

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

Grace Violeta Espinoza Pardo

**ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DO APEGO EM
DIFERENTES PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

Porto Alegre

2018

Grace Violeta Espinoza Pardo

**ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DO APEGO EM
DIFERENTES PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion
Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre

2018

Grace Violeta Espinoza Pardo

**ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DO APEGO EM
DIFERENTES PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion
Presidente e Orientador
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Grace Schenatto Pereira Moraes
Membro externo
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a. Dr^a Rachel Krolow Santos Silva Bast
Membro externo
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Nadja Schröder
Membro interno (relatora)
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Data da defesa: 26 de outubro de 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Pardo, Grace Violeta Espinoza
ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DO APEGO EM
DIFERENTES PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL /
Grace Violeta Espinoza Pardo. -- 2018.
164 f.
Orientador: Aldo Bolten Lucion.

Coorientadora: Maria Elisa Calcagnotto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Apego. 2. Mecanismos neurobiológicos. 3.
Circuito neural olfatório. 4. Eletrofisiologia. 5.
Modelagem e simulação computacional. I. Lucion, Aldo
Bolten, orient. II. Calcagnotto, Maria Elisa,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

Dedico esta tese ao professor Dr. Luis Ángel Aguilar Mendoza, meu primeiro orientador, quem me abriu as portas do mundo científico.

Agradecimentos

Meu profundo agradecimento é para:

O Professor Aldo Bolten Lucion, quem me proveu a oportunidade de fazer mestrado no Brasil e me recomendou continuar com meu doutorado e aceitou me orientar. Agradeço por comentar honestamente nas minhas ideias e ter-me guiado pacientemente até aqui. Eu cheguei ao Brasil com limitadas habilidades do português e um sonho de uma carreira científica, sem ele eu não teria conseguido realizar o que sonhei.

A professora Maria Elisa Calcagnotto, minha co-orientadora, quem me proveu a oportunidade de aprender eletrofisiologia no seu laboratório e um ambiente de contínua formação na área. Agradeço pelos seus valiosos ensinamentos, pela confiança em mim e pelo suporte em todos os aspectos da minha formação.

O CNPq por prover o suporte financeiro para a realização deste trabalho. Nos quatro anos do doutorado eu recebi bolsa do CNPq, e a pesquisa desta tese foi financiada com fundos do CNPq outorgado aos professores Aldo Bolten Lucion e Maria Elisa Calcagnotto.

As minhas colegas de laboratório. Agradeço a Andréa Finkler pela agradável convivência e suporte nos quatro anos de pesquisa, e principalmente pela sua amizade inestimável. A Clarissa Bellagamba, Izabela Espíndula, Bruna de Oliveira pelo apoio nas atividades do meu trabalho e genuíno entusiasmo no tema de pesquisa. Agradeço a Thaís Barros pelo seu companheirismo e palavras de alento. Também quero agradecer ao Felipe Bau pelo seu apoio nos experimentos iniciais do meu trabalho. Durante a minha estada no laboratório, os seminários-lanche com Andréa, Enver e as “gurias” Clarissa, Izabela e Bruna, e nos últimos meses também com Thaís, e eventualmente também com participação do prof. Marco Idiart, foram os melhores momentos da minha formação acadêmica. Quero agradecer infinitamente eles por essa oportunidade única de aprendizado. Nesses seminários informais durante mais de um ano desentranhamos muitas pesquisas, questionando a lógica fundamental de cada trabalho, buscando explicações e respostas sem uma agenda rígida, sendo o foco principal compreender completamente até os pequenos detalhes.

Os meus colegas do PPG Fisiologia, em especial ao Samir Khal, Jéferson Ferraz, Elaine Sarapio, Luciana Abreu, pela amizade, palavras de alento e aconselhamentos. Meu especial agradecimento para Jéferson e Samir que foram meus exemplos de excelência e ética no proceder da pesquisa experimental.

Os meus professores do PPG Fisiologia, em especial aos professores Luiz Kucharski, Roselis Silveira, Luciano Fraga, Ana Paula Vinagre e Márcia Trapp por me abrir as portas dos seus laboratórios toda vez que eu precisei de auxílio nos experimentos. Agradeço também ao professor Marcelo Grilo pelos seus aconselhamentos para minha vida profissional. Agradeço também a professora Elisa Winkelmann da UFSC pelos seus valiosos ensinamentos em imunohistoquímica. Quero agradecer também ao professor Marco Idiart do Instituto de Física UFRGS por participar dos nossos seminários informais e comentar com entusiasmo nas minhas ideias.

Os colegas do laboratório da professora Maria Elisa, em especial a Francine Dalpian e Carine Lampert, com quem comecei o treinamento da eletrofisiologia e nossa união e companheirismo acelerou o nosso aprendizado. Agradeço também a Leticia Meier com quem tive meus primeiros treinos no registro *patch-clamp*.

A Silvia Barbosa do Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, pelas fotografias no microscópio das marcações histológicas do córtex piriforme. Também agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pela revelação de algumas imagens de neurônios marcados.

A Cinthia Schöler pela sua ajuda nas revisões do português e suas enormes tentativas de transpor meu portunhol em português compreensível. Peço desculpas pelos erros que podem ainda ter ficado aqui e lá.

A professora Najda Schröder pelos seus valiosos comentários na minha tese. Também aos professores Grace Schenatto, Rachel Krolow e Fernando Benetti por aceitarem avaliar esta tese.

O Enver Oruro, pelo seu exemplo, apoio e incentivo que me sustentaram em tempos difíceis e cuja colaboração, discussões inspiradoras e críticas me serviram como lembretes constantes do significado de fazer ciência. Com ele eu tenho aprendido o valor de ter uma pergunta na pesquisa científica.

Resumo

O córtex piriforme anterior (aPC) modulado pela ação da noradrenalina (NA) está envolvido no circuito neural que suporta o aprendizado do apego do roedor infante com sua mãe em um período específico do desenvolvimento anterior ao dia pós-natal (P) 10. O aPC está envolvido no processamento e discriminação de odores e durante o primeiro mês de vida pós-natal sofre mudanças morfológicas e funcionais. Estudos de imunohistoquímica e registros de potencial de campo sugerem uma progressiva maturação na inibição cortical no aPC, a qual está envolvida na integração e afinamento da atividade cortical para o *input* olfatório entrante e representação do odor. O propósito da presente tese foi contribuir para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no apego do rato infante para sua mãe mediado por odor, por meio da análise do papel da transmissão sináptica GABAérgica no aPC. Assim, o estudo da tese foi realizado para: 1) descrever as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante o período sensível (P5-P8) e pós-sensível (P14-P17) para o aprendizado do apego e para, 2) explorar a contribuição das características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC em um circuito neural artificial integrado para o processamento do odor nesses períodos. O desenho experimental incluiu estudos combinados de eletrofisiologia celular *in vitro* e de modelagem computacional. Os resultados eletrofisiológicos demonstraram que a transmissão sináptica GABAérgica e as propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais da camada 2/3 do aPC são substancialmente diferentes em P5-P8 e P14-P17. Esses dados experimentais foram integrados em um circuito neural artificial onde foi simulado o processamento de odor em condições etológicas (odor de baixa intensidade e odor de alta intensidade com ação da NA). A análise das simulações sugere que o *input* GABAérgico nas células piramidais parece contribuir com um efeito despolarizante nos dois períodos de idade. Além disso, o perfil de rápida adaptação na frequência de disparo de potenciais de ação para o *input* despolarizante é maior nas células piramidais em P5-P8 que em P14-P17. Assim, o nosso estudo sugere que essas duas condições maturacionais no aPC garantem em P5-P8 um perfil de processamento de odor, que quando reforçado pela ação da NA, leva a um rápido melhoramento na eficácia sináptica, contribuindo assim para um rápido aprendizado do apego que caracteriza o período sensível; enquanto esse mecanismo parece ocorrer em menor grau para aPC no período P14-P17.

Abstract

The anterior pyriform cortex (aPC) modulated by the action of noradrenaline (NA) is involved in the neural circuitry that supports the early attachment learning in infant rodents within a specific period of development before the postnatal day (P) 10. The aPC is involved in the processing and discrimination of odors and during the first month of postnatal life goes through morphological and functional changes. Field potential recording and immunohistochemical studies suggest a progressive maturation of cortical inhibition in aPC, which is involved in the integration and tuning of cortical activity for the incoming olfactory input and odor representation. The purpose of this thesis was to contribute to the understanding of the neurobiological mechanisms involved in the rodent infant attachment by analyzing the role of GABAergic synaptic transmission in aPC. Thus, the study of the thesis was performed 1) to describe the characteristics of GABAergic synaptic transmission in the aPC during the sensitive (P5-P8) and post-sensitive (P14-P17) periods for infant attachment learning, and 2) to explore the contribution of the characteristics of GABAergic synaptic transmission in aPC in an integrated artificial neural circuit for odor processing. The experimental design included combined studies of in vitro cellular electrophysiology and computational modeling. Electrophysiological results demonstrate that GABAergic synaptic transmission and the passive and active intrinsic properties of 2/3 layer aPC pyramidal cells are substantially different in P5-P8 and P14-P17. These experimental data were integrated into an artificial neural circuit where the odor processing was simulated under ethological conditions (low-intensity odor and high-intensity odor with NA action). The analysis of the output of the simulations suggests that the GABAergic input in the pyramidal cells appears to contribute with a depolarizing effect on pyramidal cells in both periods. Moreover, the profile of rapid spike frequency adaptation is greater in P5-P8 pyramidal cells than in P14-P17 pyramidal cells. Thus, our study suggests that these two maturational conditions in aPC guarantee in P5-P8 an odor processing profile, which when reinforced by the action of NA leads to a rapid improvement in synaptic efficacy, contributing to a rapid attachment learning that characterizes the sensitive period. This mechanism seems to occur in lesser extent manner for aPC in the post-sensitive period.

Lista de Abreviações

AC	Comissura anterior
aCSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
Aff	Aferentes
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
ANOVA	Análise de variância
AON	Núcleo anterior olfatório
aPC	Córtex piriforme anterior
Assn	Associativos
BMI	Bicuculina
BO	Bulbo olfatório
CR	Resposta condicionada
CS	Estímulo condicionado
DP	Célula piramidal profunda
DP	Desvio padrão da média
E	Dia embrionário
EGABA	Potencial de reversão das sIPSC
EP	Erro padrão da média
EPSPS	Potencial excitatório pós-sináptico
Fb	Feedback
Ff	Feedforward
Fr	Fisura rinal
GABA	Acido gama-aminobutírico
Gr	Célula Granular
HPA	Eixo hipotálamo-hipótese-adrenal
K-S	Teste Kolmogorov-Smirnov
L	Camada
LC	Locus Coeruleus
LOT	Trato olfatório lateral
LTP	Potenciação de longa duração
mIPSC	Correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura
Mt	Célula Mitral
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Nervo olfatório
OSN	neurônios olfatórios sensoriais
P	Dia pós-natal
PA	Potencial de ação
Pg	Interneurônio periglomerular
pPC	Córtex piriforme posterior
Pyr	Célula piramidal
sIPSC	Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas
SL	Célula semilunar
SP	Célula piramidal superficial
TTX	Tetrodotoxina
UR	Resposta incondicionada
US	Estímulo incondicionado

Dedicatória	5
Agradecimentos	6
Resumo	8
Abstract	9
Lista de abreviações	10
Sumário	11
Lista de Figuras	15
Lista de Tabelas	17

Sumário

Capítulo 1	18
-------------------------	-----------

Introdução	18
-------------------------	-----------

1. Ideia da tese: uma jornada pessoal	18
2. Motivação do estudo	21
3. Tópico e perguntas de pesquisa	21
4. Hipóteses específicas.....	22
5. Abordagem metodológica	23
6. Objetivos	27
7. Estrutura da tese	27

Capítulo 2	29
-------------------------	-----------

Referencial teórico	29
----------------------------------	-----------

1. Aspectos comportamentais e mecanismos neurobiológicos do apego	29
1.1. Apego dos infantes com sua mãe	29
1.2. Aspectos comportamentais do apego em roedores infantes	29
1.2.1. Aprendizado do apego.....	30
1.2.1.1. Natureza associativa do aprendizado do apego	31
1.2.1.2. Períodos sensíveis para a formação do apego	34
1.3. Mecanismos neurobiológicos do aprendizado do apego	35
1.3.1. Circuito neural envolvido no aprendizado do apego	35
1.3.1.1. Mudanças no bulbo olfatório.....	36
1.3.1.2. Mudanças no córtex piriforme anterior.....	37
1.3.1.3. Sistema Locus Coeruleus-Noradrenalina	39
2. Organização estrutural e funcional do sistema olfatório	40
2.1. Bulbo olfatório principal	40
2.1.1. Visão geral	40
2.1.2. Projeções do bulbo olfatório para regiões centrais.....	42
2.2. Córtex piriforme.....	43
2.2.1. Demarcação anatômica	43
2.2.2. Organização Laminar	43
2.2.3. Células principais	45
2.2.3.1. Células semilunares.....	45
2.2.3.2. Piramidais superficiais	45
2.2.3.3. Piramidais profundas.....	46
2.2.3.4. Interneurônios	46
2.2.4. Organização Sináptica Intracortical	46
2.2.4.1. Sinapses Excitatórias.....	46
2.2.4.2. Sinapses inibitórias.....	47

2.2.5. Circuito neural.....	47
2.2.5.1. Aferentes	47
2.2.5.2. Eferentes.....	48
2.2.5.3. Autoassociativas.....	48
2.2.5.4. Inibitório.....	48
2.2.5.4.1. Inibição <i>feedforward</i>	48
2.2.5.4.2. Inibição <i>feedback</i>	49
2.2.6. Plasticidade sináptica	49
2.2.7. Retropropagação de potencial de ação	50
2.3. Aspectos do desenvolvimento pós-natal do córtex piriforme	50
2.3.1. Organização laminar	50
2.3.2. Células.....	51
2.3.3. Organização sináptica intracortical	51
2.3.3.1. Excitatória	51
2.3.3.2. Inibitória.....	52
2.3.4. Circuito Neural.....	52
2.3.5. Plasticidade Sináptica.....	53
2.3.6. Retropropagação de potencial de ação.....	53
3. Papel da transmissão sináptica GABAérgica no processamento cortical do odor	54

Capítulo 3 56

Desenvolvimento pós-natal da transmissão sináptica GABAérgica no córtex piriforme anterior 56

1. Introdução	56
2. Métodos.....	57
2.1. Ética.....	57
2.2. Animais	57
2.2.1. Alojamento.....	57
2.2.2. Acasalamento	58
2.2.3. Gestação, parto e padronização de ninhadas	58
2.3. Oclusão nasal unilateral	59
2.3.1. Anestesia por frio	59
2.3.2. Cauterização do nariz.....	59
2.3.3. Verificação da oclusão nasal	60
2.3.4. Histologia	62
2.4. Eletrofisiologia <i>in vitro</i>	62
2.4.1. Preparo de soluções.....	62
2.4.2. Preparo de fatias.....	63
2.4.3. Visualização e identificação de células.....	64
2.4.4. Registro <i>whole-cell patch clamp</i>	65
2.4.4.1. <i>Voltage-clamp</i>	66
2.4.5. Marcação de células com Lucifer Yellow	67
2.4.6. Drogas utilizadas	67
2.5. Análise de dados.....	67
3. Resultados	68
3.1. Mudanças na transmissão sináptica GABAérgica durante o desenvolvimento pós-natal normal.....	68
3.1.1. Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC).....	69
3.1.2. Correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC)	70
3.1.3. Potencial de reversão das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (E_{GABA})	71
3.2. Efeitos da privação olfatória unilateral na maturação da transmissão sináptica GABAérgica	72
3.2.1. Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC).....	72
3.2.2. Correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC)	77

3.2.3. Potencial de reversão das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (E_{GABA})	77
4. Discussão.....	78
4.1. Perfil de desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica no aPC.....	79
4.2. A privação olfatória tem efeito leve no desenvolvimento da transmissão GABAérgica	82
4.3. Privação olfatória unilateral incrementa a frequência e amplitude das sIPSC no lado contralateral à oclusão nasal.....	84
4.4. Relevância para o processamento do odor no desenvolvimento inicial pós-natal	85

Capítulo 4 87

Maturação das propriedades intrínsecas passivas e ativas de membrana das células piramidais do córtex piriforme anterior 87

1. Introdução	87
2. Método	87
2.1. Ética.....	87
2.2. Animais	88
2.3. Eletrofisiologia <i>in vitro</i>	88
2.3.1. Preparo de fatias	88
2.3.2. Registro <i>whole-cell patch clamp</i>	89
2.3.3. <i>Current-clamp</i>	89
2.4. Análise de dados.....	90
3. Resultados	90
3.1. Desenvolvimento pós-natal das propriedades passivas de membrana	91
3.1.1. Potencial de membrana em repouso.....	91
3.1.2. Resistência ao <i>input</i> e Constante de tempo da membrana.....	92
3.1.3. Capacitância da membrana.....	93
3.2. Desenvolvimento pós-natal nas propriedades de potencial de ação.....	93
3.2.1. Limiar de disparo de potencial de ação	93
3.2.2. Amplitude do potencial de ação	93
3.2.3. Duração do potencial de ação (<i>half-width</i>).....	93
3.2.4. Frequência de disparo de potenciais de ação.....	94
3.2.5. Disparo em <i>burst</i>	96
3.2.6. Disparo espontâneo	97
4. Discussão.....	98
4.1. Desenvolvimento das propriedades passivas da célula piramidal	98
4.2. Desenvolvimento de propriedades de PA	99
4.3. Relevância para o processamento de odor no aPC.....	101

Capítulo 5 103

Diferenças no processamento do odor no córtex piriforme anterior em dois períodos do desenvolvimento pós-natal inicial. Um estudo computacional 103

1. Introdução	103
2. Método	104
2.1. Modelagem.....	104
2.2. Arquitetura do modelo	104
2.2.1. Modelo do bulbo olfatório.....	105
2.2.2. Modelo do aPC e conectividade.....	106
2.2.3. Parâmetros de dados experimentais adicionados ao modelo do aPC	107
2.2.4. Parâmetro de atividade dos neurônios e plasticidade sináptica	107
2.2.4.1. Neurônios	107
2.2.4.2. Plasticidade sináptica	109

2.3. Simulações	110
2.3.1. Relação <i>input-output</i> das células piramidais artificiais do aPC	110
2.3.2. Processamento do odor no aPC artificial em P5-P8 e P14-P17	111
2.3.2.1. Condições de processamento de odor simuladas	111
2.3.2.2. Consideração do ritmo respiratório na simulação	112
2.3.2.3. Saídas das simulações e parâmetros de análises	112
3. Resultados	113
3.1. Relação <i>input-output</i> das células piramidais	113
3.2. Processamento do odor no aPC artificial em P5-P8 e P14-P17	113
3.2.1. Resposta das células piramidais individuais para estimulação de odor	113
3.2.1.1. Odor de baixa intensidade	113
3.2.1.2. Odor de alta intensidade (com ação de NA).....	115
3.2.1.2.1. Período P5-P8.....	115
3.2.1.2.2. Período P14-P17.....	115
3.2.2. Padrão de atividade do aPC em resposta ao odor em P5-P8 e P14-P17.....	117
3.2.2.1. Odor de baixa intensidade	119
3.2.2.2. Odor de alta intensidade (com ação de NA).....	119
3.2.2.2.1. Atividade das células Mitral.....	119
3.2.2.2.2. Atividade das células Piramidais.....	119
3.2.2.2.3. Atividade dos interneurônios <i>feedforward</i> e <i>feedback</i>	126
3.2.3. Ganho na força de conexão sináptica	126
3.2.3.1. Na simulação do processamento de odor de baixa intensidade.....	127
3.2.3.2. Na simulação do processamento do odor de alta intensidade (com ação de NA).....	128
4. Discussão.....	129
4.1. Diferenças no processamento do odor no aPC em P5-P8 e P14-P17.....	130
4.1.1. No processamento de células piramidais individuais do aPC	130
4.1.2. No processamento da população de células piramidais no circuito integrado do aPC.....	131
4.1.2.1. Processamento de odor de baixa intensidade	131
4.1.2.2. Processamento de odor de alta intensidade (com ação de NA).....	132
4.2. Limitações do modelo computacional.....	133
4.2.1. Representação de uma população variável de células piramidais	133
4.2.2. Representação de duas fontes de inibição confiáveis no circuito aPC	134
4.2.3. Representação do ritmo de amostragem pela maturação do <i>sniffing</i>	134
4.3. Significância para os mecanismos do aprendizado de preferência do odor	135
Capítulo 6	136
Conclusões	136
1. Sumarização dos principais achados	136
1.1. As características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante o período sensível e pós-sensível do aprendizado do apego são diferentes	136
1.2. As propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais no aPC durante o período sensível e pós-sensível do aprendizado do apego são diferentes	137
1.3. O processamento do odor em condições etológicas no circuito integrado aPC durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego são diferentes.....	137
2. Contribuição da transmissão sináptica GABAérgica nos perfis de processamento neural de odor durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego	138
3. Contribuições para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no apego	139
Referências	142
Anexos.....	154

Lista de Figuras

Capítulo 1	18
Figura 1. 1. Níveis de organização do cérebro e representação canônica de um neurônio piramidal cortical e sequencia de operações funcionais	26
Capítulo 2	29
Figura 2.1 Transição no desenvolvimento do aprendizado do apego e circuito neural que suporta o aprendizado	33
Figura 2.2. Organização laminar do Bulbo Olfatório	41
Figura 2.3. Projeções centrais do Bulbo Olfatório	41
Figura 2.4. Localização, delimitação anatômica, arquitetura laminar e circuito do córtex piriforme anterior	44
Figura 2.5. Representação dispersa de odores no córtex piriforme.....	54
Capítulo 3	56
Figura 3.1. Oclusão nasal	61
Figura 3.2. Imagens de histologia mostrando cortes coronais de filhotes com oclusão nasal unilateral em P3 marcados com cresil violeta.	61
Figura 3.3. Identificação do córtex piriforme anterior (aPC) e visualização das células piramidais na camada 2/3.	65
Figura 3.4. Traçados representativos de registros das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) e miniatura (mIPSC)	69
Figura 3.5. Desenvolvimento pós-natal das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) e miniatura (mIPSC) nas células piramidais das camadas 2/3 no aPC.	70
Figura 3.6. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento das frequências das correntes pós-sinápticas espontâneas nas células piramidais da camada 2/3 do aPC em dois períodos de idade.	74
Figura 3.7. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento da amplitude das correntes pós-sinápticas espontâneas.	75
Figura 3.8. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento da cinética das correntes pós-sinápticas espontâneas (mIPSC) em P5-P8 e P14-P17.	76
Figura 3.9. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento nas correntes pós-sinápticas miniatura (mIPSC).	78
Capítulo 4	87
Figura 4.1. Mudanças na resposta do potencial de membrana para injeção de corrente em células piramidais em P5-P8 e P14-P18.	91
Figura 4.2. Mudanças nos parâmetros de potencial de ação com a idade.	94
Figura 4.3. Curva da relação corrente-resposta das células piramidais da camada 2/3 do AP em P5-P8 e P14-P17.	95
Figura 4.4. Características de disparo de PA das células piramidais do aPC em P5-P8 e em P14-P18.	96

Figura 4.5. Mudanças no padrão de disparo de spike com o desenvolvimento	97
Figura 4.6. Disparo espontâneo de PA em células piramidais em P5-P8 e P14-P17	98
Capítulo 5	103
Figura 5.1. Arquitetura neural do circuito artificial do sistema olfatório.....	105
Figura 5.2. Relação input-output das células piramidais artificiais do aPC.....	114
Figura 5.3. Registro de atividade de cinco células piramidais artificiais aleatórias do córtex piriforme anterior para a estimulação de odor baixa e alta intensidade em P5-P8 e em P14-P1	116
Figura 5.4. Raster-plot do processamento de um odor de baixa intensidade no circuito olfatório artificial representativo para P5-P8 e P14-P17.....	118
Figura 5.5. Raster-plot do processamento de odor de alta intensidade (com ação de NA) no circuito olfatório artificial representativo para P5-P8 e P14-P17.....	120
Figura 5.6. Taxa de disparo das células Mitral e Piramidal artificial durante o processamento de odor baixa e alta intensidade no sistema olfatório artificial correspondente a P5-P8 e P14-P17	124
Figura 5.7. Gráfico superposto das taxas de disparo das células Mitral e Piramidal artificiais durante o processamento de odor baixa e alta intensidade no sistema olfatório artificial entre P5-P8 e P14-P17	125
Figura 5.8. Variação do peso de conexão sináptica nas células mitrais e piramidais do circuito olfatório artificial para o processamento de odor baixa e alta intensidade correspondente a P5-P8e P14-P17.	127
Figura 5.9. Gráfico superposto da variação no peso de conexão sináptica nas células mitrais e piramidais do circuito olfatório artificial para o processamento de odor de baixa e alta intensidade em P5-P8 e P14-P17	128

Lista de Tabelas

Capítulo 3	56
Tabela 3.1. Desenvolvimento normal das propriedades das correntes inibitórias espontâneas (sIPSC) e miniaturas (mIPSC) pós-sinápticas mediadas por GABAAR	71
Tabela 3.2. Propriedades das correntes inibitórias espontâneas e miniaturas pós-sinápticas mediadas por GABAAR em animais com oclusão nasal unilateral	73
Capítulo 4	87
Tabela 4.1. Propriedades passivas e ativas das células piramidais da camada 2/3 do aPC	92
Capítulo 5	103
Tabela 5.1. Parâmetros de simulação do circuito olfatório para P5-P8 e P14-P17(em Anexo)	155
Tabela 5.2. Resultados da simulação do processamento do odor de alta intensidade (com ação de NA) para as células piramidais em P5-P8 e P14-P17 em cada ciclo respiratório	129

Capítulo 1

Introdução

O presente estudo aponta ao entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no apego, mediado por odor, do rato infante com sua mãe, por meio da análise do papel da transmissão sináptica GABAérgica no córtex piriforme anterior em dois períodos do desenvolvimento pós-natal. Neste capítulo, descreve-se a ideia da tese, motivação para a realização do estudo, tópico de estudo e hipóteses, estratégia metodológica para abordar as hipóteses e perguntas, descrição de objetivos e, finalmente, a descrição sobre a estrutura da tese.

