

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**SIMULAÇÃO DA PREFERÊNCIA DO ODOR MATERNAL: DA
NEUROETOLOGIA À BIOFÍSICA**

ENVER MIGUEL ORURO PUMA

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

SIMULAÇÃO DA PREFERÊNCIA DO ODOR MATERNAL: DA NEUROETOLOGIA À BIOFÍSICA

ENVER MIGUEL ORURO PUMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pires Idiart
Coorientadora: Prof. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre
2020

SUMÁRIO

Sumário	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de abreviaturas	7
Lista de Figuras	8
Capítulo 1	9
Introdução, motivação e objetivos	9
1.1. Estrutura da tese	9
1.2. Uma visão introdutória da motivação da pesquisa	9
1.3. Visão geral e propósito da tese	10
1.4. Visão da integração de níveis para o estudo da preferência ao odor materno	10
1.5. Hipóteses exploradas na tese	11
1.6. Objetivos da tese	12
Capítulo 2	14
Fenômeno de estudo, estratégia de abordagem e visão geral dos métodos usados	14
2.1. O aprendizado de preferência do odor materno	14
2.2. Estratégia de abordagem	17
2.2.1. Perspectiva da neuroetologia computacional	17
2.2.2. Circuitos neurais para o aprendizado de preferência do odor materno	18
2.2.3. Princípio Unificado do Reforço	20
2.2.4. Modelagem e simulação do circuito olfatório	21
2.3. Visão geral dos métodos usados	23
2.3.1. Modelando o circuito olfatório em desenvolvimento	23
2.3.2. Níveis de Modelagem	23
2.3.3. Modelagem baseado em agentes: estratégia para simular o fenômeno	23
2.3.4. Registro eletrofisiológico de neurônios do córtex piriforme anterior em desenvolvimento	24
Capítulo 3	25
3.1. Artigo 1	25
Capítulo 4	40
4.1 Artigo 2	40
Capítulo 5	53
Discussão geral e conclusão	53
5.1 Principais contribuições do trabalho	53
5.1.1 Abordagem integrativa da neuroetologia e neurociência computacional no estudo de fenômenos comportamentais	53
5.1.2 O aprendizado da preferência do odor materno e o aprendizado precoce de preferência olfatória para um odor artificial	56
5.1.3 O papel das características maturacionais dos neurônios piramidais do CPa no aprendizado da preferência do odor materno e implicações para o aprendizado precoce de preferência olfatória para um odor artificial	57
5.1.4 O papel das características maturacionais das entradas GABAérgicas no CPa no aprendizado de preferência do odor materno	58
5.2 Conclusões	59
5.3 Futuras perspectivas da neuroetologia computacional	60
Referências	61
ANEXO	66
Pôsteres apresentados em eventos acadêmicos	66
Pôster SNF 2017	67
Cartas de aceitação dos artigos e convite para submeter figura capa de jornal	68

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos:

Ao professor Marco Idiart pela orientação e suporte durante o doutorado.

A professora Maria Elisa Calcagnotto pela coorientação e suporte durante o doutorado.

Ao professor Aldo Lucion pela valiosa colaboração nos artigos e apoio nos seminários.

A professora Aline Villavicencio pelos importantes comentários feitos para o primer artigo.

A Grace Pardo pela coautoria nos artigos e discussões incansáveis e muito emocionantes

A Izabela Espíndula pela colaboração nos pôsteres

A Cátia Nunes Corrêa pela ajuda com o Português na escrita da Tese.

Ao professor Yuefan Deng da *Stony Brook University (Department of Applied Mathematics and Statistics)* pela orientação em supercomputação

Ao professor Paul Bourguine da UNESCO UniTwin CS-DC (*Complex System Digital Campus*) pelo apoio nosso seminário de complexidade.

Ao professor Tadeu Mello e Souza pelos valiosos comentários feitos na Tese.

Ao FONDECyT do *Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica* CONCyTEC do Peru pelo financiamento da passagens e estadia para o treino em supercomputação nos Estados Unidos.

Novamente ao professor Marco e professora Maria Elisa pela compreensão e ajuda em todo momento da minha formação de doutorado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos professores Antônio Roque da Silva Filho, Lisiane Bizarro Arraujo e Tadeu Mello e Souza pelas discussões durante a defesa da tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de doutorado.

RESUMO

A tese é composta por dois trabalhos complementares. No primeiro trabalho, estudamos o aprendizado do odor materno em ratos neonatos, com foco no final do período sensível para o aprendizado precoce de preferência de odor. No segundo trabalho, estudamos as características das correntes GABAérgicas dos interneurônios do córtex piriforme anterior (CPa) e seu papel no aprendizado precoce de preferência de odor. Para ambos os estudos, foram usados dados eletrofisiológicos experimentais e modelos computacionais foram desenhados usando modelagem baseada em agentes. Os resultados são descritos como o número acumulado de *spikes* e número de neurônios ativos, antes e depois do condicionamento. No primeiro artigo, mostramos que as mudanças nas propriedades intrínsecas das células piramidais no CPa reduzem a disponibilidade de células piramidais que respondem à exposição do odor materno. No segundo artigo, experimentos computacionais mostraram que a entrada GABAérgica no CPa melhora a habilidade do circuito olfatório para o aprendizado do odor materno. A discussão geral apresenta uma integração dos níveis da neuroetologia à biofísica como uma perspectiva de trabalho.

Palavras-chave: Neurociência computacional, relação mãe-filhote, córtex olfatório, abordagem biocomportamental.

ABSTRACT

The thesis consists of two complementary studies. In the first study, we investigated the maternal odor learning in neonatal rats, focusing on the end of the sensitive period for early odor preference learning. In the second study, we examined the characteristics of the GABAergic currents of the interneurons of the anterior piriform cortex (aPC) and their role in early odor preference learning. For both studies, experimental electrophysiological data were used, and computational models were designed using agent-based modeling. The results are described as the cumulative number of spikes and the number of active neurons, before and after conditioning. In the first article, we showed that changes in the intrinsic properties of aPC pyramidal cells reduced the availability of the responsive pyramidal cells during maternal odor exposure. In the second article, computational experiments showed that GABAergic entry into the aPC improves the olfactory circuit's ability to learn maternal odor. The general discussion presents an integration of the levels from neuroethology to biophysics as a work perspective.

Keywords: Computational neuroscience, maternal-infant relationship, Olfactory cortex, Biobehavioral approach.

LISTAS DE ABREVIATURAS

BO	Bulbo olfatório
CP	Córtex Piriforme
CPa	Córtex Piriforme Anterior
LC	Locus Coeruleus
NA	Noradrenalina
OSN	Neurônios sensoriais olfatórios
PG	Neurônios periglomerulares
Mi	Neurônios mitrais
Gr	Neurônios granulares
Ff	Interneurônios de conexões pró-ação
Pyr	Neurônios piramidais
Fb	Interneurônios de conexões de retroalimentação
US	Estímulo reforçador
UR	Resposta incondicionada
CR	Resposta condicionada
S	Estímulo ambiental
CS	Estímulo condicionado
DPN	Dia pós-natal
MBA	Modelagem baseada em agentes
EGABA	Potencial de reversão das as respostas inibitórias mediadas por GABA
GABA	Ácido gama-aminobutírico
sIPSC	Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas
LTP	Potenciação de longa duração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	16
Figura 2	18
Figura 3	19
Figura 4	21
Figura 5	22
Figura 6	70
Figura 7	71
Figura 8	72

Capítulo 1

Introdução, motivação e objetivos

1.1. Estrutura da tese

Essa tese está estruturada em cinco capítulos e um anexo. O conteúdo de cada capítulo será descrito a seguir. O **Capítulo 1** estabelece a motivação para desenvolver a pesquisa, o propósito, as hipóteses e objetivos da tese. No **Capítulo 2**, o fenômeno de estudo e a estratégia de abordagem são detalhadas. São descritas a perspectiva da neuroetologia computacional, os circuitos neurais do aprendizado de preferência ao odor materno, o princípio unificado do reforço, modelagem e simulação do circuito olfatório e uma visão geral dos métodos usados. No **Capítulo 3**, a primeira publicação referente à hipótese 1 é apresentada com uma breve introdução. No **Capítulo 4**, a segunda publicação referente à hipótese 2 é apresentada com uma breve introdução. Finalmente, o trabalho encerra-se no **Capítulo 5**, no qual são apresentadas uma discussão geral e uma conclusão com base nos dois artigos. Na parte do **Anexo**, a lista de pôsteres apresentados em vários eventos acadêmicos antes da publicação dos dois artigos é incluída.

1.2. Uma visão introdutória da motivação da pesquisa

A pesquisa do sistema nervoso nas últimas décadas forneceu uma quantidade imensa de dados e hipóteses que, devido à sua natureza como método experimental, são obtidos através do isolamento dos componentes de um sistema reduzido de variáveis. Nesse contexto, é necessário integrar dados e microteorias em micromodelos. Essa atividade de integração existe na neurociência, apresentada em trabalhos de revisão como hipóteses de grandes sistemas. Com os avanços da computação, é possível construir modelos que envolvam micro-teorias em grandes sistemas computacionais. No entanto, a neurociência e o estudo do comportamento na psicologia provêm de diferentes tradições e são categorizados em diferentes níveis de análise. Tentar integrar culturas científicas independentes da neurociência e do comportamento é um problema atual.

1.3. Visão geral e propósito da tese

A presente tese procura contribuir na área da neurociência com a perspectiva de uma abordagem integrada da neuroetologia à biofísica, com o objetivo de estudar circuitos neurais de fenômenos comportamentais, usando como exemplo ilustrativo o fenômeno de aprendizado de preferência ao odor materno em filhotes de rato. Um único fenômeno comportamental ou cognitivo pode ser tratado usando estratégias diferentes. No entanto, cada uma dessas estratégias se concentra em diferentes níveis do fenômeno. Acreditamos que é necessária uma estratégia para integrar níveis da neuroetologia à biofísica ou da biofísica à neuroetologia. Uma integração desses níveis seria necessária para estudar qualquer comportamento. Contudo, há uma dificuldade. Cada uma desses níveis tem as suas próprias teorias e existem muitos níveis entre neuroetologia e biofísica. Então, como os níveis podem ser integradas da neuroetologia à biofísica? E por que a integração deve estar nessa direção?

O significado último dessa abordagem integrativa é contribuir para entender como as mudanças ambientais poderiam levar a alterações no nível neural. Desse modo, essa tese propõe responder a duas perguntas: primeiro, como podemos integrar as mudanças ambientais às mudanças no nível neural e como podemos organizar esses níveis; e segundo, uma vez organizados os níveis, como podemos estudar com esse esquema um fenômeno comportamental específico, como o aprendizado de preferência pelo odor maternal em filhotes de rato? Portanto, o objetivo desta tese foi tentar integrar computacionalmente o nível neuroetológico à biofísica.

1.4. Visão da integração de níveis para o estudo da preferência ao odor maternal

A preferência pelo odor maternal, na prática, é um teste no qual o filhote de rato ou camundongo é colocado em uma caixa-teste para escolher entre dois odores. Através da mensuração do tempo gasto na área do odor do ninho ou o odor da mãe, em relação ao da área neutra, é inferida uma preferência por um desses odores (Moriceau and Sullivan, 2005; Morrison et al., 2013). Esse aprendizado é nosso fenômeno comportamental básico. Portanto, é importante explorar o que se sabe sobre ele, como estudá-lo, quais estruturas neurais podem ser ativadas por esses estímulos, quais neurotransmissores estão envolvidos e o que é conhecido experimentalmente.

Na neurociência computacional, existem modelos do bulbo olfatório (BO) e o córtex piriforme anterior (CPa) nos quais a modulação da noradrenalina (NA) é empregada no estudo da percepção e aprendizado olfatório em ratos adultos (DE ALMEIDA et al, 2013; DE ALMEIDA et al., 2015; LI et al., 2015). Portanto, nesse trabalho, usamos as equações do modelo de DE ALMEIDA et al. (2013, 2015), e, com base na arquitetura neural também proposta por eles, implementamos um modelo baseado em agentes com características de ratos neonatos. No modelo computacional desenvolvido, mostramos que no aprendizado olfatório em neonatos a projeção noradrenérgica do *locus coeruleus* (LC) funciona como um estímulo incondicionado, semelhante ao relatado em modelos experimentais de condicionamento clássico em ratos neonatos. Integramos o circuito, simulamos o ambiente como interação mãe-filhote e treinamos o circuito com uma série de diferentes estratégias computacionais. Os resultados foram apresentados em vários eventos acadêmicos (**Anexo**). Com o sistema integrado e os novos dados experimentais, em nosso primeiro artigo trabalhamos em uma nova teoria para o final do período sensível de aprendizado precoce de preferência do odor. Finalmente, no último manuscrito focalizamos a biofísica das correntes GABAérgicas e sua importância durante o aprendizado de odor materno.

Em resumo, testamos nossas hipóteses em um modelo de neuroetologia computacional. Nosso modelo de neuroetologia computacional considera os níveis neurais, plasticidade-microcircuito, comportamento animal e o ambiente. O modelo resultante deste trabalho permitiu a integração de dados experimentais desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), fazendo convergir as linhas de pesquisa de eletrofisiologia, relação mãe-filhote e neurociência computacional.

