o 3º e o 5º dia de idade após a eclosão (Mery et al. 2009; Battesti et al. 2012), e a manipulação das moscas durante as experiências já não foi feita com a ajuda de anestesia por CO₂, mas sim por aspiração suave.

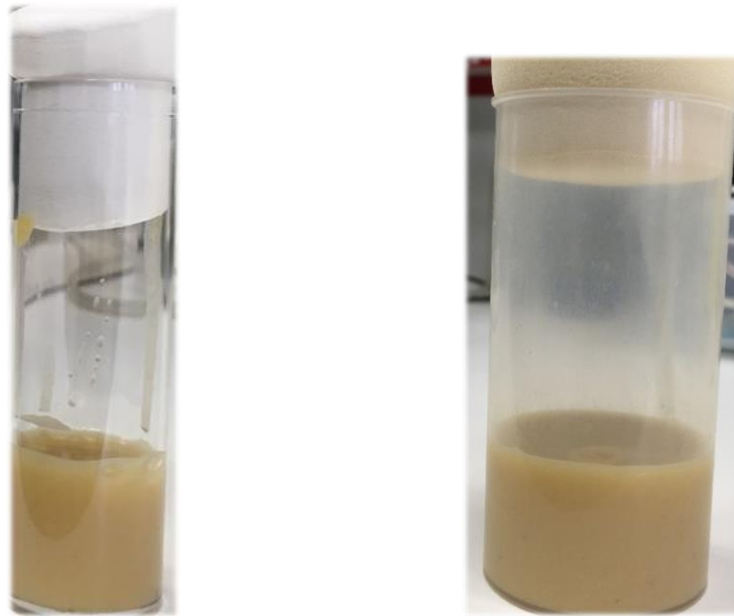


Figura 3. Tubo de manutenção e garrafa de cruzamento.

As linhas de transgênicas

As linhas transgênicas que utilizámos para o controlo da expressão da dopamina nos conjuntos de neurónios PAM e PPL1 eram linhas do sistema GAL4 vs UAS-miR.

- **GAL4** é um transgene (proveniente da levedura, mas que é funcional em drosófila) que codifica para uma proteína com o mesmo nome, que é uma proteína ativadora da transcrição do ADN. O gene pode ser inserido em qualquer local do genoma da drosófila e em qualquer tipo de tecido ou células e, por isso, ter alvos mais ou menos específicos. No caso do nosso estudo, utilizámos linhas transgênicas com expressão do gene GAL4 exclusivamente nos tecidos do sistema nervoso, e especificamente nos sub-conjuntos de neurónios dopaminérgicos PAM e PPL1.
 - A linha PAM-GAL4: R58E02-GAL4 (código FlyBase: FBti0137105).
 - A linha PPL1-GAL4: TH-GAL4 (Código FlyBase: FBti0072936).

- **UAS** (*Upstream Activation Sequence*) é uma sequência de ativação localizada a montante do transgene GAL4 e ao qual a proteína GAL4 se liga, ativando a transcrição de um transgene vizinho de interesse.
- **miR** foi o transgene de interesse que utilizámos nas nossas experiências. Este é um micro-RNA que, à semelhança de um RNA de interferência, neutraliza moléculas alvo de RNA mensageiro, inibindo desse modo a expressão genética das células onde é ativado, sendo que é apenas ativado nas células que expressam o transgene GAL4. No nosso caso, essas células são apenas os neurónios PAM e PPL1. Para além disso, a linha miR que utilizámos é também específica para a dopamina, inibindo a produção de dopamina.
- A linha UAS-TH-miR-G (Xie et al. 2018)

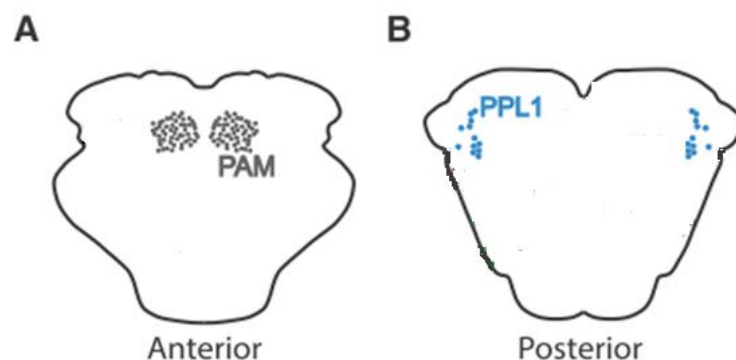


Figura 4. Conjuntos de neurónios de DA nas regiões cerebrais anterior (A) e posterior (B). Na região anterior estão identificados os neurónios PAM (*protocerebral anterior median*) e na região posterior os neurónios PPL1 (*protocerebral posterior lateral 1*) (Vogt et al., 2014)

Para produzir fêmeas com o sistema GAL4-UAS-miR completo, utilizámos sempre fêmeas F1 de cruzamentos entre linhas transgênicas GAL4 e linhas UAS-miR. Dado que nem toda a descendência F1 contém os dois transgenes em simultâneo, para identificar as fêmeas com os dois transgenes fizemos a triagem das moscas à lupa utilizando marcadores fenotípicos conhecidos, tais como as asas curvas (associadas à mutação *Curly*), os olhos brancos (associados à mutação *White*), e os pelos curtos (associados à mutação *MKRS*). As moscas com estes marcadores foram rejeitadas, pois só as moscas com o fenótipo selvagem é que possuíam os dois transgenes (à exceção da

cor dos olhos, que em vez de vermelha era laranja escuro, proveniente do marcador genético *miniWhite*).

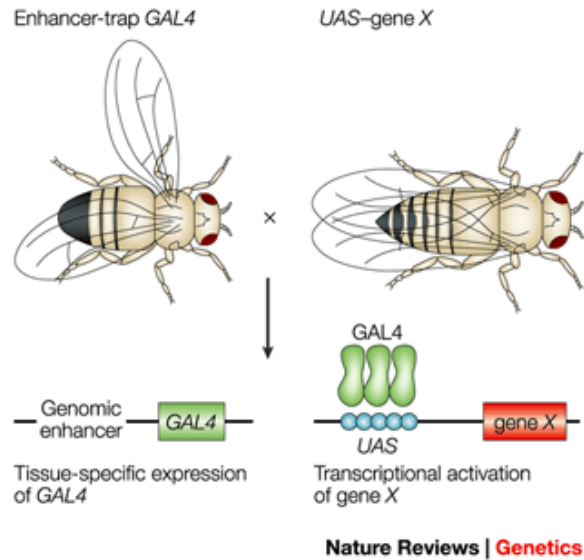


Figura 5. O sistema GAL4 vs UAS-miR. Para produzir moscas com o sistema GAL4-UAS-miR completo foi preciso cruzar moscas GAL4, que expressam o transgene em tecidos específicos (no nosso caso, os *clusters* PAM e PPL1 do sistema nervoso), com moscas UAS-gene X. No nosso caso, o gene X era o TH-miR, que na F1 era activado por ligação da proteína GAL4 à sequência de activação UAS. O TH-miR tinha a função de silenciar os receptores de DA nas células alvo, PAM e PPL1. (Imagem de Miratul & Feany, 2002)

Dispositivo experimental

Utilizámos o mesmo dispositivo que noutros estudos de MCC em drosófila (e.g. Mery et al. 2009; Dagaëff et al. 2016; Monier et al. 2019; Danchin et al. 2019), o qual consiste em dois tubos de plástico rígido transparente, com aproximadamente 3×1 cm cada um, e separados por uma lamela. Uma fêmea focal (ou observadora) era colocada num dos tubos, conseguindo observar, através da lamela, as moscas demonstradoras colocadas no outro tubo. Os tubos estão presos a duas molas, as quais assentavam, por sua vez, numa base de madeira.