1. Ideia da tese: uma jornada pessoal

A ideia de estudar a transmissão sináptica GABAérgica no córtex piriforme anterior surgiu quando revisava a literatura sobre a formação de apego nos roedores infantis. A formação do apego em roedores, ratos e camundongos, precisa de uma breve experiência com os estímulos da mãe, a qual resulta em preferências subsequentes pelas características da mãe. Os ratos nascem com limitadas habilidades sensoriais (cegos, surdos) e motoras, porém são capazes de se orientar para o ventre materno, localizar o mamilo da mãe e sugar o leite deste. Experimentos com ratos no período fetal (TEICHER; BLASS, 1977; PEDERSEN; BLASS, 1982; ABEL *et al.*, 1998; ALBERTS; RONCA, 2012) mostram que o feto é capaz de detectar sinais químicos presentes no líquido amniótico, e que o odor do líquido amniótico aprendido é o que guia o recém-nascido para encontrar rapidamente o mamilo materno e amamentar-se pela primeira vez, e não apenas pela exposição pré ou pós-natal a esse odor. Nos dias seguintes após o nascimento, os ratos neonatos (P1-P4) avaliados em testes de duas escolhas já mostram comportamentos organizados de orientação-aproximação, evidenciando preferências para o odor da mãe em relação à maravalha do ninho (POLAN; HOFER, 1998; POLAN; HOFER, 1999; POLAN *et al.*, 2002) e odor da maravalha do próprio ninho em relação à maravalha limpa (SCZERZENIE; HSIAO, 1977; CORNWELL-JONES; SOBRIAN, 1977). Os ratos infantis, na primeira e segunda semana pós-natal, continuam exibindo preferências consistentes guiadas pelo odor da própria mãe (POLAN; HOFER, 1998; AL AIN

et al., 2016; PERRY *et al.*, 2016) e do próprio ninho (GREGORY; PFAFF, 1971; CORNWELL-JONES; SOBRIAN, 1977). Em todos esses trabalhos, os filhotes apresentam preferências consistentes quando são desafiados a escolher entre um odor aprendido, materno ou do próprio ninho, em relação a um odor familiar, como a maravalha limpa. Curiosamente, quando filhotes dessas mesmas idades são desafiados a escolher entre dois odores altamente parecidos, essa preferência olfatória apresenta variações interessantes entre a primeira e terceira semana pós-natal.

Quando filhotes com idade superior a P10, ratos e camundongos, são avaliados em um teste de duas escolhas para escolher entre o odor do próprio ninho em relação a odor de outro ninho, correspondente a outra ninhada do mesmo estágio de lactação (da mesma cepa, alimentados com a mesma dieta, com o mesmo tipo de material de ninho e mantidos na mesma sala colônia), mostram preferência consistente pelo odor do próprio ninho. Porém, filhotes menores de P10 exibem comportamentos de orientação-aproximação semelhantes tanto para os odores do próprio ninho quanto para o odor do ninho de outra ninhada, indicando não preferência (GREGORY; PFAFF, 1971; MEYER; ALBERTS, 2016). Essa transição na acurácia discriminativa do odor aprendido, além do desenvolvimento nas habilidades sensoriais (visão, audição) e motoras, entre a primeira e a terceira semana pós-natal, sugere um refinamento paralelo nos centros de processamento e percepção do odor. Quais seriam os centros do sistema olfatório implicados no aprendizado desta preferência olfatória e no processamento deste odor?

Experimentos desenhados utilizando o paradigma de condicionamento clássico têm confirmado a natureza associativa do aprendizado de preferência olfatória nos roedores infantis, mediante o qual se presume que o filhote forma o apego com sua mãe, e também exploram o circuito neural que suporta esse aprendizado. A exploração comportamental com esse paradigma tem mostrado que ratos e camundongos infantis < P10 são mais sensíveis para formar preferências condicionadas a um odor artificial pareado com estimulação tátil no dorso do filhote usando um pincel suave (*stroke*), simulando as lambidas da mãe (MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015), ou odor pareado com o cuidado materno (SULLIVAN *et al.* 1990). Inclusive, um odor artificial pareado com estímulo nocivo, como *shock* elétrico na pata do filhote, induz preferência olfatória pelo odor condicionado dentro desse período (MORICEAU; SULLIVAN, 2005; RAINEKI *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2013). Posterior a esse período (>P10), o pareamento odor-*stroke* não induz mais preferência comportamental pelo odor condicionado nos roedores (WOO; LEON, 1987;

WILSON; SULLIVAN, 1994; SULLIVAN *et al.*, 2000a; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015) e o pareamento odor-*shock* elétrico não induz mais preferência pelo odor condicionado, pelo contrário induz consistente evitação comportamental (SULLIVAN; WILSON, 1995; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; RAINEKI *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2013). O aprendizado de preferência olfatória odor-*stroke* antes de P10 é suportado por um circuito neural que inclui o bulbo olfatório (BO) (WOO; LEON, 1987; SULLIVAN; WILSON, 1991; RANGEL; LEON, 1995; SULLIVAN *et al.*, 2000a; 2003; MORICEAU; SULLIVAN, 2004; LETHBRIDGE *et al.*, 2012) e o córtex piriforme anterior (aPC) (ROTH; SULLIVAN, 2005; FONTAINE *et al.*, 2013; MORRISON *et al.*, 2013), ambos modulados pela noradrenalina (NA). Assim, é possível que a transição na acurácia da discriminação do odor materno ou do próprio ninho aprendido ocorra por mudanças nesse mesmo circuito.

É interessante pensar que a reduzida discriminação (ou preferência não específica) que os roedores infantem mostram (<P10) para odores da mesma categoria (próprio ninho vs outro ninho) ocorre durante o período em que os filhotes são capazes de formar facilmente associações odor-*stroke*. Além disso, a discriminação desse odor aprendido surge durante o período em que os filhotes não são mais sensíveis a formar associações odor-*stroke* (>P10). Isso me levou a pensar que, possivelmente, os odores aprendidos (da mãe, próprio ninho, irmãos), em associação com as contingências maternas (leite, calor, lambidas, cuidado materno) durante o período sensível, são de uma categoria geral, os quais uma vez aprendidos, o odor do próprio ou outro ninho/mãe/irmãos, têm o mesmo valor para eliciar comportamentos de orientação-aproximação no filhote. Uma vez que o período de alto aprendizado de preferência olfatória associativa fecha, o odor aprendido ganha uma categoria diferente nos centros de processamento do odor e, dessa forma, melhora a capacidade discriminativa do filhote para o odor da mãe em relação a outros muito semelhantes. Nesse sentido, a transição da discriminação do odor aprendido seria também uma característica do desenvolvimento do apego nos roedores infantem.

Entre o BO e o aPC, o último está envolvido no processamento e na discriminação de odores (ISAACSON, 2010; WILSON; SULLIVAN, 2011). Além disso, especificamente, o circuito inibitório dentro do aPC está envolvido na integração e afinamento da atividade cortical para o *input* olfatório e na representação do odor (POO; ISAACSON, 2009; FRANKS; ISAACSON, 2006; LUNA; SCHOPPA, 2008; ISAACSON, 2010). Tanto estudos de potencial de campo evocado *in vivo* (SCHWOB *et al.*, 1984) quanto estudos de

imunohistoquímica da densidade sináptica inibitória (SARMA *et al.*, 2011) sugerem um gradual desenvolvimento da inibição no aPC entre a primeira e terceira semana pós-natal. Assim, surgiu a ideia de estudar a transmissão sináptica inibitória no aPC de ratos na primeira e terceira semana pós-natal, dois períodos-chaves onde ocorrem mudanças comportamentais para o aprendizado e expressão do apego.

2. Motivação do estudo

Em várias regiões cerebrais, a maturação do sistema inibitório está relacionada com o aparecimento de formas mais finas de processamento sensorial e motor, e inclusive, emocional; e durante o período de maturação, o sistema inibitório suporta um processamento neural diferenciado nas regiões corticais, e, às vezes, conforma períodos críticos de plasticidade neural. Em certos córtices sensoriais, a maturação do sistema inibitório inclusive abre períodos críticos, como é o caso para a organização colunar competitiva da dominância ocular no sistema visual. É possível também que no córtex piriforme anterior existam mudanças críticas no processamento olfatório, as quais podem estar relacionadas às particularidades dos estágios do desenvolvimento do sistema inibitório.

Considero que conhecer as características da transmissão GABAérgica no aPC durante a primeira e terceira semana pós-natal contribuirá para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no processamento e aprendizado associativo de odor nesses períodos. Além disso, a literatura não apresenta dados sobre a transmissão sináptica GABAérgica nos períodos do desenvolvimento mencionados, dessa forma, os resultados do presente trabalho poderiam contribuir com conhecimento básico nesse campo e beneficiar estudos de modelagem e simulação computacional, com uma abordagem integrativa, para a compreensão de um fenômeno no desenvolvimento pós-natal envolvendo o sistema olfatório.

3. Tópico e perguntas de pesquisa

Pouco se conhece sobre a ontogenia da função inibitória no aPC. Sabe-se por estudos de potencial de campo, que a atividade cortical evocada por estimulação elétrica do trato olfatório lateral (LOT) aparece no início da primeira semana pós-natal associada com o componente da atividade cortical inibitória que progressivamente se evidencia e atinge um padrão semelhante ao adulto ao redor de P14 (SCHWOB *et al.*, 1984). Esses dados são coerentes com estudos de imunohistoquímica realizados em ratos (WESTRENBROEK *et al.*,

1998) e camundongos (SARMA *et al.*, 2011) que demonstram o aparecimento das primeiras sinapses inibitórias funcionais em P6-P7 e estabelecem o perfil adulto em torno de P21. Desse modo, esses dados sugerem que a transmissão sináptica GABAérgica no aPC também se encontra funcional na primeira semana pós-natal e muda com o avanço do desenvolvimento. Contudo, quais serão as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante o primeira e terceira semana pós-natal? Essas características são semelhantes ou diferentes nesses períodos? Estabelecer as características da transmissão sináptica GABAérgica durante esses períodos permitirá abrir *insights* sobre como opera o sistema GABAérgico durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego. Mas, antes disso, caso essas características da transmissão sináptica GABAérgica sejam semelhantes ou diferentes nesses dois períodos, a seguinte questão a resolver seria como essas características contribuem para um processamento neural diferencial do circuito olfatório nesses dois períodos.

Assim, o presente estudo foca na abordagem das seguintes perguntas:

1. Quais são as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante os períodos sensível (<P10) e pós-sensível (>P10) do aprendizado do apego? Essas características são semelhantes ou diferentes entre esses períodos?
2. Tais características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC, semelhantes ou diferentes, nos períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego, integrados em um circuito neural, contribuem com um padrão de processamento neural diferencial em cada período?

4. Hipóteses específicas

Considerando que, o aparecimento da função inibitória cortical gradualmente amadurece de P1 até atingir um perfil semelhante ao adulto em P14 (SCHWOB *et al.*, 1984) e que as sinapses inibitórias maduras aparecem em P5-P7, com densidade constante até P14 e após com rápido incremento (SARMA *et al.*, 2011), com modificações na forma e extensão dos pontos sinápticos sobre os dendritos das células piramidais do aPC (WESTRENBROEK *et al.*, 1998), pensamos que a transmissão sináptica GABAérgica no aPC entre a primeira e terceira semana pós-natal se desenvolve refletindo tais mudanças. Assim, para responder a primeira pergunta, propomos as seguintes hipóteses a serem testadas experimentalmente:

1. Semelhante ao desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica em outros córtices e áreas cerebrais em desenvolvimento do rato (OKADA *et al.*, 2000;

BOSMAN *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2008; BEN-ARI *et al.*, 2012; EHRLICH *et al.*, 2013), a transmissão sináptica GABAérgica no aPC altera-se, principalmente, nas seguintes características entre a primeira e terceira semana pós-natal: duração da transmissão sináptica, frequência da transmissão sináptica, dinâmica de ativação das correntes pós-sinápticas mediadas por receptor GABA_A e potencial de reversão das correntes pós-sinápticas mediadas por receptor GABA_A.

Por outro lado, o desenvolvimento da transmissão sináptica excitatória no aPC é modulado pela atividade sensorial olfatória no início da vida e, na ausência dessa atividade, a maturação da plasticidade é demorada (FRANKS; ISAACSON, 2005). Em outros córtices, o desenvolvimento inicial da transmissão sináptica GABAérgica também é modulada pela experiência sensorial (JIAO *et al.*, 2006; KRECZKO *et al.*, 2009; GAINEY *et al.*, 2016). Assim, pensamos também que:

2. No aPC, o desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica é modulado pela experiência olfatória e na ausência de estimulação olfatória ocorre modificações nas propriedades da transmissão sináptica GABAérgica em desenvolvimento.

Para a segunda pergunta não oferecemos hipóteses específicas, pois ela foi explorada como um todo em um estudo de abordagem integradora, a qual se discute na seção seguinte.

5. Abordagem metodológica

Pergunta 1: Quais são as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego? Essas características são semelhantes ou diferentes entre esses períodos?

Para o estudo das características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC propomos um estudo eletrofisiológico em nível celular. No córtex aPC, os interneurônios GABAérgicos estão distribuídos em todas as camadas e formam sinapses com as células piramidais da camada 2/3 ao longo do comprimento dos seus dendritos apical distal, proximal, basal e soma (uma descrição detalhada sobre a organização do circuito intracortical inibitório se encontra no **Capítulo 2**). Para estudar a transmissão sináptica GABAérgica existem duas estratégias eletrofisiológicas principais: registro de potencial inibitório pós-sináptico e registro de corrente inibitória pós-sináptica nas células que recebem o *input* GABAérgico. As duas estratégias, uma medindo a mudança de potencial e a outra a mudança da corrente, conseguem refletir a ação imediata prévia de um evento de transmissão sináptica na célula.

Para o estudo das características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC propomos um **estudo eletrofisiológico das correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas (sIPSC)** mediadas por ativação dos receptores GABA_A nas células piramidais do aPC. As sIPSC refletem a soma de muitas sinapses GABAérgicas resultantes da liberação de GABA, seja por ação dependente ou independente de potencial de ação (*input* do LOT ou das próprias piramidais recorrentes, veja o Capítulo 2) sobre as células pré-sinápticas GABAérgicas. O estudo das correntes foi realizado nas células piramidais do aPC em dias representativos dos períodos sensível e pós-sensível para o aprendizado do apego, mediante *whole-cell patch-clamp voltage clamp*. Essa estratégia permite registrar os eventos sinápticos, a cinética de ativação e a inativação das correntes, em uma ordem temporal de dezenas de milissegundos. Os detalhes do desenho experimental e teste de hipóteses para a pergunta 1 se encontram descritos no **Capítulo 3**.

Pergunta 2: Tais características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC, semelhantes ou diferentes nos períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego, integrados em um circuito neural, contribuem com um padrão de processamento neural diferencial em cada período?

A abordagem da segunda pergunta implica a integração dos dados eletrofisiológicos da transmissão sináptica GABAérgica (sIPSC) em dois períodos do desenvolvimento pós-natal em um circuito neural. Um **circuito neural** representa a organização de vários níveis biológicos, no qual a sinapse é o elemento estrutural e funcional unitário (**Figura 1.1 A**) (SHEPHERD, 2004). Os nossos dados de sIPSC representam os padrões de conexão sináptica e interação de vários pontos sinápticos distantes em uma célula (nos espinhos dendritos, nos dendritos, no soma), caracterizando o microcircuito (SHEPHERD, 2004). Porém, somente com os dados do **microcircuito** não poderíamos inferir nada funcional para o circuito neural, pois este se encontra várias escalas de organização acima. O nível hierárquico mais próximo do microcircuito é o **neurônio**. Assim, para obtermos dados para esse nível biológico desenhamos um estudo experimental eletrofisiológico *whole-cell patch-clamp* na configuração *current-clamp*. Nas mesmas condições de preparação de fatias cerebrais correspondentes a filhotes de rato, foram obtidos registros das propriedades intrínsecas de membrana e de propriedades de disparo das células piramidais do aPC. Os detalhes do desenho experimental, análise de dados e resultados se encontram descritos no **Capítulo 4**.

Com os dados experimentais do neurônio, modelamos um **circuito regional do aPC**. O modelo artificial do aPC representa os elementos básicos do circuito local: número de

neurônios piramidais com regras de conexão com um grande conjunto de outros neurônios piramidais e interneurônios GABAérgicos. Para a modelagem do circuito, o neurônio piramidal foi modelado com a complexidade necessária para representar o neurônio real (**Figura 1.1 B**) (SHEPHERD, 2004). No nosso modelo, a **arquitetura do neurônio**, que integra os nossos próprios dados experimentais das propriedades intrínsecas da membrana e padrão de atividade neural das células piramidais, integra os seguintes níveis de organização (**Figura 1.1 C**):

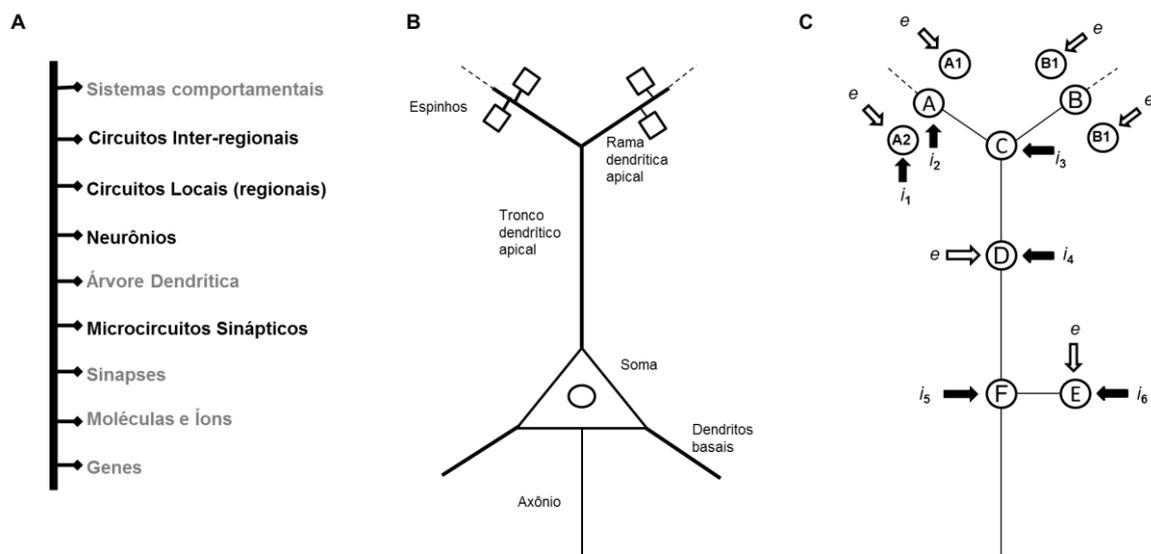
1. Divisão das árvores dendríticas basal e apical (os pontos de integração dos *inputs* na célula);
2. Diferentes *inputs* sinápticos excitatórios e inibitórios em níveis distintos das árvores dendríticas apical e basal;
3. Axônios que enviam seus colaterais e estabelecem sinapses sobre outros neurônios vizinhos e, também, distantes.

Baseado nessa arquitetura do neurônio piramidal foi modelado o seguinte nível hierárquico, o **circuito regional do aPC**. O circuito é capaz de representar a interação entre neurônios dentro do aPC, incluindo todos os níveis de organização prévios, além das conexões colaterais de axônios, circuitos excitatório e inibitório *feedforward* e *feedback*; e excitação recorrente. O nosso modelo artificial do circuito regional do aPC também conecta com um circuito regional do BO, constituindo um **circuito integrado** especializado em processamento do odor (**Capítulo 5, Figura 5.1**).

Uma vez que os nossos dados experimentais do neurônio piramidal foram integrados ao circuito integrado BO-aPC, a seguinte etapa foi o **desenho de um experimento de simulação computacional** para explorar, neste último circuito, o modo de contribuição das características de transmissão sináptica GABAérgica do aPC, perfis da primeira e terceira semana pós-natal, no processamento do odor. O desenho experimental buscou representar o processamento de odor em um contexto etológico comum dos ratos infantis dessas idades: 1) os filhotes e a mãe dentro ou fora do ninho, com o odor do ninho ou o odor da mãe sendo constante para os filhotes; 2) a mãe, eventualmente, lambendo os filhotes dentro do ninho e o odor dela ou do ninho é reforçado pelas lambidas. Essas duas condições foram simuladas no nível do circuito integrado BO-aPC. Para representar a condição 1, foi simulada a atividade do circuito integrado BO-aPC apenas para um odor constante de baixa intensidade. Para representar a condição 2 foi simulada a atividade do circuito para estimulação constante de odor de alta intensidade junto com a ação da noradrenalina. Os resultados das simulações

foram analisados considerando, comparativamente, os períodos, e a partir deste se discutem as possíveis contribuições distintas no processamento neural do circuito regional do aPC das características da transmissão sináptica GABAérgica em dois períodos do desenvolvimento. Os detalhes do desenho experimental, análise de dados e resultados se encontram descritos no **Capítulo 5**.

Figura 1. 1. Níveis de organização do cérebro e representação canônica de um neurônio piramidal cortical e sequência de operações funcionais



A. Múltiplos níveis de organização do cérebro. O presente trabalho integra os níveis grifados em negrito. Os nossos dados experimentais correspondem aos níveis *microcircuitos sinápticos* e *neurônios*. O modelo computacional que foi usado contempla os níveis *circuitos locais* ou *regionais do aPC* e integra com o circuito do BO conformando o *circuito inter-regional* ou *integrado* para processamento de odor. **B.** Representação canônica de um neurônio piramidal cortical. **C.** Representação abstrata de um neurônio piramidal com um sistema de séries de compartimentos integrativos e a sequência de operações funcionais. Cada compartimento está representado pelas letras A-F e formam uma subunidade local para o processamento de informação. Os sítios principais de *inputs* excitatórios são os espinhos A₁ e A₂ e a sua interação podem gerar um processamento de informação local específico e mudanças de atividade dependente local. A atividade nos ramos dendríticos B e C são somados no ponto D, esse ponto atua como um ponto de decisão local na passagem de informação para o soma. Se essa atividade se espalhar à o soma, depende da ação do *gating* modulatório pelos *inputs* excitatórios (*e*) e inibitórios (*i*) ao longo da extensão do dendrito apical (D). O ponto F é um estágio de somação entre as atividades espalhadas para o soma dos dendritos apicais (D) e basais (E). No soma (F) também chegam *input* diretos, muitos deles inibitórios (*i*), os quais provêm uma integração e modulação global do *output* neuronal. Uma vez que o impulso nervoso é iniciado no cone axonal, se propaga pelo axônio, mas também retropropaga aos dendritos. (Modificado de SHEPHERD, 2004, Cap 1. *The Synaptic Organization of the Brain*, 2004, Fifth Edition, Oxford University Press).

6. Objetivos

Objetivos gerais

1. Descrever as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante os períodos sensível e pós-sensível para o aprendizado do apego;
2. Explorar a contribuição das características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC, em um circuito neural artificial integrado do BO-aPC, para o processamento do odor durante os períodos sensível e pós-sensível para o aprendizado do apego.

Objetivos específicos

1. Caracterizar o perfil do desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica mediante registro eletrofisiológico das células piramidais da camada 2/3 do aPC nos períodos de idade P5-P8 e P14-P17, e determinar os efeitos da privação sensorial olfatória precoce;
2. Caracterizar o perfil maturacional das propriedades intrínsecas ativas e passivas das células piramidais da camada 2/3 do aPC nos períodos de idade P5-P8 e P14-P17;
3. Modelar um circuito neural artificial do aPC, integrando o perfil da transmissão sináptica GABAérgica e as propriedades intrínsecas ativas e passivas das células piramidais de P5-P8 e P14-P17, e simular o funcionamento do circuito nos dois períodos para o processamento de odor.