1.5. Hipóteses exploradas na tese

Na presente tese, foram exploradas as seguintes hipóteses:

1. **O período sensível para o aprendizado do apego se deve à maturação dos neurônios piramidais do córtex piriforme anterior.** O filhote de rato ou camundongo pode aprender odores artificiais pareados com estimulação tátil que simula o contato materno (por exemplo, lambidas da mãe). Esse pareamento induz preferência pelo odor somente se for realizado dentro do período correspondente aos primeiros dez dias de vida pós-natal do filhote, considerado período sensível. Após esse período, o pareamento dos mesmos

estímulos deixa de induzir uma preferência pelo odor (veja o **Capítulo 2**). Presume-se que o filhote aprenderia o cheiro da mãe dessa maneira, e manteria essa habilidade nos primeiros dez dias pós-natais, a fim de garantir sua sobrevivência em uma fase em que ele está completamente dependente dos cuidados dela. Esse fenômeno nos levou a pensar em outras duas hipóteses específicas que podem apoiar o final do período sensível do aprendizado de apego. **Primeiro**, o filhote aprende a associar o cheiro da sua mãe dentro do ninho, e então isso serviria como base para aprender outros cheiros fora do ninho, mas isso não ocorreria após o período sensível. **Segundo**, aprender o odor materno dentro do ninho aumenta a conectividade do circuito olfatório envolvido, e essa conectividade está disponível quando o filhote é exposto a um experimento de condicionamento para induzir a preferência por um odor artificial. Mas esse condicionamento não resulta em preferência após o período sensível, pois o número de neurônios que são responsivos ao odor materno é reduzido. Essa redução na responsividade ao odor materno ocorreria devido à característica de maturação dos neurônios piramidais e não à perda da habilidade de aprendizado. Os resultados do teste dessa hipótese foram publicados no artigo 1 (veja **Capítulo 3**).

2. **As características de maturação das entradas GABAérgicas no córtex piriforme anterior contribuem em dar suporte ao aprendizado do odor materno durante o período sensível.** Na literatura considera-se que o papel do GABA, durante o período sensível, possui um efeito inibitório nas células piramidais do córtex piriforme anterior, impedindo o aprendizado da preferência olfatória (veja **Capítulo 2**). No entanto, a exemplo de outros córtices em desenvolvimento, também é possível que o GABA possa ter um efeito excitatório e, se houver, poderia contribuir no suporte do aprendizado do odor materno. Os resultados da exploração dessa hipótese estão descritos no artigo 2 (veja **Capítulo 4**).

1.6. Objetivos da tese

Objetivo geral:

Simular computacionalmente a interação ambiente-organismo-comportamento em modelo neuroetológico de aprendizado de preferência olfatória no início do desenvolvimento pós-natal de ratos.

Objetivos específicos:

1. Criar um modelo computacional do circuito olfatório do filhote de rato durante o período sensível para o aprendizado do odor maternal, usando dados eletrofisiológicos de neurônios piramidais do córtex piriforme anterior, obtidos de filhotes com idade dentro do período sensível.
2. Simular o aprendizado da preferência ao odor maternal, durante o período sensível, no circuito olfatório artificial.
3. Simular o papel dos interneurônios GABAérgicos no córtex piriforme anterior no aprendizado da preferência ao odor maternal durante o período sensível.

Capítulo 2

Fenômeno de estudo, estratégia de abordagem e visão geral dos métodos usados

2.1. O aprendizado de preferência do odor maternal

O aprendizado de preferência olfatória é um fenômeno comportamental observado em roedores no início da vida pós-natal, descrito principalmente em ratos e camundongos. Logo após o nascimento, os filhotes de roedores são capazes de formar memórias de odor associados tanto a estímulos prazerosos, como leite, calor e estimulação tátil (MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015) quanto aversivos (RAINEKI *et al.*, 2009; UPTON; SULLIVAN, 2010; ROTH *et al.*, 2013; MEYER; ALBERTS, 2016). As memórias dos odores são expressas como preferências nas fases posteriores do desenvolvimento desses filhotes (MORICEAU; SULLIVAN, 2006). Igualmente foi demonstrado que outras formas de vínculo social no início do desenvolvimento, como o amontoamento com os irmãos de ninhada, ocorrem por meio de processos associativos de sinais olfativos com estimulação termo-tátil (ALBERTS; BRUNJES, 1978; KOJIMA; ALBERTS, 2009). Mas como ocorre esse aprendizado de preferência olfatória no filhote? O mecanismo para aprender o odor materno dentro do ninho é semelhante ou diferente do aprendizado de um odor artificial fora do ninho? Para aproximar algumas respostas a essas perguntas, consideramos importante separar os contextos etológicos em que o filhote aprende as preferências olfatórias dentro do ninho, interagindo com mãe, e fora do ninho em um ambiente controlado.

O aprendizado de preferência olfatória, tanto do odor da mãe quanto de um odor artificial, pode ser rapidamente induzido em um período do desenvolvimento pós-natal, durante o qual o filhote depende completamente dos cuidados da mãe para sobreviver (<DPN 10, dia pós-natal). Após esse período, os mesmos estímulos pareados (odor e estimulação tátil) perdem a habilidade de induzir a mesma preferência (**Figura 1A**). Foi sugerido, então, que esse tipo de aprendizado precoce em filhotes de rato ou camundongo ocorre durante um período sensível (SULLIVAN,

2003). Embora o aprendizado de preferência pelo odor materno e de um odor artificial estejam restritos ao mesmo período sensível, aparentemente, por mecanismos associativos semelhantes, ambos ocorrem em contextos e tempos diferentes. O filhote dentro do ninho está exposto ao cheiro da mãe desde o nascimento (DPN 0) (**Figura 1A, barra amarela**), e os experimentos de condicionamento de odor artificial e estimulação táctil, que simula as lambidas da mãe, são realizados principalmente a partir do DPN 5 (**Figura 1A, barra azul**). Foi proposto que esses dois tipos de aprendizado de preferência têm como suporte um único circuito neural (MORICEAU; SULLIVAN, 2004). Na segunda parte da tese, descrevemos detalhes desse circuito. Propomos que o aprendizado de preferência pelo odor materno modela o circuito neural em desenvolvimento, e esse circuito suporta o aprendizado posterior de preferência olfatória induzida fora do ninho dentro da janela temporal do período sensível. A seguir discutimos a proposta.

Como indicado acima, tanto a preferência pelo odor materno (**Figura 1B**) quanto a pelo odor artificial (**Figura 1C**) são induzidas por processos associativos, especificamente por condicionamento clássico (SULLIVAN, 2003). O processo de condicionamento clássico baseia-se na associação de dois tipos estímulos, um estímulo incondicionado (EI, para o qual a resposta do organismo é reflexa, por exemplo o jato de ar nos olhos de uma pessoa provoca que ela feche os olhos) e um estímulo neutro (EN, para o qual a resposta do organismo é diferente de sua resposta para o EI). A exposição repetitiva aos estímulos pareados EI-EN faz com que o EN, uma vez apresentado sozinho, seja capaz de induzir uma resposta semelhante à induzida pelo EI. Portanto, após o pareamento, o estímulo inicialmente neutro tornou-se condicionado (EC). No paradigma de condicionamento clássico para induzir preferência por um odor artificial, o EI é a estimulação táctil no dorso do filhote (pinceladas vigorosas) e o EN é o odor artificial (Moriceau and Sullivan, 2005; Morrison et al., 2013).

Usando modelos de condicionamento, associando estimulação táctil a um odor, e usando o teste de preferência olfatória, o grupo liderado pela Dra. Regina Sullivan propôs que o BO, modulado por uma alta inervação noradrenérgica originada no LC, é a estrutura necessária e suficiente para o aprendizado da memória de preferência a odores em filhotes durante o período sensível (SULLIVAN; WILSON, 2003; ROTH *et al.*, 2006). Por outro lado, usando o mesmo modelo de comportamento, o grupo

liderado pela Dra Qi Yuan sugeriu que o aprendizado do odor é modulado por projeções de LC no CPA, que também seria uma estrutura necessária e suficiente para a representação do odor (MORRISON *et al*, 2013).

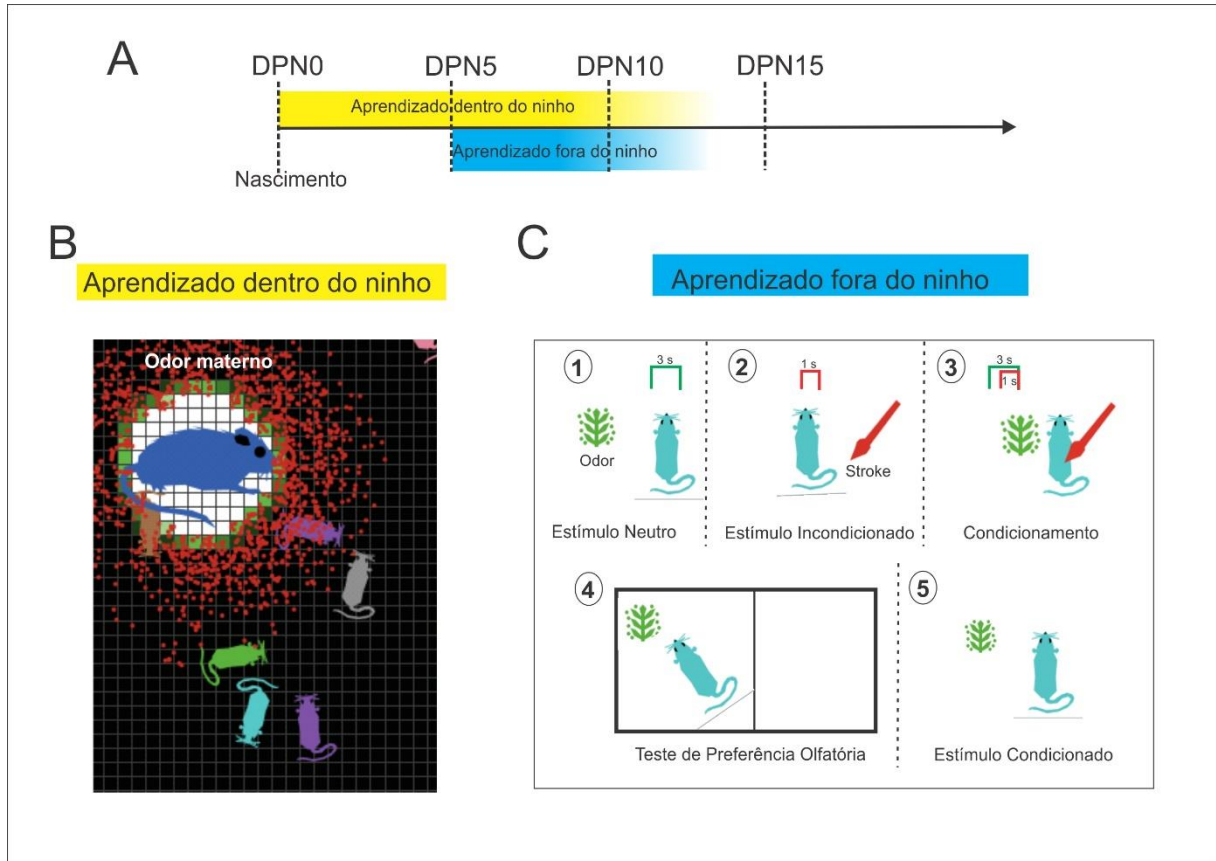


Figura 1. Simulação do ambiente etológico no qual o filhote de rato ou camundongo aprende a preferência pelo odor materno. A simulação foi realizada usando o software NetLogo, usando a metodologia baseada em agentes. **A)** Linha temporal do desenvolvimento pós-natal do filhote de rato durante o qual os fenômenos de aprendizado de preferência para o odor maternal ou para um odor artificial são observados. Após nascimento, o filhote, dentro do ninho está exposto ao aprendizado do odor maternal mediante processos associativo do odor da mãe e os estímulos sensoriais que ela provê no cuidado materno (calor, lambidas, leite). Esse aprendizado ocorre dentro de uma janela temporal chamado de período sensível (linha amarela). A resultante desse aprendizado é a formação de uma preferência para o odor maternal ou ninho maternal, medido mediante comportamentos de aproximação para esses odores. Outro fenômeno observado em filhotes neonato é também a habilidade para formar preferências para odores artificiais quando pareados com estímulos tácteis que simulam as lambidas da mãe. Esse fenômeno tem sido observado em filhotes entre idades de DPN 5 e DPN 8. O pareamento do odor artificial e os estímulos tácteis não induzem preferência pelos odores condicionados depois do DPN 10 (linha azul). **B)** Simulação da representação do aprendizado do odor maternal dentro do ninho usando o NetLogo. O odor da mãe (bolinhas vermelhas ao redor da mãe (rata azul grande) atrai os filhotes que se encontram perto da mãe. Quando os filhotes se aproximam da mãe, a mãe lambe ele, provê de calor e alimento. Esses estímulos podem servir de reforço para o aprendizado do odor maternal. **C)** Representação das fases do condicionamento fora do ninho para o aprendizado de preferência de um odor artificial em filhotes DPN 5-DPN 10. Um odor inicialmente neutro (1) pareado repetidas vezes com um estímulo táctil (2-3) (estimulação vigorosa no dorso do filhote com um pincel suave) induz uma preferência no filhote, o qual é

medido em um labirinto de duas escolhas (4) e o odor artificial inicialmente neutro torna-se condicionado (5). Fonte elaborada pelo autor a partir do fenômeno descrito na seção 2.1.

Nosso projeto inicial foi criar um modelo computacional para diferenciar as duas propostas de suporte do aprendizado de preferência olfatória no nível neural durante o período sensível. Finalmente, o resultado do nosso modelo conseguiu integrar as duas propostas no mesmo modelo, tanto o incremento da frequência de disparo das células mitrais no BO como o efeito da taxa de disparo nos terminais axônicos nas conexões do trato olfatório lateral (LOT). No artigo 1, incluído no **Capítulo 2**, pode-se apreciar os esforços dessa integração.

2.2. Estratégia de abordagem

Para testar nossa hipótese, usamos um modelo de neuroetologia computacional no qual consideramos os seguintes níveis de integração: neural, plasticidade-microcircuito, comportamento animal e ambiente. Para representar os níveis neurais e o comportamento, a modelagem foi desenvolvida de acordo com as principais variáveis obtidas na revisão da literatura (SULLIVAN *et al.*, 2000; MORRISON *et al.*, 2013). Para a confiabilidade da modelagem, consideramos variáveis experimentais dependentes e independentes análogas as utilizadas pelos autores que descreveram o fenômeno e o circuito neural (Sullivan e Yuan); garantindo, assim, a consistência das saídas do sistema de simulação com os dados de laboratório. Para representar a plasticidade dentro do circuito olfatório, usamos o modelo de Jensen, Idiart e Lisman (JENSEN; IDIART; LISMAN, 1996). Além disso, para o nosso projeto usamos o princípio unificado do reforço (DONAHOE *et al.*, 1993; BURGOS, 2010), descrito mais adiante, como um esquema teórico e para o desenho das contingências. Este referencial teórico também foi essencial para organizar os registros de saída da simulação e apresentação dos estímulos em um paradigma de condicionamento respondente. Em vista disso, usamos essas estratégias para o caso específico do circuito BO e CPa no aprendizado ao odor materno. A seguir descrevemos cada uma das estratégias mencionadas.