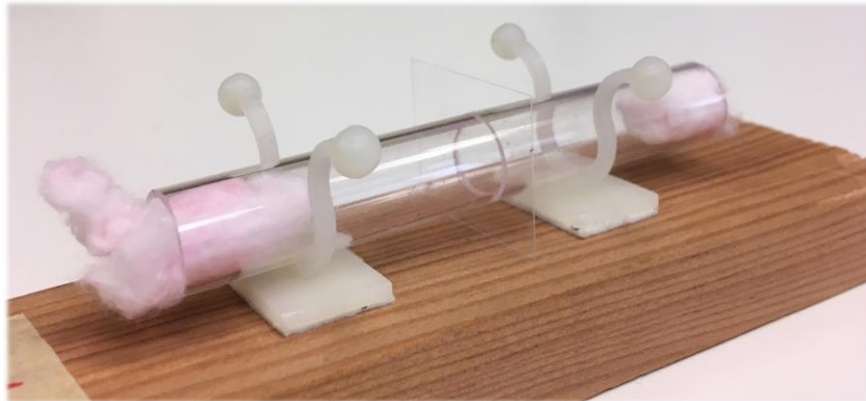
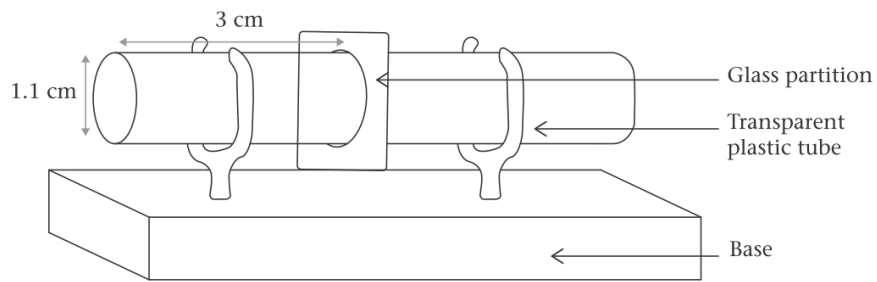


Figura 6. Dispositivo experimental em esquema e em fotografia. Esquema copiado de Dagaeff et al. (2016): *glass partition* = lamela; *transparent plastic tube* = tubo transparente de plástico; *base* = base de madeira.

Experiências comportamentais

Experiência 1: MCC

No teste de MCC utilizamos o protocolo experimental validado por Dagaeff et al. (2016) e apelidado de *speed learning*. O protocolo é mais simples e rápido do que aquele usado em Mery et al. (2009), mas igualmente eficaz, e é constituído por duas fases: a fase da demonstração e a fase de teste.

Antes da fase da demonstração era necessário colorir os machos, formar casais e esperar que estes entrassem em cópula. Os machos eram coloridos com pós próprios para marcar insetos e dessa forma criar dois fenótipos artificiais: o da cor azul (*BioQuip Luminous Powder Blue 1162B*) e o da cor rosa (*BioQuip Luminous Powder Red 1162R*) (Fig. 7). Os machos eram deixados nos frascos de comida para limpar o excesso de pó durante pelo menos 10 min, até voltarem à sua atividade normal (Dagaeff et al. 2016).

Os casais eram formados a seguir e alternadamente com machos azuis ou rosa.

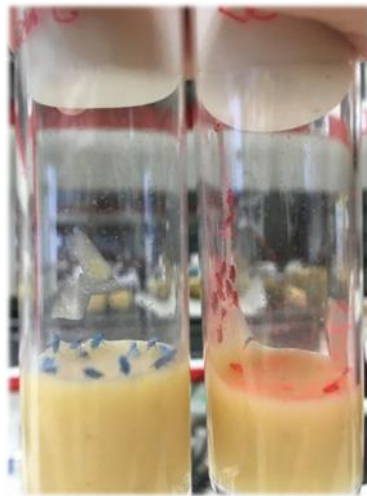


Figura 7. Machos coloridos de azul e rosa antes dos testes

A fase da demonstração começava quando uma fêmea focal era colocada num dos tubos do dispositivo experimental e no tubo adjacente, separado do primeiro pela lamela de vidro, eram colocados um casal em cópula e um macho solitário. Imaginemos que o macho que estava em cópula era o azul e o solitário o cor-de-rosa. Isto implicava que o macho azul estava a transmitir à fêmea observadora informação social positiva pela sua capacidade de atrair parceiros e garantir a cópula e o macho rosa a transmitir informação social negativa.

Uma vez que a cópula dura perto de 20 min, é tempo suficiente para que as fêmeas observadoras consigam recolher estas informações sobre a escolha do parceiro da fêmea demonstradora e aprender a associação entre o desempenho dos machos e as suas cores respetivas.

Quando a cópula terminava, removiam-se as três moscas demonstradoras e esperava-se cerca de 15 min, que é o tempo necessário para que a memória associativa em drosófila seja consolidada (Folkers et al., 1993), e assim detetar se houve aprendizagem/memorização ou não (Monier et al. 2019). Depois disso, iniciávamos o teste de escolha do parceiro (Dagaeff et al. 2016; Nöbel et al. 2018).

No teste de escolha de parceiro era avaliada a preferência da fêmea observadora, dando-

lhe a escolher entre dois novos machos, mas com as mesmas características que ela observou nos primeiros durante a fase da demonstração. Estes novos machos eram colocados em simultâneo no segundo tubo e passado cerca de um minuto a lamela era removida para que os dois machos e a fêmea observadora se pudessem encontrar e acasalar. Verificava-se que ocorria MCC se a fêmea escolhesse acasalar com o macho que tivesse a mesma cor do macho que ela observou a acasalar com sucesso na fase de demonstração (Nöbel, S. Et al. 2018). Portanto, no seguimento do exemplo acima, verificava-se que a fêmea tinha feito MCC se escolhesse também ela um macho azul.

Experiência 2: preferências sexuais inatas

O teste das preferências sexuais inatas, tal como no teste de MCC, incluía uma fase de demonstração e uma fase de teste, de maneira a que as condições de um e outro teste fossem o mais semelhantes possível.