7. Estrutura da tese

A presente tese estrutura-se em seis capítulos e um anexo. A seguir descrevemos brevemente o teor de cada capítulo. No **Capítulo 2** realizamos uma discussão do referencial teórico com explicação do fenômeno de interesse. O **Capítulo 3** descreve o primeiro estudo de natureza experimental, realizado para investigar as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC dos filhotes de rato, em dois períodos do desenvolvimento pós-natal. Neste apresentamos a introdução, as descrições da metodologia e dos resultados, bem como discussões específicas dos achados. O **Capítulo 4** contém o segundo estudo de natureza experimental, realizado para investigar as características das propriedades intrínsecas passivas e ativas da membrana das células piramidais do aPC, em dois períodos do desenvolvimento pós-natal. Além disso, compreende também uma introdução, descrições de metodologia e resultados; e discussões específicas para os achados. O **Capítulo 5** apresenta um estudo de

natureza computacional, no qual integramos os dados experimentais obtidos nos capítulos 3 e 4 em um modelo computacional do circuito BO-aPC, com o propósito de explorar as perguntas sobre as características de processamento do odor nos dois períodos de idade. Neste apresentamos também a introdução, a descrição da metodológica da modelagem e simulação computacional, a descrição dos resultados e as discussões específicas para os achados. Finalmente, no **Capítulo 6** encerramos com conclusões gerais sobre a pesquisa, resumizando as principais contribuições do trabalho além de descrever as principais linhas futuras que se derivam da presente pesquisa. No **Anexo**, encontra-se os parâmetros da simulação e o artigo publicado.

O objetivo do **Capítulo 1** foi introduzir as perguntas de pesquisa, clarificar o porquê da realização do estudo, modo de abordagem das hipóteses e perguntas exploradas, e como o estudo seria reportado nas seguintes seções da tese.

Capítulo 2

Referencial teórico

Na seção inicial desse capítulo, descrevemos o referencial teórico no qual o presente trabalho se baseia. Em um primeiro momento, são discutidos estudos experimentais sobre a natureza aprendida da formação do apego em roedores e a exploração de circuitos neurais envolvidos sob a luz do paradigma do condicionamento Pavloviano ou clássico. Em seguida, é discutida a organização do sistema olfatório, mecanismos de plasticidade sináptica e modulação noradrenérgica e desenvolvimento pós-natal do sistema olfatório.

1. Aspectos comportamentais e mecanismos neurobiológicos do apego

1.1. Apego dos infantes com sua mãe

No campo da psicologia, o apego se refere a uma conexão emocional que os infantes humanos estabelecem com um adulto (a figura de apego), o qual é caracterizado por comportamentos que envolvem a procura de proximidade com esta figura, especialmente quando os infantes experimentam situações assustadoras ou desconfortantes (BOWLBY; 1984). Esses comportamentos teriam a função de garantir o acesso ao abrigo, proteção, alimento e a proximidade física com a mãe, essenciais para a sobrevivência do infante (BOWLBY; 1984; SULLIVAN, 2017).

Acredita-se que o comportamento de apego dos infantes com sua mãe/cuidador seja formado nas interações com a mãe/cuidador, e as variações no padrão de comportamento materno ou a separação da mãe pode modificar o padrão do apego e sua organização (BOWLBY; 1984; HOFER, 2009; LUCION; BORTOLINI, 2014; RAINEKI *et al.*, 2014; SULLIVAN, 2017).

1.2. Aspectos comportamentais do apego em roedores infantes

A existência do comportamento de apego em espécies de aves e mamíferos tem levado a explorar questões sobre a formação do apego, sua manutenção, desenvolvimento, causas e função em experimentos controlados, com perspectiva integradora da biologia e psicologia

em vários níveis de análises. Dentro desta perspectiva, estudos desenvolvidos com roedores têm provido importantes *insights* para o entendimento da formação do apego no início da vida e função da figura de apego no desenvolvimento fisiológico e comportamental do infante e os mecanismos neurais envolvidos. Contudo, neste estudo focamos somente nos aspectos comportamentais e neurobiológicos da formação do apego em roedores, ratos e camundongos.

1.2.1. Aprendizado do apego

O aprendizado é um dos processos biológicos que facilita a adaptação ao ambiente no qual se encontram os indivíduos em desenvolvimento. Esse ambiente pode ser o útero materno, o corpo da mãe, os irmãos-ninhada ou outros mais amplos no decorrer do desenvolvimento do animal. Em cada um desses ambientes, ou como Jeffrey Alberts chama “nichos ontogenéticos” (ALBERTS, 1994; 2008), os ratos recém-nascidos têm que aprender a encontrar o mamilo da mãe e sugar leite dele e encontrar o ninho ou a mãe e os irmãos quando se encontrarem fora ou longe deles. Essas tarefas também requerem certas habilidades para prever eventos importantes no ambiente, tais como: quando e onde mãe/calor/leite/ninho/irmãos estarão disponíveis. Tudo isso envolve aprendizado.

A formação do apego nos roedores, ratos e camundongos, precisa de uma breve experiência com os estímulos da mãe, os quais resultam em uma preferência pelas características aprendidas dela. Os ratos nascem com limitadas habilidades sensoriais (cegos, surdos) e motoras, porém são capazes de se orientar para o ventre materno, localizar o mamilo da mãe e sugar o leite dele. Experimentos com ratos no período fetal (TEICHER; BLASS, 1977; PEDERSEN; BLASS, 1982; ABEL *et al.*, 1998; ALBERTS; RONCA, 2012) têm mostrado que o feto é capaz de detectar sinais químicos presentes no líquido amniótico, e que o líquido amniótico aprendido é o que guia o recém-nascido a encontrar rapidamente o mamilo da mãe e amamentar pela primeira vez, e não apenas a exposição pré ou pós-natal a esse odor. O líquido amniótico liberado no parto e que fica na mãe seria espalhado no seu pelo por ela mesma, mediante frequentes lambidas que realiza durante e depois do parto, impregnando assim a região ventral e o mamilo dela com esse líquido, que contém os odores já aprendidos e guia o filhote para encontrar o mamilo e sugar o leite (ALBERTS, 2008). Apontando-se a possibilidade de que a liberação de grandes fontes de noradrenalina e dopamina no cérebro fetal durante o processo do parto, a saída do filhote pelo canal vaginal da mãe, seria o mediador do aprendizado do odor do líquido amniótico (ALBERTS, 1994; RONCA *et al.*, 1996; 2006; ALBERTS, 2008; ALBERTS; RONCA, 2012).

Nos dias seguintes após o nascimento, os ratos neonatos (P1-P4) avaliados em testes de duas escolhas já exibem comportamentos organizados de orientação-aproximação, evidenciando preferências para o odor da mãe em relação à maravalha do ninho (POLAN; HOFER, 1998; POLAN; HOFER, 1999; POLAN *et al.*, 2002), odor da maravalha do próprio ninho em relação a maravalha limpa (SCZERZENIE; HSIAO, 1977; CORNWELL-JONES; SOBRIAN, 1977) e odor da dieta materna (impregnada com odor artificial) em relação à dieta padrão (DUVEAU; GODINOT, 1988). Estudos experimentais com ratos infantis (primeira e segunda semana pós-natal) continuam a mostrar preferências consistentes guiados por odor da própria mãe (POLAN; HOFER, 1998; AL AIN *et al.*, 2016; PERRY *et al.*, 2016), do próprio ninho (GREGORY; PFAFF, 1971; CORNWELL-JONES; SOBRIAN, 1977) e da dieta materna (DUVEAU; GODINOT, 1988; SULLIVAN *et al.*, 1996; TERRY; JOHANSON, 1994). Esses trabalhos sugerem a ocorrência de algum tipo de associação entre o odor com uma gama de estímulos (calor, leite, tato, cuidado materno) mediando o aprendizado de preferência olfatória. Presume-se que essas associações acontecem durante e após o parto na interação mãe-infante dentro do ninho.

Experimentos desenhados usando o paradigma de condicionamento clássico têm confirmado a natureza associativa do aprendizado do apego e também tem permitido compreender as características particulares desse fenômeno, do qual apresentamos uma revisão a seguir.

1.2.1.1. Natureza associativa do aprendizado do apego

Um aprendizado de natureza associativa implica aprender a relação entre eventos no ambiente e a prever quais eventos ocorrerão juntos, sendo importante para adequar o comportamento nesse ambiente. O condicionamento clássico é o mecanismo mais simples pelo qual os organismos aprendem as relações entre os eventos. Os estudos experimentais que iremos descrever nesta seção são de natureza comportamental, os quais têm sido desenvolvidos dentro desse paradigma. Assim descreveremos brevemente a definição usada no paradigma dos elementos-chaves para formar a associação.

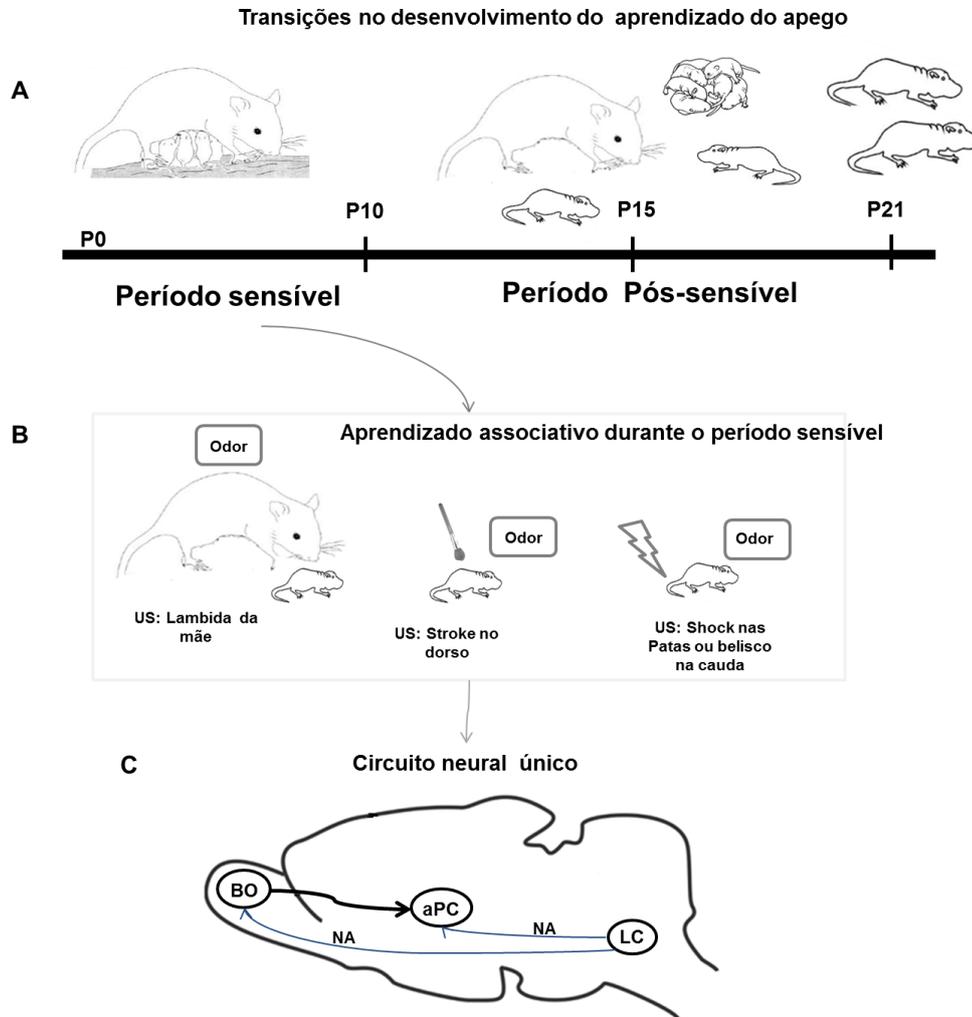
No paradigma do Condicionamento Pavloviano ou Clássico, os elementos-chaves que formam a associação são: 1) um estímulo que elicia uma resposta particular, sem necessidade de treinamento prévio, é chamado de estímulo incondicionado (US), e a resposta eliciada por ele denominada resposta incondicionada (UR); 2) um estímulo que não provoca uma resposta particular inicialmente, mas que depois o faz como um resultado de uma associação com um

estímulo incondicionado, é chamado de estímulo condicionado (CS), e a resposta eliciada por ele é chamada de resposta condicionada (CR). A consecução do condicionamento de uma CS depende da relação temporal da apresentação dos estímulos CS e US em vários ensaios (pareamento CS-US). Para medir o condicionamento do CS (magnitude, probabilidade ou latência da resposta condicionada) um novo ensaio é realizado, apresentando o CS sozinho (sem o US) (DOMJAN, 2010).

Usando um paradigma experimental de condicionamento clássico se demonstrou que filhotes de rato são capazes de aprender a relação temporal entre dois estímulos. O pareamento de um odor artificial (laranja ou menta) (CS) com saliva materna, infusão oral de leite ou vigoroso *stroke* no dorso do filhote (que simula as lambidas da mãe) (US) resulta em uma consistente resposta melhorada da atividade comportamental do filhote (movimento das patas, cabeça e corpo inteiro) (CR) para a apresentação do odor condicionado sozinho (CS), bem como uma preferência pelo odor condicionado (CR) em um teste de duas escolhas (odor CS vs maravalha limpa) medido como tempo de permanência ou número de visitas na área contendo o odor CS (SULLIVAN *et al.*, 1986a; SULLIVAN; LEON, 1986; WILSON *et al.*, 1987; SULLIVAN; LEON, 1987; WOO; LEON, 1987; DO *et al.*, 1988; SULLIVAN *et al.*, 1989a,b; SULLIVAN; WILSON, 1991; SULLIVAN *et al.*, 1991; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013). O mesmo protocolo de condicionamento clássico aplicado em filhotes de camundongos, também induz preferência olfatória para o odor condicionado (GHOSH *et al.*, 2015).

A particularidade desse condicionamento é que os filhotes de rato também mostram resposta semelhante para o pareamento de odor (CS) com uma estimulação dolorosa (belisco na cauda ou *shock* elétrico nas patas) (US) (SULLIVAN *et al.*, 1986a; 2000b; CAMP; RUDY, 1988; MORICEAU; SULLIVAN, 2004 b; 2005; RAINEKI *et al.*, 2009; UPTON; SULLIVAN, 2010; ROTH *et al.*, 2013), a qual, como veremos na seção seguinte, está restrita a um estágio específico do desenvolvimento do filhote (**Figura 2.1 A**).

Figura 2.1 Transição no desenvolvimento do aprendizado do apego e circuito neural que suporta o aprendizado



O apego do infante para sua mãe é guiado pelo odor dela, esse odor é aprendido e passa por transições antes do período do desmame (A). Na primeira semana pós-natal os filhotes confinados ao ninho (<P10) dependem dos cuidados da mãe para sobreviver, nesse período os filhotes aprendem associações de odor (CS) com estímulos incondicionados (US) tácteis (lambidas, da mãe ou *stroke* do dorso) e inclusive estímulo nocivo (*shock* elétrico) (B), que resultam em preferência pelo odor condicionado. Esse aprendizado é de natureza transitória e é suportado por um circuito neural único (C) que envolve o bulbo olfatório (BO) e córtex piriforme anterior (aPC) modulados pela noradrenalina (NA) liberada pelo locus coeruleus (LC). Posterior a esse período, conforme os filhotes ganham maturidade motora e sensorial, saem do ninho e exploram o ambiente ao redor, começam a apresentar formas de aprendizado associativo semelhante ao adulto, o qual não é mais suportado pelo circuito neural único (Gráfico modificado de DEBIEC; SULLIVAN, 2017; *The neurobiology of safety and threat learning in infancy*. *Neurobiology of Learning and Memory* 143 (2017) 49–58).

1.2.1.2. Períodos sensíveis para a formação do apego

Tem sido mostrado que os roedores infantis, ratos e camundongos, são mais sensíveis para formar preferências condicionadas para um odor artificial em um estágio específico do desenvolvimento. O condicionamento de odor-*stroke* em filhotes de rato induz uma efetiva preferência, expressada como comportamentos de orientação-aproximação pelo odor condicionado antes do P10 (WOO; LEON, 1987; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013). Porém, posterior a esse período, o pareamento odor-*stroke* não induz mais nos filhotes a mesma magnitude da resposta comportamental para apresentação do odor (WOO; LEON, 1987; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013) (**Figura 2.1 B**). Esse mesmo fenômeno também tem sido observado em camundongos infantis (GHOSH *et al.*, 2015).

Por outro lado, experimentos de condicionamento pareando um odor artificial (CS) com belisco na cauda ou *shock* elétrico (0,5 mA) nas patas (US) também têm mostrado diferenças nas respostas condicionadas limitadas a estágios específicos do desenvolvimento dos filhotes. Antes de P10, o pareamento do CS-US induz comportamentos de orientação-aproximação pelo odor condicionado (CAMP; RUDY, 1988; SULLIVAN *et al.*, 1986; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; RAINEKI *et al.*, 2009), porém posteriormente o pareamento CS-US induz comportamento de evitação para a apresentação do odor condicionado (CAMP; RUDY, 1988; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; RAINEKI *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2013). A resposta de orientação-aproximação dos filhotes <P10 não seria devido a falta de sensibilidade para a dor, pois durante os ensaios de pareamento CS-US eles mostram reações nociceptivas (vocalizações e tentativas de escape) (CAMP; RUDY, 1988; SULLIVAN *et al.*, 2000a; LANGUILLE *et al.*, 2009).

A ocorrência desse fenômeno em faixas iniciais do desenvolvimento pós-natal dos filhotes coincide com o período em que eles se encontram confinados no ninho. Assim, a inibição de aprendizado de evitação seria crucial para a sobrevivência do infante, pois enquanto se encontra dentro do ninho está exposto a eventuais pisadas, mordidas e manipulação brusca da mãe, as quais caso fossem aprendidas como estímulo aversivo levariam a evitar a mãe (SULLIVAN, 2001; 2003; SULLIVAN; HOLMAN, 2010). No momento em que os filhotes ganham mais habilidade motora, saem do ninho e exploram outros ambientes e coespecíficos (>P10) os aprendizados de preferências condicionadas de odores se tornam mais específicos e mais semelhantes ao animal adulto.

Desse modo, os dois fenômenos de aprendizado de preferência do odor condicionado com estimulação tátil ou estímulo aversivo em período anterior a P10 têm sido interpretados como um mecanismo adaptativo dos filhotes, permitindo o aprendizado do apego da mãe e suprimindo sua aversão (SULLIVAN; 2001; 2003; SULLIVAN; HOLMAN, 2010). O fechamento do período sensível parece ser dependente da modulação do sistema de estresse. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (incremento do hormônio corticosterona circulante), antes de P10, pode acelerar o fechamento do período sensível e a inibição farmacológica do sistema pode prolongá-lo (SULLIVAN, 2005; MORICEAU *et al.*, 2010; SULLIVAN; HOLMAN, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2017). Tem sido apontado o papel chave da presença da mãe na regulação do funcionamento do estresse, para o aprendizado de eventos aversivos e ameaça dos filhotes durante o período sensível, e na transição para períodos posteriores (BERTOLUS *et al.*, 2016; GUNNAR; SULLIVAN, 2017; DEBIEC; SULLIVAN, 2017; SANTIAGO *et al.*, 2017).

Como veremos na seção seguinte, as características do **aprendizado de preferência olfatória** durante o período sensível são atribuídas ao suporte de um circuito neural único de aprendizado nos filhotes (**Figura 2.1C**).

1.3. Mecanismos neurobiológicos do aprendizado do apego

1.3.1. Circuito neural envolvido no aprendizado do apego

Usando o modelo de condicionamento clássico em filhotes de roedor, tem sido proposto que o mecanismo neural subjacente a esse fenômeno é um circuito transitório de aprendizado, que inclui uma massiva liberação de noradrenalina (NA) do locus coeruleus (LC) no bulbo olfatório (WOO; LEON, 1987; SULLIVAN; WILSON, 1991; RANGEL; LEON, 1995; LANDER; SULLIVAN, 1999; SULLIVAN *et al.*, 2000a; SULLIVAN, 2003; MORICEAU; SULLIVAN, 2004; LETHBRIDGE *et al.*, 2012) e no córtex piriforme anterior (aPC) (ROTH; SULLIVAN, 2005; FONTAINE *et al.*, 2013; MORRISON *et al.*, 2013), com subsequente indução de plasticidade estrutural e funcional nessas regiões (YUAN *et al.*, 2014). A ação da NA nas duas regiões é considerada necessária e suficiente para o aprendizado de preferência do odor condicionado.

Esse circuito parece não suportar mais esse aprendizado após o dia P10, pois o pareamento odor-*stroke* não induz mais preferência comportamental pelo odor condicionado nos roedores (WOO; LEON, 1987; WILSON; SULLIVAN, 1994; SULLIVAN *et al.*, 2000a;

MORICEAU; SULLIVAN, 2005; ROTH *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015) e nem mudanças no bulbo olfatório (WOO; LEON, 1987). Por outro lado, o pareamento odor-*shock* elétrico depois de P10 não induz mais preferência pelo odor condicionado, pelo contrário, induz consistente evitação comportamental (SULLIVAN; WILSON, 1995; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; RAINEKI *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2013). Esse último fenômeno, tem sido explicado como uma transição no circuito neural que suporta o aprendizado de evitação-aversão, para o qual se sugere progressivo envolvimento da amígdala, modulado pelo hormônio corticosterona (SULLIVAN, 2005; MORICEAU; SULLIVAN, 2005; UPTON; SULLIVAN, 2010), e da porção posterior do córtex piriforme ao invés do anterior (RAINEKI *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2013).

1.3.1.1. Mudanças no bulbo olfatório

O aprendizado de preferência olfatória condicionada odor-*stroke* ou odor-*shock* elétrico (0,5 mA) melhora a atividade do BO dos roedores infantis antes do P10 (SULLIVAN; WILSON, 1991a; SULLIVAN; WILSON, 1991b; SULLIVAN; WILSON, 1995; ROTH *et al.*, 2013). Esse aprendizado é mediado pela ativação noradrenérgica. Durante o condicionamento dos filhotes infantis, os níveis de NA se incrementam no BO (RANGEL; LEON, 1995) e têm sido mostrados que a liberação de NA é necessária para a aquisição do aprendizado de preferência olfatória nos roedores infantis (SULLIVAN *et al.*, 1991; SULLIVAN, WILSON, 1991a; SULLIVAN *et al.*, 2000a). O bloqueio de receptores β -adrenérgicos dentro do BO (SULLIVAN *et al.*, 1992) ou a lesão do LC, impedindo a liberação de NA (SULLIVAN *et al.*, 1994), previne esse aprendizado.

Interessantemente, o pareamento de odor com agonista β -adrenérgico isoproterenol via infusão, sistêmica ou dentro do BO (SULLIVAN *et al.*, 1991a; SULLIVAN *et al.*, 2000a), ou com estimulação, farmacológica ou elétrica, das fibras ascendentes do NA (SULLIVAN; WILSON, 1991a; SULLIVAN *et al.*, 2000a), na ausência de algum outro estímulo incondicionado ou reforçador, é suficiente para produzir respostas condicionadas de preferência para o odor. A ativação do locus coeruleus (LC) no BO posterior a P10 não suporta mais o aprendizado de odor (MORICEAU; SULLIVAN, 2004). De modo que, no BO, a ação da NA é tanto necessária quanto suficiente para induzir preferência olfatória para um odor condicionado.

As fibras noradrenérgicas que se projetam para o BO terminam em todas as camadas e o pareamento odor-*stroke* incrementa a liberação de NA no BO, porém só durante o período

sensível (RANGEL; LEON, 1995). Observa-se um incremento na atividade elétrica das células Mitrais (Mt) durante o pareamento do odor com estimulação elétrica da projeção do LC para o BO em comparação com o grupo controle (WILSON; SULLIVAN, 1992). Além disso, as células Mt de ratos infantis expostos somente à estimulação de odor mostram uma rápida habituação (WILSON; SULLIVAN, 1992), sugerindo que a ação da NA nas células Mt impede de se habituarem para o odor entrante durante o condicionamento.

A NA também atua em outro grupo de células, as células granulares (Gr), que são interneurônios inibitórios que modulam o *output* do BO através de células Mt adjacentes. A NA suprime a atividade das células Gr (TROMBLEY; SHEPHERD, 1992; WILSON; LEON, 1988) mediado por receptores $\alpha 2$ (PANDIPATI *et al.*, 2010). A ação inibitória da NA na atividade das células Gr libera do bloqueio às células Mt (inibe a inibição), mantendo as células Mt mais responsivas para o *input* entrante do odor (WILSON; SULLIVAN, 1994). Estudo *ex vivo* do BO tem mostrado também que a ação inibitória da NA é dependente da idade e da dose. Uma dose baixa suprime a IPSC nas células Mt, a qual é bloqueada por antagonista de receptor $\alpha 2$, ocorrendo esse efeito, principalmente, em filhotes <P14. De modo contrário, uma dose alta de NA melhora a IPSC nas células Mt mediante a ativação do receptor $\alpha 1$, principalmente depois de P14 (PANDIPATI; SCHOPPA, 2012).