2.2.1. Perspectiva da neuroetologia computacional

A neuroetologia computacional estuda as bases neurais dos padrões de comportamento animal expostos em condições naturais (**Figura 2A**), propondo

modelos computacionais para avaliar teorias na área através de uma abordagem evolutiva e comparativa do comportamento animal.

Nessa tese, nossa perspectiva para a neuroetologia computacional enfoca o nível após a ocorrência de mudanças ambientais, especificamente o comportamento da mãe, que é o ambiente natural para um filhote de rato e que pode ser representado através das entradas e saídas do ninho. Isso implica que o filhote seja exposto a estímulos intermitentes, como odor da mãe e o contato maternal (**Figura 5B**). Esse é considerado nosso esquema de trabalho.

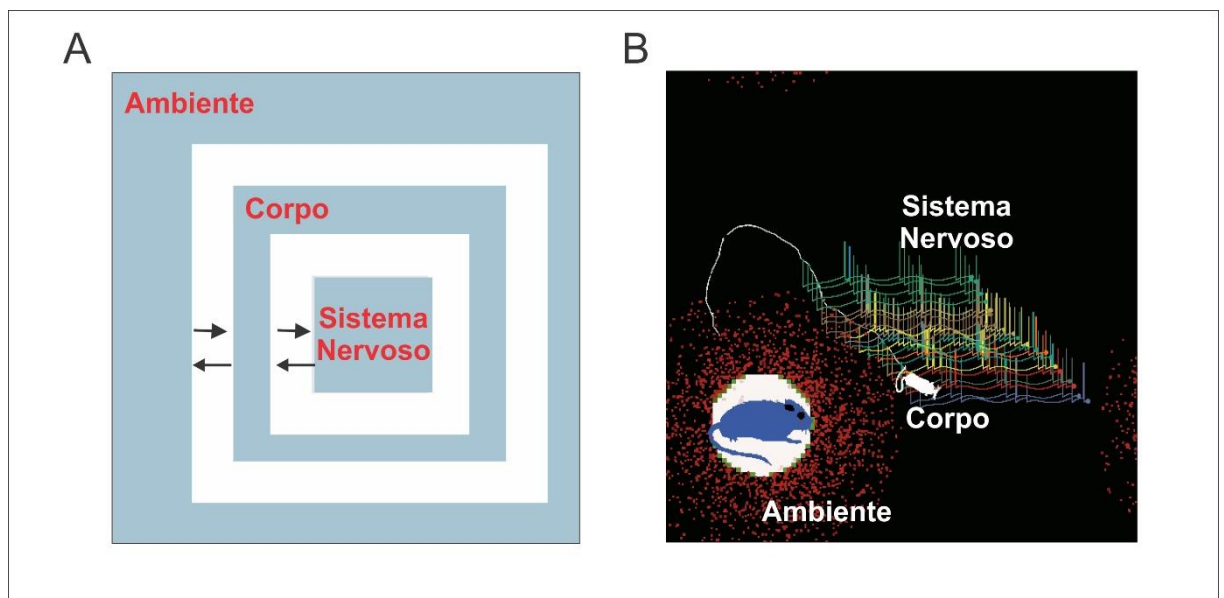


Figura 2. Perspectiva da neuroetologia computacional para a modelagem da base neural do comportamento animal. **A)** Esquema representando como o comportamento animal surge da interação entre a dinâmica neural com o periférico e o ambiente ecológico (Adaptado de http://www.scholarpedia.org/article/Computational_neuroethology). **B)** Representação do ambiente etológico dentro do ninho, no qual o comportamento do filhote de aproximação a mãe surge da interação da dinâmica neural com seu entorno que é a mãe.

2.2.2. Circuitos neurais para o aprendizado de preferência do odor materno

O aprendizado precoce para a preferência ao odor é uma forma rápida de condicionamento clássico que provou ser um modelo útil para identificar circuitos celulares e mecanismos moleculares de aprendizado. Ratos e camundongos recém-nascidos podem ser condicionados a novos odores, mediante a utilização de estímulos que imitam os estímulos recebidos durante o cuidado materno. Uma

variedade de estímulos foi empregada como estímulo incondicionado (EI) na indução de respostas condicionadas a novos odores (estímulo condicionado, EC) em recém-nascidos, incluindo o ambiente do ninho, apresentação de leite, estimulação táctil, o odor materno, choque elétrico leve na pata, e estimulação cerebral intracraniana (YUAN *et al.*, 2014). Uma variedade de trabalhos sugere a existência de um período sensível para o desenvolvimento das preferências iniciais ao odor. Ensaio de 10 min de pareamento de choque elétrico e odor aplicado no DPN 6, induziram a preferência pelo odor e isso pode permanecer apenas 24 horas (YUAN *et al.*, 2014) (**Figura 3A**).

Sullivan e seus colegas (SULLIVAN *et al.*, 2000) demonstraram a natureza associativa do comportamento de preferência precoce pelo odor. Seus trabalhos sugerem que os eventos simultâneos da entrada do odor e a liberação de noradrenalina dos terminais do LC no bulbo olfatório são suficientes para estabelecer o aprendizado de preferência olfatória (SULLIVAN *et al.*, 2000) (**Figura 3B**). Além disso, Yuan e seus colegas também demonstraram que o córtex piriforme anterior é importante para esse aprendizado (MORRISON *et al.*, 2013) (**Figura 3C**).

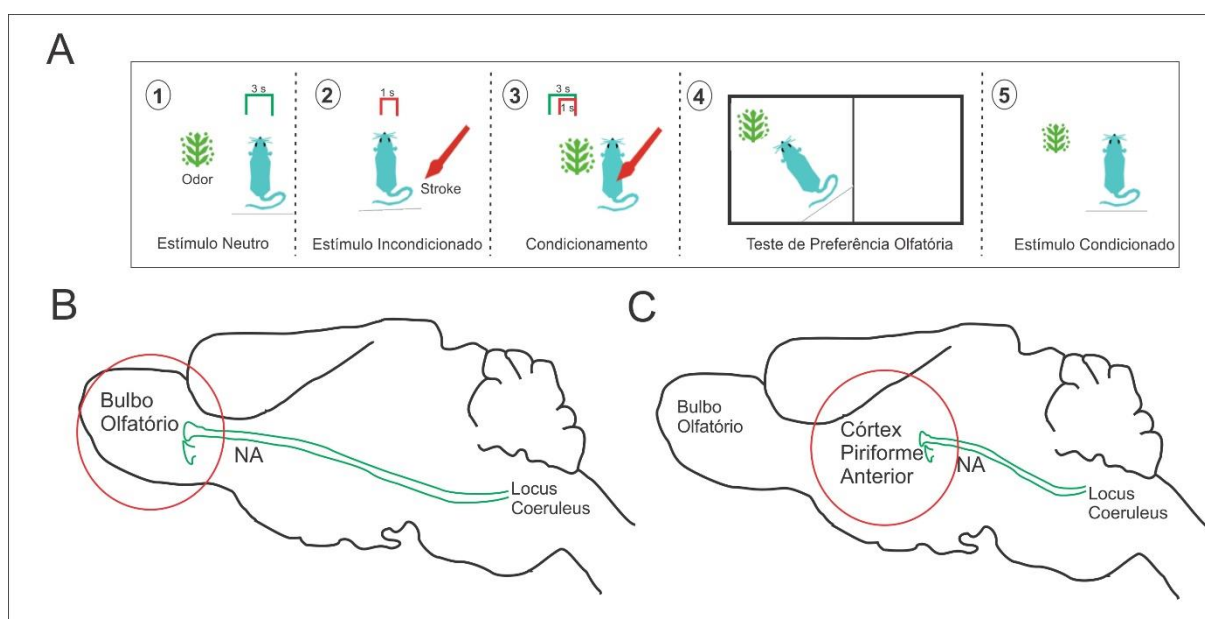


Figura 3. Hipótese de circuitos neurais que suportam o aprendizado de preferência olfatória. **A)** Representação do condicionamento de um odor artificial inicialmente neutro (1) com um estímulo táctil (estimulação vigorosa no dorso do filhote usando um pincel suave) que induz incremento na atividade locomotora do filhote (2) quando pareados (3) em tempos específicos, o odor apresentado durante 3 segundos e a estimulação táctil no último segundo, resulta em uma preferência pelo odor artificial quando testado contra um odor neutro (4), tornando-se assim o odor neutro inicial em um odor condicionado (5). **B)** A noradrenalina liberada do *locus coeruleus* no bulbo olfatório (proposta do grupo da Regina Sullivan em SULLIVAN *et al.*, 2000) e também no córtex piriforme anterior (proposta do grupo da Qi Yuan em YUAN *et al.*, 2014) (**C**) é necessária e suficiente para a aquisição do aprendizado de preferência olfatória durante o período sensível.

2.2.3. Princípio Unificado do Reforço

O princípio unificado do reforço (DONAHOE *et al*, 1993) foi proposto com base na análise experimental do comportamento. Essa proposta foi importante para a classificação das entradas e saídas do nosso modelo computacional de condicionamento de redes neurais artificiais. Existem estratégias para a avaliação do aprendizado com base no paradigma do princípio unificado do reforço. Para tanto, usamos as mesmas estratégias para examinar o aprendizado de preferência olfatória. Donahoe e colegas indicaram dois conjuntos de condições que são necessárias para que o reforço selecione o comportamento: (a) curtos intervalos de tempo entre o evento ambiental, comportamental e reforço e (b) um estímulo de reforço que evoca mudanças no comportamento ou discrepância (**Figura 4**). Na **Figura 4**, a conectividade neural é mostrada de maneira simplificada a partir de estímulos comportamentais, onde qualquer R (resposta operante) contíguo temporariamente entre o aparecimento de S (estímulo ambiental) e UR (resposta incondicionada) ativa vias neurais que conectam S a R. Desse ponto de vista, as sensibilidades dos organismos a relações definidas em intervalos de tempo mais longos são devidas ao efeito cumulativo das relações momento a momento entre reforços, comportamentos e eventos ambientais (DONAHOE *et al*, 1993).

O princípio unificado do reforço estabelece que, sempre que houver uma discrepância comportamental, todos os estímulos anteriores a essa discrepância adquirirão controle sobre todas as respostas que ocorrem imediatamente antes e simultaneamente a ela (DONAHOE *et al*, 1993). Esse paradigma foi proposto a partir da análise experimental do comportamento como uma estrutura conceitual complementar com os resultados da análise experimental das neurociências, que forneceu uma variedade de modelos computacionais dos fenômenos do condicionamento respondente. Atualmente existem mais de 16 modelos desenvolvidos (BURGOS, 2010).

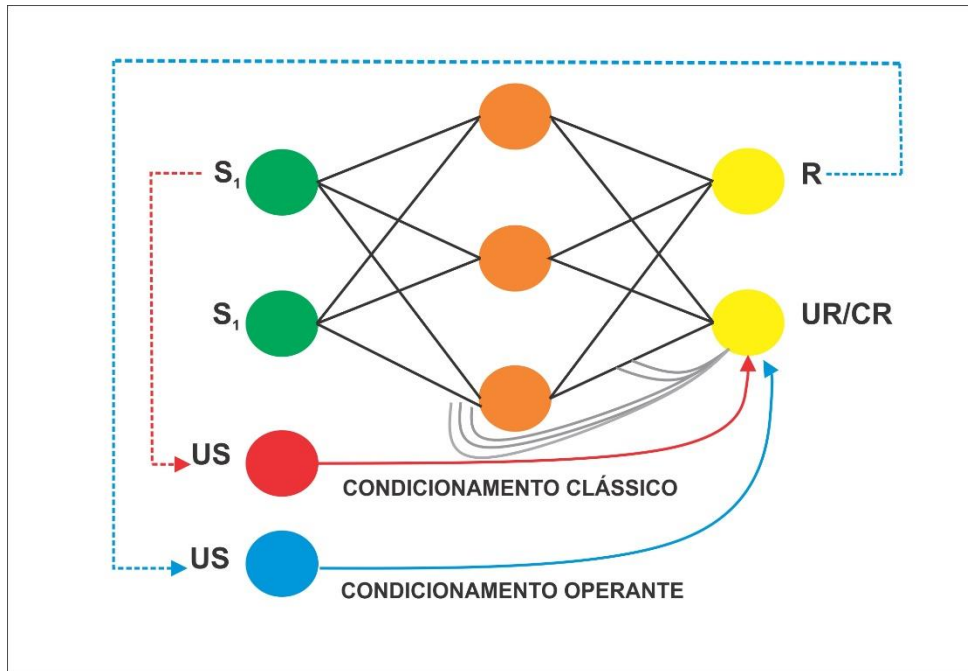


Figura 4. Princípio Unificado do Reforço. O componente seleção-resposta de uma rede de seleção com três unidades de entrada, três unidades internas e duas unidades de saída. As unidades de entrada podem ser ativadas tanto por estímulos ambientais (S1 e S2) quanto por um estímulo reforçador (US). A ativação das unidades de saída simula a ocorrência da resposta operante (R) e da resposta incondicionada (UR), ou, quando a unidade UR é ativada por um estímulo diferente do US, a resposta condicionada (CR). A ativação das unidades UR/CR também pode engajar o sistema de reforço difuso que modifica a conectividade de pesos entre todas as unidades coativadas. A figura ilustra a contingência clássica (linhas pontilhadas em vermelho), em que a ocorrência do US é dependente de uma ativação prévia de uma unidade de entrada (S1). Também na figura se ilustra uma contingência operante (linhas pontilhadas em azul), em que a ativação da unidade US é dependente da ativação prévia da unidade de saída (R) pela representação de S1. Gráfico adaptado de DONAHOE *et al.*, 1993).