Na primeira fase, colocávamos uma fêmea focal num dos tubos do dispositivo experimental e no outro tubo colocávamos dois machos de cores diferentes. Depois de 20 min de observação (para simular o mesmo tempo da cópula do casal demonstrador do protocolo de MCC), retirávamos os machos e deixávamos a fêmea sozinha por 15min (para consolidação da memória, tal como no protocolo de MCC). Só depois se iniciava a fase de teste onde colocávamos dois novos machos, um azul e um cor-de-rosa, e deixávamos que a fêmea escolhesse um para acasalar.

O objetivo deste teste era demonstrar que a escolha das fêmeas para a cor azul ou rosa dos machos é aleatória e que, portanto, não há uma preferência inata por nenhuma das cores. Porque existindo uma tendência preferencial para uma cor, esta poderia ser um fator de enviesamento dos testes de MCC, o que dificultaria a interpretação dos resultados.

Procedimentos gerais

Em todos os ensaios realizados só eram considerados válidos aqueles em que ambos os machos cortejavam a fêmea. Considerava-se que as fêmeas cortejadas por apenas um dos machos não estavam em condição de escolher parceiros corretamente, já que a escolha poderia não ser da fêmea, mas da competição entre os machos e da hierarquia

de dominância daí resultante (Dagaeff, A. et al. 2016). Em todos os ensaios realizados verificávamos também se tinha havido acasalamento (era a este o comportamento que utilizávamos como medida da escolha da fêmea), por isso os testes em que as fêmeas não acasalavam também não eram contabilizados como válidos (Nöbel, et al. 2018).

Durante cada experiência eram realizados sete ensaios em simultâneo, com separações de plástico entre dispositivos experimentais, para evitar troca de informações entre as moscas e evitar perturbações pelo meio envolvente (Nöbel, S. Et al. 2018).

Tanto os machos como as fêmeas eram apenas usados uma vez em cada ensaio, e os machos na fase de demonstração eram sempre diferentes dos machos que se usavam na fase de teste.

Todas as experiências foram conduzidas na mesma sala com uma temperatura de $22 \pm 1,5$ °C, e com uma humidade $60 \pm 7\%$ e sempre realizadas, salvo raras exceções, entre as 7h e as 11h. Este horário corresponde à fase de maior atividade das drosófilas por estar diretamente relacionado com ciclo de luz da estufa onde as moscas eram mantidas. Essa estufa acende a luz às 8h da manhã e desliga-a às 20h, sendo que o período de maior atividade das moscas se situa duas horas antes e duas horas depois do nascer do dia (Dubowy & Sehgal, 2017)

Análise da escolha de parceiro sexual

Analisámos os dados no *software* de programação R, versão 3.6.1 (R Core Team 2019), com modelos estatísticos do tipo GLM (*Generalized Linear Models*), aos quais aplicámos a distribuição binomial, porque a variável resposta é binária, ou seja, só pode ter os valores 0 ou 1.

As variáveis explicativas (x) que incluímos no modelo foram as seguintes:

- A variável “Tratamento”, que é uma variável categórica com dois grupos: o das preferências sexuais inatas, a que chamámos de *Independent unconditioned Mate-Choice* (IMC), e o *Mate-Choice Copying* (MCC).
- A variável “Linha”, que é uma variável categórica com três grupos: a linha controlo *Canton-S* (CS), e as linhas transgénicas PAM e PPL1.

A variável resposta (y) define se a escolha de parceiro sexual das fêmeas focais foi

enviesada para um dos machos ou não. Nesse sentido, no caso do teste IMC, a variável resposta representa a proporção de acasalamentos com o macho azul (1 = cor azul e 0 = cor-de-rosa), e no caso do teste MCC representa a proporção de acasalamentos com o macho correcto (1 = fez MCC e 0 = não fez MCC).

Fizemos três tipos de modelos estatísticos para três tipos de análises:

- Modelo 1: para a interação geral entre Tratamento e Linha.
- Modelo 2: para a diferença entre linhas dentro de cada tratamento e para a diferença com a escolha aleatória.
- Modelo 3: para a diferença entre tratamentos dentro de cada linha.

No modelo 1, a hipótese nula (H_0) é a de que as fêmeas das diferentes linhas não respondem diferentemente umas das outras em função do tratamento. Prevemos rejeitar H_0 , já que esperávamos que houvesse enviesamento da escolha no tratamento MCC, pelo menos para a linha CS, já que as linhas PAM e PPL1 poderão ter perdido a capacidade de aprender.

No modelo 2, a hipótese nula (H_0) é a de que não há diferença entre linhas em nenhum tratamento, nem diferenças com a escolha aleatória. Prevemos rejeitar H_0 para o tratamento MCC, já que esperávamos que houvesse aprendizagem, pelo menos na linha CS, incluindo diferenças com a escolha aleatória.

No modelo 3, a hipótese nula (H_0) é a de que não há diferença entre tratamentos em nenhuma linha. Prevemos rejeitar H_0 , pelo menos para a linha CS.

Análise do efeito das condições meteorológicas no comportamento

As condições meteorológicas de pressão atmosférica, temperatura e humidade podem ter uma influência significativa no comportamento dos animais e a drosófila não é exceção. Foi demonstrado que as experiências de aprendizagem, nomeadamente as de MCC, podem ser afetadas sobretudo pela pressão atmosférica (Dagaeff, A. et al. 2016). O comportamento que é afetado não é propriamente o da escolha de parceiro, mas sim o dos níveis de atividade. As fêmeas, em dias de baixa pressão atmosférica, podem ficar letárgicas e, por isso, não acasalar. Os machos podem também ficar mais inativos e não fazer a corte.

Como tivemos uma proporção elevada de ensaios sem acasalamentos, fizemos uma

análise à taxa de sucesso dos ensaios em função destas covariáveis. Obtivemos estes dados através de uma estação meteorológica no laboratório, exceto para a pressão atmosférica que medíamos por uma aplicação móvel. Estes dados foram sempre recolhidos no início de cada ensaio.

Nesta análise, a variável resposta (y) define se os ensaios tiveram sucesso ou não, ou seja, se os machos fizeram a corte e se as fêmeas acasalaram (1 = sucesso e 0 = insucesso). As variáveis explicativas (x) da pressão atmosférica, temperatura e humidade foram testadas juntas no mesmo modelo estatístico. Foram testadas enquanto efeitos principais e cada uma em interação com Linha e Tratamento, de modo a avaliar se as condições atmosféricas tiveram efeitos maiores ou menores nalguma destas condições. O modelo estatístico empregue foi também um GLM com distribuição binomial.

Nota relativa ao bem-estar animal

O presente estudo envolveu a utilização de populações de *D. melanogaster* que foram mantidas nas condições de laboratório referidas anteriormente, e por várias gerações. Apesar de não haver regulamentação quanto à utilização ética de insetos em trabalhos científicos, tomámos alguns procedimentos que tiveram em conta o bem-estar dos animais. Nomeadamente, cada mosca só foi sujeita a anestesia por CO₂ uma vez, e as aspirações, com recurso a aspiradores bucais foram sempre as mais suaves possíveis. Após as experiências, os indivíduos eram primeiro anestesiados com CO₂ e só depois colocados numa “morgue”, que consistia num copo com água e álcool mais ou menos em porções semelhante e um pouco de detergente. Em alternativa, as garradas de cruzamento e os tubos de manutenção eram colocados em congeladores.