Também se reporta a ação da NA, via ativação dos receptores β -adrenérgicos, no nível das sinapses intra-glomerulares. A expressão de receptores β -adrenérgicos parece estar localizada, principalmente, nas células periglomerulares (Pg) e Mt (YUAN *et al.*, 2003). Logo, a ação da NA parece ter efeito inibitório nas células Pg, pois a aplicação do agonista de receptores β -adrenérgicos, isoproterenol, suprime a atividade excitatória evocada das células Pg em resposta à estimulação elétrica do nervo olfatório (YUAN, 2009; YUAN *et al.*, 2014).

1.3.1.2. Mudanças no córtex piriforme anterior

Semelhante ao observado para o BO, tem sido apontado o papel modulador da NA no aPC. A ação da NA no aPC é tanto necessária quanto suficiente para o aprendizado de preferência olfatória inicial (YUAN *et al.*, 2014). A ação noradrenérgica no aPC atua mediante seus receptores α e β . O bloqueio dos receptores β -adrenérgico previne o aprendizado de preferência olfatória e a infusão local do agonista isoproterenol no aPC pareado com um odor induz preferência condicionada para esse mesmo odor. Além disso, a ativação dos receptores β -adrenérgicos melhora a plasticidade sináptica entre o LOT-aPC em

filhotes <P10 (MORRISON *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015, 2017). Não se conhece se esse efeito persiste depois de P10, como se tem descrito para o BO, porém registros eletrofisiológicos *in vitro* do aPC têm mostrado uma ação da NA dependente de dose e idade. Uma dose baixa e alta de NA induz um incremento na frequência das mEPSC e reduz a frequência das mIPSC das células piramidais da camada L2/3 em P8-P11, respectivamente. Contudo, em P14-P21, essas mesmas doses têm o efeito contrário, nas duas idades, mediados por receptores β e α -adrenérgicos (GHOSH *et al.*, 2015).

Além do papel da ativação dos receptores β -adrenérgicos também têm sido descrito o papel do receptor de glutamato NMDA, que ativa canais de cálcio tipo L (LTCC) nas células piramidais da camada L2 do aPC, considerado como importante para ao aprendizado de preferência olfatória durante o período sensível. O bloqueio local do receptor NMDA no aPC previne o aprendizado de preferência olfatória (MORRISON *et al.*, 2013; MUKHERJEE; YUAN, 2016) e a indução de LTP¹ *in vitro* (MORRISON *et al.*, 2013). A ativação dos LTCC nas células piramidais da camada L2 do aPC são dependentes da ativação dos receptores NMDA, e o bloqueio dos LTCC previne a formação de memória de preferência olfatória de 24 horas, mas não interrompe a de três horas, em roedores infantis no período sensível (MUKHERJEE; YUAN, 2016). Recentemente reportou-se que a ativação dos receptores β -adrenérgicos (usando o agonista isoproterenol) no aPC incrementa as correntes de cálcio, mediadas por canais LTCC, mensurados mediante *whole-cell* nas células piramidais da camada L2 em roedores infantis <P10, porém esse efeito do isoproterenol não foi mais observado em filhotes > P10 (GHOSH *et al.*, 2017).

Baseado nesses dados sugere-se que uma ação modulatória da NA, melhorando a excitação e reduzindo a inibição, seria o suporte do aprendizado da preferência do odor no aPC durante o período sensível nos roedores (GHOSH *et al.*, 2015); especificamente, a manutenção de uma plasticidade sináptica dependente de NMDA nas sinapses do LOT com as células piramidais da camada L2 (MUKHERJEE; YUAN, 2016), moduladas pela ativação dos receptores β -adrenérgicos (GHOSH *et al.*, 2017). Por outro lado, a falta de suporte dessa plasticidade (reduzida expressão receptores NMDA, canais LTCC e receptores β -adrenérgicos nas células piramidais da camada L2) caracterizaria a atividade do aPC nos filhotes maiores de > P10 (GHOSH *et al.*, 2017). Contudo, até o momento, não há estudos detalhados do desenvolvimento dos sistemas de neurotransmissão intracorticais no aPC, que

¹ LTP (do inglês Long-Term Potentiation), referido a uma forma de plasticidade sináptica que reflete a um aumento duradouro na força de transmissão sináptica.

permitam compreender o papel do aPC para o aprendizado de preferência olfatória no início do desenvolvimento pós-natal, com a mesma profundidade de estudo do BO para o mesmo fenômeno. Como veremos nas seções seguintes, o aPC piriforme sofre mudanças significativas no desenvolvimento dos sistemas de transmissão excitatórios e inibitórios, nos períodos coincidentes com o aprendizado de preferência olfatória. Conhecer melhor as características desses sistemas e seus modos de ação no processamento do odor, durante o período sensível de aprendizado do apego e no período pós-sensível, poderia abrir *insights* para a compreensão do papel do aPC no circuito BO-LC-Noradrenalina no suporte dos mecanismos de aprendizado de preferência olfatória.

1.3.1.3. Sistema Locus Coeruleus-Noradrenalina

A maior fonte de NA no sistema nervoso é o LC e tanto o BO quanto o aPC recebem *inputs* noradrenérgicos do LC (SHIPLEY *et al.*, 1985; McLEAN; SHIPLEY, 1991; ASTON-JONES, 2004). As células do LC respondem a diferentes estímulos sensoriais, especificamente quando ocorre uma mudança no ambiente, tais como a aparição de um evento novo ou inesperado; ou uma mudança nas contingências de estímulo-reforço dentro de uma situação de aprendizado em laboratório (BOURET; SARA, 2005). Tem sido proposto que as diferenças particulares entre o neonato e o rato adulto, na resposta para o estímulo do LC e os padrões de liberação de NA, medeiam a modulação diferente do funcionamento em curso do circuito neural olfatório, envolvido no aprendizado da preferência do odor. No roedor adulto, a resposta do LC para o estímulo sensorial é menos sensível, particularmente para estímulos não nocivos (ASTON-JONES; BLOOM, 1981; KIMURA; NAKAMURA, 1985; NAKAMURA; SAGAKUCHI, 1990), e ante a uma estimulação sensorial repetida mostra rápida habituação (KIMURA; NAKAMURA, 1985; VANKOV *et al.*, 1995).

O LC do rato infante é mais responsivo para o estímulo sensorial, incluindo estímulos nocivos ou não nocivos (ASTON-JONES; BLOOM, 1981; KIMURA; NAKAMURA, 1985; NAKAMURA; SAGAKUCHI, 1990) e falha na habituação em resposta à estimulação sensorial repetida (KIMURA; NAKAMURA, 1985; NAKAMURA; SAKAGUCHI, 1990). Além dessas diferenças, também tem sido mostrado que o LC em neonato libera, substancialmente, mais NA dentro do BO do que o LC de adulto (RANGEL; LEON, 1995). As mudanças no perfil de infante para adulto, na resposta para o estímulo do LC e na redução da liberação de NA, têm sido atribuídas à redução na expressão de auto-receptores $\alpha 1$ e a emergência da função inibitória dos auto-receptores $\alpha 2$, resultando em um decaimento rápido

(em poucos milissegundos) na atividade das células do LC em resposta a um estímulo sensorial (NAKAMURA; SAKAGUCHI, 1990; WINZER-SERHAN; LESLIE, 1997; HAPPE *et al.*, 2004). Tais particularidades no padrão de atividade do sistema LC-NA suportariam o aprendizado do odor condicionado com estimulação táctil no início da vida e também o fechamento do período sensível para esse aprendizado.

2. Organização estrutural e funcional do sistema olfatório

2.1. Bulbo olfatório principal

2.1.1. Visão geral

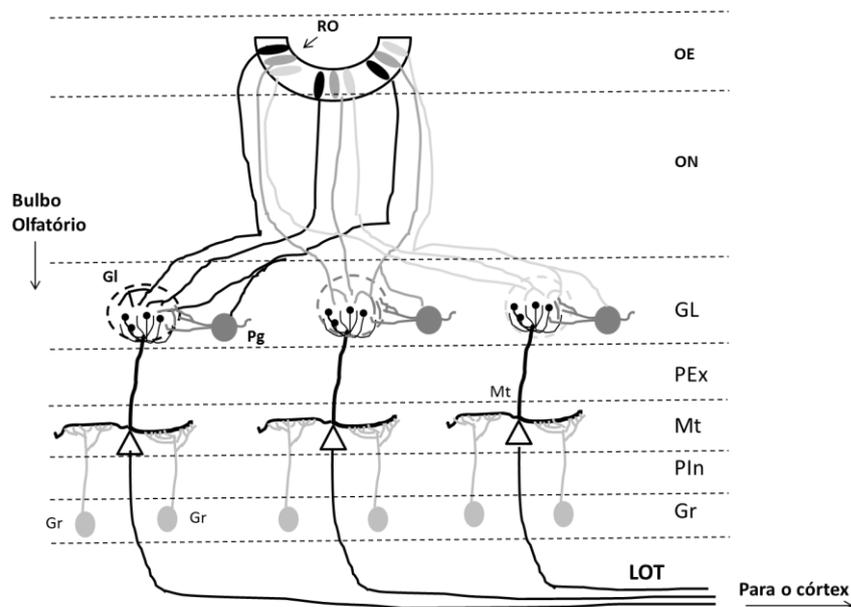
O bulbo olfatório (BO) é uma estrutura com camadas bem distinguidas (**Figura 2.2**). A camada mais superficial é o ponto de entrada dos terminais axonais dos neurônios sensoriais olfatórios (OSN). Em seguida, esses axônios fazem contato sináptico com os dendritos apicais das células Mitral (Mt) formando estruturas esféricas, chamadas glomérulos. Ao redor dos glomérulos se encontram os interneurônios periglomerulares (Pg) que formam contatos sinápticos com as células Mt e os OSN dentro dos glomérulos e também estabelecem conexão entre glomérulos. As células Mt se encontram na camada mais profunda e projetam seus axônios para regiões corticais pelo trato olfatório lateral (LOT). Na camada profunda se encontram as células granulares (Gr), interneurônios inibitórios, que estabelecem contatos sinápticos dendro-dendríticos de modo recíproco com os dendritos laterais das células Mt (SHEPHERD *et al.*, 2004).

No roedor adulto estimam-se aproximadamente 1.800 glomérulos distribuídos ao longo do BO (ROYET *et al.*, 1988; MOMBAERTS *et al.*, 1996), com axônios OSN expressando um mesmo tipo de receptor olfatório, convergindo dentro de um ou dois glomérulos no BO (MOMBAERTS *et al.*, 1996; IMAI; SAKANO, 2007; ZOU *et al.*, 2009), junto com os dendritos das células Mt. A inervação específica dos glomérulos pelos axônios OSN, expressando um único tipo de receptor, formam mapas randomicamente distribuídos ao longo do BO (VASSAR *et al.*, 1994; MORI, SAKANO, 2011; TAKEUCHI; SAKANO, 2014; ZAPIEC; MOMBAERTS, 2015).

Dentro dos glomérulos, as células Pg estabelecem sinapses dendro-dendríticas GABAérgicas com as células Mt (KOSAKA; KOSAKA, 2005; MURPHY *et al.*, 2005), as quais, por sua vez, estabelecem sinapses dendro-dendríticas glutamatérgicas com as células

Pg (SHEPHERD *et al.*, 2004). No roedor adulto estima-se um total aproximado de 30.000-40.000 células Mt (ROSSELLI-AUSTIN;ALTMAN, 1979, MESIAMI, 1989; RICHARD *et al.*, 2010), dessas 10-20 células projetam para cada glomérulo (RICHARD *et al.*, 2010; SOSULSKI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2016).

Figura 2.2. Organização laminar do Bulbo Olfatório



Os axônios dos OSN saem do OE e atravessam a placa cribiforme formando o nervo olfatório (ON) e terminam na camada superficial do bulbo olfatório (BO) estabelecendo sinapses com os dendritos apicais das células Mitrais (Mt) e os interneurônios periglomerulares (Pg), formando estruturas esféricas chamadas glomérulos (GL). Os corpos das células Mt se encontram na camada mais profunda (Mt) e lateralmente estendem seus dendritos sobre os quais se estabelecem sinapses dendro-dendríticas com as células granulares (Gr), com soma distribuídos mais profundamente. Entre a camada GL e a camada Mt se encontra uma camada formada pelos ramos dendríticos apicais e distais das células Mt (camada plexiforme externa). Entre a camada Mt e a camada Gr se encontra a camada plexiforme interna (Pin), formada pelos axônios das células Mt e os dendritos apicais das células Gr. Os axônios das células Mt saem do BO formando o trato olfatório lateral (LOT) e projetam para regiões centrais.

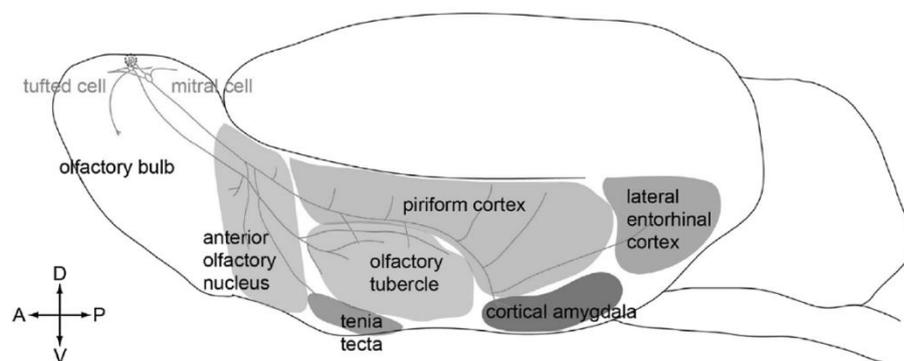
Por outro lado, as células Gr formam sinapses dendro-dendríticas recíprocas em espaços adjacentes com as células Mt. As células Gr recebem *inputs* excitatórios glutamatérgicos das células Mt e, por sua vez, essas recebem *inputs* GABAérgicos das células Gr (SHEPHERD *et al.*, 2007). A inibição gerada pelas células Gr sobre as células Mt depende da ativação de receptores NMDA nas células Gr (e não de AMPA) (SCHOPPA *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000). Propõe-se que para ativar os receptores NMDA nas células Gr e conseqüentemente liberarem GABA, a célula Gr recebe excitação axo-dendrítica de *inputs* corticofugais

(originados no córtex piriforme), os quais facilitam a ativação dos receptores NMDA para que a seguinte excitação dendro-dendríticas Mt-Gr possa, portanto, facilitar a inibição dendro-dendríticas Gr-Mt (BALU *et al.*, 2007).

2.1.2. Projeções do bulbo olfatório para regiões centrais

Os axônios das células Mt deixam o BO formando o LOT, que se estende ventralmente no cérebro (**Figura 2.3**). De cada axônio no LOT, saem vários axônios colaterais que deixam o LOT ao longo da sua extensão e se espalham obliquamente, entrando em várias regiões corticais (SHEPHERD *et al.*, 2004). A primeira projeção central é o núcleo anterior olfatório (AON), que recebe uma porção de axônios BO, ipsilateral e contralateral, bem como de projeções corticofugais de regiões olfatórias mais centrais. Uma porção importante de axônios das células Mt também se projeta, diretamente, para o córtex piriforme anterior (aPC), posterior (pPC) e córtex entorrinal ipsilateral. Esses córtices também recebem projeções importantes do BO e do AON contralateral via a comissura anterior (AC) (SHIPLEY *et al.*, 2004; IMAI, 2014).

Figura 2.3. Projeções centrais do Bulbo Olfatório



Os axônios das células Mitrais saem do bulbo olfatório e projetam diretamente para regiões corticais diversas, através do trato olfatório lateral (LOT). O gráfico é uma visão ventrolateral dessas projeções. Os terminais axônios do LOT saem perpendicularmente para entrar em cada região. As letras da A, D, P e V se referem a anterior, dorsal, posterior e ventral, respectivamente. (Gráfico tomado de IMAI, 2014; *Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 35 (2014) 180–188).

A formação do LOT antecede à formação anatômica do BO. No período embrionário E16-E17, antes mesmo dos glomérulos estarem formados, o LOT já se encontra estendido ao longo da porção ventral do cérebro do rato (SCHWOB; PRICE, 1984; MORIIZUMI *et al.*,

1995; LOPEZ-MASCARAQUE *et al.*, 1996) e começa a se mielinizar rapidamente entre P9 e P21 (SCHWOB *et al.*, 1984; MORIIZUMI *et al.*, 1995). A velocidade de condução no LOT é de 1 metro/segundo em P3-P10, de 2,7 metros/segundo em P15 e de 9,6 metros/segundo no adulto (SCHWOB *et al.*, 1984).

2.2. Córtex piriforme

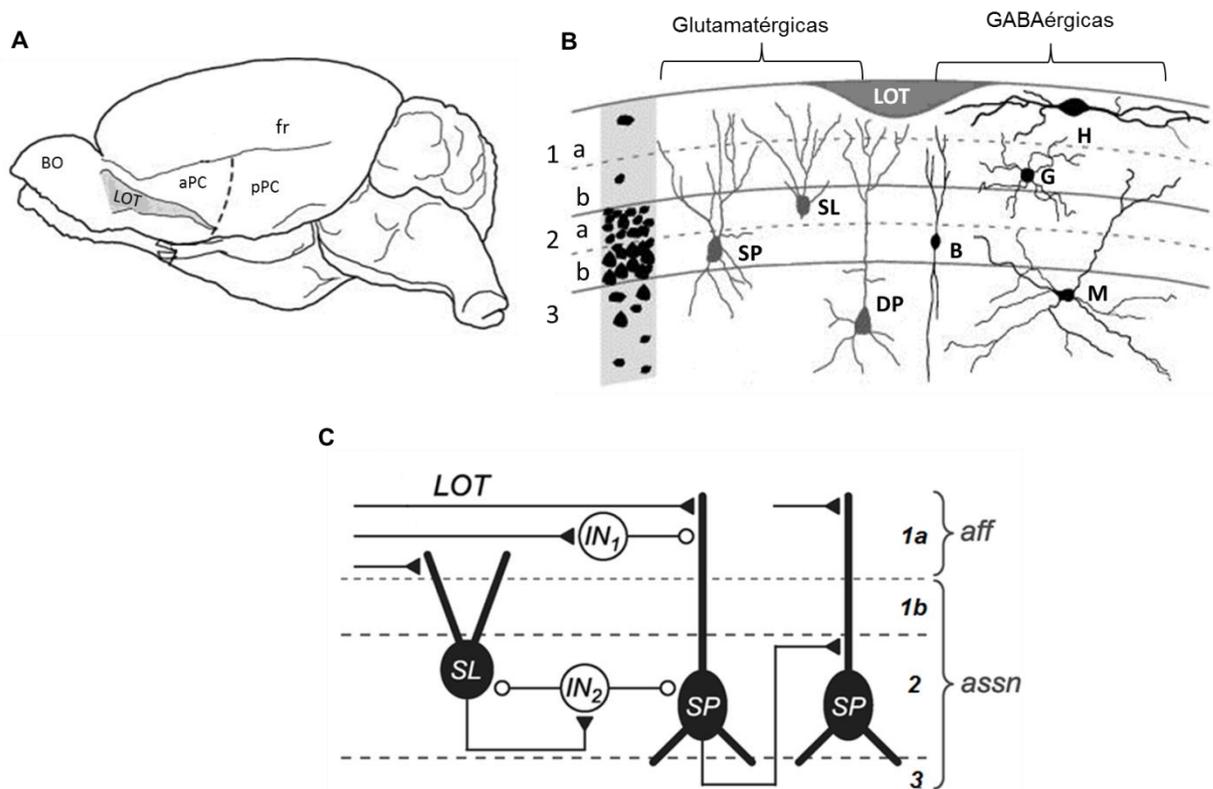
2.2.1. Demarcação anatômica

O córtex piriforme se estende ventralmente ao longo do cérebro, paralelo à fissura rinal, desde o final do tubérculo olfatório, na sua porção anterior, até o final da fissura rinal, na porção posterior. Em toda sua extensão, recebe *inputs* diretamente dos axônios das células Mt via o LOT (**Figura 2.3 A**). Descreve-se duas sub-regiões de córtex piriforme, o córtex piriforme anterior (aPC) e o córtex piriforme posterior (pPC). A demarcação anatômica entre as duas sub-regiões reside no estreitamento da densidade do LOT (**Figura 2.4A**) e internamente na extensão e espessura das suas camadas (NEVILLE; HABERLY, 2004). Além dessas subdivisões grossas, existem outras em cada sub-região caracterizadas pelas variações na espessura em alguma das suas três camadas (NEVILLE; HABERLY, 2004). Devido à relevância para o nosso trabalho, aqui focamos na descrição e discussão apenas do aPC.

2.2.2. Organização Laminar

Internamente, o aPC está organizado em três camadas (**Figura 2.4B**). A camada 1 (L1) é a mais superficial e contém terminais axonais, dendritos e um número reduzido de corpos neuronais, compondo-se de duas subdivisões, L1a e L1b. A camada L1a contém os terminais axonais das Mt, que saem do LOT, e a camada L1b contém os terminais axonais, que se projetam de outras regiões corticais olfatórias e não olfatórias, chamados de *inputs* associativos (NEVILLE; HABERLY, 2004; HAGIWARA *et al.*, 2012). A camada 2 (L2) contém uma grande densidade de corpos celulares das células piramidais superficiais (SP), células semilunares (SL) e, também, axônios dos *inputs* associativos (NEVILLE; HABERLY, 2004; BEKKERS; SUZUKI, 2013). A camada 3 (L3) contém, em menor densidade, os corpos das células piramidais profundas (DP) e os terminais axonais dos *inputs* associativos (NEVILLE; HABERLY, 2004; BEKKERS; SUZUKI, 2013). Nas três camadas também se encontram distribuídos interneurônios GABAérgicos de diversa morfologia (BEKKERS; SUZUKI, 2013).

Figura 2.4. Localização, delimitação anatômica, arquitetura laminar e circuito do córtex piriforme anterior



Visão ventrolateral de um cérebro de rato mostrando a extensão do LOT saindo do BO e se estendendo para o aPC e pPC. Uma maior extensão do LOT (cinza) caracteriza a região do aPC, organizados ventralmente à fissura rinal (*fr*) (A). Internamente o aPC está organizado em camadas bem definidas (B). A camada superficial (L1a) é o lugar de entrada dos terminais axônais do LOT. Nessa camada também se encontram alguns interneurônios GABAérgicos (H, horizontais; G, neurogliais; B, bastquet; M, multipolares) e predominantemente os ramos dos dendritos apicais das células semilunares (SL), piramidais superficiais (SP) e piramidais profundas (DP), com corpos nas camadas mais profundas (L2/3). Esses neurônios formam microcircuitos intracorticais excitatórios e inibitórios (IN1, inibição *feedforward*; IN2, inibição *feedback*) (C). Os dendritos apicais distais das células principais e os interneurônios na camada L1a recebem *inputs* diretos do LOT (*inputs* aferentes, *aff*). Nas camadas L1b, L2 e L2 se integram *inputs* excitatórios aferentes (LOT) e nas camadas L1b, L2/3 se integram vários *inputs* associativos (*assn*), tanto os provenientes de outras regiões corticais quanto os gerados dentro do próprio microcircuito (recorrentes excitatórias SP→SP, SL/SP/DP→interneurônios, interneurônios→SP). As células SP e DP são as que saem do aPC e projetam para outras regiões corticais e inclusive para o próprio BO (Gráficos foram tomados dos trabalhos de Suzuki; Bekkers, 2007. *Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex*, The Journal of Neuroscience, January 18, 2012, 32(3):919–931, 919/ *Inhibitory Interneurons in the Piriform Cortex*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (2007) 34, 1064–1069).

2.2.3. Células principais

O aPC contém vários tipos celulares, dentre esses descrevemos as células principais, que se caracterizam pela extensão de sua arborização dendrítica e axônios que se projetam para outras áreas (células piramidais superficial e profunda) e pela grande conexão associativa intracortical (células semilunares) (NEVILLE; HABERLY, 2004); e também interneurônios, que formam amplas conexões internas nas diferentes camadas do aPC (NEVILLE; HABERLY, 2004; BEKKERS; SUZUKI, 2013) (**Figura 2.4 B**). As três classes de células principais e as várias classes de interneurônios possuem diferentes características morfológicas e propriedades eletrofisiológicas intrínsecas (SUZUKI; BEKKERS, 2006; 2010a, b; 2011; CHOY *et al.*, 2017).

2.2.3.1. Células semilunares

As células semilunares (**SL**) são a população celular que se encontra em maior proporção na porção superficial da camada L2 do aPC e são também as mais abundantes do córtex piriforme. Morfológicamente se caracterizam por possuir: ramos dendríticos de curto alcance projetando apicalmente em direção à camada L1a e axônios que atingem horizontalmente a mesma camada, em direção à outras células piramidais; e colaterais para interneurônios nas camadas mais profundas do aPC, mas que não projetam para fora do aPC (SUZUKI; BEKKERS, 2006; HAGIWARA *et al.*, 2012; CHOY *et al.*, 2017; MAZO *et al.*, 2017).