2.2.4. Modelagem e simulação do circuito olfatório

O modelo canônico consiste em duas redes diferentes que representam o BO e o CPa. O BO é composto pelos neurônios sensoriais olfativos (OSN), neurônios periglomerulares (PG), neurônios mitrais (Mi) e neurônios granulares (Gr). O CPa é constituído por interneurônios de conexões pró-ação ou *feedforward* (Ff), neurônios piramidais (Pyr) e os interneurônios de conexões de retroalimentação ou *feedback* (Fb) (DE ALMEIDA *et al.*, 2015) (**Figura 5**).

No intuito de conferir importância dos dados experimentais e preservar propriedades deduzidas desses dados na simulação, simplificamos essa arquitetura, especificamente no nível das conexões do BO. Nosso modelo considerou apenas

células Mt como um componente do BO. Nos pôsteres (em Anexo), usamos o modelo canônico.

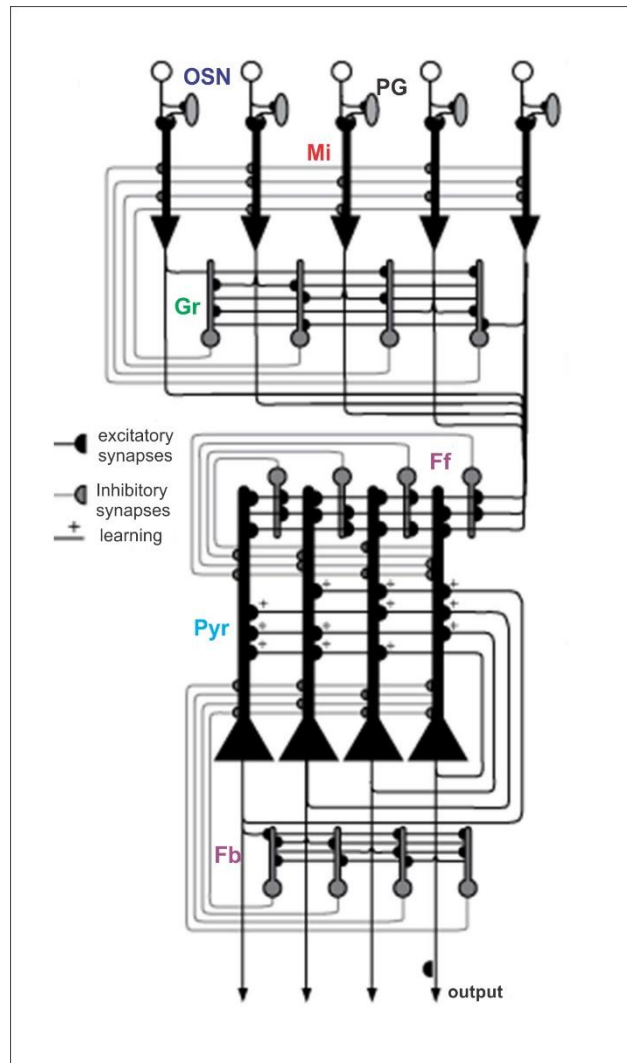


Figura 5. Arquitetura neural do circuito olfatório. O ponto de entrada no circuito é o grupo de neurônios sensoriais olfatórios (OSN), os quais projetam seus terminais axônicos para o bulbo olfatório (BO) dentro de estruturas chamados de glomérulos, onde estabelecem conexões sinápticas excitatórias com os dendritos principais dos neurônios Mitrals (Mi) e os interneurônios periglomerulares (PG) que rodeiam esses glomérulos. Os neurônios PG estabelecem conexões inibitórias com os dendritos apicais das células Mi. As células Mi também recebem entradas inibitórias das células granulares (Gr) nos seus dendritos laterais. Os axônios das células Mi saem do BO, formando o trato olfatório lateral (LOT) e se projetam para regiões centrais. O córtex piriforme anterior (CPa) é uma das regiões centrais que recebem esses inputs, formando conexões excitatórias com os dendritos apicais das células piramidais (Pyr) e os interneurônios de conexões pró-ação (*feedforward*) (Ff) na camada superficial do CPa. Os interneurônios Ff também estabelecem conexões inibitórias com os dendritos apicais das células Pyr. Em outras camadas do CPa, as células Pyr recebem entradas excitatórias de outras células Pyr, sendo chamada esta conexão de recorrente; além disso, também recebe entradas inibitórias de outro grupo de interneurônios que formam conexões de retroalimentação (*feedback*) (Fb). Os axônios das células Pyr se projetam para fora do CPa. Tomado de DE ALMEIDA *et al.*, 2015.

2.3. Visão geral dos métodos usados

2.3.1. Modelando o circuito olfatório em desenvolvimento

Para modelar o circuito olfatório em desenvolvimento, além de revisar a literatura sobre os circuitos neurais envolvidos, foi necessário investigar as características das conexões e da plasticidade sináptica nas células piramidais do CPa. Trabalhos prévios foram muito úteis na determinação desses parâmetros (FRANKS; ISAACSON, 2005; POO; ISAACSON, 2007). Além disso, era necessário ter dados correspondentes às características de maturação dos neurônios. Com a colaboração de Grace Pardo, do PPG Fisiologia UFRGS, obtivemos esses dados através dos experimentos realizados como parte de sua tese de doutorado.

2.3.2. Níveis de Modelagem

As seguintes propriedades e seus respectivos níveis foram consideradas na modelagem:

- Nível 1: Potenciais dos neurônios, potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios
- Nível 2: Integração sináptica, plasticidade, microcircuito do BO e do CPa
- Nível 3: Integração do Sistema Neural, Comportamento e Ambiente

O aprendizado foi avaliado nos níveis 2 e 3. As entradas e saídas dos sistemas foram definidas com base nas descrições do fenômeno de aprendizado precoce da preferência olfatória e no princípio unificado do reforço, sendo que esses foram diferentes para cada nível.

2.3.3. Modelagem baseado em agentes: estratégia para simular o fenômeno

A modelagem baseada em agentes (MBA) é uma classe de modelos computacionais utilizada para simular as ações e interações de entidades autônomas individuais chamadas agentes. Cada um desses agentes pode avaliar sua situação e tomar decisões com base em um conjunto de regras introduzidas no modelo. Uma característica importante da MBA é a interação repetitiva que existe entre eles, podendo ser simulada com o uso de computadores e softwares que permitem explorar a dinâmica do sistema. Com a MBA, fenômenos têm sido explorados em física, química,

biologia, ecologia e no comportamento animal e humano. Existem diversos ambientes de programação de MBA, os mais conhecidos são Repast, Mason, Breve, Netlogo. Igualmente existem ambientes de MBA implementados em linguagens como MATLAB, Python e C.

NetLogo é um ambiente de programação para MBA e sistemas complexos. É usado por dezenas de milhares de estudantes, professores e pesquisadores em todo o mundo. O programa está disponível gratuitamente. O NetLogo foi projetado e criado por Uri Wilensky, diretor do Centro de Aprendizagem Conectada e Modelagem Computacional da Northwestern University. O Netlogo está sujeito a melhorias aproximadamente a cada 6 meses, e existem outros projetos para aumentar o potencial da plataforma como vínculos com outras linguagens de programação como MATLAB, Mathematica, R, Python, além da construção da extensão RNetlogo para aproveitar a computação paralela em R (WILENSKY, 1999; THIELE; GRIMM, 2010; THIELE *et al*, 2012). Usamos o Netlogo para o nosso trabalho.

2.3.4. Registro eletrofisiológico de neurônios do córtex piriforme anterior em desenvolvimento

Os dados eletrofisiológicos foram fornecidos por Grace Pardo, obtidos como parte da sua tese de doutorado no laboratório da professora Maria Elisa Calcagnotto, Departamento de Bioquímica, UFRGS. Para obter dados sobre as propriedades intrínsecas das células especificadas, foi usada a técnica de fixação de um fragmento da membrana plasmática (*patch-clamp*) no modo de fixação de corrente (*current-clamp*). As células piramidais na camada 2/3 foram registradas em fatias de CPa, obtidas de filhotes de rato no DPN 5,6,7 e 8 e DPN 14,15,16 e 17. A descrição detalhada da técnica pode ser encontrada no artigo 1 (**Capítulo 3**).

Para obter dados sobre as correntes pós-sinápticas GABAérgicas, foi utilizada a técnica de *patch-clamp no modo de fixação de voltagem (voltage-clamp)*, na qual também se registraram as células piramidais da camada 2/3 em fatias de CPa, extraídas de cérebros de filhotes de rato nos DPN 5,6,7 e 8. A descrição detalhada pode ser encontrada no artigo 2 (**Capítulo 3**).

Capítulo 3

3.1. Artigo 1

O artigo intitulado “*Maturation of pyramidal cells in anterior piriform cortex may be sufficient to explain the end of early olfactory learning in rats*”, propõe a uma nova explicação para o fim do período sensível do aprendizado olfatório em ratos neonatos para o qual integra dados experimentais e modelagem computacional. Esse trabalho foi produzido de maneira colaborativa com a Grace Pardo, quem realizou o trabalho experimental no laboratório da professora Maria Elisa Calcagnotto e do professor Aldo Bolten Lucion como parte de sua tese de doutorado. O artigo foi publicado na Revista Learning and Memory 2020 (27:20–32) e também foi capa da edição 01-2020. O artigo pode ser citado como:

Oruro, E.M., Pardo, G.V.E., Lucion, A.B., Calcagnotto, M.E., Idiart, M.A.P., 2020.

Maturation of pyramidal cells in anterior piriform cortex may be sufficient to explain the end of early olfactory learning in rats. Learn. Mem. 27:20–32.

<https://doi.org/10.1101/lm.050724.119>

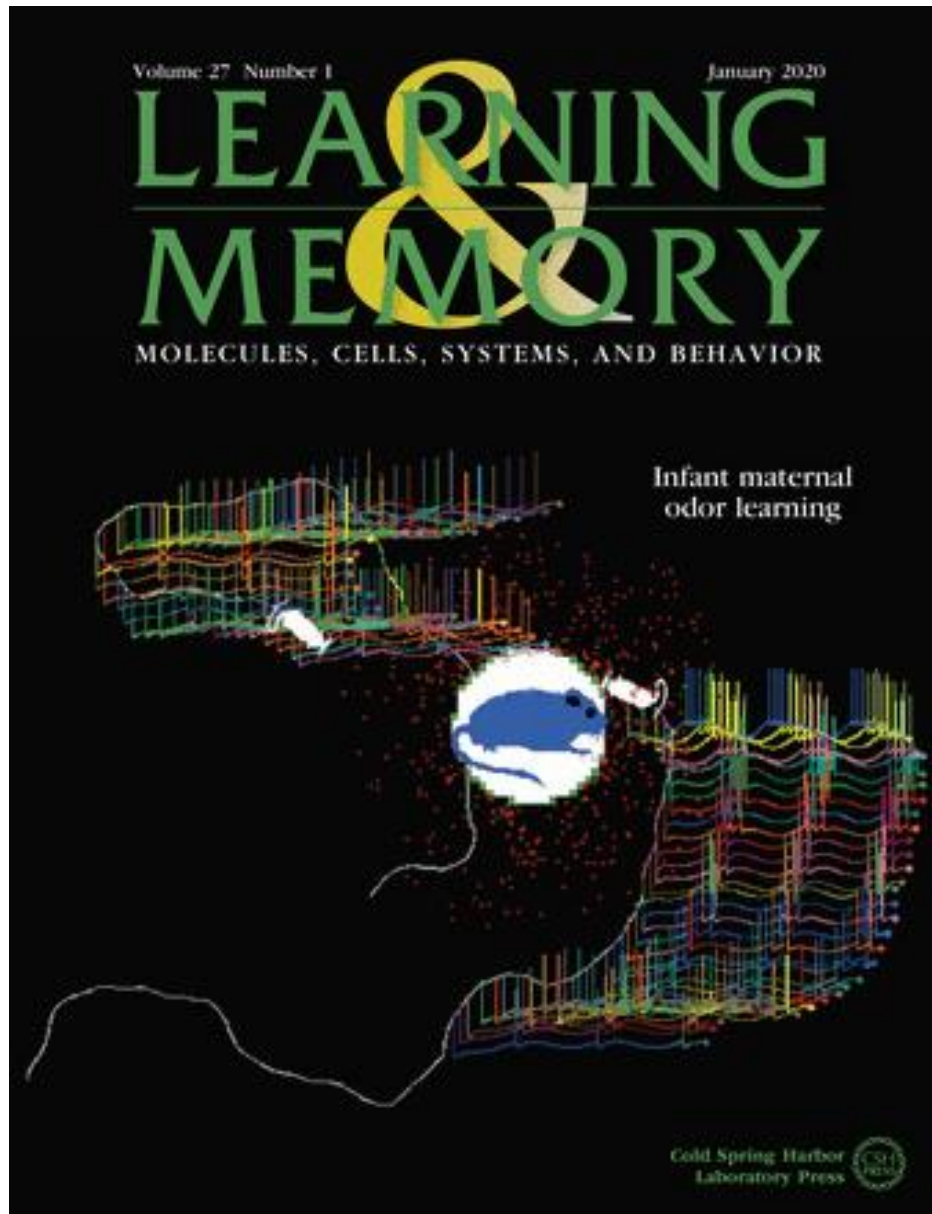


Figura na capa da revista Learning & Memory volume 27, número 1 de janeiro de 2020, preparada pelos autores.

Legenda da figura tirada de <http://learnmem.cshlp.org/content/27/1.cover-expansion>.