3. Resultados

Análise da escolha de parceiro sexual

Relativamente à análise da escolha de parceiro sexual, e recapitulando as nossas previsões, esperávamos, antes de mais, que as fêmeas focais da linha controlo (CS) observassem a escolha das fêmeas demonstradoras e a copiassem, ou seja, que fizessem MCC. Quanto às fêmeas focais das linhas transgênicas, se estas demonstrassem incapacidade para copiar isto significaria que o MCC seria modulado por neurónios de DA que formam memórias apetitivas (*cluster* PAM), memórias aversivas (*cluster* PPL1), ou ambas.

De um modo geral, os resultados mostram que a linha CS faz MCC e que as linhas PAM e PPL1 não o fazem, sugerindo que a aprendizagem por MCC é modulada tanto por memórias apetitivas como aversivas. Contudo, o resultado para a linha PPL1 poderá ser um caso de erro estatístico tipo II, já que parece haver uma tendência para MCC, mas o tamanho da amostra é pequeno (ver Fig. 8). Nos próximos parágrafos descrevemos estes resultados em detalhe.

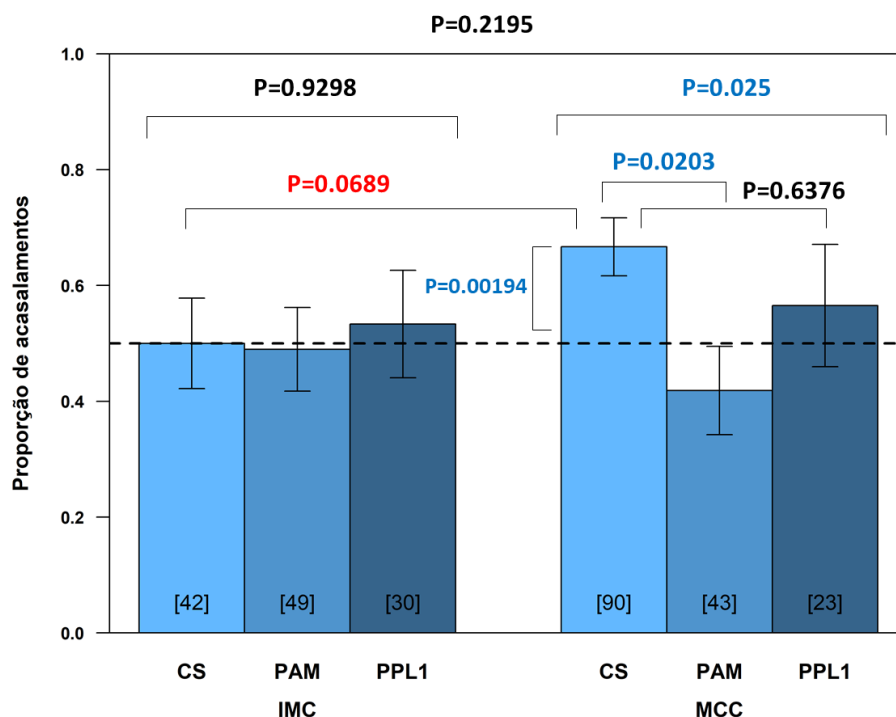


Figura 8. Escolha de parceiro sexual das fêmeas controle (*Canton-S*, CS), e das fêmeas transgênicas para os neurónios dopaminérgicos PAM e PPL1, nos tratamentos IMC (*Independent unconditioned Mate Choice*) e MCC (*Mate-Choice Copying*). As barras representam a proporção média de acasalamentos enviesados: no tratamento IMC representam a preferência das fêmeas pelos machos azuis; no tratamento MCC representam a preferência das fêmeas pelos machos que elas viram acasalar, ou seja, a tendência de *copying*. Os números entre parênteses retos indicam o tamanho das amostras. A linha horizontal a tracejado representa a escolha aleatória. As barras de erro representam o erro padrão da média, mostrando o erro associado à probabilidade de haver escolha enviesada. Os p-values correspondem às comparações relevantes das análises estatísticas realizadas.

MODELO 1: Interação entre Tratamento e Linha

O resultado para a interação Tratamento*Linha não foi significativo: *Chi-square* ($d.f. = 2, N = 277$) = 3,0332, $p\text{-value} = 0,2195$. Como o $p\text{-value} > 0,05$, não rejeitamos a hipótese nula. Ou seja, concluímos que, no geral, as fêmeas das diferentes linhas, ao contrário do que esperávamos, não respondem de maneira significativamente diferente nos dois tratamentos.

O resultado para o fator Tratamento também não foi significativo: *Chi-square* ($d.f. = 1$,

$N = 277$) = 1,7259, $p\text{-value} = 0,1889$. Como $p\text{-value} > 0,05$, não rejeitamos a hipótese nula. Ou seja, juntando dentro de cada tratamento todas as linhas, não há diferenças gerais entre tratamentos.

O resultado para o fator Linha também não foi significativo: *Chi-square* ($d.f. = 2$, $N = 277$) = 4,4897, $p\text{-value} = 0,1059$. Como $p\text{-value} > 0,05$, não rejeitamos a hipótese nula. Ou seja, juntando dentro de cada linha os dois tratamentos não há diferença gerais entre linhas.

MODELO 2A: Diferença entre linhas no tratamento IMC

O resultado para a diferença de comportamento entre linhas no tratamento IMC não foi significativo: *Chi-square* ($d.f. = 2$, $N = 121$) = 0,14558, $p\text{-value} = 0,9298$. Como o $p\text{-value} > 0,05$, não rejeitamos a hipótese nula. Ou seja, as preferências sexuais inatas para machos de cor azul ou rosa não são significativamente diferentes entre linhas, tal como esperado.

MODELO 2B: Diferenças entre linhas no tratamento MCC

O resultado para a diferença de comportamento entre linhas no tratamento MCC foi significativo: *Chi-square* ($d.f. = 2$, $N = 156$) = 7,3774, $p\text{-value} = 0,025$. Como $p\text{-value} < 0,05$, rejeitamos a hipótese nula, logo existem diferenças entre linhas na capacidade para MCC, tal como esperado.

- Comparações entre CS e as linhas transgênicas:
 - CS vs PAM: $p\text{-value} = 0,0203$
 - CS vs PPL1: $p\text{-value} = 0,6376$
- Comparações de cada linha com a escolha aleatória:
 - CS vs escolha aleatória: $p\text{-value} = 0,00194$
 - PAM vs escolha aleatória: $p\text{-value} = 0,288$
 - PPL1 vs escolha aleatória: $p\text{-value} = 0,533$

MODELO 3A: Diferenças entre tratamentos na linha CS

O resultado para a diferença de comportamento entre tratamentos na linha CS foi apenas marginalmente significativo: *Chi-square* (*d.f.* = 1, N = 132) = 3,3158, *p-value* = 0,06862. Como o *p-value* > 0,05, não podemos rejeitar a hipótese nula, ou seja, não há diferença estatística entre tratamentos, ao contrário do esperado. No entanto, este resultado é muito provavelmente um erro estatístico tipo II (quando a H0 é falsa, mas não se consegue rejeitar provavelmente por falta de dados, neste caso no tratamento IMC).