2.2.3.2. Piramidais superficiais

As células piramidais superficiais (**SP**) têm seus corpos distribuídos majoritariamente na porção profunda da camada L2, e seus dendritos apicais se estendem em frondosas ramificações nas camadas mais superficiais. Seus dendritos basais se expandem radialmente desde o soma com profusão de pequenos espinhos dendríticos (SUZUKI; BEKKERS, 2011; HAGIWARA *et al.*, 2012; CHOY *et al.*, 2017). Os axônios mielinizados dessas células projetam para outras áreas olfatórias, ipsi e contralateralmente e ainda projetam de volta para o BO (NEVILLE; HABERLY, 2004; BALU *et al.*, 2007; MAZO *et al.*, 2017).

2.2.3.3. Piramidais profundas

As células piramidais profundas (DP) se encontram distribuídas na camada L3, estendendo um dendrito principal que se ramifica na camada L1 e apresentam também dendritos basais que se estendem horizontalmente na camada L3 (SUZUKI; BEKKERS, 2006; SUZUKI; BEKKERS, 2011; HAGIWARA *et al.*, 2012; CHOY *et al.*, 2017). São as células com maior extensão dendrítica no aPC e; semelhante às células SP, projetam seus axônios mielinizados para outras áreas olfatórias, ipsi e contralateralmente e também de volta para o BO (NEVILLE; HABERLY, 2004; BALU *et al.*, 2007; MAZO *et al.*, 2017).

2.2.3.4. Interneurônios

O aPC contém interneurônios que usam GABA ou outra substância como neurotransmissor (NEVILLE; HABERLY, 2004; BEKKERS; SUZUKI, 2013). Até o momento, têm sido identificadas sete classes de interneurônios que expressam diferentes marcadores moleculares e apresentam características morfológicas e eletrofisiológicas diferentes, sendo que a maior parte deles libera GABA como neurotransmissor (SUZUKI; BEKKERS, 2010 a, b). Esses interneurônios se encontram amplamente distribuídos nas três camadas do córtex piriforme e a maioria estende seus frondosos dendritos na mesma camada, porém alguns estendem densos dendritos basais e apicais nas três camadas do aPC (**Figura 2.3B**). Como veremos mais adiante, a posição desses interneurônios GABAérgicos em cada camada e o tipo de *input* que recebem são consideradas cruciais para a função inibitória intracortical (BEKKERS; SUZUKI, 2013).

2.2.4. Organização Sináptica Intracortical

As células descritas acima formam sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas em cada camada descrita (NEVILLE; HABERLY, 2004; BEKKERS; SUZUKI, 2013) (**Figura 2.3 C**).

2.2.4.1. Sinapses Excitatórias

As sinapses excitatórias glutamatérgicas dentro do aPC são estabelecidas pelos terminais axonais do LOT, pelas as células SL, SP e DP; e pelos *inputs* associativos provenientes de outros córtices olfatórios ou não olfatórios. As células piramidais recebem os *inputs* nos seus dendritos apicais. Os originados do BO terminam formando sinapses excitatórias nos dendritos distais das células SL, SP, DP e dos interneurônios na camada L1b,

enquanto que os *inputs* excitatórios associativos terminam formando sinapses nos dendritos proximais, basais ou soma das células SL, SP, DP; e interneurônios nas camadas L1b, L2/3 (NEVILLE; HABERLY, 2004; FRANKS; ISAACSON, 2005; BEKKERS; SUZUKI, 2013) (**Figura 2.4 C**).

2.2.4.2. Sinapses inibitórias

As sinapses inibitórias são estabelecidas pelos dendritos e axônios dos interneurônios GABAérgicos que se encontram distribuídos nas três camadas do aPC. As sinapses são estabelecidas nos dendritos apicais, proximais e basais e também no soma das células SL, SP e DP (**Figura 2.4C**).

2.2.5. Circuito neural

2.2.5.1. Aferentes

O primeiro circuito aferente é constituído pelos *inputs* que chegam do BO na camada L1a, onde estabelecem sinapses glutamatérgicas com os dendritos apicais distais das células SL, SP e DP (FRANKS; ISAACSON, 2005; BATHELLIET *et al.*, 2009); e com os dendritos dos interneurônios GABAérgicos (STOKES; ISAACSON, 2010). O segundo circuito aferente é constituído pelos *inputs* excitatórios que chegam de diversas regiões do córtex olfatório e também do lado ipsi e contralateral que chegam à camada L1b, chamados também de *inputs* associativos (NEVILLE; HABERLY, 2004; HAGIWARA *et al.*, 2012). Tem-se evidência de que as células piramidais, individualmente, recebem *inputs* sinápticos provenientes de diferentes glomérulos do BO (BATHELLIER *et al.*, 2009; APICELLA *et al.*, 2010). Tem sido proposto que cada célula piramidal recebe *inputs* de aproximadamente 200 aferentes do BO (DAVISON; EHLERS, 2011), sendo que cada terminal axonal Mt realiza cinco contatos sinápticos nesta célula (FRANKS; ISAACSON, 2006; BATHELLIER *et al.*, 2009; FRANKS *et al.*, 2011).

Das células piramidais, as células SL tendem a receber um *input* aferente do LOT mais forte, e as células SP e DP mais fraco (SUZUKI; BEKKERS, 2006; SUZUKI, BEKKERS, 2011; HAGIWARA *et al.*, 2012. BEKKERS; SUZUKI, 2013; CHOY *et al.*, 2017). Por outro lado, também tem sido sugerido que os interneurônios da camada L1a recebem seis vezes mais *inputs* das fibras do LOT do que os dendritos das células piramidais (STOKES; ISAACSON, 2010).

2.2.5.2. Eferentes

A principal projeção eferente do aPC é mediada pelos axônios das células SP e DP. As maiores projeções ocorrem para as próprias regiões olfatórias, como: córtex piriforme posterior, córtex entorrinal e também as projeções de tipo corticofugais para o núcleo anterior olfatório e BO. Projeções abundantes são também enviadas para: tálamo, hipotálamo, amígdala e regiões do córtex pré-frontal; e o córtex olfatório contralateral, mediante a comissura anterior (NEVILLE; HABERLY, 2004; SHIPLEY *et al.*, 2004; HAGIWARA *et al.*, 2012).

2.2.5.3. Autoassociativas

As células SL e SP recebem *inputs* associativos de outras áreas corticais olfatórias, ipsilateralmente e também contralateralmente via os *inputs* comissurais. As células SL tendem a receber *input* associativo mais fraco, comparado com o *input* aferente que recebem do LOT, enquanto que as células SP e DP recebem mais forte (SUZUKI; BEKKERS, 2006; SUZUKI, BEKKERS, 2011; HAGIWARA *et al.*, 2012. BEKKERS; SUZUKI, 2013; CHOY *et al.*, 2017).

As células piramidais do aPC também recebem *inputs* delas mesmas (*inputs* autoassociativos ou recorrentes), os quais formam sinapses nos dendritos apicais e proximais nas camadas L1b (SP e DP) (FRANKS; ISAACSON, 2005). As células SL inervam preferencialmente as células SP e DP na camada L3, mas não outras SL, e interneurônios GABAérgicos em L3(CHOY *et al.*, 2017). Assim, o principal circuito autoassociativo é formado pelas conexões sinápticas recorrente entre as células piramidais SP e DP. Cada célula piramidal recebe uma conexão recorrente de pelo menos outras 20% células piramidais, sendo que cada contato sináptico é uniquantal (FRANKS *et al.*, 2011).

2.2.5.4. Inibitório

O circuito inibitório é mediado por duas fontes de inibição sináptica sobre as células piramidais da camada L2 e L3 do aPC (*feedforward* e *feedback*).

2.2.5.4.1. Inibição *feedforward*

A inibição *feedforward* é formada pelos interneurônios na camada L1a que recebem *input* direto do LOT. Como mencionamos acima, os interneurônios na camada L1a recebem

alta convergência de *input* das células Mt, mais do que as células piramidais (STOKES. ISAACSON, 2010; STOKES *et al.*, 2014).

Tem sido descrito duas variantes de circuito: LOT→ célula horizontal→ SP/SL e LOT→ célula com forma neuroglial→ SL/SP (SUZUKI, BEKKERS, 2012), formando contatos sinápticos dispersos ao longo dos dendritos apicais distais das células piramidais da camada L2/3 (STOKES *et al.*, 2014).

2.2.5.4.2. Inibição *feedback*

A inibição *feedback* é formada pelos interneurônios camadas L1b e L2/3, que recebem *inputs* associativos, exclusivamente das células piramidais ativas, e que inibem preferentemente as células que os excitam (STOKES; ISAACSON, 2010), sendo LOT→ SL→ célula multipolar de disparo rápido o tipo de circuito mais comum (SUZUKI, BEKKERS, 2012; CHOY *et al.*, 2017). Propõe-se que a excitação recorrente sobre os interneurônios da camada L3 é mais forte do que a excitação recorrente entre as células piramidais (STOKES. ISAACSON, 2010), de modo que a inibição *feedback* provê uma inibição mais forte do que a inibição *feedforward* sobre as células piramidais das camadas L2/3 (FRANKS *et al.*, 2011; LARGE *et al.*, 2016a,b).

Além de promover inibição nas células piramidais, há evidência de que um grupo de interneurônios (que expressam somatostatina e com padrão de disparo regular e rápido) também inibe outros interneurônios inibitórios, na camada L2/3, e a si mesmos (LARGE *et al.*, 2016b).

2.2.6. Plasticidade sináptica

É sugerido que para manter uma representação invariante de características específicas de odores, a plasticidade dependente da atividade dos *inputs* do LOT poderia não ser necessariamente desejada. Em estudo de potencial de campo evocado em fatias de córtex olfatório de ratos adultos, a estimulação tetânica do LOT não induz de modo confiável LTP mediado por receptor NMDA (JUNG *et al.*, 1990). Além disso, a indução bem-sucedida de LTP foi difícil de alcançar e resultou em pequeno incremento de 10-15% da força sináptica (JUNG *et al.*, 1990; KANTER; HABERLY, 1990; KANTER; HABERLY, 1993).

2.2.7. Retropropagação de potencial de ação

É sugerido que a plasticidade LTP nas sinapses LOT-aPC nos dendritos apicais distais das células piramidais depende da retropropagação do potencial de ação nos dendritos distais das células piramidais, induzindo sinal de cálcio transitório. Em animal adulto, o pareamento de disparo pré e pós-sináptico leva a um sinal pequeno de cálcio transitório nos dendritos distais das células piramidais na camada L1b (*input* associativo), levando uma falha seletiva na indução de LTP na camada L1a, o qual pode ser recuperado melhorando o potencial de ação de retropropagação. Por outro lado, a indução de LTP pareando disparo pré e pós-sináptico pode ser induzida na camada L1b, porém requer disparo em *bursts*² da célula piramidal pós-sináptica (JOHENNING *et al.*, 2009).

2.3. Aspectos do desenvolvimento pós-natal do córtex piriforme

2.3.1. Organização laminar

As camadas do córtex piriforme começam a se formar ainda no período embrionário (MARTIN-LOPEZ *et al.*, 2017). No dia embrionário E19 observa-se a camada L1 sem distinção clara entre as suas porções L1a e L1b (MORIIZUMI *et al.*, 1995; MARTIN-LOPEZ *et al.*, 2017).

Para o momento do nascimento a camada do LOT no aPC já se encontra presente e ganha espessura entre a primeira e quarta semana pós-natal (WILSON *et al.*, 2000; SARMA *et al.*, 2011). As subdivisões L1a e L1b aparecem em P7, e ao longo do tempo a espessura da camada L1a se incrementa, estabilizando-se em P30. A camada L1b se desenvolve na primeira semana pós-natal e permanece estável nas semanas seguintes (WILSON *et al.*, 2000; SARMA *et al.*, 2011), enquanto que a camada L2 se incrementa progressivamente entre P0 e P30 (SARMA *et al.*, 2011).

Observa-se também que a projeção comissural do lado contralateral não atinge a camada L1b até ao redor da segunda semana pós-natal (SCHWOB; PRICE, 1984; WILSON *et al.*, 2000). Antes desse período prima o *input* do BO de projeção ipsilateral, sendo a função olfatória também processada nos córtices de cada hemisfério como vias independentes (KUCHARSKI; HALL, 1987; 1988; FONTAINE *et al.*, 2013).

² Referido a uma série de disparos rápidos de potenciais ação com intervalo de menos de 5 ms entre cada potencial (BEAN, 2007).

2.3.2. Células

Conta-se com dados escassos na literatura sobre as características de desenvolvimento morfológicas e eletrofisiológicas dos diferentes tipos celulares no aPC, durante a primeira e terceira semana pós-natal, sem comparação do tipo de células piramidais. Estudos de imunohistoquímica têm mostrado que a população de células piramidais com corpos celulares na camada L2 permanece estável ao longo do desenvolvimento, enquanto que o número de interneurônios GABAérgicos é alto entre P0 e P2 e, rapidamente, reduz-se entre P2 e P7 e mais lentamente até P14, permanecendo depois disso estável até o período adulto (SARMA *et al.*, 2011). Assim, a proporção de interneurônios/células piramidais cai significativamente durante a primeira semana pós-natal (P0-P7) e se reduz ainda mais ao longo da segunda semana pós-natal (P14), permanecendo posteriormente estável com uma proporção de 1 interneurônio para cada 10 células piramidais (SARMA *et al.*, 2011).

Ao redor do P14, o córtex piriforme tem um perfil morfológico semelhante ao adulto, com células piramidais completamente desenvolvidas nas camadas L2 e L3 (VALVERDE; SANCATANA, 1994). As células piramidais da porção mais superficial da camada L2 maturam antes das distribuídas na porção profunda, sugerindo que as primeiras em amadurecer sejam as células SL que dependem do *input* direto do BO (SARMA *et al.*, 2011).

Paralelo às mudanças morfológicas, há também mudanças importantes nas propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais da camada L2/3. Entre a segunda e quarta semana pós-natal, o potencial de membrana em repouso e o limiar de disparo de potencial de ação se tornam mais negativos, sem mudanças na resistência ao *input*, e a geração e duração dos potenciais de ação se tornam mais rápidos (GHOSH *et al.*, 2015).

2.3.3. Organização sináptica intracortical

2.3.3.1. Excitatória

Na primeira semana pós-natal nos ratos, predomina expressão de receptores NMDA em relação os receptores AMPA nas sinapses do LOT-aPC (L1a), o qual ao longo do primeiro mês pós-natal muda progressivamente, reduzindo a expressão de receptores NMDA e incrementando a expressão de receptores AMPA. Essa mudança não foi observada nas sinapses glutamatérgicas associativas (L1b e L2/3) (FRANKS; ISAACSON, 2005).

Paralela com essas mudanças no desenvolvimento de receptores glutamatérgicos, também tem sido observada uma rápida maturação na densidade de espinhos dendríticos nos sítios de *input* do LOT (dendritos apicais distais) comparado com as sinapses associativas (dendritos apicais basais e proximais). A densidade de espinhos dendríticos nas sinapses do LOT se incrementa rapidamente nas duas primeiras semanas pós-natal e permanecem estáveis ao longo do período adulto, enquanto que a densidade sináptica dos espinhos dendríticos nas sinapses associativas continua a se incrementar progressivamente ao longo da fase adulta (POO; ISAACSON, 2007).

2.3.3.2. Inibitória

De P0 a P10, a densidade sináptica total na camada L1a do córtex piriforme se incrementa em 1/3 da sua densidade de adulto (WESTRUM, 1975; MORIIZUMI *et al.*, 1995). Um trabalho de microscopia eletrônica reporta que os contatos sinápticos GABAérgicos em L1a aparecem em P6, mudando significativamente em tamanho e lugar de distribuição entre P13 e P21, atingindo o perfil adulto. Enquanto que na camada L1b e L2, os contatos sinápticos GABAérgicos aparecem desde P2 e também atravessam mudanças em tamanho e distribuição nas semanas seguintes, atingindo o perfil adulto em P21 (WESTENBROEK *et al.*, 1988).

Estudo de imunohistoquímica mais recente reporta a presença de sinapses GABAérgicas na camada L2 em P7, e não antes, e a densidade permanece estável entre P7 e P14, incrementando-se de modo importante em P60 (SARMA *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que durante a primeira semana pós-natal em roedores a inibição se encontra funcional, principalmente na camada mais profunda do córtex piriforme.

2.3.4. Circuito Neural

Pouco se conhece sobre a ontogenia da função do circuito do córtex piriforme. Sabe-se, por estudos de potencial de campo, que a atividade cortical para a estimulação elétrica do LOT aparece bem no início da primeira semana pós-natal, e o padrão de atividade cortical inibitória progressivamente muda, atingindo um padrão semelhante ao adulto ao redor de P14 (SCHWOB *et al.*, 1984). Esses dados são coerentes com os estudos de imunohistoquímica de SARMA e colaboradores (2011), que mostram evidências de sinapse GABAérgica funcional em P7 e entre P14 e P30, com a contínua formação de sinapses GABAérgicas funcionais no aPC. Além disso, outras funções corticais como a discriminação comportamental específica

de dois odores altamente semelhantes (próprio ninho vs. outro ninho), também aparecem em período pós-natal semelhante (GREGORY; PFAFF, 1979; MEYERS; ALBERTS, 2016).

2.3.5. Plasticidade Sináptica

Uma maior contribuição de receptores NMDA nas sinapses do LOT-aPC predomina durante o início do desenvolvimento pós-natal (FRANKS; ISAACSON, 2005). Além disso, essas sinapses expressam robusta LTP dependente de receptor NMDA em ratos infantis, com a magnitude declinando rapidamente durante o primeiro mês pós-natal. Por outro lado, essa capacidade para expressar robusta LTP dependente de NMDA nas sinapses associativas permanece constante ao longo do período pós-natal (POO; ISAACSON, 2007). Tem sido sugerido que essa alta capacidade de plasticidade sináptica excitatória em nível das sinapses LOT-aPC poderia contribuir na rápida formação de aprendizado de preferências olfatórias, no início do desenvolvimento pós-natal (FRANKS; ISAACSON, 2005; POO; ISAACSON, 2007).

Como descrevemos na **seção 1.3.3**, uma plasticidade LTP dependente de NMDA nas sinapses LOT-aPC parece ser necessária para a indução de aprendizado de preferência olfatória em roedores infantis <P10, pois a infusão de antagonista de receptor NMDA no aPC, antes do pareamento odor-*stroke*, previne o aprendizado do odor. Além disso, a indução de LTP *in vitro* nas sinapses LOT-aPC, pareando a aplicação de agonista β -adrenérgico com estimulação de alta frequência no LOT, é prevenido pela aplicação de antagonista de receptor NMDA (MORRISON *et al.*, 2013).

2.3.6. Retropropagação de potencial de ação.

A pesar de não existir dados experimentais para o início do desenvolvimento, JOHENNING e colaboradores (2009) discutem a possibilidade dos mecanismos que suportam o LTP dependente de NMDA nas sinapses LOT-aPC (camada L1a) também serem sustentados por retropropagação³ do potencial de ação para os dendritos apicais distais e as propriedades intrínsecas de disparo das células piramidais (JOHENNING *et al.*, 2009). Considerando que, no início do desenvolvimento, a indução de LTP mediada por receptores NMDA nas sinapses LOT-aPC se encontra particularmente incrementada e gradualmente se

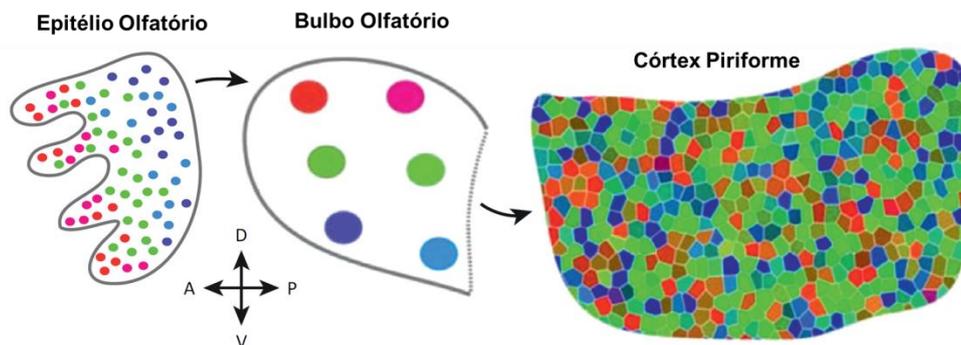
³ Referido a uma condução ativa ao longo do dendritos da despolarização produzida pelo potencial de ação no segmento inicial do axônio. A amplitude da despolarização diminui ao longo dos dendritos com o distanciamento do soma.

reduz ao longo do primeiro mês pós-natal, é possível que o mecanismo de retropropagação de potencial de ação mediado pelas propriedades intrínsecas de disparo das células piramidais suporte a LTP nesse período.

3. Papel da transmissão sináptica GABAérgica no processamento cortical do odor

Um modelo possível de como o córtex piriforme processa o odor seria que esse estímulo evocaria uma atividade espacialmente distribuída no córtex piriforme, onde apenas uma pequena fração de células piramidais responde para um estímulo, sem uma relação topográfica aos padrões espaciais do processamento nos glomérulos do BO (ISAACSON, 2010; WILSON; SULLIVAN, 2011; BEKKERS; SUZUKI, 2013) (**Figura 2.5**). Pensa-se que essa distribuição dispersa de codificação permite que um grande número de padrões das características de odor seja armazenado (WILSON; SULLIVAN, 2011). A atividade evocada pelo odor no aPC, mantendo uma forma de processamento espacialmente disperso, tem sido observada em ratos a partir de P3, com perfil semelhante ao adulto em P10 (ILLIG, 2007).

Figura 2.5. Representação dispersa de odores no córtex piriforme



O gráfico que mostra uma representação abstrata de como o odor é representado no córtex piriforme. No epitélio olfatório, os pontos coloridos iguais representam receptores olfatórios que expressam um mesmo gene receptor. Os neurônios olfatórios sensoriais expressando um mesmo gene receptor projetam para um mesmo glomérulo no bulbo olfatório (no gráfico representado como circuitos coloridos maiores). As células mitrais de cada glomérulo projetam difusamente para o córtex piriforme (disperso) (Gráfico tomado do trabalho de BEKKERS; SUZUKI, 2013, *Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex*. Trends in Neurosciences, July 2013, Vol. 36, No. 7).

O padrão de processamento de odor disperso tem sido estudado e proposto a partir de estudos *in vivo* e *in vitro*, os quais sugerem que a codificação dispersa do odor é suportada por

uma característica particular dos circuitos intracorticais excitatórios e inibitórios. A estimulação de odor evoca tipicamente um fraco incremento na taxa de disparo das células piramidais da camada L2/3, porém apenas uma pequena porção celular dispara forte, essa atividade corresponderia com a atividade dispersa (RENNAKER *et al.*, 2007; POO; ISAACSON, 2009; ISAACSON, 2010). O mecanismo pelo qual apenas um grupo pequeno de células piramidais, aleatoriamente dispersas, mostra uma alta atividade evocada por odor, tem sido atribuído à atividade do circuito inibitório

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que um determinado odorante evoca a atividade de uma ampla população de interneurônios. Em registros individuais de células piramidais, a excitação é específica para um odor, porém, a inibição é inespecífica. O registro individual de interneurônios tem sugerido que um determinado odor evoca uma inibição global no córtex piriforme (POO; ISAACSON, 2009; ZHAN; LUO, 2010). Essa atividade inibitória contribuiria para a representação dispersa do odor, garantindo que apenas as células piramidais que recebem uma excitação forte e preferente consigam disparar potencial de ação (ISAACSON, 2010). Porém, em estudo com camundongos acordados, combinando estimulação optogenética e registro multicanal de células, tem mostrado que os interneurônios GABAérgicos individuais no aPC exibem, de fato, uma resposta excitatória para diferentes odorantes, porém essa resposta não foi uniforme em todos esses interneurônios, havendo pelo menos quatro tipos de resposta excitatória, inclusive alguns interneurônios mostrando uma resposta inibitória (HU *et al.*, 2017). Isso sugere que, talvez, os subtipos diferentes de interneurônios GABAérgicos descritos no cortex piriforme (SUZUKI; BEKKERS, 2010a,b), tenham diferentes papéis funcionais no processamento cortical do odor.

O processamento diferenciado do microcircuito inibitório do córtex piriforme, modulado pela atividade entrante do BO, seria o suporte mais básico para o processamento disperso do odor no córtex piriforme. Tem sido mostrado que os interneurônios da camada mais superficial do córtex piriforme (L1a) recebem um *input* olfatório mais forte do que as células piramidais, e atividade desses interneurônios promovem uma inibição inicial *feedforward* transitória sobre a atividade das células piramidais. Os interneurônios das camadas L2/3, recrutados exclusivamente pela excitação recorrente das células piramidais, promovem uma inibição *feedback* de início tardio sobre a atividade das células piramidais, porém de efeito mais duradouro (STOKES; ISAACSON, 2010; 2013). Há a proposta que esses dois microcircuitos inibitórios forcem uma inibição ampla no córtex piriforme (STOKES; ISAACSON, 2013).