The image illustrates a representation of the conditioned behavioral response of the infant rat to the maternal odor. A group of pyramidal neurons in the anterior olfactory cortex (aPC) respond preferentially when the pup is close to the mother's odor. Using a combined electrophysiological and computational approach, Oruro et al. (*LearnMem* 27: 20–32) report that more neurons are sensitive to maternal odor in pups younger than 10 postnatal days (P) than in older pups due to the maturation of intrinsic properties of the neurons itself. Early odor preference learning is induced in rat pups <P10 by pairing an artificial odor with tactile stimuli that mimics maternal care. After P10, the pairing of the same stimuli becomes ineffective for conditioning. Based on these results, the authors proposed that odor conditioning in <P10 pups recruits a group of pyramidal cells in the aPC that are also activated by the maternal odor. As this neural circuit promotes approximation to the maternal odor, we assume their coincidental activation also promotes behavioral preference for the conditioned odor. However, this overlap occurs only for younger pups. For older pups, the odor conditioning results in less activation of the aPC pyramidal cells, overlap in the circuit is no longer possible, and the conditioning is no longer effective.

Capítulo 4

4.1 Artigo 2

O artigo intitulado “***The maturational characteristics of the GABA input in the anterior piriform cortex may also contribute to the rapid learning of the maternal odor during the sensitive period***” também apresenta uma atualização do modelo computacional proposto no artigo 1 com a integração das características maturacionais das entradas GABAérgicas no córtex piriforme anterior, interneurônios de conexões de retroalimentação e Interneurônios de conexões pró-ação, e dados obtidos experimentalmente. No modelo, o trabalho explora o papel do GABA no aprendizado do odor materno no período sensível e discute uma possível ação despolarizante do GABA no córtex piriforme anterior durante essa faixa do desenvolvimento, o qual contraria o papel GABA no aprendizado de preferência olfatória em ratos neonatos como descrito na literatura. Esse trabalho foi produzido de maneira colaborativa com a Grace Pardo, quem realizou o trabalho experimental no laboratório da professora Maria Elisa Calcagnotto e do professor Aldo Bolten Lucion como parte de sua tese de doutorado. O trabalho foi submetido no dia 21 de junho de 2020 à revista Learning and Memory e foi aceito para publicação no dia 27 de setembro de 2020. O artigo também foi capa da edição Vol 27 N° 12, 2020. O artigo pode ser citado como:

Oruro, E.M., Pardo, G.V.E., Lucion, A.B., Calcagnotto, M.E., Idiart, M.A.P., 2020. The maturational characteristics of the GABA input in the anterior piriform cortex may also contribute to the rapid learning of the maternal odor during the sensitive period. Learn. Mem. 2020, 27:493-502

<https://doi.org/10.1101/lm.052217.120>

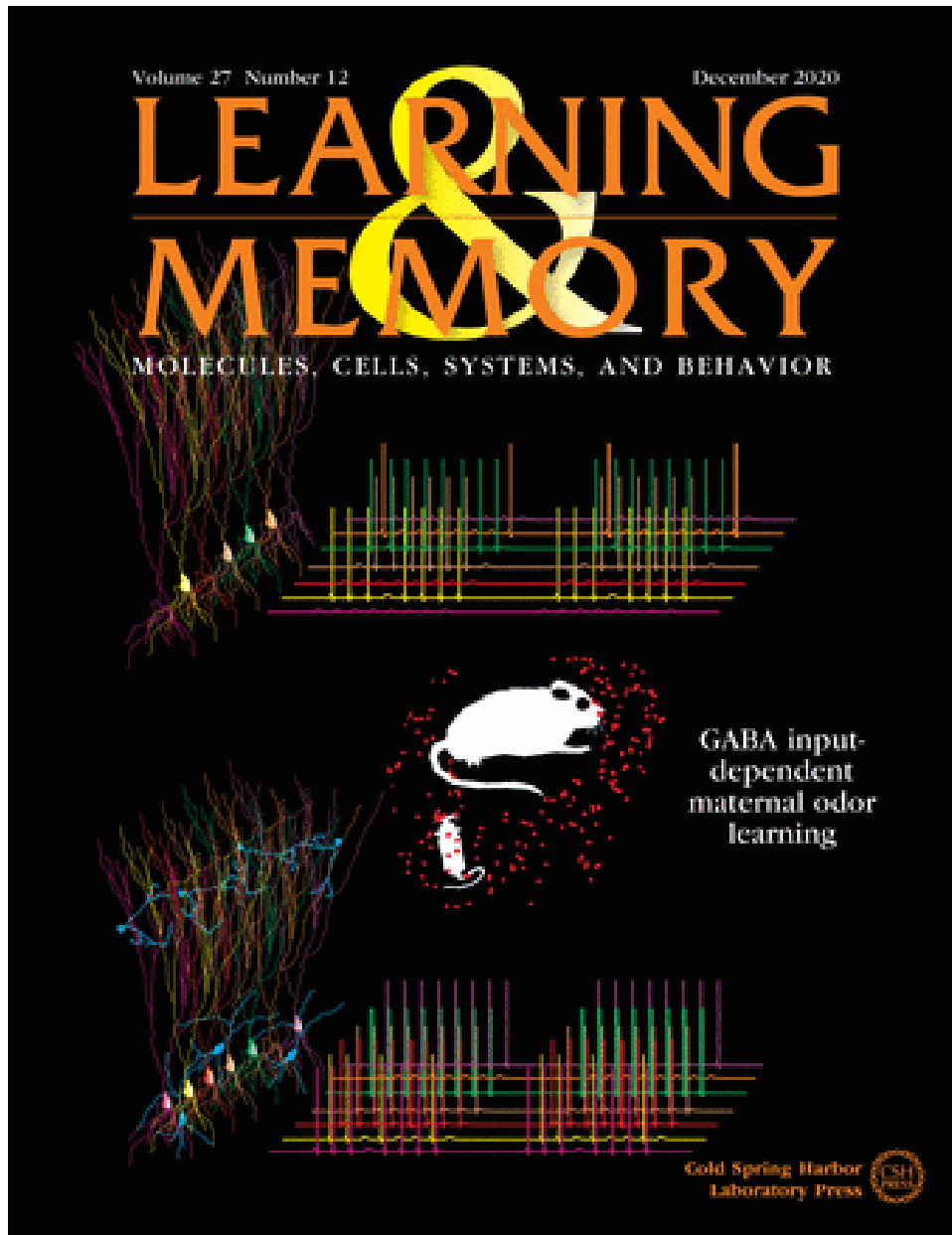


Figura na capa da revista Learning & Memory volume 27, número 12 de dezembro de 2020, preparada pelos autores.

Legenda da figura tirada de <http://learnmem.cshlp.org/content/27/12.cover-expansion>

Using a combined electrophysiological and computational approach, Oruro et al. (*LearnMem* **27**: [493–502](#)) show that the GABAergic input enhances the olfactory bulb-anterior piriform cortex (OB-aPC) circuit's ability for maternal odor learning and amplifies its recall. Such an effect is due to the maturational characteristics of the GABAergic inputs that depolarize aPC pyramidal neurons during the sensitive period for attachment learning. The image shows that aPC circuits without (*top* figure) or with (*bottom* figure) GABAergic interneurons can learn maternal odor after conditioning. However, GABA-conditioned circuits are more likely to recruit more aPC pyramidal cells and engage them in more triggering activity in response to the conditioned maternal odor, thereby amplifying the entire circuit's response to maternal odor.

Capítulo 5

Discussão geral e conclusão

5.1 Principais contribuições do trabalho

5.1.1 Abordagem integrativa da neuroetologia e neurociência computacional no estudo de fenômenos comportamentais

A presente tese apresenta um modelo computacional que integra dados experimentais, simulando o aprendizado do odor materno durante o período sensível do apego. Propomos uma hipótese sobre o final do período sensível e, igualmente, avaliamos a função das correntes GABAérgicas durante o período sensível. Nossa estratégia de trabalho é nova no campo do aprendizado olfatório de recém-nascidos, pois nos permite integrar níveis de análise.

Os problemas de integração em vários níveis foram estudados por cientistas da complexidade. Com o objetivo de estudar em vários níveis, grupos de pesquisa de sistemas complexos e sociedades surgiram em todo o mundo, sendo o mais importante o Instituto de Santa Fé (SFI), nos Estados Unidos de América, fundado por cientistas de prestígio de diferentes áreas, incluindo vencedores de prêmio Nobel. Outro movimento é a Sociedade de Sistemas Complexos, fundada na Europa em 2004. Atualmente, a CSS se encarrega de organizar o evento mais importante em sistemas complexos, a Conferência sobre Sistemas Complexos (Conference on Complex System, CCS). O evento CCS foi influenciado pelos grupos da complexidade da França, organizados em Roadmaps (French Roadmap for Complex Systems 2008-2009 <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00392486>). Uma peculiaridade que torna o CCS especial foi a promoção do método de modelagem baseado em agentes (**Figura 6**) para resolver os problemas em vários níveis (para obter mais detalhes, consulte: The CSS Roadmap for Complex Systems Science and its Applications 2012 – 2020” Edited by Paul Bourguin, Jeffrey Johnson, and Davis Chavalarias).

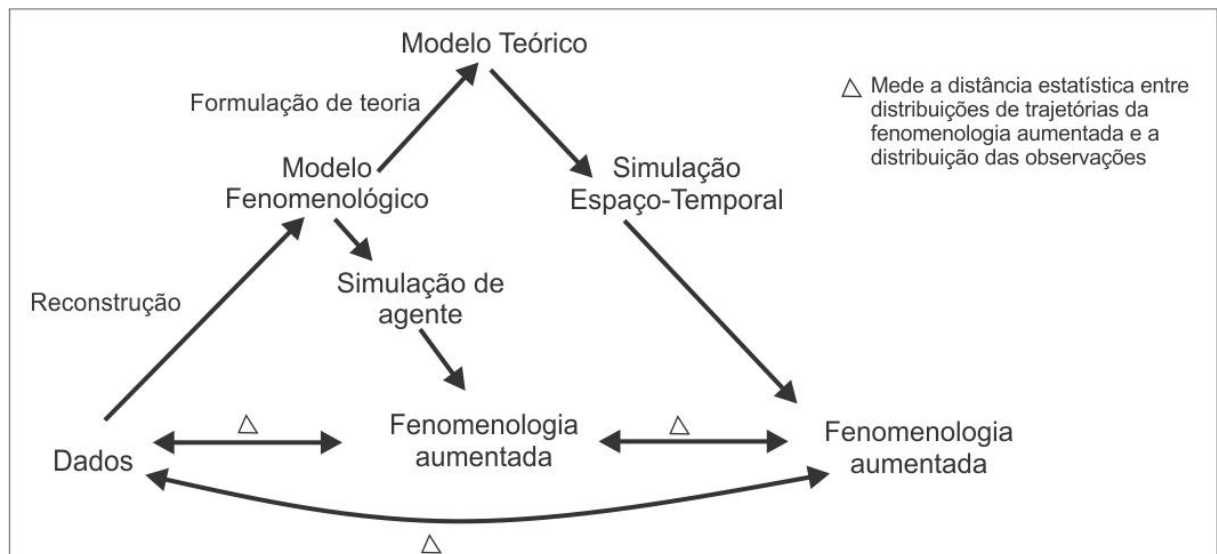


Figura 6. Metodologia de sistemas complexos para a reconstrução de modelos a partir de dados.

Nossa proposta foi integrar a organização conceitual da abordagem biocomportamental com uma visão experimental no nível neural, todavia considerando a emergência no mesmo nível neural (aparecimento de um novo padrão na organização do nível neural), contrariando a proposta biobehaviorista.

O princípio unificado do reforço é uma proposta teórica computacional de Donahoe, Burgos e Palmer (1993) para um dos problemas abertos do behaviorismo, que é a distinção operante/respondente. Nesse trabalho não queremos abordar o caráter histórico nem discutir as soluções para esse problema. A proposta do grupo Biobehaviorista já foi discutida na edição especial da revista behaviorista *Journal of Experimental Analysis of Behavior* na edição de março 1997, volume 67 (DOMJAN, 2016); e no trabalho de Burgos (2010). Para essa tese, consideramos a proposta de princípio unificado do reforço como esquema conceitual para estudar o aprendizado de preferência ao odor da mãe.

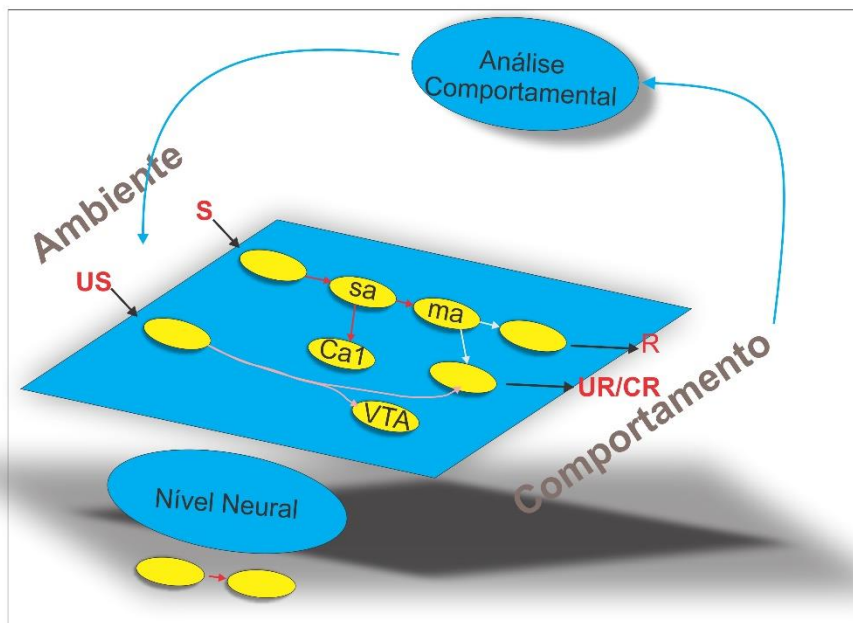


Figura 7. Esquema de integração. Figura adaptada de Oruro, PE; Pardo, G.E, do trabalho “ A hipótese da seleção por reforço em resposta à emergência do problema dos sistemas complexos adaptativos”. Título original em Inglês: “The hypothesis of selection by reinforcement in response to the emergence problem of complex adaptive systems in computational neuroethology” (trabalho apresentado na seção de pôster no congresso da *International Brain Research Organization*, IBRO, Rio de Janeiro, agosto, 2015).