MODELO 3B: Diferenças entre tratamentos na linha PAM

O resultado para a diferença de comportamento entre tratamentos na linha PAM não foi significativo: *Chi-square* (*d.f.* = 1, N = 92) = 0,4685, *p-value* = 0,4937. Como o *p-value* > 0,05, não rejeitamos a hipótese nula, ou seja, não há diferença significativa entre tratamentos. Significa que as moscas PAM não aprenderam, sendo este o resultado esperado se as memórias criadas durante o MCC forem apetitivas.

MODELO 3C: Diferenças entre tratamentos na linha PPL1

O resultado para a diferença de comportamento entre tratamentos na linha PPL1 também não foi significativo: *Chi-square* (*d.f.* = 1, N = 53) = 0,053454, *p-value* = 0,8172. Como o *p-value* > 0,05, não rejeitamos a hipótese nula, ou seja, não há diferença significativa entre tratamentos. Significa que as moscas PPL1 também não aprenderam, sendo este o resultado esperado se as memórias criadas durante o MCC forem também do tipo aversivo. No entanto, a figura sugere que não houve perda da função de aprendizagem, indicando que este poderá ser mais um caso de erro estatístico tipo II (quando a H0 é falsa, mas não pode ser rejeitada provavelmente por falta de dados, neste caso nos dois tratamentos).

Análise do efeito das condições meteorológicas no comportamento

Relativamente à análise do sucesso dos ensaios, testamos se haveria algum efeito das condições meteorológicas de pressão atmosférica, temperatura e humidade na motivação das drosófilas para a corte e o acasalamento. Esperávamos, tendo em conta dados da literatura (Dagaeff, A. et al. 2016), que houvesse, pelo menos, um efeito da

pressão atmosférica, com mais acasalamentos com pressões altas (e.g. 1015 Mb ou hPa).

Os resultados mostraram que não há, no entanto, qualquer efeito de nenhuma destas covariáveis, nem enquanto efeitos principais, nem em interação com Linha e Tratamento. O resultado geral do modelo foi o seguinte: *Chi-square* (*d.f.* = 1, *N* = 897) = 15,924, *p-value* = 0,5979. No entanto, a percentagem de sucesso dos ensaios foi apenas de 31% (em 897 ensaios ao todos, apenas 275 foram validados), já que todos os ensaios em que pelo menos um dos machos não fazia a corte, ou em que a fêmea focal não acasalava foram considerados inválidos.

4. Discussão

O objetivo desta tese foi estudar o papel do neuro-modulador dopamina (DA) no controlo da formação de memórias apetitivas ou aversivas durante o processo de aprendizagem social por Mate-Choice Copying (MCC), em *D. melanogaster*. Obtivemos dois resultados principais: por um lado, os resultados indicam claramente que os neurónios dopaminérgicos do cluster PAM, responsáveis pela formação de memórias apetitivas, têm uma função no processo de aprendizagem por MCC, já que sem estes neurónios ativos as fêmeas perdem a capacidade de aprender; por outro lado, os resultados sugerem que os neurónios dopaminérgicos do cluster PPL1, responsáveis pela formação de memórias aversivas, não têm uma função no processo de aprendizagem por MCC, já que sem estes neurónios ativos as fêmeas parecem não perder a capacidade para aprender. No entanto, este segundo resultado não é conclusivo. Nos próximos parágrafos aprofundamos esta interpretação dos resultados e as suas implicações.

Primeiro que tudo, o facto de as três linhas testadas (a linha controlo CS, e as duas linhas transgénicas com os neurónios dopaminérgicos PAM e PPL1 silenciados) não mostrarem um comportamento significativamente diferente nos dois tratamentos (o tratamento controlo da escolha inata de parceiros sexuais, ou IMC, e o tratamento MCC), mas as análises mais finas dentro de cada tratamento e linha já mostrarem padrões comportamentais significativos, é revelador da falta de poder estatístico dos testes e, portanto, da falta de dados nalguns casos. Este é, infelizmente, o terceiro resultado geral do nosso trabalho.

Nessa análise mais fina, no tratamento IMC, aquele em que as fêmeas focais tinham apenas de escolher entre dois machos de cores artificiais diferentes, conseguimos verificar que as três linhas cumpriram o que esperávamos, ou seja, as médias das escolhas ficaram ao nível ou muito perto dos 50%. Isto significa que as três linhas fizeram escolhas aleatórias quanto à cor do macho que escolheram, ou seja, que não têm uma preferência inata para o azul ou para o rosa, como seria de esperar em fêmeas ingénuas para esses fenótipos. Este resultado é importante, pois assegura-nos que não tendo as fêmeas de nenhuma das linhas uma preferência inata para os fenótipos

artificiais dos machos, qualquer padrão comportamental no tratamento do MCC será revelador, por comparação, da presença ou ausência de aprendizagem.

Sendo assim, no tratamento MCC, aquele em que as fêmeas focais tinham de aprender qual dos dois machos era escolhido ou rejeitado pela fêmea demonstradora e copiar essa decisão, conseguimos precisamente verificar que existe uma diferença geral significativa entre as três linhas, e que essa diferença se deve aos diferentes comportamentos das linhas CS e PAM, com a PAM a perder a função de aprendizagem. Pelo contrário, as linhas CS e PPL1 não são estatisticamente diferentes, indicando que não há perda da função de aprendizagem neste caso. Este resultado sugere, numa primeira interpretação, que as memórias moduladas pelos neurónios da dopamina durante o MCC são sobretudo apetitivas, e que, portanto, as fêmeas focais prestam mais atenção ou aprendem melhor a informação positiva proveniente do macho escolhido pela fêmea demonstradora do que a informação negativa proveniente do macho rejeitado. Esta diferença na relevância das informações sociais positivas e negativas irá ajudar-nos a compreender melhor o mecanismo da aprendizagem social, assim como o impacto que este poderá ter na evolução, já que se mostrou, por exemplo, num estudo com modelos matemáticos, que as consequências do MCC para a evolução da atratividade dos machos é diferente se as fêmeas copiarem só a informação positiva, ou também a informação negativa (Santos et al. 2014).

Quanto à comparação entre tratamentos na linha CS, as diferenças são apenas marginalmente significativas, o que vai contra aquilo que esperávamos. A linha controlo deveria mostrar claramente uma capacidade para aprendizagem, já que a mesma linha tem sido utilizada nas várias experiências de MCC anteriormente publicadas (e.g. Mery et al. 2009; Dagaëff et al. 2016; Monier et al. 2019; Danchin et al. 2019). Nesses estudos, a frequência de MCC está ao nível dos 70%, e está significativamente acima da escolha aleatória dos 50%, tal como na nossa experiência. Sendo assim, a diferença marginalmente significativa que obtivemos entre os tratamentos MCC e IMC parece ser claramente um caso de erro estatístico tipo II, podendo vir a ser corrigido com uma amostra de dados maior para o tratamento IMC.