Capítulo 3

Desenvolvimento pós-natal da transmissão sináptica GABAérgica no córtex piriforme anterior

1. Introdução

Um estudo de imunohistoquímica mostrou que o número de interneurônios GABAérgicos em todas as camadas do aPC é maior no momento do nascimento até o dia pós-natal (P) 4 e logo se reduzem à metade em P7, permanecendo com quantidade estável depois dos P14 (SARMA *et al.*, 2011). Além disso, a densidade das sinapses inibitórias na camada 1a (L1a) incrementa-se progressivamente do P14 até o período adulto, sendo que antes do P7 não é detectada a presença de sinapses inibitórias (SARMA *et al.*, 2011). Paralelo ao incremento na densidade de sinapses inibitórias, a inibição cortical no aPC, evocada pela estimulação elétrica no LOT, atinge o perfil semelhante ao adulto ao redor do P14 (SCHWOB *et al.*, 1984). O período de transição no aprendizado do apego em roedores infantis (>P10) (MORICEAU; SULLIVAN, 2005; RAINEKI *et al.*, 2009; ROTH *et al.*, 2013; GHOSH *et al.* 2015) é coincidente com o intenso aumento na inibição sináptica no aPC (P14-P60) (SARMA *et al.*, 2011; SCHWOB *et al.*, 1984).

O desenvolvimento progressivo na morfologia e função do circuito inibitório no aPC durante as três primeiras semanas após o nascimento, sugere que a sinapse inibitória poderia operar de modo diferente nos ratos neonatos (<P10) e nos filhotes maiores (>P10). Assim, neste estudo examinamos o perfil do desenvolvimento das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) nas células piramidais da camada 2/3 usando eletrofisiologia *in vitro*. Nós focamos em dois períodos do desenvolvimento pós-natal (P5-P8 e P14-P17) com a finalidade de representar as idades de transição no aprendizado do apego. Também foram mensuradas as correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC) para testar se o incremento na densidade sináptica inibitória, como mostrado em estudo imunohistoquímica prévio (SARMA *et al.*, 2011), poderia também refletir no incremento do número de sítios sinápticos de liberação de GABA. Além disso, pelo fato do desenvolvimento de circuito inibitório no neocórtex poder ser modulado pela experiência sensorial, e este é fraco e com

persistência de fenótipos sinápticos imaturos quando privados dela (JIAO *et al.*, 2006; KRECKO *et al.*, 2009; GAINEY *et al.*, 2016), nós também estudamos a transmissão sináptica GABAérgica após privação olfatória em P3. Portanto, considerando que os circuitos inibitórios corticais no aPC podem ser formados mediante mudanças neuronais intrínsecas e por influências do ambiente durante os processos de maturação, nós mensuramos as sIPSC e mIPSC nos animais com nariz unilateralmente ocluídos. Assim, nós isolamos as mudanças conduzidas pela maturação no aPC ipsilateral ao nariz ocluído, e aquelas mudanças provocadas pela interação do ambiente e maturação ficaram isoladas no aPC contralateral ao nariz ocluído.

2. Métodos

2.1. Ética

Todos os procedimentos experimentais que contemplam o uso de animais foram realizados em concordância com as diretrizes e normas do *Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* (2011) e, especialmente, com as disposições da Lei Brasileira número 11.794 de 08 de novembro de 2008, que regula o uso de animais para propósitos científicos e didáticos no Brasil. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a carta de aprovação de número 27961 do dia 27 de novembro de 2014 além do ADENDO aprovado em Fevereiro de 2016 pelo mesmo Comitê.

2.2. Animais

2.2.1. Alojamento

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas e machos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Os animais foram trasladados ao biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), no Departamento de Fisiologia, vinte dias antes do início do experimento. Nesse ambiente, os animais foram mantidos à temperatura (21-22° C) e umidade (60%) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas, luz a partir de 8h; e livre acesso à comida (Nuvilab Cr2, Colombo, Brasil) e água durante todo o período de pesquisa. As fêmeas adultas foram alojadas em caixas transparentes (44 x 33 x 21 cm) com maravalha, mantendo quatro animais por caixa. Os ratos machos foram alojados em caixas semelhantes com dois animais por caixa. As

condições de cuidados e manutenção dos animais foram realizadas pela equipe de médicos veterinários e bioteristas que atuam no CREAL da UFRGS.

2.2.2. Acasalamento

Após o período de habituação dos animais foi iniciado o procedimento para acasalamento. A forma mais usada para acasalar os ratos é determinar o ciclo estral da fêmea a partir de amostra do lavado vaginal. Identificando o pico da fase de proestro a fêmea é colocada junto com o macho. Esse procedimento é realizado diariamente até obter um período estável do ciclo estral. Nas nossas condições experimentais, para evitarmos o estresse por manipulação nas fêmeas para a coleta de lavado vaginal, colocamos a fêmea junto com o macho em caixa separada com maravalha limpa no início do período escuro. A verificação de receptividade da fêmea para o macho foi realizada mediante a observação do comportamento de lordose. A apresentação desse comportamento na fêmea foi necessária para deixá-la ou não com o macho na caixa até o dia seguinte. Após a noite, a constatação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi considerada como o início da gestação (dia 0).

2.2.3. Gestação, parto e padronização de ninhadas

Entre os dias 17 e 19 de gestação, as fêmeas foram individualizadas em caixas transparentes contendo maravalha abundante para o parto dias depois. A maravalha não foi trocada até cinco dias após o parto. Algumas fêmeas prenhas foram trasladadas ao biotério setorial do Departamento de Bioquímica, onde foram alojadas em caixas transparentes (44 x 33 x 21 cm), e mantidas em condições ambientais semelhantes ao biotério do Departamento de Fisiologia. Para o traslado as fêmeas foram colocadas em caixas pequenas com maravalha, grades cobertas com jalecos descartáveis novos e colocadas em um saco preto de pano para transporte em táxi. Os translados foram realizados em horários do dia em que o trânsito é reduzido. O tempo de traslado foi de aproximadamente de 5 a 10 minutos. O traslado de fêmeas prenhas foi necessário pela impossibilidade de alojar os animais no biotério do Departamento de Bioquímica desde o início da gestação. O parto aconteceu no dia 22 para todas as fêmeas. As que foram trasladadas não mostraram complicações no parto, exceto uma fêmea que demorou 23 dias para parir e teve que ser sacrificada. O dia do nascimento foi considerado dia 1 (P1). No P2, os filhotes de cada ninhada foram padronizados em 8-10 filhotes e, quando possível, com igual proporção de machos e fêmeas.

2.3. Oclusão nasal unilateral

2.3.1. Anestesia por frio

A hipotermia é considerada um método seguro e eficaz para anestésiar roedores neonatos até P7, pois durante esta idade os recém-nascidos são funcionalmente pecilotérmicos, ou seja, a temperatura corporal e a taxa metabólica estão estreitamente relacionadas com a temperatura do ambiente, assim a termorregulação não está completamente desenvolvida até a terceira semana de vida (FOWLER; KELLOG, 1975; GORDON, 1993). Este procedimento é usado também com eficácia para cirurgias cerebrais em neonatos (ALVARES-DOLADO *et al.*, 2006; MORRISON *et al.*, 2013). Após a anestesia por hipotermia, a recuperação do esfriamento foi rápida, sendo que os filhotes permaneceram aquecidos a temperatura semelhante ao ninho (33°C) e com retorno gradual da ao normal (entre 20-30 minutos). Só depois deste tempo de recuperação, os filhotes foram retornados para o ninho com a mãe para evitar infanticídio (PHIFER; TERRY, 1986).

Iniciamos a anestesia por hipotermia pela preparação de uma caixa de isopor com gelo moído, com registro de temperatura de aproximadamente 2-4°C. Um grupo de quatro filhotes foi retirado do ninho, colocado em uma caixa pequena contendo maravalha limpa e levado para uma outra sala para realizar o procedimento cirúrgico. A caixa contendo os filhotes foi colocada sobre uma almofada térmica em temperatura, controlada de 30-33°C; antes, durante e depois do procedimento de oclusão nasal. Para induzir hipotermia, os filhotes foram envoltos em gaze e submersos até o pescoço em gelo moído (2-3°C), entre 8-10 minutos (PHIFER; TERRY, 1986). Durante esse período foram monitorados os sinais vitais do filhote bem como a ausência de reflexos de extensão das patas por pressão, antes de prosseguir com a oclusão nasal.

2.3.2. Cauterização do nariz

Após a comprovação da anestesia, o filhote foi pego cuidadosamente com uma mão, ajeitando a cabeça com o dedo anelar, de modo que ficasse visível o nariz. Usando hastes de algodão estéril, a região do nariz foi limpa com antisséptico (Timeoláte, que contém cloridrato de lidocaína 21,0 mg/mL e cloreto de benzetônio 1,33 mg/mL). Seguidamente, colocou-se a ponta de um ferro quente sobre o nariz do animal para cauterizar a parte externa do nariz direito do animal. O procedimento teve uma duração inferior à 30 segundos. Após a cauterização, foi colocado anestésico local em creme (lidocaína) e antibiótico em creme

(Nebacetin: Sulfato de neomicina 5 mg/g, bacitracina zíncica 250 UI/g) sobre a região cauterizada com o filhote sendo colocado junto aos irmãos na caixa, sobre a almofada quente. O mesmo procedimento foi realizado para os animais do grupo *Sham*, porém a cauterização unilateral correspondeu à superfície dorsal do nariz direito, adaptação do protocolo descrito por Meisiami (1976) e utilizado por Wilson *et al.* (2000).

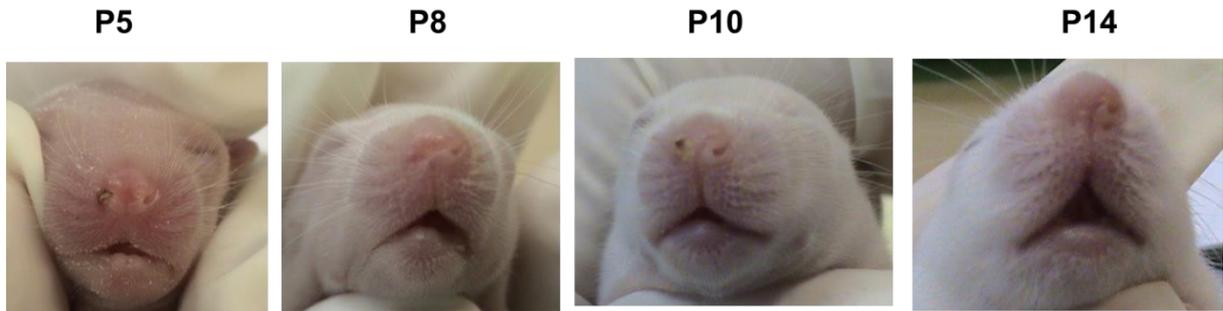
Após a recuperação da anestesia, comprovando os sinais vitais e o ganho de temperatura, os quatro filhotes foram devolvidos para o ninho da mãe, e seguidamente foram retirados os quatro filhotes restantes para o procedimento da oclusão unilateral do nariz. Durante os dias seguintes à oclusão, foi observada a recuperação dos filhotes e antibiótico em creme (Nebacetin) foi aplicado externamente até completa cicatrização do ferimento.

Na literatura não encontramos referências sobre a taxa de mortalidade em decorrência desse procedimento, porém o trabalho de Mesiami (1976) relata que o procedimento de oclusão nasal por cauterização em P1 tem maior ocorrência de mortalidade que ao ser realizado em P3. Assim, nós decidimos realizar o procedimento de oclusão nasal unilateral em P3. O nosso procedimento de oclusão nasal unilateral resultou entre dois e três filhotes mortos por cada ninhada, entre o terceiro e quarto dias após a cirurgia.

2.3.3. Verificação da oclusão nasal

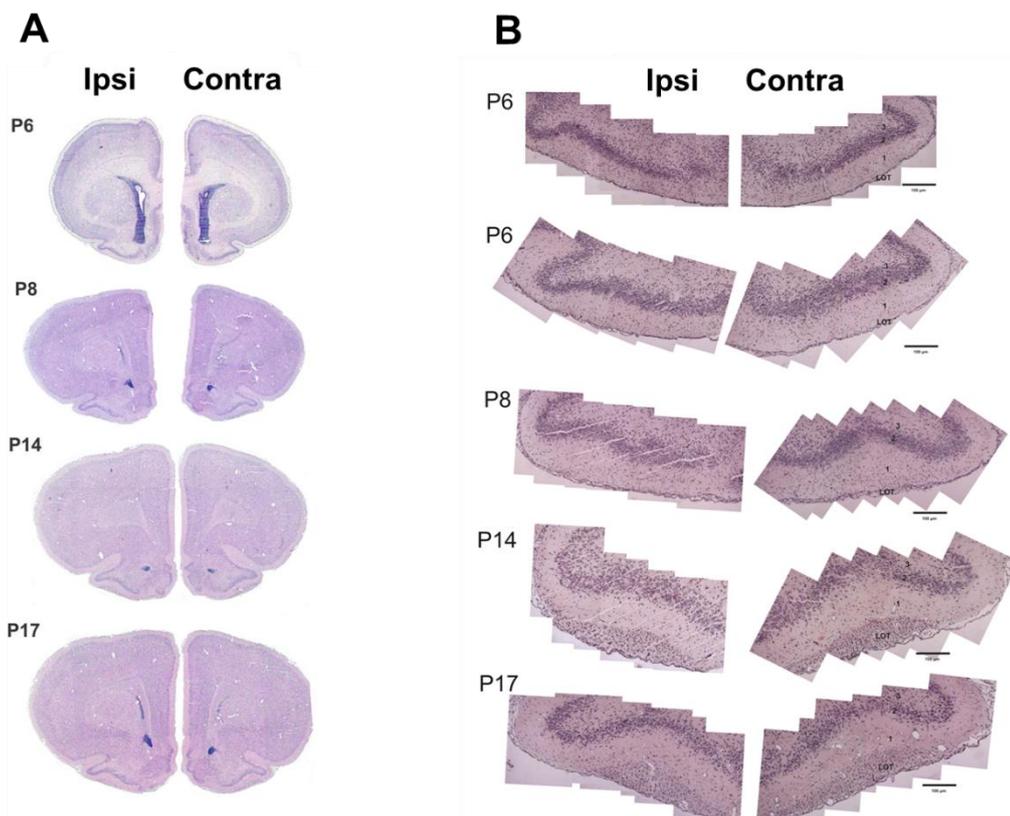
A verificação da oclusão nasal foi realizada nos dias seguintes à cirurgia (P5-P8). Metade dos filhotes foi retirada da caixa-ninho e transportada em uma caixa pequena com maravalha para a sala de observação, onde permaneceu aquecida (30-33°) sobre uma almofada térmica durante a observação. Um a um, o nariz dos filhotes foi observado usando uma lupa e verificado se o nariz estava completa ou parcialmente ocluído. Esfregou-se, delicadamente, uma haste de algodão molhada em espuma de sabonete neutro, diluído em água morna, sobre o nariz cauterizado. A observação de borbulhas de ar no nariz foi usada como indicador de oclusão parcial, no caso contrário foi considerado completamente ocluído. Os filhotes com confirmação de oclusão completa foram marcados no dorso e observados nos dias seguintes pós-natais indicados. Na **Figura 3.1** se mostra exemplos de nariz completamente ocluído.

Figura 3.1. Oclusão nasal



Exemplos de verificação de oclusão nasal em 3, 5, 7 e 11 dias após a oclusão nasal unilateral do lado direito mediante cauterização (desde P3). No P5, ainda se observa a cicatrização da cauterização. A partir de P8 o nariz se encontra completamente ocluído.

Figura 3.2. Imagens de histologia mostrando cortes coronais de encéfalos com oclusão nasal unilateral em P3 marcados com cresil violeta.



Em **A**, se mostra o córtex piriforme anterior em 4 períodos de idade no lado ipsi e contralateral à oclusão nasal. Imagens fotografadas com câmera acoplada a microscópio Luz obtidas com aumento 5 x. Em **B**, imagens dos mesmos cortes histológicos em aumento 20x. A observação simples, as camadas 2/3, correspondentes às células piramidais não mostram diferenças. Barra escala: 100 μ m.

2.3.4. Histologia

Com o propósito de verificar alguma modificação morfológica no córtex piriforme decorrente da oclusão nasal unilateral, alguns filhotes foram profundamente anestesiados com overdose de xilazina/cetamina e, em seguida, foram perfundidos transcardialmente com solução salina fria, seguido de paraformaldeído 8%. Posteriormente, seus encéfalos foram dissecados e colocados em paraformaldeído 8% durante 12 horas. No dia seguinte, os encéfalos foram transferidos para álcool 96% por 12 horas. No terceiro dia, os encéfalos foram desidratados com concentrações crescentes de álcool e de xilol e logo incluídos em parafina. Os encéfalos incluídos foram cortados em micrótomo a 7 μm de espessura e montados em lâminas gelatinizadas. Após a secagem das lâminas, estas foram coradas com cresil violeta, cobertas com lamínulas usando Paramount e observadas no microscópio de luz acoplada a uma câmera. Na **Figura 3.2** se apresentam imagens representativas do aPC e BO.

2.4. Eletrofisiologia *in vitro*

2.4.1. Preparo de soluções

Com o propósito de manter as células saudáveis, tanto durante o corte e incubação das fatias quanto durante o registro das células, foi importante manter o ambiente extracelular semelhante ao encontrado no encéfalo do animal vivo. Assim, foi usado uma solução líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) semelhante ao encontrado no rato. As soluções de corte e de perfusão (normal) foram preparadas usando os mesmos componentes, porém com variações nas suas concentrações de cloreto de sódio, sacarose e cloreto de cálcio.

Para preservar as células nas fatias foi usada solução aCSF com alto teor de sacarose (solução de corte). A solução foi preparada substituindo o cloreto de sódio (NaCl) por uma concentração isomolar de sacarose para reduzir o influxo de sódio, o qual leva a possibilidade dos neurônios despolarizarem durante a anóxia que acompanha a decapitação, dissecação e corte do encéfalo (MOYER; BROWN, 2002). A solução aCSF de corte estoque foi preparada um dia antes de cada experimento, usando água MiliQ com osmolaridade de 18,2 mOsm e mantida sob refrigeração (0-4°C). A manutenção da temperatura entre 0-4°C é usada para reduzir o metabolismo das células na região de interesse (HÁJOS et al. 2009). A solução de aCSF de corte foi preparada contendo os seguintes reagentes: 220 mM sacarose, 3mM KCl; 1,25mM NaH₂PO₄-H₂O; 2mM MgSO₄-7H₂O; 26mM NaHCO₃ e 10mM de dextrose.

A solução aCSF normal foi usada para a incubação e perfusão de fatias durante os registros eletrofisiológicos das células, de modo que essa solução correspondeu ao ambiente extracelular. A solução estoque da solução aCSF normal foi preparada com água MiliQ, com osmolaridade de 18,2 mOSm e pH de 7,2, mantida a temperatura da sala (21-23 °C). Os componentes da solução foram: 124mM de NaCl; 3mM de KCl; 1,25mM de NaH₂PO₄-H₂O; 2mM de MgSO₄-7H₂O; 26mM de NaHCO₃; 10mM de Dextrose. Foi adicionado 2mM de CaCl₂ depois de 20 minutos de oxigenação, com mistura de O₂-CO₂ (95%-5%). A solução aCSF normal em uso foi constantemente oxigenada durante os procedimentos de incubação, recuperação e registro.

2.4.2. Preparo de fatias

Antes do início do experimento, a sala de eletrofisiologia era regulada na temperatura de 22-23° C. Em seguida, o *cooler* do vibrátomo era ligado para refrigerar a temperatura estável de 0°C e o banho de incubação era aquecido para manter uma temperatura estável de 37°C. Uma vez que o *cooler* do vibrátomo atingia os 0°C, o que manteve a solução de corte a 4° C, a solução aCSF normal foi colocada em um Becker de 600 mL, acoplado a um sistema de rede no seu interior para manter as fatias. Essa solução foi oxigenada com uma mistura de gás carbogênio (95% O₂-5% CO₂) entre 15-20 minutos antes de colocar o cloreto de cálcio. A solução de corte foi oxigenada do mesmo modo. Na bancada, colocamos um Becker pequeno contendo solução de corte, previamente refrigerada, mantida dentro de um recipiente retangular com gelo moído. Uma vez que essas condições foram estabelecidas, foi prosseguido com os seguintes procedimentos abaixo descritos.

Nos períodos de idade P5-P8 e P14-P17, o filhote era retirado da sua caixa-ninho e levado para a sala de eletrofisiologia, onde, após a verificação da oclusão nasal, era anestesiado com uma combinação de xilazina/cetamina (100mg/10 mg por kg). Imediatamente após a confirmação da anestesia, mediante uma forte pressão com pinça na pata posterior, o filhote era colocado em posição dorsal. Usando uma lâmina de bisturi foi realizada uma incisão desde a região frontal até o bregma, para expor o crânio. Em seguida, foi realizada uma incisão na região do pescoço até atingir a jugular do animal. Após a essa incisão, com uma tesoura era feito rapidamente um corte vertical na linha média do crânio e um corte horizontal no limite do cerebelo, extraindo o encéfalo com o bulbo olfatório intacto. Todo esse procedimento foi cuidadosamente executado para ocorrer em menos de 1 minuto. O encéfalo foi colocado na solução de corte oxigenada e em seguida foi talado o cerebelo

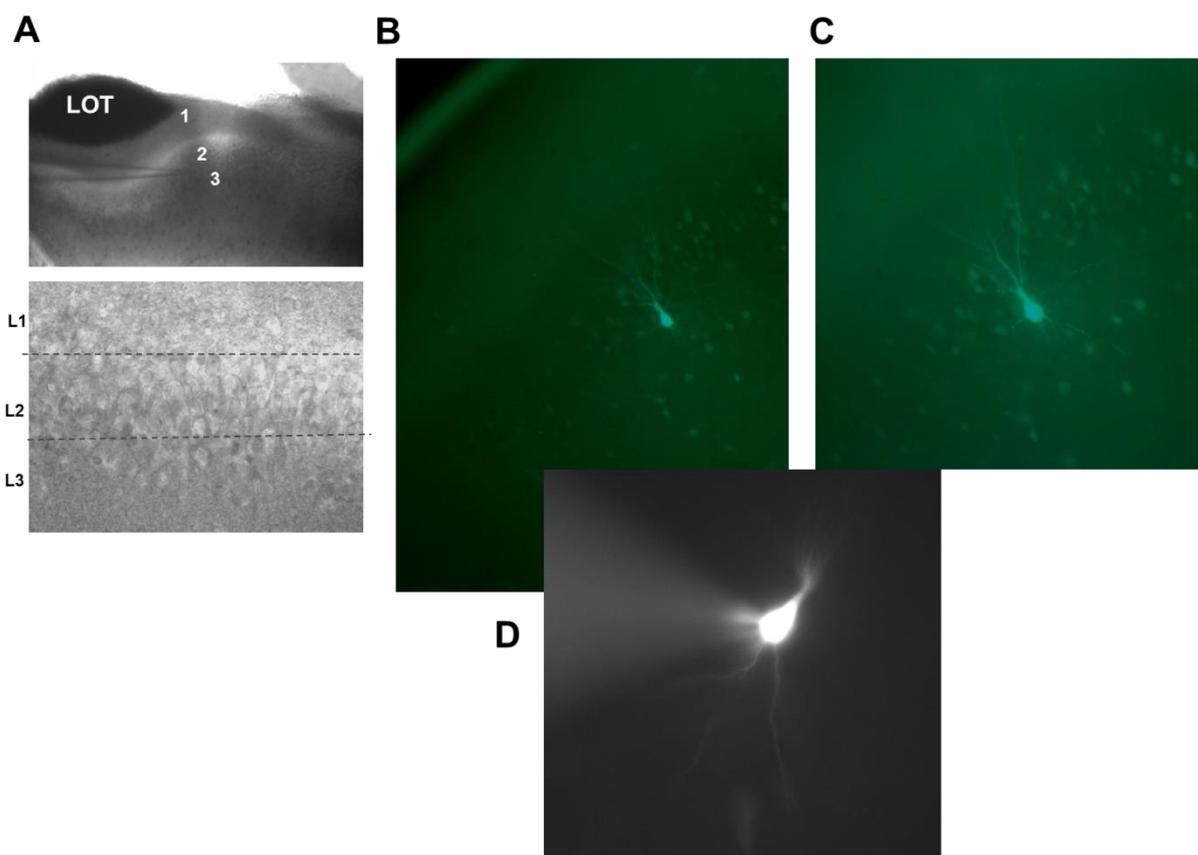
sobre uma base de petri fria e oxigenada. Feito isso, usamos cola sintética (Super bonder) para colar o cérebro sobre uma plataforma, com a região posterior voltada à base e a região dorsal encostando-se à parede de um bloco retangular de agarose, colado previamente na plataforma. Imediatamente, a plataforma contendo o cérebro foi colocada na câmara do vibrátomo já preenchida com solução de corte oxigenada.