Uma aplicação do princípio do reforço unificado foi distinguir que comportamentos respondentes e operantes são adquiridos simultaneamente e podem ter diferentes saídas do sistema (**Figura 7**). Isso pode estar acontecendo durante o aprendizado do odor da mãe no período sensível, ocorrendo naturalmente no momento em que o filhote recebe o cuidado materno. Por tanto, sabemos que durante o condicionamento para o aprendizado de preferência olfatória de um odor artificial, usando o protocolo de condicionamento clássico em filhotes com DPN 5-7, uma resposta operante de aproximação não é reforçada, mas essa resposta já existe no circuito do filhote dessa idade e durante o condicionamento clássico ela é ativada no circuito. Agora entendemos que ele é ativado simultaneamente com o procedimento de condicionamento clássico, sendo por isso que o filhote se aproxima durante o teste de preferência olfatória. Após o período sensível, o circuito operante não é recrutado. A questão do que acontece no nível neural ao final do período sensível foi estudada no artigo 1. Consequentemente, esta proposta do princípio unificado do reforço nós permitiu integrar os níveis de comportamento e da neurociência com conteúdo teórico da análise do comportamento.

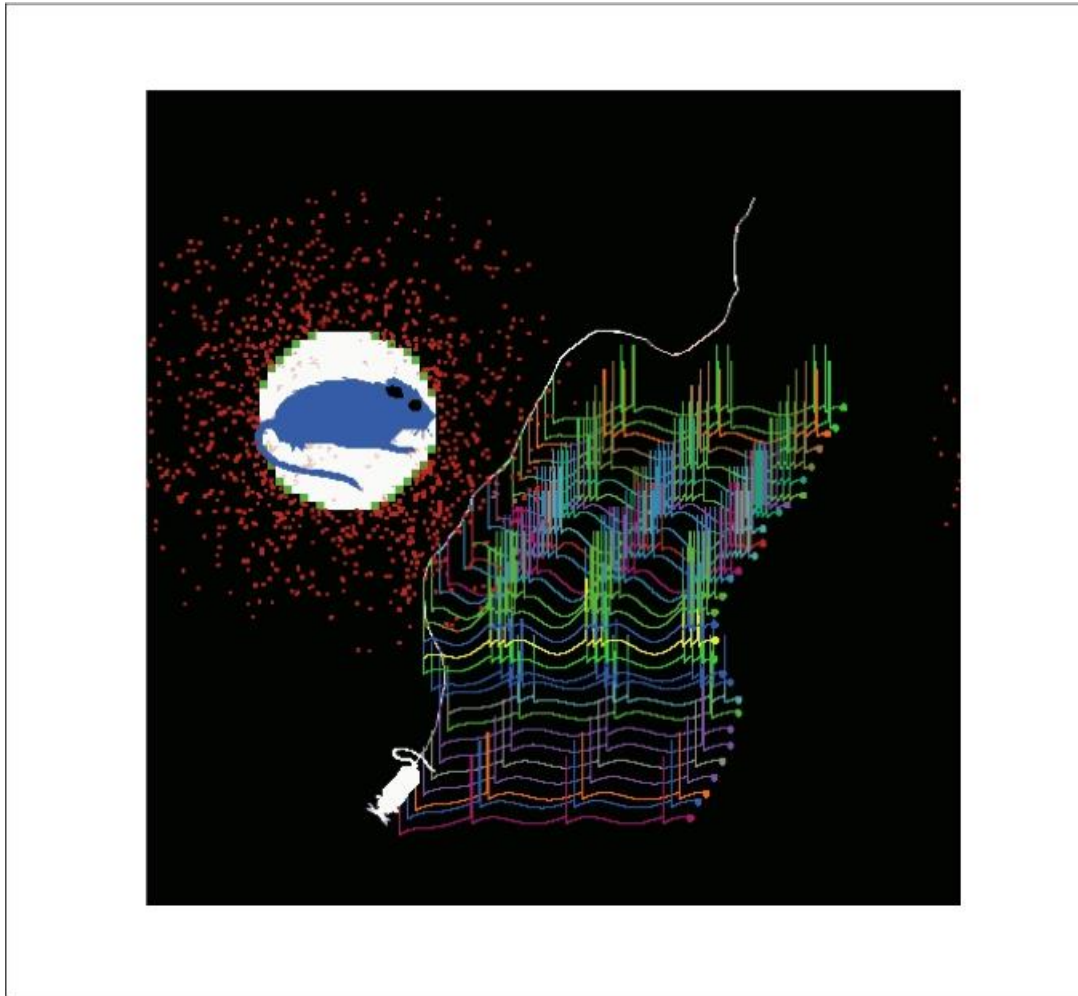


Figura 8. A figura é uma simulação baseada em agentes feita com Netlogo. A rata mãe é fonte de calor (em branco) e fonte de odor (vermelho), o filhote pode se mexer no espaço, a resposta dos neurônios incrementa quanto mais perto ele estiver do odor da mãe. Na simulação os agentes são a mãe, a molécula de odor, o filhote e os neurônios

5.1.2 O aprendizado da preferência do odor maternal e o aprendizado precoce de preferência olfatória para um odor artificial

Uma das principais contribuições da presente tese para o entendimento do aprendizado de preferências olfatórias nos roedores neonatos é a proposta de que a preferência do aprendizado do odor maternal é mediada pelo mesmo circuito envolvido no aprendizado precoce de preferência olfatória para um odor artificial. Os dois artigos fazem contribuições nesse ponto baseado em experimentos de simulação computacional com dados das características eletrofisiológicas maturacionais dos neurônios piramidais e da transmissão sináptica GABAérgica no CPa. Os dois trabalhos de simulação representam o entendimento atual de que os roedores

neonatos aprendem o odor maternal mediante as experiências com mãe dentro do ninho durante a primeira semana pós-natal.

Os resultados da presente tese podem ajudar na compreensão dos desfechos comportamentais do condicionamento odor-estimulação táctil de filhotes de rato antes e depois do DPN 10, em um nível neural. No paradigma do condicionamento clássico usado para filhotes com DPN 5-8 para induzir preferência olfatória para odores artificiais, o estímulo incondicionado é uma pincelada vigorosa no dorso dos filhotes, o qual depois de repetidos pareamentos com um odor artificial (o estímulo neutro), induz uma resposta comportamental de aproximação para o odor artificial (agora estímulo condicionado). Curiosamente, a estimulação táctil no dorso do filhote não induz essa resposta de aproximação antes do pareamento, apenas induz um incremento na atividade locomotora basal dos filhotes (Sullivan et al., 1986; Sullivan and Wilson, 1993). Porém, como pode ser que um odor artificial induza uma resposta de aproximação depois de ter sido pareado com a estimulação táctil, o qual não induz uma resposta de aproximação? A presente tese oferece uma resposta para essa pergunta, discutida na seguinte seção.

5.1.3 O papel das características maturacionais dos neurônios piramidais do CPa no aprendizado da preferência do odor maternal e implicações para o aprendizado precoce de preferência olfatória para um odor artificial

A resposta para a pergunta na seção anterior está baseada na consideração de que o pareamento de um odor artificial com a estimulação táctil é possível porque esse novo aprendizado aproveita um circuito no CPa previamente formado durante a interação mãe-filhote dentro do ninho. Ou seja, as propriedades das células piramidais imaturas do CPa permitem que o condicionamento de um odor artificial- estimulação táctil recrute um circuito neural que parcialmente se encontra superposto com o circuito que suporta o comportamento de aproximação para o odor da mãe. Conforme amadurecem as células piramidais do CPa, a superposição do circuito não é mais possível. Assim o pareamento do odor artificial- estimulação táctil em filhotes > DPN 10 não é mais efetivo em induzir aprendizado de preferência olfatória.

Pensamos que essa hipótese oferecida é a mais simples, dado o conhecimento da circuitaria que se tem até o momento. Além disso a hipótese proposta é possível de ser testada experimentalmente. Por outro lado, a proposta poderia ser explicada pelo princípio unificado do condicionamento proposto por Donahoe e colaboradores,

(1993), no qual os comportamentos operantes e respondentes emergem simultaneamente. Desde essa perspectiva, os neurônios recrutados para o odor maternal condicionado no CPa podem ser os mesmos que são ativados durante o condicionamento do odor- estimulação táctil, e esses neurônios coincidentes poderiam ser os que se encontram reduzidos no circuito BO-CPa P14-P17 na simulação da exposição do odor maternal (resultados do artigo 1).

Em suma, o nosso modelo apresentado no primeiro artigo sugere duas distintas funções para o processamento no circuito BO-CPa no aprendizado associativo em filhotes de ratas com idades antes e depois do DPN 10, isso baseado no desenvolvimento das propriedades intrínsecas das células piramidais do CPa. Para os dos circuitos BO-CPa em desenvolvimento, o sucesso para o pareamento odor-estimulação táctil é dependente da ativação coincidente das células piramidais do CPa responsivas para o odor maternal, promovendo o comportamento de aproximação-orientação. As mudanças nas propriedades intrínsecas das células piramidais do CPa reduzem a disponibilidade das células responsivas para o odor maternal durante a exposição desse odor.

5.1.4 O papel das características maturacionais das entradas GABAérgicas no CPa no aprendizado de preferência do odor maternal

Além do papel das propriedades intrínsecas das células piramidais do CPa, os nossos experimentos computacionais têm mostrado que as entradas GABAérgicas melhoram a habilidade do circuito BO-CPa para aprender o odor mãe e amplificar o recorde de esse odor. Esse efeito é devido às características maturacionais das entradas GABAérgicas que despolarizam os neurônios piramidais do CPa em filhotes com idades menores ao DPN 10. Esses resultados publicados no segundo artigo sugerem que durante o aprendizado de preferência olfatória em filhotes menores do DPN 10, as entradas sinápticas GABAérgicas possivelmente atuam depolarizando os neurônios piramidais do CPa, de modo que isso leva para uma amplificação na resposta dos neurônios piramidais para o odor maternal condicionado. Contribuindo assim para um rápido aprendizado do odor maternal durante esse período do desenvolvimento.

5.2 Conclusões

Nosso trabalho é o primeiro na literatura de simulação na área de estudo do apego mãe-filhote. Apresentamos novidades para a literatura do aprendizado do odor maternal, como:

1. Incluir a técnica da modelagem baseada em agentes e sistemas de equações para modelar neurônios e comportamento usando o software Netlogo;
2. Identificar componentes importantes no sistema olfatório para o aprendizado precoce de preferência olfatória;
3. Integrar modelos de registro etológicos e eletrofisiológico no campo da neuroetologia computacional;
4. Usar abordagens teóricas da análise do comportamento para estudar a distinção operante/respondente no aprendizado precoce de preferência olfatória;
5. Uma explicação para o fim do período sensível para o aprendizado de preferência olfatória em filhotes de roedor, rato ou camundongo, depois do DPN 10, é que a mudança nas propriedades intrínsecas das células piramidais do CPa reduz a disponibilidade de células piramidais que respondem ao odor materno durante a exposição a esse estímulo. Assim, o número reduzido de neurônios que respondem ao odor condicionado (materno) pode não coincidir com os neurônios que respondem a um segundo odor condicionado;
6. As entradas GABAérgicas melhoram a capacidade do circuito BO-CPa para aprender o odor materno durante o período sensível. Esse efeito é devido às características maturacionais das entradas GABAérgicas que despolarizam os neurônios piramidais do CPa em idades menores a DPN 10. Além disso, nesse circuito em desenvolvimento, a aparente falta de inibição sináptica mediada por GABA parece ser compensada pelas propriedades de ativação adaptativa de neurônios piramidais imaturos do CPa;
7. A preferência ao odor maternal tem circuitos que são coincidentes com a preferência a um segundo odor condicionado, o qual só é possível adquiri-lo durante uma janela temporal do desenvolvimento. Nosso modelo computacional, desenhado usando estratégias que vão da neuroetologia à biofísica, permitiu estudar o circuito neural da preferência do odor maternal e permitirá explorar novas hipóteses sobre como mudanças ambientais podem

gerar mudanças no padrão da conectividade neural no circuito em desenvolvimento.

5.3 Futuras perspectivas da neuroetologia computacional

No pôster “Computational Simulation of Maternal Odor on Neonatal Learning in the Nest” apresentado no congresso da Sociedade para a Neurociência dos Estados Unidos (Society for Neuroscience) do ano 2017(**anexo**), realizamos um estudo sobre como as diferentes mudanças ambientais em cada período de cuidado maternal (variações naturais no padrão do comportamento maternal durante o pós-parto) pode ter um efeito diferente ao aprender o odor materno. Este tipo de desenho experimental para simular o aprendizado pode ser usado para trabalhar em neuroetologia.

Outra característica importante que nosso modelo preserva é que o mesmo sujeito possui propriedades de estímulo neutro/condicionado e estímulo incondicionado, como proposto por Domjam como característica do aprendizado em condições naturais (DOMJAN, 2005); nesse caso, a mãe é fonte do estímulo neutro e incondicionado simultaneamente para o filhote. Para tanto, o desenho mais apropriado para condicionar o circuito foi apresentar o odor primeiro e após alguns segundos o efeito da NA, representando assim a aproximação da mãe para o filhote e o contato materno, respectivamente. Na **Figura 8** mostramos uma representação ideal para simulação em neuroetologia. Essa perspectiva pode crescer ainda mais na Neuroetologia. Por exemplo, para explorar como as mudanças do cuidado materno dois dias antes e depois ao período sensível organizam o circuito. Progressivamente, entendendo as propriedades do nível neural durante o condicionamento, estaremos no caminho de estudar situações de maior complexidade comportamental. Neste trabalho, portanto, introduzimos uma estratégia de simulação da Neuroetologia à biofísica com dados experimentais.