Não existem diferença significativa entre tratamentos na linha PAM, nem diferença com a escolha aleatória no tratamento MCC, o que é de esperar numa linha transgénica que perdeu a capacidade de aprendizagem. A Fig. 8 demonstra que há, de facto, perda da função de aprendizagem na linha PAM, mas também sugere que as moscas PAM não

escolhem os machos apenas aleatoriamente, mas que parecem preferir o macho rejeitado pelas fêmeas demonstradoras, já que a média da proporção de escolha fica claramente abaixo da linha dos 50%. Se com mais dados este resultado se viesse a consolidar não seria surpreendente, dado que num estudo anterior também se verificou que a perda de função de certos neurónios de DA levava à expressão do fenótipo oposto: moscas associas (criadas em isolamento) passaram a ser sociais e moscas sociais passaram a ser associas (Xie et al. 2018). Não houve a expressão de um fenótipo intermédio de preferência social/associal aleatória. Isto sugere que o ambiente em que os animais nascem ou onde são criados é aquele que gera as bases para a forma como o cérebro caracteriza as memórias apetitivas e aversivas e que as valências de todas as experiências que um indivíduo vive posteriormente são atribuídas por comparação com essas referências: se, neste exemplo, a referência das moscas criadas em grupo é “ser social”, a valência base atribuída às experiências sociais é positiva; e sendo assim, na ausência dos neurónios de DA que atribuem essa valência, surge o comportamento oposto, ou seja, o comportamento associal. No caso da nossa experiência, não há uma referência base para os fenótipos azul e rosa dos machos, mas poderá haver para o MCC, com uma regra do tipo “copia o que os outros fazem”. Ora, na falta dos neurónios que atribuem uma valência positiva a esse comportamento, as fêmeas fazem o oposto, ou seja acasalam com o macho que a fêmea demonstradora rejeitou.

Comparando, por fim, os dois tratamentos na linha PPL1, também não encontramos diferenças entre tratamentos, nem com a escolha aleatória no tratamento MCC. Este resultado sugere, tal como para a linha PAM, que há perda de função nestes neurónios e que, portanto, a aprendizagem por MCC também requer a formação de memórias aversivas. Contudo, este resultado é contraditório com a comparação entre as linhas PPL1 e CS no tratamento MCC. Nesta comparação, tal como discutido acima, sugere-se que não há perda de função e que, portanto, não há formação de memórias aversivas durante o MCC. Dado que a amostra para a linha PPL1 é pequena (é a amostra mais pequena de todas) e que a proporção média de MCC fica acima da linha da escolha aleatória, este resultado poderá ser um artefacto estatístico.

Se, por ventura, tivéssemos mais dados para a linha PPL1 poderia acontecer uma de duas coisas: ou verificávamos que estas moscas não perdiam a capacidade de aprender, e concluíamos que as memórias formadas durante o MCC são, sobretudo, apetitivas, ou seja, que apenas a informação sobre o macho que acasala com sucesso com as fêmeas

demonstradoras é adaptativa; ou que estas moscas perdiam, tal como as PAM, a capacidade para aprender, e concluíamos que as memórias formadas durante o MCC são também aversivas, ou seja, que memorizar informação tanto sobre os machos de melhor como de pior qualidade é igualmente adaptativo.

Sabendo que as memórias apetitivas são importantes nos processos motivacionais (Cardinal et al. 2002; Xie et al. 2018), incluindo a procura ativa de parceiros sexuais, a formação de memórias apetitivas na aprendizagem social por MCC não é surpreendente. E por isso, um cenário em que haja uma maior ou até uma exclusiva participação das memórias apetitivas no MCC, comparativamente às memórias aversivas, não nos parece impossível. As consequências para a nossa compreensão do mecanismo e evolução da aprendizagem social são, no entanto, muito diferentes com um ou outro cenário. Contudo, o nosso estudo deixa a segunda hipótese em aberto.

Considerações finais

Sabemos que um dos principais objetivos das neurociências é perceber como é que circuitos específicos de células cerebrais permitem que os animais respondam de forma adaptativa a um ambiente em constante mudança. Estes processos são estudados ambiciosamente em laboratório com cérebros simples, como é o caso do cérebro da mosca da fruta. Consideramos que de alguma maneira conseguimos desvendar um pouco deste mundo misterioso do cérebro por termos pegado num tema completamente novo na literatura que relaciona a modulação da valência das memórias com a aprendizagem social no contexto da escolha de parceiro.

Em estudos futuros seria interessante averiguar de que forma estas duas grandes forças controladoras do comportamento dos animais, a informação genética e a informação social, quando entram em conflito durante o processo de escolha de parceiro (e.g. quando as fêmeas têm uma preferência inata por machos de um certo fenótipo e a informação social é contraditória), são pesadas pelo sistema nervoso e decisão final dos animais é tomada. Seria também interessante perceber se existe algum dimorfismo sexual na modulação da dopamina que fosse interessante avaliar no contexto de escolha de parceiro. Como em *D. melanogaster* os machos também fazem MCC (Nöbel et al. 2018), este estudo não seria difícil de realizar.

Uma grande limitação a estes estudos comportamentais é que muitas vezes as memórias associativas podem conter informações de mais do que um sentido, como o visual, o auditivo e o olfativo. Essa multiplicidade de informações que entram no sistema nervoso torna muito difícil o estudo da aprendizagem e de como os animais tomam decisões, principalmente porque pouco se sabe como é que o somatório destas informações é integrado e processado no cérebro, nomeadamente se cada sentido tem o seu próprio circuito de aprendizagem individual ou se convergem para um mesmo circuito geral (Vogt, K. et al 2014). Por exemplo, em *D. melanogaster*, os circuitos dos sistemas nervosos periférico e central que processam as informações olfativa e visual são diferentes, pelo menos até certo ponto (Aso et al. 2014). Contudo, os neurónios DA dos clusters PAM e PPL1 que inervam esses circuitos são os mesmos (Aso et al. 2014; Fig. 2). De que modo é que o cérebro conjuga a informação proveniente destes dois circuitos (e.g. a informação visual e olfativa provenientes de dois machos a cortejarem uma fêmea) é uma pergunta relevante, particularmente se a cada tipo de informação os neurónios dopaminérgicos atribuírem uma valência diferente (e.g., se os machos, ou um deles, tiver um odor que apela a memórias apetitivas e uma cor que apela a memórias aversivas). Compreender como é que o cérebro resolve estes conflitos é um desafio para o futuro.