Usando um vibrátomo (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) foram realizados cortes coronais de 300 µm de espessura, com avanço posterior-anterior com velocidade de 2.0. Após o aparecimento do LOT, foram coletadas entre 3 e 4 fatias. Cada fatia coronal foi separada na linha média com uma lâmina de aço inoxidável acoplada a uma tesoura hemostática. As fatias correspondentes a cada hemisfério foram colocadas para incubação, em redes separadas e sinalizadas, em um Becker com solução aCSF normal. Eram perfundidas continuamente com mistura de gás carbogênio (95% O₂-5% CO₂) e mantidas a temperatura ambiente. O procedimento de corte teve duração entre 10-15 minutos. Depois da coleta de todas as fatias, o Becker contendo as fatias foi colocado em banho-maria para incubação a 37 °C, durante 45 minutos. Após a finalização desse tempo, o Becker foi retirado da incubação e as fatias foram mantidas em recuperação na temperatura ambiente, por 60 minutos, antes de iniciar com os registros. Por todo o tempo as fatias permaneceram oxigenadas com mistura de gás carbogênio.

2.4.3. Visualização e identificação de células

Após o período de recuperação de uma hora, as fatias foram transferidas para uma câmara acoplada a um microscópio, equipado com contraste de interferência diferencial e padrão de iluminação infravermelho(IR-DIC) e sistema de vídeo com objetiva de imersão em água 40X (Olympus BX51WI), para proceder com os registros. A câmara esteve continuamente perfundida com solução aCSF normal em temperatura ambiente (22-23°C), e borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. A região do córtex piriforme anterior (aPC) e as camadas foram visualizadas usando objetiva 5X em padrão de IR-DIC infravermelho. Essas regiões foram reconhecidas baseadas na sua localização relativa ao trato olfatório lateral (LOT) e a densidade compacta das células da camada 2 (SUZUKI; BEKKERS, 2006). A identificação do soma neuronal na camada 2/3 foi visualizada diretamente usando a objetiva de imersão 40X. Na **Figura 3.3** se mostram exemplos de visualização das camadas do aPC e das células piramidais.

Figura 3.3. Identificação do córtex piriforme anterior (aPC) e visualização das células piramidais na camada 2/3.



Em **A**, identificação aPC com o sistema de vídeo no microscópio de contraste de interferência diferencial e padrão de iluminação infravermelho (IR-DIC). Na **imagem superior** se mostra um exemplo de como foi identificado a camada 2/3 no aPC em aumento 5X. A imagem sinaliza o local do LOT e a posição das camadas se encontra numerada. A pipeta registrando na camada 2. Na **imagem inferior**, se mostra as células nas camadas 2/3 em aumento 10X. Note a aglomeração de células em L2. Em **B**, célula piramidal marcada com Lucifer Yellow observada em microscópio de fluorescência. A célula se encontra no limite das camadas 2/3, com prolongamentos dendríticos orientados em direção ao LOT (franja preta). Em **C**, a mesma célula fotografada em aumento maior. Em **D**, outra célula piramidal registrada com pipeta contendo Lucifer Yellow. A observação foi realizada com o microscópio de registro que não possui filtros para obter imagens coloridas.

2.4.4. Registro *whole-cell patch clamp*

Uma vez que o neurônio de interesse foi visualizado, foram fabricadas pipetas para *patch* a partir de capilares de vidro de borosilicato (1.5/1.12 OD/ID, WPI, Sarasota,FL), usando um estirador de pipetas (P-1000, Sutter instruments, Novato, CA) que esquentava e estende o vidro. Os parâmetros foram ajustados para obter pipetas com diâmetro da ponta de 1

µm e uma resistência final de 3-6 MΩ. Após a fabricação, as pipetas foram polidas com fogo usando Micro Forge (MF-830, Narishige, Japan).

2.4.4.1. Voltage-clamp

O registro sIPSC foi realizado na configuração *whole-cell voltage-clamp* usando uma pipeta *patch* que foi preenchida com solução contendo: 117,5 mM CsGluconato; 11 mM CsCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 11 mM EGTA; 2 mM Na-ATP; 0,5 mM Na-GTP e QX-314 (Lidocaína). O gluconato de céσιο (CsGluconato) foi preparado a partir de CsOH e o ácido glucónico. A solução foi preparada usando água MILIQ e pH foi ajustado a 7,25 com 10 M de CsOH. Após o ajuste, a solução foi filtrada e ajustada a uma osmolaridade de 285-290 mOsm. Nessas condições, o potencial de equilíbrio do cloreto foi de -43 mV, o qual foi calculado usando a equação de Nerst, onde o meio extracelular foi dado pelas concentrações totais de cloreto extracelular (no aCSF descrito acima).

Para isolar as correntes inibitórias pós-sinápticas (sIPSC e mIPSC) a membrana da célula foi fixada em 0 mV, próximo do potencial de equilíbrio das correntes excitatórias pós-sinápticas. As sIPSC e mIPSC foram registradas após um minuto do rompimento do selo da membrana e da obtenção da configuração *whole cell*. O registro foi realizado usando o Multiclamp 700B Amplifier (Molecular Devices, CA, USA), no modelo *gap free* durante 5 minutos na presença de ácido quinurênico diluído na solução aCSF de perfusão (1mM, KyA), para bloquear as correntes excitatórias ionotrópicas. Todos os registros foram realizados na sala com temperatura ambiente (22-25 °C). As mIPSC foram registradas em aCSF de perfusão, contendo tetrodotoxina (1 µM, TTX). Ao final de alguns experimentos, bicuculina metiodida (10 µM, BMI) foi diluída na solução de perfusão (aCSF + KyA) para verificar o envolvimento dos receptores GABA_A nas IPSC.

Durante todo registro a resistência em serie e a capacitância *whole-cell* foram continuamente monitoradas. Registros com mais de 20% de mudança na resistência *whole-cell* foram excluídos. Os dados obtidos nos registros *whole-cell voltage-clamp* foram filtrados em passa baixa a 1 HZ (-3 dB, eight-pole Bessel) e a amostra foi coletada em 10 kHz com o Digidata 1440- A System (Molecular Devices, CA, USA). A aquisição de dados foi constantemente monitorada com um osciloscópio e com o software pClamp 10.6 (Molecular Devices, CA, USA). Os dados foram armazenados em um computador para análise posterior *off-line*.

2.4.5. Marcação de células com Lucifer Yelow

Em alguns experimentos, as células foram perfundidas com corante Lucifer Yellow, diluído na solução da pipeta de *patch*. Essa estratégia foi utilizada para verificar a identidade celular através da sua morfologia e verificar com a forma descrita para as células piramidais no aPC (SUZUKI; BEKKERS, 2006). Na solução da pipeta de *patch* foi diluída 0,1-0,2 % de Lucifer Yelow (peso/ volume) para realização do registro de *patch clamp*. Depois de 10-15 minutos de registro, tempo padronizado para a difusão do corante por todos os prolongamentos da célula, a pipeta foi retirada lentamente para fora da célula e fatia era mantida na solução de registro durante 2-5 minutos. Após esse tempo, a fatia foi fixada com paraformaldeído 4%, durante uma noite a 4°C. No dia seguinte, a fatia foi retirada da solução fixadora e lavada por um minuto (3 X) em fria de 0,1 M PBS. Em seguida, a fatia foi montada em lamínulas, coberta com outra lamínula, usando Paramount, e imediatamente foi observada em microscópio de fluorescência ativando a luz azul.

Algumas células foram diretamente observadas através da lente do microscópio com ativação de luz fluorescente azul, acoplada ao sistema de registro, e outras foram observadas mediante microscopia confocal. Na **Figura 3.3**, são mostrados alguns exemplos de células piramidais da camada 2/3 marcadas em verde com Lucifer Yellow. Pela sua morfologia cumprem com o critério de células piramidais.

2.4.6. Drogas utilizadas

Todas as drogas utilizadas foram adicionadas no sistema de perfusão do aCSF em sua concentração final. O ácido quinurênico (KyA, Sigma-Aldrich), antagonista competitivo dos receptores ionotrópicos de glutamato; bicuculina (BMI, Sigma –Aldrich), antagonista competitivo dos receptores de GABA_A; e tetrodotoxina (TTX, Tocris Bioscience), bloqueador altamente seletivo dos canais de sódio dependentes de voltagem, foram preparadas a partir das soluções estoque no dia do experimento. A solução-estoque para cada droga foram as seguintes: 26 mM de KyA diluída em DMSO, 5mM de BMI diluída em água destilada e 1mM de TTX diluída em água destilada.

2.5. Análise de dados

Todos os dados coletados provieram de um total de 245 células piramidais das camadas 2/3 de 52 ratos em idade pós-natal P5, P6, P7 e P8 (20 fêmeas e 32 machos) e de 53 ratos em

idade pós-natal P14, P15, P15 e P17 (31 fêmeas e 22 machos). Cada evento de correntes inibitória pós-sináptica (sIPSC, mIPSC) foi selecionado manualmente e uma média de 100 eventos individuais ou 1 minuto de registro foram analisados para cada célula.

A frequência das sIPSC e mIPSC, intervalo inter-evento, amplitude, *decay time constant* e 10-90% *rise time constant* foram mensurados usando o *software* Mini Analysis 6.0.3 (Synaptosoft, Inc, Fort Lee, NJ, USA). As comparações estatísticas e os gráficos foram realizados usando o SPSS e o Graph Prisma 6 (GraphPad, LaJolla, CA). O teste de normalidade para todos os dados com um $n > 30$ foi o teste D'agostino-Pearson (K2) de uma amostra.

As comparações estatísticas dos parâmetros das sIPSC e mIPSC entre os dois períodos de idade foram realizadas usando o *two-tailed Student's t test* ou o *two-way ANOVA* (idade x condição experimental), seguido de *Tukey's post hoc test*. Os resultados do teste *Omnibus* (valores F) foram descritos no texto. Para a comparação das curvas de probabilidade cumulativa dos intervalos inter-eventos das sIPSC e mIPSC entre os grupos, o *two-sample Kolmogorov-Smirnov (K-S) test* foi usado.

Todos os dados são apresentados como média \pm SEM e o "n" representa o número de neurônios ou eventos. Para todos os casos, o nível de significância estatística foi estabelecido em $\alpha = 0,05$. Os resultados significativos para todos os testes foram denotados usando asterisco nas figuras e tabelas associadas.

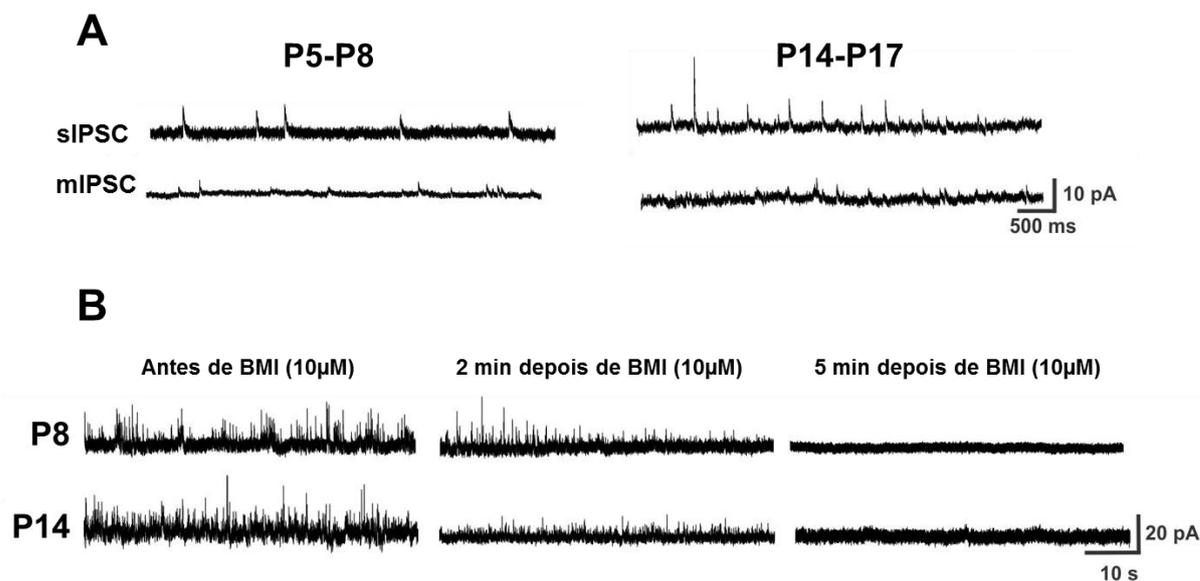
3. Resultados

3.1. Mudanças na transmissão sináptica GABAérgica durante o desenvolvimento pós-natal normal

Foi caracterizado o desenvolvimento normal da transmissão sináptica GABAérgica medindo as sIPSC e mIPSC nas células piramidais das camadas 2/3 (L2/3) do aPC obtidas de ratos infantis em dois períodos do desenvolvimento pós-natal (P5-P8 e P14-P17). A **Figura 3.4 (A)** mostra exemplos de traçados de sIPSC e mIPSC nos dois períodos de idade. Nós registramos as sIPSC na presença de ácido quinurênico, antagonista dos receptores ionotrópicos excitatórios de glutamato, mantendo a célula em um voltagem de 0 mV (voltagem de reversão das correntes pós-sinápticas excitatórias) com as sIPSC observadas como correntes de saída. As sIPSC foram bloqueadas por adição 10 μ M de bicuculina no

banho das fatias (**Figura 3.4 B**), indicando que as sIPSC mediadas por receptor GABA_A foram isoladas.

Figura 3.4. Traçados representativos de registros das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) e miniatura (mIPSC)



Traçados em P5-P8 (**A, esquerda**) e P14-P17 (**A, direita**) registrado com fixação de voltagem em 0 mV. Em **B** se mostram exemplos de traçado das sIPSC, bloqueados após aplicação de bicuculina metiodida (BMI), indicando que as sIPSC foram mediadas por receptor GABA_A. **Superior**, traçado representativo do período de idade P5-P8, antes da aplicação de BMI e **inferior** traçado representativo do período de idade P14-P17 para antes, 2 min e 5 min depois da aplicação de BMI.

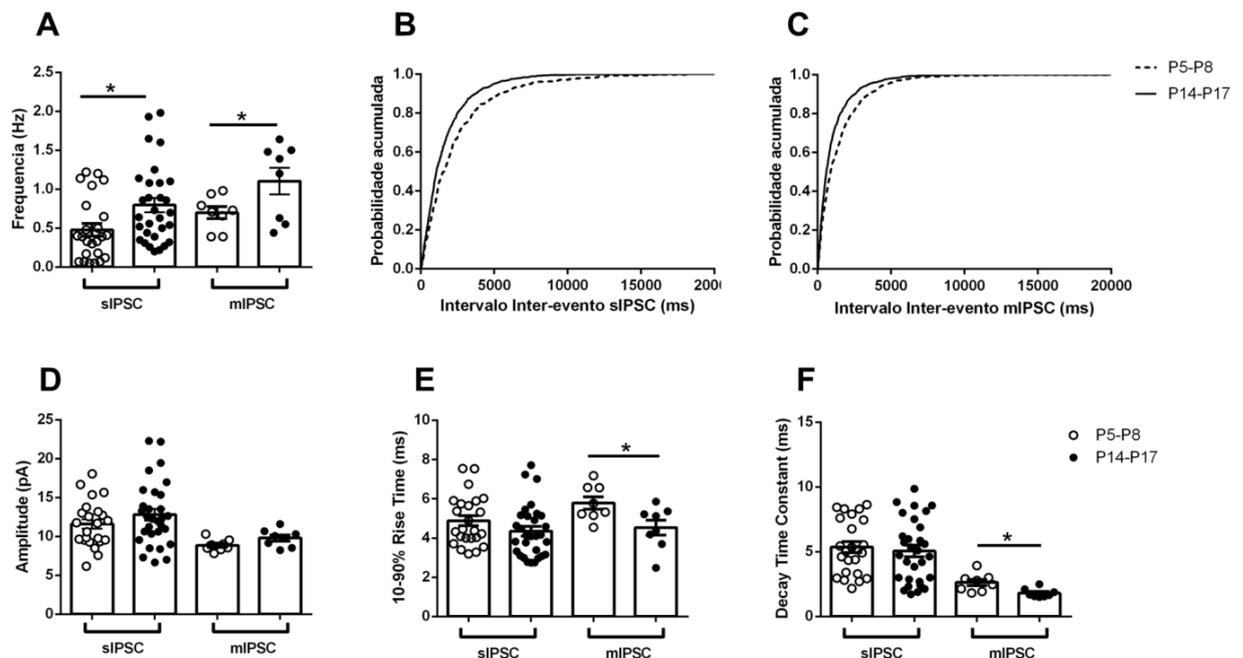
3.1.1. Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC)

Observamos um incremento significativo de 65% na média das frequências das sIPSC do período P5-P8 ($0,48 \pm 0,08$ Hz; $n=24$ células) ao P14-P17 ($0,79 \pm 0,09$ Hz; $n=30$ células) [$t(52) = 2,14$; $p=0,01$; t Student] (**Fig 3.5 A; Tabela 3.1**). Consistentemente também observamos uma diminuição significativa no intervalo inter-evento das sIPSC em P14-P17 comparado com a curva da distribuição da probabilidade acumulativa em P5-P8 ($p<0,0001$; $K-S$ test). De acordo com a mesma curva de distribuição de probabilidade acumulada dos intervalos inter-eventos das sIPSC, a probabilidade de encontrar sIPSC com intervalos inter-eventos menores que 2000 ms em P14-P17 foi de 22% mais alto que em P5-P8 (**Fig 3.5 A**).

Por outro lado, não observamos mudanças significativas no desenvolvimento para os outros parâmetros das sIPSC (**Fig 3.5 C-E**) ($p>0,05$; t Student test) (P5-P8 vs P14-P17:

Amplitude $11,61 \pm 0,59$ pA vs $12,81 \pm 0,75$ pA; 10-90% *risetime* $4,88 \pm 0,26$ ms vs $4,35 \pm 0,24$ ms; *decay time constant* $5,36 \pm 0,43$ ms vs $5,06 \pm 0,44$ ms) (Tabela 3.1).

Figura 3.5. Desenvolvimento pós-natal das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) e miniatura (mIPSC) nas células piramidais das camadas 2/3 no aPC.



Em **A** se mostra a média (\pm EP) das frequências sIPSC e mIPSC incrementando-se significativamente com a idade. **B**, **C** probabilidade acumulada de intervalos inter-evento mostrando o incremento da frequência com a idade (sIPSC e mIPSC) (P5-P8, $n=559$ eventos vs P14-P17, $n=1151$ eventos; $p<0,0001$; *K-S test*). **D-F**, gráficos da média (\pm EP) de sIPSC e mIPSC da amplitude, 10-90% *rise time constant* e *decay time constant* comparando entre idades (*t Student test*). $*<0,05$. Cada círculo nos gráficos representa os valores de uma célula.

3.1.2. Correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC)

Com o objetivo de determinar se o incremento na densidade sináptica inibitória reportado durante as duas primeiras semanas pós-natais reflete aumento das sinapses GABAérgicas funcionais em função da idade, nós registramos as mIPSC aplicando tetrodotoxina (TTX) no banho de perfusão das fatias. Semelhante às sIPSC, nós observamos um significativo incremento de 59% nas frequências das mIPSC de P5-P8 ($0,69 \pm 0,08$ Hz; $n=8$ células) a P14-P17 ($1,10 \pm 0,17$ Hz; $n= 8$ células) [$t(14) = 2,14$; $p=0,04$; *t Student test*] (Figura 3.5 B, gráfico inserido; Tabela 3.1). Este resultado foi confirmada pela diminuição significativa no intervalo inter-evento das mIPSC em P14-P17, representado no gráfico da distribuição de probabilidade acumulada ($p<0,0001$; *K-S test*). A probabilidade para encontrar

mIPSC com intervalo inter-evento menor que 200 ms em P14-P17 foi 14,5% maior que em P5-P8 (**Fig 3.5 B**).

Semelhante ao que foi observado para as sIPSC, a média da amplitude das mIPSC não mudou significativamente com a idade (P5-P8: $9,81 \pm 0,30$ pA vs P14-P17: $8,87 \pm 0,27$ pA; $t(14)=1,95$; $p=0,07$; *t Student test*) (**Fig 3.5 C**; **Tabela 3.1**). Porém, diferente das sIPSC, a cinética das mIPSC diminuiu com a idade. A média do 10-90% *rise time* das mIPSC diminuiu significativamente (P5-P8: $5,79 \pm 0,32$ ms vs. P14-P17: $4,53 \pm 0,39$ ms; $t(14) = 2,52$; $p=0,02$; *t Student test*) (**Fig 3.5 D**; **Tabela 3.1**). Adicionalmente, a média do *decay time constant* das mIPSC também diminuiu significativamente com a idade (P5-P8: $2,63 \pm 0,25$ ms vs. P14-P17: $1,81 \pm 0,12$ ms; $t(14) = 2,99$; $p=0,01$; *t Student test*) (**Fig 3.5 E**; **Tabela 3.1**).

Tabela 3.1. Desenvolvimento normal das propriedades das correntes inibitórias espontâneas (sIPSC) e miniaturas (mIPSC) pós-sinápticas mediadas por GABA_AR.

Parâmetros	P5-P8	P14-P17
	(n=24)	(n=30)
sIPSC		
Frequência (Hz)	$0,48 \pm 0,08^a$	$0,79 \pm 0,09^a$
Amplitude(pA)	$11,61 \pm 0,59$	$12,81 \pm 0,75$
10-90% Rise Time (ms)	$4,88 \pm 0,26$	$4,35 \pm 0,24$
Decay Time Constant (ms)	$5,36 \pm 0,43$	$5,06 \pm 0,44$
E _{GABA} (mV)	$-21,67 \pm 1,67$ (6) ^a	$-40 \pm 2,89$ (3) ^a
mIPSC	(n=8)	(n=8)
Frequência (Hz)	$0,69 \pm 0,08^a$	$1,10 \pm 0,17^a$
Amplitude(pA)	$9,81 \pm 0,39$	$8,87 \pm 0,27$
10-90% Rise Time (ms)	$5,79 \pm 0,32^a$	$4,53 \pm 0,39^a$
Decay Time Constant (ms)	$2,63 \pm 0,25^a$	$1,81 \pm 0,12^a$

Os valores são apresentados como média \pm EP. Letras iguais representam comparações estatisticamente significativas (*t* de *Student test*). Significância quando $p < 0,05$. Entre parênteses se indicam o número de células registradas. sIPSC registro em presença de KyA e mIPSC registro em presença de Kya e TTX.

3.1.3. Potencial de reversão das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (E_{GABA})

Nós também investigamos se o nível de inibição provida pelo *input* GABAérgico ao córtex piriforme muda durante o desenvolvimento. Assim, nós estimamos o potencial de reversão do GABA (E_{GABA}) pela mensuração dos picos das amplitudes das sIPSC das células piramidais das camadas 2/3 em diferentes potenciais de membrana. Nós observamos que no período P5-P8, o E_{GABA} se encontra mais despolarizado que no período P14-P17 [P5-P8: -

$21,67 \pm 1,67$ mV; n=6 células vs. P14-P17: $-40 \pm 2,89$ mV; n=3 células; $t(7) = 5,94$; $p=0,001$; *t Student test*] (**Tabela 3.1**).

Uma vez que o perfil normal do desenvolvimento das propriedades das sIPSC e mIPSC foi investigado, a nossa pesquisa focou em investigar se esse perfil normal do desenvolvimento das propriedades das IPSC entre P5-P8 e P14-P17 são influenciadas pela experiência sensorial olfatória.

3.2. Efeitos da privação olfatória unilateral na maturação da transmissão sináptica GABAérgica

3.2.1. Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC)

Com o objetivo de compreender como a experiência sensorial olfatória afeta o desenvolvimento pós-natal da transmissão sináptica GABAérgica nas camadas 2/3 do aPC, registramos as sIPSC nas células piramidais do aPC em filhotes com oclusão unilateral do nariz direito (desde P3), em dois períodos do desenvolvimento pós-natais (P5-P8 e P14-P17). Nós comparamos os parâmetros das sIPSC nas células piramidais da camada 2/3 do aPC ipsilateral e contralateral ao nariz ocluído e *sham*. Na **Figura 3.6 (A)** são exibidos os traçados representativos das sIPSC. A análise de variância para dois fatores (ANOVA-2 vias) foi realizada para explorar os efeitos da idade e da privação olfatória sobre os parâmetros das sIPSC. Foram considerados como fatores fixos: o período de idade estudado (P5-P8 e P14-P17) e a condição de privação olfatória (lado ipsilateral, lado contralateral e *sham*) (**Figura 3.6 B**).