Referências

- Alberts, J. R. and Brunjes, P. C. (1978) 'Ontogeny of thermal and olfactory determinants of huddling in the rat', *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. doi: 10.1037/h0077533.
- Burgos, J. E. (2010) 'The operant/respondent distinction: A computational neural-network analysis', in *Computational Models of Conditioning*. doi: 10.1017/CBO9780511760402.009.
- de Almeida, L. et al. (2015) 'Computational modeling suggests distinct, location-specific function of norepinephrine in olfactory bulb and piriform cortex', *Frontiers in Computational Neuroscience*. doi: 10.3389/fncom.2015.00073.
- de Almeida, L., Idiart, M. and Linster, C. (2013) 'A model of cholinergic modulation in olfactory bulb and piriform cortex', *Journal of Neurophysiology*. doi: 10.1152/jn.00577.2012.
- Domjan, M. (2005) 'Pavlovian Conditioning: A Functional Perspective', *Annual Review of Psychology*. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.141409.
- Domjan, M. (2016) 'Elicited versus emitted behavior: Time to abandon the distinction', *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. doi: 10.1002/jeab.197.
- Donahoe, J. W., Burgos, J. E. and Palmer, D. C. (1993) 'A SELECTIONIST APPROACH TO REINFORCEMENT', *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. doi: 10.1901/jeab.1993.60-17.
- Franks, K. M. and Isaacson, J. S. (2005) 'Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex.', *Neuron*, 47(1), pp. 101–14. doi: 10.1016/j.neuron.2005.05.024.
- Ghosh, A. et al. (2015) 'Norepinephrine Modulates Pyramidal Cell Synaptic Properties in the Anterior Piriform Cortex of Mice: Age-Dependent Effects of β -adrenoceptors.', *Frontiers in cellular neuroscience*, 9(November), p. 450. doi: 10.3389/fncel.2015.00450.
- Jensen, O., Idiart, M. A. P. and Lisman, J. E. (1996) 'Physiologically realistic formation of autoassociative memory in networks with theta/gamma oscillations: Role of fast NMDA channels', *Learning Memory*, 3(2–3), pp. 243–256. doi: 10.1101/lm.3.2-3.243.

- Kojima, S. and Alberts, J. R. (2009) 'Maternal care can rapidly induce an odor-guided huddling preference in rat pups', *Developmental Psychobiology*, 51(1), pp. 95–105. doi: 10.1002/dev.20349.
- Li, G., Linster, C. and Cleland, T. A. (2015) 'Functional differentiation of cholinergic and noradrenergic modulation in a biophysical model of olfactory bulb granule cells', *Journal of Neurophysiology*. doi: 10.1152/jn.00324.2015.
- Meyer, P. M. and Alberts, J. R. (2016) 'Non-Nutritive, Thermotactile Cues Induce Odor Preference in Infant Mice (*Mus musculus*)', *Journal of Comparative Psychology*, 130(4), pp. 369–379. doi: 10.1037/com0000044.
- Moriceau, S. and Sullivan, R. M. (2004) 'Unique neural circuitry for neonatal olfactory learning.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 24(5), pp. 1182–1189. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4578-03.2004.
- Moriceau, S. and Sullivan, R. M. (2005) 'Neurobiology of infant attachment', *Developmental Psychobiology*. doi: 10.1002/dev.20093.
- Moriceau, S. and Sullivan, R. M. (2006) 'Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn1733.
- Morrison, Gillian L. et al. (2013) 'A role for the anterior piriform cortex in early odor preference learning: Evidence for multiple olfactory learning structures in the rat pup', *Journal of Neurophysiology*. doi: 10.1152/jn.00072.2013.
- Poo, C. and Isaacson, J. S. (2007) 'An early critical period for long-term plasticity and structural modification of sensory synapses in olfactory cortex.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(28), pp. 7553–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1786-07.2007.
- Raineki, C. et al. (2009) 'Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: Similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence', *Learning and Memory*, 16(2), pp. 114–121. doi: 10.1101/lm.977909.
- Roth, T. L., Moriceau, S. and Sullivan, R. M. (2006) 'Opioid modulation of Fos protein expression and olfactory circuitry plays a pivotal role in what neonates remember.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(5), pp. 590–8. doi: 10.1101/lm.301206.

- Roth, T. L. *et al.* (2013) 'Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: A mouse model', *Genes, Brain and Behavior*. doi: 10.1111/gbb.12067.
- Sullivan, R. M. (2003) 'Developing a Sense of Safety: The Neurobiology of Neonatal Attachment', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008, pp. 122–131. doi: 10.1196/annals.130.013.
- Sullivan, R. M. and Wilson, D. a (2003) 'Molecular biology of early olfactory memory.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 10(1), pp. 1–4. doi: 10.1101/lm.58203.
- Sullivan, R. M., Stackenwalt, G., Nasr, F., Lemon, C. and Wilson, D. A. (2000) 'Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic β -receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats', *Behavioral Neuroscience*, 114(5), pp. 957–962. doi: 10.1037/0735-7044.114.5.957.
- Thiele, J. C. and Grimm, V. (2010) 'NetLogo meets R: Linking agent-based models with a toolbox for their analysis', *Environmental Modelling and Software*. doi: 10.1016/j.envsoft.2010.02.008.
- Thiele, J. C., Kurth, W. and Grimm, V. (2012) 'RNetLogo: An R package for running and exploring individual-based models implemented in NetLogo', *Methods in Ecology and Evolution*. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00180.x. de Almeida, L., Reiner, S.J., Ennis, M., Linster, C., 2015. Computational modeling suggests distinct, location-specific function of norepinephrine in olfactory bulb and piriform cortex. *Front. Comput. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fncom.2015.00073>
- Donahoe, J.W., Burgos, J.E., Palmer, D.C., 2006. A selectionist approach to reinforcement. *J. Exp. Anal. Behav.* 60, 17–40. <https://doi.org/10.1901/jeab.1993.60-17>
- Donahoe, J.W., Burgos, J.E., Palmer, D.C., 1993. A SELECTIONIST APPROACH TO REINFORCEMENT. *J. Exp. Anal. Behav.* <https://doi.org/10.1901/jeab.1993.60-17>
- Ghosh, A., Purchase, N.C., Chen, X., Yuan, Q., 2015. Norepinephrine Modulates Pyramidal Cell Synaptic Properties in the Anterior Piriform Cortex of Mice: Age-Dependent Effects of β -adrenoceptors. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 450. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00450>

- Meyer, P.M., Alberts, J.R., 2016. Non-Nutritive, Thermotactile Cues Induce Odor Preference in Infant Mice (*Mus musculus*). *J. Comp. Psychol.* 130, 369–379.
<https://doi.org/10.1037/com0000044>
- Moriceau, S., Sullivan, R.M., 2005. Neurobiology of infant attachment. *Dev. Psychobiol.* <https://doi.org/10.1002/dev.20093>
- Morrison, G.L., Fontaine, C.J., Harley, C.W., Yuan, Q., 2013. A role for the anterior piriform cortex in early odor preference learning: Evidence for multiple olfactory learning structures in the rat pup. *J. Neurophysiol.*
<https://doi.org/10.1152/jn.00072.2013>
- Raineki, C., Shionoya, K., Sander, K., Sullivan, R.M., 2009. Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: Similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learn. Mem.* 16, 114–121.
<https://doi.org/10.1101/lm.977909>
- Roth, T.L., Raineki, C., Salstein, L., Perry, R., Sullivan-Wilson, T.A., Sloan, A., Lalji, B., Hammock, E., Wilson, D.A., Levitt, P., Okutani, F., Kaba, H., Sullivan, R.M., 2013. Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: A mouse model. *Genes, Brain Behav.*
<https://doi.org/10.1111/gbb.12067>
- Sullivan, R.M., 2003. Developing a Sense of Safety: The Neurobiology of Neonatal Attachment, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 122–131.
<https://doi.org/10.1196/annals.130.013>
- Sullivan, R.M., Hofer, M.A., Brake, S.C., 1986. Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Dev. Psychobiol.* 19, 615–623. <https://doi.org/10.1002/dev.420190612>
- Sullivan, R.M., Wilson, D.A., 1993. Role of the Amygdala Complex in Early Olfactory Associative Learning. *Behav. Neurosci.* 107, 254–263.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.2.254>
- Upton, K.J., Sullivan, R.M., 2010. Defining age limits of the sensitive period for attachment learning in rat pups. *Dev. Psychobiol.* 52, 453–64.
<https://doi.org/10.1002/dev.20448>

Wilensky, U. (1999) 'NetLogo. [http://ccl.northwestern.edu/netlogo/.](http://ccl.northwestern.edu/netlogo/)', Center for Connected Learning and ComputerBased Modeling Northwestern University Evanston IL.

Yuan, Q., Shakhawat, A. M. D. and Harley, C. W. (2014) 'Mechanisms underlying early odor preference learning in rats', in Progress in Brain Research. doi: 10.1016/B978-0-444-63350-7.00005-X.

ANEXO

Pôsteres apresentados em eventos acadêmicos

1. Título: **"The Operant/respondent distinction: An analysis in artificial piriform cortex"**.

Evento: 2nd FALAN Congress, Buenos Aires, outubro 17-20 de 2016.

Autores:

Enver Oruro Puma (primeiro autor e apresentador)

Grace E. Pardo (Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Maria Elisa Calcagnotto (Professora associada, Dpto de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

Marco Idiart (Professor Titular, Dpto de Física, UFRGS)

2. Título: **"O problema das assembleias celulares no modelo selecionista do córtex piriforme anterior"**.

Evento: IX Oficina de Neurociências - As múltiplas dimensões da plasticidade neural.

Bento Gonçalves, RS - 10 e 11 de setembro de 2016

Autores:

Enver Oruro Puma (primeiro autor e apresentador)

Grace E. Pardo (Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Maria Elisa Calcagnotto (Professora associada, Dpto de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

Marco Idiart (Professor Titular, Dpto de Física, UFRGS)

3. Título: **"Contato materno seleciona neurônios preferentes ao odor no córtex piriforme de filhotes de rato"**.

Evento: Apresentado em XXXIV Anual de Etologia, 12-15 de novembro 2016, Jaboticabal, SP, Brasil.

Autores:

Enver Oruro Puma (primeiro autor e apresentador)

Grace E. Pardo (Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Maria Elisa Calcagnotto (Professora associada, Dpto de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

Marco Idiart (Professor Titular, Dpto de Física, UFRGS)

4. Título: **"Computational model of early odor preference learning"**.

Evento: Brain, Behavior and Emotions Congress. Porto Alegre, 14-17 de junho 2017

Autores:

Enver Oruro Puma (primeiro autor e apresentador)

Grace E. Pardo (Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Maria Elisa Calcagnotto (Professora associada, Dpto de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

Marco Idiart (Professor Titular, Dpto de Física, UFRGS)

5. Título: **"Neurocomputational Simulation of Natural Olfactory Learning in the Neonatal Rat"**

Evento: 38 th World Congress of the International Union of Physiological Sciences, 1-5 agosto 2017, Rio de Janeiro, Brasil

Primeiro autor e apresentador: Grace E. Pardo (Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Autores:

Grace E. Pardo (primeira autora e apresentadora)

Izabela Amaro Espíndula (Estudante de Iniciação Científica, Dpto Fisiologia, ICBS, UFRGS)

Enver Oruro Puma (Doutorando, PPG Neurociências UFRGS).

6. Título: “**Computational simulation of the infant maternal odor learning in the nest**”.
Evento: SfN's 47th annual meeting, Neuroscience 2017, Washington, D.C, novembro 2017

Autores:

Grace E. Pardo (primeira autora e apresentadora)

Izabela Amaro Espíndula (Estudante de Iniciação Científica, Dpto Fisiologia, ICBS, UFRGS)

Enver Oruro Puma (Doutorando, PPG Neurociências UFRGS).

7. Título: “**From emitted to elicited neuronal activity in the neonatal piriform cortex**”.
Evento: SfN's 47th annual meeting, Neuroscience 2017, Washington, D.C, novembro 2017.

Autores:

Enver Oruro Puma (primeiro autor)

Grace E. Pardo (apresentadora, Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Izabela Amaro Espíndula (Estudante de Iniciação Científica, Dpto Fisiologia, ICBS, UFRGS)

Maria Elisa Calcagnotto (Professora associada, Dpto de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

Marco Idiart (Professor Titular, Dpto de Física, UFRGS)

8. Título: “**Simulation of amygdala input to posterior piriform cortex: an exploration of fear conditioning from cells to cognition**”.
Evento: 16th Annual MO-LECULAR AND CELLULAR COGNITION SOCIETY Symposium and Poster Session -WASHINGTON DC novembro 2017.

Autores:

Enver Oruro Puma (primeiro autor)

Grace E. Pardo (apresentadora, Doutoranda PPG Fisiologia UFRGS)

Maria Elisa Calcagnotto (Professora associada, Dpto de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

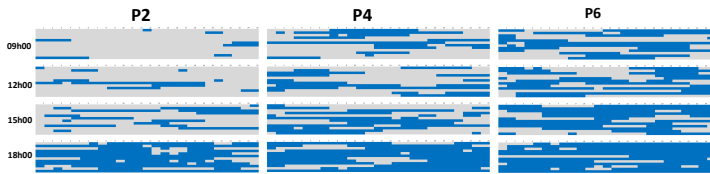
Marco Idiart (Professor Titular, Dpto de Física, UFRGS)

Pôster SNF 2017

Introduction

Studies have shown that neonatal rats exhibit high ability to learn artificial odor associated with a stimulus that mimics maternal care (Sullivan, 2003). It is presumed that this association also occurs under natural circumstances within the nest (Domjan, 2005).

During the first 6 postnatal days (P), maternal care shows variation with a progressive increase in the maternal absence of the nest.