Bibliografia:

- Andersson, M., Simmons, L. (2006) Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 21 (6).
- Aribi, N., Oulhaci, M., Kilani-Morakchi, S., Sandoz, J., Kaiser, L., Denis, B., Joly, D. (2017). Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, pp.95–100.
- Aso Y, Herb A, Ogueta M, Siwanowicz I, Templier T, Friedrich AB, Ito K, Scholz H, Tanimoto H. (2012). Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLOS Genetics*, 8
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R.M., Iyer, N.A., Ngo, T.T., Dionne, H., Abbott, L.F., Axel, R., Tanimoto, H., and Rubin, G.M. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife* 3.
- Aso Y, Sitaraman D, Ichinose T, Kaun K, Vogt K, Belliard-Guérin G, Plaçais P, Robie A, Yamagata N, Schnaitmann C, Rowell W, Johnston RM, Ngo TT, Chen N, Korff W, Nitabach MN, Heberlein U, Preat T, Branson K, Tanimoto H, Rubin GM. (2014). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife* 3.
- Atkinson, N., (2011). Recent advances in the use of *Drosophila* in neurobiology and neurodegeneration, 99.
- Battesti M, Moreno C, Joly D & Mery F. (2012). Spread of social information and dynamics of social transmission within *drosophila* groups. *Current Biology*, 22, pp. 309–313.
- Bi, J., Zheng, y., Wang, R., Ai, H., Haynes, P., Brownlie, J., Yu, X., Wang, Y., (2018). *Wolbachia* infection may improve learning and memory capacity of *Drosophila* by altering host gene expression through microRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- Burke, C. J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., et al. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*, *Nature*, 492, pp. 433–437.
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J. & Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, pp. 321–352.
- Civetta, A., Cantor, E. (2003). The genetics of mating recognition between *Drosophila simulans* and *D. sechellia*. *Genetics Research*, 82, pp. 117–126.
- Clemens, J., Coen, P., Roem, R., Aldarondo, D., Pacheco, D., Murthy, M., (2018). Discovery of a new song mode in *drosophila* reveals Hidden structure in the sensory and neural drivers. *Current Biology*, 28, pp. 2400–2412.
- Cowling, D. (1980). The genetics of *drosophila melanogaster* courtship song - diallel analysis. *Heredity*, 45 (3), pp. 401-403.

- Danchin, E., Giraldeau, L.-A., Valone, T. J. & Wagner, R. H. (2004). Public information: from nosy neighbors to cultural evolution. *Science*, 305, pp.487–491.
- Danchin, E., Nöbel, S., Pocheville, A., Dagaëff, A., Demay, L., Alphan, M., Ranty-Roby, R., Van Renssen, L., Monie, M., Gazagne, E., Allain, M., Isabel, G. (2018). Cultural flies: Conformist social learning in fruitflies predicts long-lasting mate-choice tradition. *Science*, 362, pp.1025–1030.
- Dewar, A., Wystrach, A., Graham, P., Philippides, A. (2015). Navigation-specific neural coding in the visual system of *Drosophila*. *Biosystems*, 136, pp. 120-127.
- Dolan, M., Belliard-Guérin, G., Bates, A., Plaçais, T., Jefferis, G. (2018). Communication from Learned to Innate Olfactory Processing Centers Is Required for Memory Retrieval in *Drosophila*. *Neuron*, 100, pp. 651–668.
- Droney, D., Hock, B., (1998). Male Sexual Signals and Female Choice in *Drosophila grimshawi* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior*, 11 (1).
- Dubowy, T., Sehgal, A. (2017). Circadian Rhythms and Sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 205, pp.1373–1397.
- Felsenberg, J., Waddell, S. (2017). Neural Networks for a Reward System in *Drosophila*. *Learning and Memory*, 4 (2)
- Fernandez, R.W., Akinleye, A.A., Nurilov, M., Feliciano, O., Lollar, M., Aijuri, R.R., O'Donnell, J.M., and Simon, A.F. (2017). Modulation of social space by dopamine in *Drosophila melanogaster*, but no effect on the avoidance of the *Drosophila* stress odorant. *Biology Letters*, 13.
- Foucaud J, Philippe A-S, Moreno C & Mery F. (2013). A genetic polymorphism affecting reliance on personal versus public information in a spatial learning task in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280.
- Friberg, U., Arnqvist, G., (2003). Fitness effects of female mate choice: preferred males are detrimental for *Drosophila melanogaster* females. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, pp. 797–811.
- Germain, M., Blanchet, S., Loyau, E., Danchin, É. (2016). Mate-choice copying in *Drosophila melanogaster*: Impact of demonstration conditions and male–male competition. *Behavioural Processes*, Vol. 125, pp.76-84.
- Gleason, J., Nuzhdin, S., Ritchie, M. (2002). Quantitative trait loci affecting a courtship signal in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 89, pp.1–6.
- Goodwin, S., Nojima, T., Rings, A (2018) *Drosophila* Courtship: Love Is Not Blind, *Current Biology*, 28 (15), pp. 840-842.
- Grüter, C., Leadbeater, E. (2014). Insights from insects about adaptive social information use. *Trends in ecology & evolution*, 23 (3), pp.177-184.
- Grillet, M., Dartevelle, L., Ferveur, J. (2006). A *Drosophila* male pheromone affects female sexual receptivity. *Proceedings of the royal society*, 273, pp.315–323.
- Guo, A., Gong, Z., Li, H., Li, Y., Liu, L., Liu, Q., Lu, H., Pan, Y., Ren, Q., Wu, Z., Zhang, K., Zhu, Y. (2017) Vision, Memory, and Cognition in *Drosophila*. *Neuroscience and Biobehavioral Psychology*.