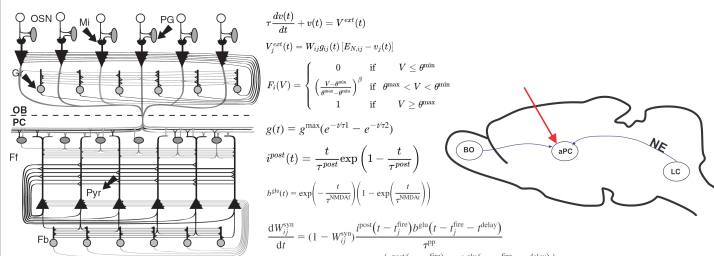


Maternal profile of the presence and absence of the nest in postpartum day 2, 4 and 6 of the rat. The graph was constructed from the work of Pardo et al. 2016. Blue: mother outside the nest. Grey: mother in the nest. n=12

We hypothesized that the profile on P6 could shape the olfactory neural circuit to distinguish the mother odor or the nest odor than the profile of day P2.

Method

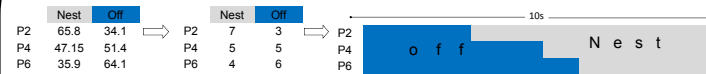
1. Network architecture of the olfactory bulb (OB) and piriform cortex (PCx)



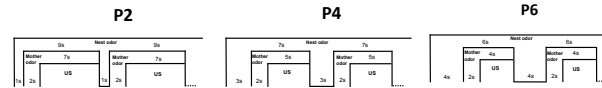
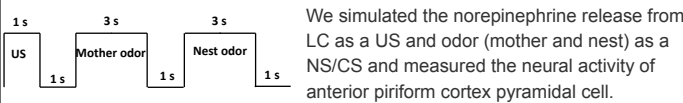
Simplified artificial neural network of the OB and PCx(A) (from de Almeida, Idriat and Linster.) and Equations used for the artificial neural network (B) (from Almeida et al 2015).

We measured a neural activity every 1 ms and in a window of 2000 ms seconds we quantified the rate of firing every 500 ms.

2. Reduction of the data from Fig 1 to an equivalent minimal representation

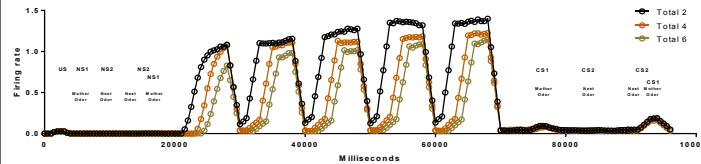


3. General protocol of natural conditioning



4. Criteria for data analysis

Total neural activity before, during and after conditioning

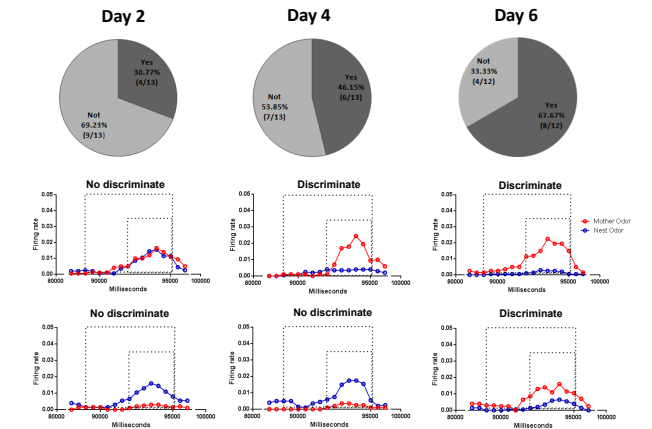


- After the conditioning a specific test was performed to select the neurons that fire exclusively in response to the mother odor and in response to the nest odor.
- Only data with firing rate greater than 0.0002 in response to the nest odor presentation was considered for analysis.
- To determine if the artificial circuit discriminates the mother odor from the nest odor after conditioning, we realized a qualitative analysis based on following criteria:

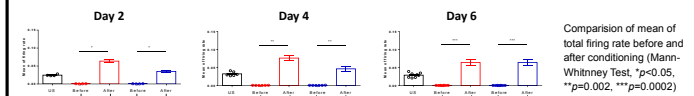
- The nest odor presentation evokes firing of set of neurons specific to nest odor but not the firing of neurons specific to mother odor
- The mother odor presentation evokes firing of set of neurons specific to mother odor but the firing of neurons specific to the nest odor should remain stable and not increase their firing.

Results

A higher percentage of the artificial circuit of day 6 meet the criteria for odor discrimination than that the circuit of day 2.



The circuit was able to learn in the three days



Discussion and Conclusion

The artificial neural circuit representative for rat pup shown a progressive increase with age in discriminative capacity of mother odor from the nest odor, which is coincident with a progressive increase maternal absence from the nest during the first postpartum days.

These results suggest that the profile of maternal care at postnatal day 6, outside and inside the nest, allows a greater distinction of the mother's odor and the nest's odor than at postnatal day 2.

Cartas de aceitação dos artigos e convite para submeter figura capa de jornal

[Enver Oruro Puma \(Author\)](#), [Queue Summary](#)[Reviewer Area](#)

not 1-4,9
Decision Letter

[\[Return to Queue\]](#)

To: "Enver M. Oruro" <envermiguel@gmail.com>
From: Susan Cushman <susan.j.cushman@uth.tmc.edu>
Subject: Learning and Memory -- Manuscript Accepted
Cc: macciol@cshl.edu

RE: LEARNMEM/2019/050724

Dear Dr. Oruro,

Thank you for your revised manuscript, "Maturation of pyramidal cells in anterior piriform cortex may be sufficient to explain the end of early olfactory learning in rats," which we are pleased to accept for publication in Learning and Memory.

Any essential changes to the manuscript should be made in your forthcoming page proofs.

At this stage we require the LICENSE TO PUBLISH form, available in your Author Area at submit.learnmem.org to be filled out, signed, and returned. Please e-mail (preferred) or fax the form to: Dana Macciola, Fax: 516-422-4094; e-mail: macciol@cshl.edu. Any delay in sending the form will cause a delay in the Production of your manuscript for publication.

IN ADDITION, DIGITAL ART FILES ARE REQUIRED for all figures (as detailed in the Author Instructions

(<http://learnmem.cshlp.org/site/misc/ifora.xhtml>). Please ensure that the digital art files meet the digital art guidelines at <http://learnmem.cshlp.org/site/misc/ifora.xhtml>. If your art files do not meet these guidelines, please e-mail Dana Macciola, (macciol@cshl.edu), and advise her that you have revised art files to upload to the submission website. Dana will then direct you on how to upload your revised art files through the submission website.

In addition, if applicable, please check that you have acquired permission from the publisher to reproduce, modify or adapt any previously published figure or table for use both in print and online in Learning & Memory. This is essential as we can not publish an article without the permission on file. Most publishers and scientific journals list instructions for obtaining reprint permissions on their websites. All data or information obtained through personal communication also requires a letter of approval for use and any material that was obtained from another publication requires permission for publication from the source. We remind authors that it is a condition of publication that reagents, clones, cell lines, etc., generated in the course of the work described will be made available on request to qualified members of the research community.

Information about our OPEN ACCESS option is available on our website (<http://learnmem.cshlp.org/>).

The editors of Learning and Memory would like to invite you to submit potential cover images to feature your recently accepted manuscript. The image does not need to be an exact duplicate of a figure from the manuscript but should represent both an artistic and informative representation of your research results. Please feel free to submit several different images for our consideration. We will select images based on artistic quality and your scientific results. Please see the instructions on our website (<http://learnmem.cshlp.org/site/misc/ifora.xhtml>), under "Manuscripts Accepted for Publication," for digital file requirements for artwork (note that we need only a

digital file of the image; no hard copies are necessary). We will also need a legend describing the image (including manuscript number, title and first author) and a 3-5 word caption for the cover. Please email your proposed images, legends, and cover captions to Dana Macciola (macciol@csih.edu). Please contact us for directions for uploading if the image is too large to email.

With kind regards,

Susan Cushman, Ph.D.

Learning and Memory

PLEASE NOTE: The corresponding author for this manuscript has been designated as: Enver M. Oruro. This person to whom we will send the galleys for proofing, and at the following address. If ANY of this information is incorrect or missing, please let us know immediately.

Galleys will be sent to:

Enver M. Oruro

Enver Miguel Oruro Puma

Universidad Federal de Río Grande del Sur

Instituto de Ciências Básica e Saúde

Av Borges de Medeiros 612 ap 39

Porto alegre 90020022

Brazil

TEL: 55-51-991460204

FAX:

E-mail: envermiguel@gmail.com

LEARNING AND MEMORY

COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS

Dana Macciola

500 Sunnyside Boulevard

Woodbury, NY 11797-2924

Phone (516) 422-4012

Fax (516) 422-4092

Learning & Memory [Journal Site](#) [Contact Us](#) [Terms of Use](#) [Privacy Policy](#)

[Enver Oruro Puma \(Author\)](#), [Queue Summary](#)[Reviewer Area](#)

not 1-4,9
Decision Letter

[\[Return to Queue\]](#)

To: Enver Miguel Oruro <envermiguel@gmail.com>
From: Susan Cushman <susan.j.cushman@uth.tmc.edu>
Subject: Learning and Memory -- Manuscript Accepted
Cc: macciol@cshl.edu

RE: LEARNMEM/2020/052217

Dear Dr. Oruro,

Thank you for your revised manuscript, "The maturational characteristics of the GABA input in the anterior piriform cortex may also contribute to the rapid learning of the maternal odor during the sensitive period.," which we are pleased to accept for publication in Learning & Memory.

Any essential changes to the manuscript should be made in your forthcoming page proofs. Please note that the reviewer indicated figures 6 and 7 were missing from the revision and take steps to ensure these figures are included in final submission material.

At this stage we require the LICENSE TO PUBLISH form, available in your Author Area at submit.learnmem.org filled out, signed, and returned. Please e-mail (preferred) or fax the form to: Dana Macciola, Fax: 516-422-409. Email: macciol@cshl.edu. Any delay in sending the form will cause a delay in the Production of your manuscript publication.

IN ADDITION, DIGITAL ART FILES ARE REQUIRED for all figures (as detailed in the Author Instructions (<http://learnmem.cshlp.org/site/misc/ifora.xhtml>)). Please ensure that the digital art files meet the digital art guidelines at <http://learnmem.cshlp.org/site/misc/ifora.xhtml>. If your art files do not meet these guidelines, please e-mail Dana Macciola, (macciol@cshl.edu), and advise her that you have revised art files to upload to the submission website. Dana will then direct you on how to upload your revised art files through the submission website.

In addition, if applicable, please check that you have acquired permission from the publisher to reproduce, modify or adapt any previously published figure or table for use both in print and online in Learning & Memory. This is essential as we can not publish an article without the permission on file. Most publishers and scientific journals have instructions for obtaining reprint permissions on their websites. All data or information obtained through personal communication also requires a letter of approval for use and any material that was obtained from another publication requires permission for publication from the source. We remind authors that it is a condition of publication that reagents, clones, cell lines, etc., generated in the course of the work described will be made available on request to qualified members of the research community.

Information about our OPEN ACCESS option is available on our website (<http://learnmem.cshlp.org/>).

The editors of Learning and Memory would like to invite you to submit potential cover images to feature your recently accepted manuscript. The image does not need to be an exact duplicate of a figure from the manuscript but should represent both an artistic and informative representation of your research results. Please feel free to submit several different images for our consideration. We will select images based on artistic quality and your

scientific results. Please see the instructions on our website (<http://learnmem.cshlp.org/site/misc/ifora.xhtml>), under "Manuscripts Accepted for Publication," for digital file requirements for artwork (note that we need only a digital file of the image; no hard copies are necessary). We will also need a legend describing the image (include manuscript number, title and first author) and a 3-5 word caption for the cover. Please email your proposed legends, and cover captions to Dana Macciola (macciol@cshl.edu). Please contact us for directions for upload if the image is too large to email.

With kind regards,

Susan Cushman, Ph.D.

Learning and Memory

PLEASE NOTE: The corresponding author for this manuscript has been designated as: Enver Miguel Oruro. If you are not the person to whom we will send the galleys for proofing, and at the following address. If ANY of this information is incorrect or missing, please let us know immediately.

Galleys will be sent to:

Enver Miguel Oruro

Enver Miguel Oruro Puma

Universidad Federal de Río Grande del Sur

Instituto de Ciências Básica e Saúde

Av Borges de Medeiros 612 ap 39

Porto alegre 90020022

Brazil

TEL: 55-51-991460204

FAX:

E-mail: envermiguel@gmail.com

LEARNING AND MEMORY

COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS

Dana Macciola

500 Sunnyside Boulevard

Woodbury, NY 11797-2924

Phone (516) 422-4012

Fax (516) 422-4092

Learning & Memory [Journal Site](#) [Contact Us](#) [Terms of Use](#) [Privacy Policy](#)



Enver Miguel <envermiguel@gmail.com>

Learning & Memory - Invitation to submit cover

Cushman, Susan J <Susan.J.Cushman@uth.tmc.edu>
Para: "envermiguel@gmail.com" <envermiguel@gmail.com>
Cc: "marco.idiart@gmail.com" <marco.idiart@gmail.com>

5 de octubre de 2020, 13:14

Dear Dr. Oruro,

The editors of Learning & Memory would like to feature your recently accepted paper (LEARNMEM/2020/052217: "The maturational characteristics of the GABA input in the anterior piriform cortex may also contribute to the rapid learning of the maternal odor during the sensitive period") as a Journal cover. Your article will appear in the December, 2020 issue and we would like to feature your cover on the same issue, so we would need your image in the near future.

The image can be either a figure from your manuscript or a creative/artistic representation of your research. We would however prefer that data charts and graphs not be used. Please feel free to submit several different images for our consideration. Images should be as large as possible (full page preferred) and submitted as either an EPS or TIFF file (TIFFs must be at least 300 dpi-resolution). In addition, please remove any panel tags from your image. When you are ready to submit your images please email them to me. If they are too large for conventional email we have used WeTransfer (<https://wetransfer.com>) very successfully to email large files.

We will also need a legend describing the image (including manuscript number, title and first author) and a 3-5 word caption for the cover.

Please send the caption separately; do not embed the caption in the image.

Please let me know if you would like to accept this invitation to submit cover art or if you have any questions.

Thank you in advance for your time.

Best-
Susan

Susan Cushman, PhD
Assistant Editor
Learning & Memory