- Hall, J.C. (1994). The mating of a fly. *Science*, 264, pp.1702-1714.
- Hebets, E., Sullivan-Beckers, L. (2010). Mate choice and Learning. *Encyclopedia of Animal Behavior*, 2nd edition;
- Heyes, C. (2012). What's Social About Social Learning?, *Journal of Comparative Psychology*, 126 (2), pp.193–202.
- Hige, T., Aso, Y., Modi, M., Rubin, G., Turner, G. (2015). Heterosynaptic Plasticity Underlies Aversive Olfactory Learning in *Drosophila*. *Neuron*, 88, pp.985–998.
- Hige, T. (2018). What can tiny mushrooms in fruit flies tell us about learning and memory. *Neuroscience Research*, 129, pp. 8–16.
- Hoikkala, A., Aspi, J., (1993). Criteria of Female Mate Choice in *Drosophila littoralis*, *D. montana*, and *D. ezoana*, *Evolution*, 47 (3) pp. 768-777.
- Kavaliere, M., Choleris, E. (2017). Social Cognition and the Neurobiology of Rodent Mate Choice. *Society for Integrative and Comparative Biology*, 57 (4) pp. 846-856.
- Kavaliere, M., Matta, R., Choleris, E. (2017). Mate -choice copying, social information processing, and the roles of oxytocin. *Neuroscience And Biobehavioral Reviews*, 72, pp.232–242.
- Kendal, R., Boogert, N., Rendell, L., Laland, K., Webster, M., Jones, P. (2018). Social Learning Strategies: Bridge-Building between Fields. *Trends in cognitive sciences*, 22 (7), pp.651-665.
- Kirkpatrick, M. (1982). Sexual Selection and the Evolution of Female Choice, *Evolution*, 36 (1), pp. 1-12.
- Koppik, M., Ruhmann, H., Fricke, C. (2018) The effect of mating history on male reproductive ageing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 111, pp. 16–24.
- Laturney, M., Moehring, A. (2012). The Genetic Basis of Female Mate Preference and Species Isolation in *Drosophila*. *International Journal of Evolutionary Biology*, 201.
- Lasbleiz, C., Ferveur, JF., Everaerts, C. (2006). Courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* revisited. *Animal Behaviour*, 72, pp. 1001-1012.
- Liu, C., Plaçais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B. D., Aso, Y., Friedrich, A. B., et al. (2012). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*, *Nature*, 488, pp. 512–516.
- Mery, F., Kawecki, T.J. (2004). The effect of learning on experimental evolution of resource preference in *drosophila melanogaster*. *Evolution*, 58 (4), pp. 757–767.
- Mery, F., Varela, SA., Danchin, E., Blanchet, S., Parejo, D., Coolen, I., Wagner, RH. (2009). Public versus personal information for mate copying in an invertebrate, *Current Biology*.
- Monier, M., Nöbel, S. Danchin, E., Isabel, G. (2019). Dopamine and Serotonin Are Both Required for Mate-Copying in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers Behavioral Neuroscience*
- Monier, M., Nöbel, S., Danchin, E., Isabel. G. (2019). Dopamine and Serotonin Are Both Required for Mate-Copying in *Drosophila melanogaster*, *FrontIERS*

Behavioral Neuroscience.

- Muqit MM1, Feany MB (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?, *Nature Reviews Neuroscience*, 3, pp.237–243.
- Nöbel, S., Allain, M., Isabel, G., Danchin, E. (2018). Mate copying in *Drosophila melanogaster* males. *Animal Behaviour*, 141, pp. 9-15.
- Ostrowski, D., Kahsai, L., Kramer, E., Knutson, P., Zars, T. (2015). Place memory retention in *drosophila*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 123, pp.217–224.
- Pavlou, H., Goodwin, S. (2013). Courtship behavior in *Drosophila melanogaster*: towards a courtship connectome. *Current Opinion in Neurobiology*, 23 (1) pp.76–83.
- Plath, M., Bierbach, D. (2011). Sex and the public: Social eavesdropping, sperm competition risk and male mate choice. *Communicative & Integrative Biology*, 3 pp.276-280.
- Haynes, P., Christmann, B., Griffith, L. (2015). A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in *Drosophila melanogaster*. *eLife*.
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (2), pp. 834–839.
- Riemensperger, T., Völler, T., Stock, P., Buchner, E., and Fiala, A. (2005) Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Current Biology*, 15, pp. 1953–1960.
- Ribeiro, I., Drewn, M., Bahl, A., Machacek, C., Borst, A., Dickson, B. (2018). Visual Projection Neurons Mediating Directed Courtship in *Drosophila*, *Cell*, 74 pp.607–621.
- Robinson, S., Kennington, W., Simmons, L. (2012). Preference for related mates in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, *Animal Behaviour*, 84 (5), pp. 1169-1176.
- Saltz, J. (2011) Natural Genetic Variation in Social Environment Choice: Context-dependent Gene–environment Correlation in *Drosophila melanogaster*, *Evolution*, 65,(8), pp. 2325–2334.
- Santos, M., Sapage, M. Matos, M., Varela, S. (2017) Mate-choice copying: A fitness-enhancing behavior that evolves by indirect selection, *Evolution*, 71 (6) pp. 1456–1464.
- Santos, M., Matos, M. & Varela, S. A. M. (2014). Negative public information in mate-choice copying helps the spread of a novel trait. *The American Naturalist* 184(5), pp. 658–672
- Schultzhaus, J., Nixon, J., Duran, J., Carney, G. (2017). Diet alters *Drosophila melanogaster* mate preference and attractiveness, *Animal Behaviour*, 123, pp. 317-327.
- Sharma, M.D., Griffin, R.M., Hollis, J., Tregenza, T., Hosken, D.J. (2012).

- Reinvestigating good genes benefits of mate choice in *Drosophila simulans*, *Biological Journal of the Linnean Society*, 106, pp. 295–306.
- Taborsky, B., & Oliveira, R. F. (2012). Social competence: An evolutionary approach. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, pp.679–688.
- Takao, K., Kawanishi, M. (1979). Mating Preference and the Direction of Evolution in *Drosophila*. *Science*, 205.
- Tanaka, NK., Tanimoto, H., Ito, K. (2008). Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of Comparative Neurology*, 508 (5), pp.711-755.
- Tang, S., Guo, A. (2001) Choice Behavior of *Drosophila* Facing Contradictory Visual Cues. *Science*, 294, pp. 1543-1547.
- Tramm, N., Servedio, M. (2008) Evolution of mate-choice imprinting: competing strategies, *Evolution*, 62 (8), pp. 1991–2003.
- Varela SAM, Teles MC & Oliveira RF. (2019). The correlated evolution of social competence and social cognition. *Functional Ecology*, pp.1–12.
- Vogt, K., Aso, Y., Hige, T., Knapek, S., Ichinose, T., Friedrich, A. B., et al. (2016). Direct neural pathways convey distinct visual information to *Drosophila* mushroom bodies. *eLife*, 5
- Vogt, K., Schnaitmann, C., Dylla, K. V., Knapek, S., Aso, Y., Rubin, G. M., et al. (2014). Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *eLife*, 3
- Westneat, D., Walters, A., McCarthy, T., Hatch, M., Hein, W (1999). Alternative mechanisms of nonindependent mate choice. *Animal Behaviour*, 59 (3).
- Weitekamp, C., Hofmann, H. (2014). Evolutionary themes in the neurobiology of social cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 28, pp.22-27.
- Widmann, A., Eichler, K., Selchoa, M., Thum, A.S., Paulsa, D. (2018). Odor-taste learning in *Drosophila* larvae, *Journal of Insect Physiology*, 106, pp.47–54.
- Xia, SZ., Liu, L., Feng. CH., Guo, AK. (1997). Nutritional Effects on Operant Visual Learning in *Drosophila melanogaster*. *Physiology & Behavior*, 62, pp.263-271.
- Xie T, Ho MCW, Liu Q, ..., White BH, Potter CJ, Wu MN. (2018). A Genetic Toolkit for Dissecting Dopamine Circuit Function in *Drosophila*. *Cell Reports*, 23, pp. 652–665.
- Zacarias, R., Namiki, S., Card, GM., Vasconcelos., ML., Moita. MA., (2018). Speed dependent descending control of freezing behavior in *Drosophila melanogaster*, *Nature Communications*.
- ZheFeng, G. (2012). Innate preference in *Drosophila melanogaster*. *Science china life sciences*. 55 (1), pp. 8–14.