A frequência das sIPSC foi incrementada com a idade [$F(1,152) = 36,27$; $p < 0,001$; η^2 parcial = 0,19] e foi afetada pela privação olfatória [$F(2, 152) = 3,45$; $p = 0,034$; η^2 parcial = 0,04] e pela interação da idade e privação [$F(2, 152) = 3,81$; $p = 0,02$; η^2 parcial = 0,05]. Nas células piramidais do aPC no *sham*, lados contralateral e ipsilateral, a frequência das sIPSC se incrementou entre P5-P8 e P14-P17 em 52%, 143% e 57% respectivamente (**Tabela 3.2**). Em P5-P8, a média das frequências sIPSC foi semelhante nos três grupos (Tukey's *post hoc multiple comparison test*) (**Figura 3.6 B**; **Tabela 3.2**). Porém, em P5-P8 a distribuição de probabilidade acumulada de intervalos inter-evento das sIPSC no lado ipsilateral foi ligeiramente deslocada para intervalos maiores quando comparada ao *sham* e lado contralateral ($p < 0,0001$; *K-S test*). A probabilidade de encontrar sIPSC com intervalos inter-eventos menor que 200 ms no *sham* e no lado contralateral foi 13% maior que para o lado

ipsilateral (**Figura 3.6 C**). Em P14-P17, as sIPSC nas células piramidais do lado contralateral tiveram uma frequência significativamente maior que no *sham* e no lado ipsilateral (Tukey's *post hoc multiple comparison test*) (**Fig 3.6 D; Tabela 3.2**). A curva de probabilidade acumulada também mostra o encurtamento no intervalo inter-eventos no lado contralateral comparado com o *sham* e lado ipsilateral ($p < 0,0001$; *K-S test*). A probabilidade de encontrar sIPSC com intervalos inter-evento menor que 200 ms no lado contralateral e no lado ipsilateral foi 13 % maior e 7% menor respectivamente em comparação com o *sham* (**Figura 3.6 D**).

Tabela 3.2. Propriedades das correntes inibitórias espontâneas e miniaturas pós-sinápticas mediadas por GABA_AR em animais com oclusão nasal unilateral

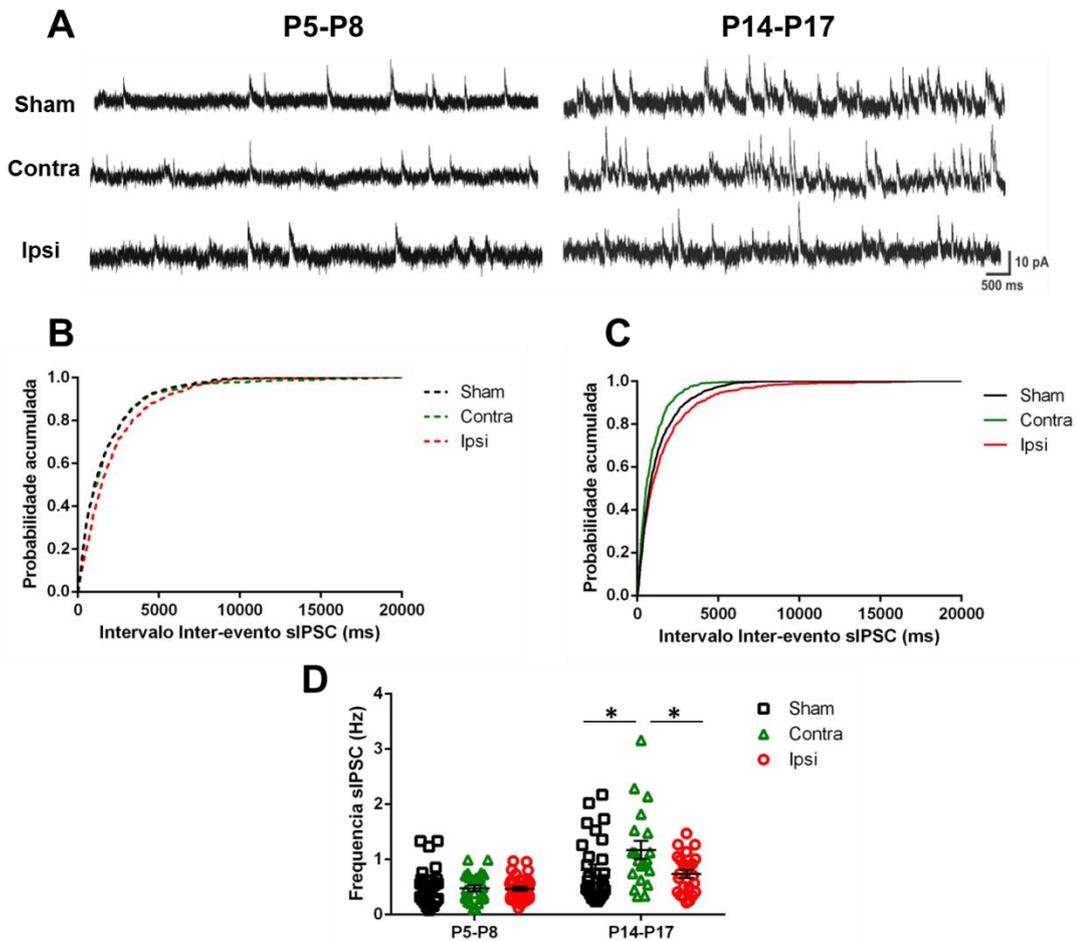
Parâmetros das sIPSC e mIPSC						
Período de idade	Grupo	No. Células	Frequência (Hz)	Amplitude (pA)	10-90% Rise Time(ms)	Decay Time Constant (ms)
sIPSC						
P5-P8	Sham	27	0,53 ± 0,07	13,73 ± 0,79	4,09 ± 0,24	4,16 ± 0,40 ^{a,b}
	Contra	25	0,48 ± 0,05	14,20 ± 0,65	4,38 ± 0,38	5,40 ± 0,33 ^a
	Ipsi	33	0,47 ± 0,04	13,85 ± 0,79	4,44 ± 0,26	5,34 ± 0,30 ^b
P14-P17	Sham	29	0,81 ± 0,10 ^a	15,09 ± 0,94	4,10 ± 0,28	4,20 ± 0,30
	Contra	20	1,17 ± 0,16 ^{a,b}	17,77 ± 1,23	3,90 ± 0,28	3,64 ± 0,24
	Ipsi	24	0,74 ± 0,07 ^b	15,72 ± 1,02	3,59 ± 0,23	3,80 ± 0,21
mIPSC						
P5-P8	Sham	13	0,58 ± 0,10	8,89 ± 0,35	5,31 ± 0,43	2,81 ± 0,37
	Contra	9	0,65 ± 0,14	8,42 ± 0,48	4,49 ± 0,31	2,90 ± 0,15
	Ipsi	8	0,74 ± 0,11	9,22 ± 0,27	5,08 ± 0,49	2,99 ± 0,30
P14-P17	Sham	12	1,06 ± 0,17	9,37 ± 0,36	4,38 ± 0,44	2,72 ± 0,23
	Contra	11	1,35 ± 0,24	8,59 ± 0,27	5,10 ± 0,35	3,09 ± 0,57
	Ipsi	8	1,03 ± 0,22	8,71 ± 0,36	4,56 ± 0,50	2,41 ± 0,23

Os valores são apresentados como média ± EP. Letras iguais representam comparações *post hoc* estatisticamente significativas (*Tukey's Test*). Significância quando $p < 0,05$. sIPSC registro em presença de K_yA e mIPSC registro em presença de K_yA e TTX.

A análise da amplitude mostrou um efeito principal da idade [$F(1, 152) = 9,34$; $p = 0,003$; η^2 parcial = 0,06], mas não efeito da privação olfatória [$F(2, 152) = 1,54$; $p = 0,22$; η^2 parcial = 0,02] ou a interação entre esses fatores [$F(2, 152) = 0,76$; $p = 0,47$; η^2 parcial = 0,01] (**Figura 3.7 A**). O incremento da média da amplitude das sIPSC de P5-P8 para P14-P17 ocorreu principalmente no lado contralateral à oclusão nasal (25,14%) em relação ao *sham* e ao lado ipsilateral, nos quais o incremento foi < 13,5% (**Tabela 3.2**). A curva de

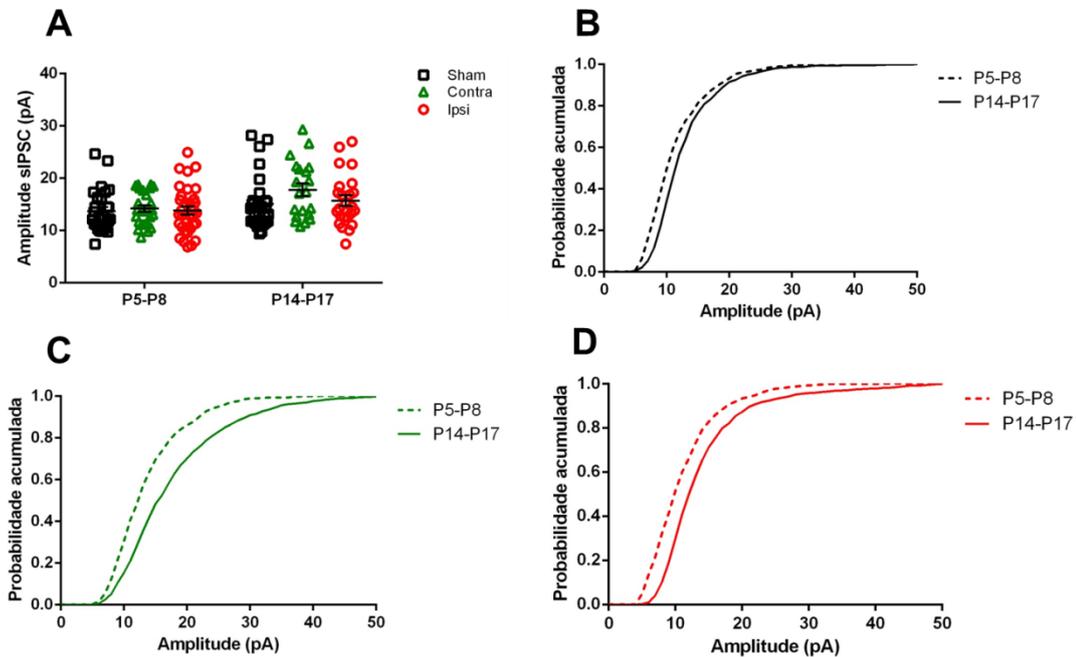
probabilidade acumulada mostra um deslocamento significativo para amplitudes maiores com a idade no contralateral e também no ipsilateral ($p < 0,0001$; *K-S test*) (Figura 3.7 B-D).

Figura 3.6. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento das frequências das correntes pós-sinápticas espontâneas nas células piramidais da camada 2/3 do aPC em dois períodos de idade.



Em **A**, traçados representativos de sIPSC (registrados com fixação de voltagem em 0 mV) em P5-P8 e P14-P17 em *sham*, lado contralateral e lado ipsilateral. **B**, Probabilidade acumulada do intervalo inter-eventos em P5-P8 comparando *sham*, contra e ipsilateral. Note o intervalo inter-eventos maior no lado ipsilateral comparado com a curva do lado contralateral e *sham* ($n=752-1031$; os dois $p < 0,0001$; *K-S test*). Em **C**, probabilidade acumulada curta para o lado contralateral e maior para o lado ipsilateral, os dois comparados com o *sham* (contralateral vs *sham*, $n=832-1365$; $p < 0,0001$; *K-S test*. Ipsilateral vs *sham*, $n=997-1365$; $p=0,002$; *K-S test*). A probabilidade acumulada inter-eventos do lado contralateral está deslocada para valores mais curtos comparado com lado ipsilateral ($n=832-997$ eventos; $p < 0,0001$; *K-S test*). **D**, gráfico da média de frequência (\pm EP) analisada usando ANOVA 2-vias seguido pelo Tukey's *post hoc test*. $*p < 0,05$. Cada quadrado triângulo e círculo representam os valores de uma célula.

Figura 3.7. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento da amplitude das correntes pós-sinápticas espontâneas

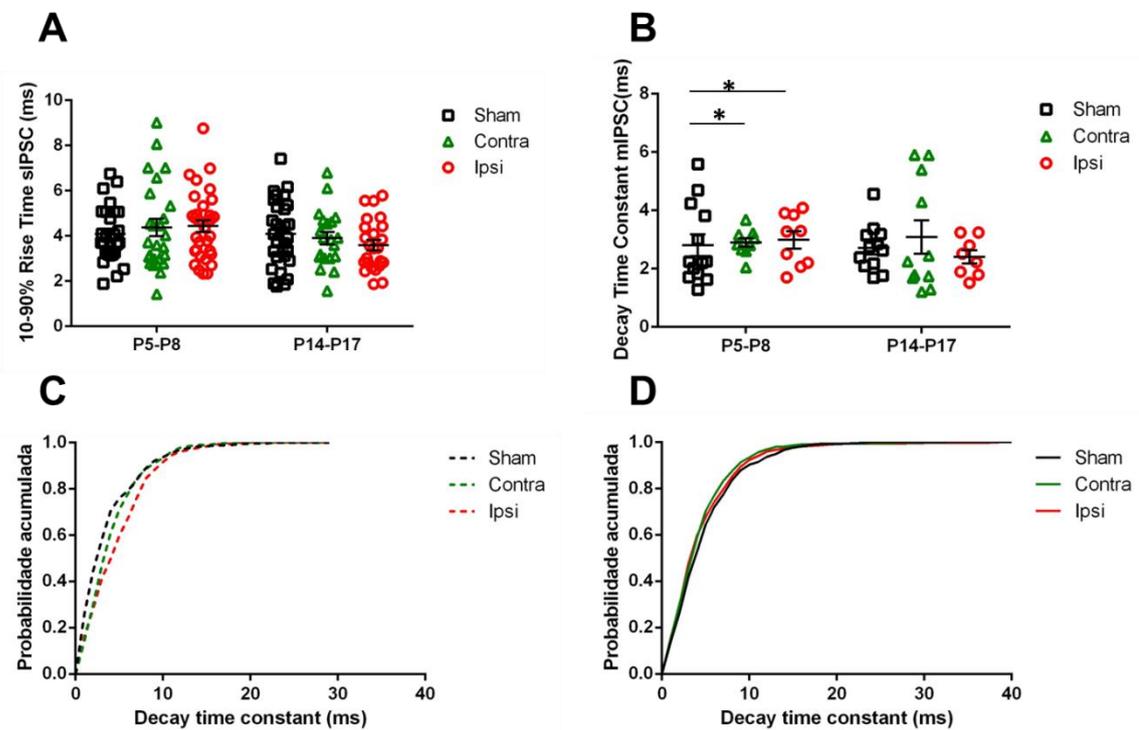


A, Gráfico de dados da média (\pm EP) da amplitude em *sham*, lado ipsilateral e contralateral. A amplitude incrementa com a idade (Anova de 2-vias), isso também é observado na probabilidade acumulada com a idade em *sham* (**B**), lado contralateral (**C**) e lado ipsilateral. Note que no lado contralateral a amplitude em P14-P17 está mais distribuída em amplitudes maiores que em P5-P7. Cada quadrado, triângulo e círculo representam os valores de uma célula.

A análise do 10-90% *rise time* das sIPSC não mostrou modificações significativas com a idade [$F(1, 152) = 3,56$; $p = 0,06$; η^2 parcial = 0,02], com a privação olfatória [$F(2, 152) = 0,09$; $p = 0,91$; η^2 parcial < 0,01] ou com a interação dos dois fatores [$F(2, 152) = 1,23$; $p = 0,29$; η^2 parcial = 0,02] (**Figura 3.8 A; Tabela 3.2**). Porém, a análise do *decay time constant* das sIPSC mostrou significativa redução com a idade [$F(1, 152) = 17,79$; $p < 0,001$; η^2 parcial = 0,11], sem efeito principal da privação olfatória [$F(2, 152) = 0,96$; $p = 0,387$; η^2 parcial = 0,01], porém mostrou um efeito significativo da interação idade e privação $F(2, 152) = 5,00$; $p = 0,008$; η^2 parcial = 0,06] (**Figura 3.8 B; Tabela 3.2**). A redução da média do *decay time constant* das sIPSC com a idade foi principalmente no lado contralateral (48%) e ipsilateral (40%), enquanto que o *sham* teve incremento < 1% (**Figura 3.8 B; Tabela 3.2**). A análise *post hoc* no P5-P8 mostrou que o *decay time constant* das sIPSC nos lados contralateral e ipsilateral da oclusão nasal foram significativamente maiores quando comparado com o *sham* (Tukey's *post hoc* test, para os dois $p = 0,01$; (**Figura 3.8 C; Tabela 3.2**). A probabilidade de encontrar sIPSC com *decay time constant* menor que 5 ms no lado

contralateral e ipsilateral foi de 7% e 28% menos, respectivamente, em comparação com o *sham* (**Figura 3.8 C**). O deslocamento na distribuição de probabilidade acumulada nos lados contra e ipsilateral para valores altos de *decay time constant* relativos ao *sham* (**Figura 3.8 C**, esquerda; $p < 0,001$ e $p < 0,0001$; *K-S test*) (**Figura 3.8 C**). Essas mudanças observadas em P5-P8 não foram mais evidenciadas nas análises da cinética das sIPSC no período P14-P17 (**Figura 3.8 D**).

Figura 3.8. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento da cinética das correntes pós-sinápticas espontâneas (mIPSC) em P5-P8 e P14-P17.



Em **A**, gráfico da média (\pm EP) do 10-90% *rise time constant* em sham, lado contralateral e ipsilateral em P5-P8 e P14-P17 (Two-way Anova, $p > 0,05$). **B**, gráfico da média (\pm EP) do *decay time constant* em sham, lado contralateral e ipsilateral em P5-P8 e P14-P17 (Two-way Anova, efeito da interação idade x privação olfatória, $p < 0,05$). Note que o *decay time constant* no lado contra e ipsilateral estão incrementados em relação ao sham (Tukey's *post hoc test*, $*p < 0,05$). **C**, curva de probabilidade acumulada no lado ipsilateral está deslocada para valores *decay time constant* maior que no lado contralateral ($n = 646-692$; $p < 0,0001$, *K-S test*) e no sham ($n = 634-692$; $p < 0,0001$, *K-S test*). **D**, probabilidade acumulada de *decay time constant* em P14-P17 semelhante para sham, nos lados contra e ipsilateral (*K-S test*, $p < 0,05$). Cada quadrado, triângulo e círculo representam os valores de uma célula.

3.2.2. Correntes inibitórias pós-sinápticas miniatura (mIPSC)

Em seguida, nós mensuramos a frequência, a amplitude e a cinética das IPSC, independente de potencial de ação, mIPSC (**Figura 3.9 A**). A análise da média da frequência das mIPSC nas células piramidais nas camadas 2/3 do aPC mostrou mudanças significativas com a idade [$F(1, 56) = 12,76$; $p = 0,001$; η^2 parcial = 0,19], porém não mostrou efeito da privação olfatória [$F(2, 56) = 0,639$; $p = 0,53$; η^2 parcial = 0,04] ou de interação dos dois fatores [$F(2, 56) = 0,53$; $p = 0,59$; η^2 parcial = 0,05] (**Figura 3.9 B**). O incremento na frequência das mIPSC de P5-P8 a P14-P18 no *sham* (82%) e no lado contralateral (107%) foram maiores que o aumento no lado ipsilateral (39%) (**Tabela 3.2**). A curva de distribuição da probabilidade acumulada dos intervalos inter-eventos das mIPSC também ilustra essas mudanças (**Figura 3.9 C1-C3**). A probabilidade de encontrar mIPSC com intervalo inter-eventos menor que 2000 ms em P14-P17 comparado com P5-P8 foi maior no *sham* (0,14) e no lado contralateral (0,13) do que no lado ipsilateral (0,09) (**Figura 3.9 C1-C3**).

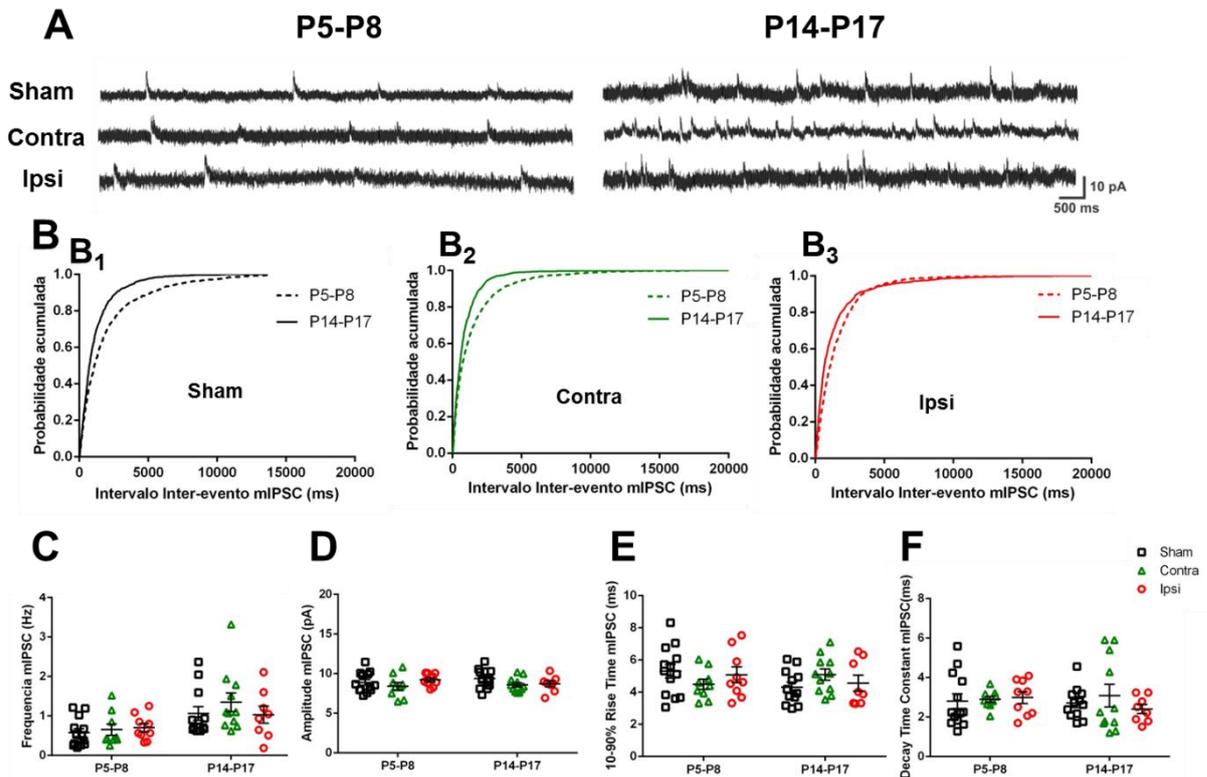
Nós não encontramos efeitos significativos da idade, da privação olfatória ou da interação dos dois fatores na amplitude [idade, $F(1, 56) = 0,03$; $p = 0,88$; η^2 parcial < 0,01; privação, $F(2, 56) = 1,72$; $p = 0,19$; η^2 parcial = 0,06; interação, $F(2, 56) = 0,94$; $p = 0,39$; η^2 parcial = 0,03] (**Figura 3.9 D**), no 10-90% *rise time* [idade, $F(1, 56) = 0,84$; $p = 0,36$, $\eta^2 = 0,02$; privação, $F(2, 56) = 0,00$; $p = 0,99$; η^2 parcial < 0,01; interação, $F(2, 56) = 2,20$, $p = 0,12$, η^2 parcial = 0,07] (**Figura 3.9 E**) ou no *decay time constant* das mIPSC [idade, $F(1, 56) = 0,29$; $p = 0,59$; $\eta^2 = 0,11$; privação, $F(2, 56) = 0,34$; $p = 0,71$, η^2 parcial = 0,01; interação, $F(2, 56) = 0,51$; $p = 0,60$; η^2 parcial = 0,06] (**Figura 3.9 E**).

3.2.3. Potencial de reversão das correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (E_{GABA})

Nós também investigamos se as mudanças dependentes da idade no nível da inibição, observadas nas células piramidais dos animais controle, poderiam ser afetadas pela experiência de privação olfatória. Nós estimamos o potencial de reversão como descrito nas seções anteriores, e encontramos que o E_{GABA} das sIPSC nas células piramidais das camadas 2/3 se encontra despolarizado em filhotes mais jovens no *sham* (P5-P8: $-29,38 \pm 1,48$ mV, n= 8 células vs. P14-P17: $-43,74 \pm 4,27$ mV, n= 4 células, $t(10) = 4,02$, $p = 0,002$; t Student test) e no lado contralateral (P5-P8: $-29,17 \pm 0,83$ mV; n=6 células vs. P14-P17: $-42 \pm 3,74$ mV; n= 5 células; $t(9) = 3,67$; $p = 0,005$; t Student test) (**Tabela 3.2**). Porém, no lado ipsilateral a

oclusão nasal, o E_{GABA} das sIPSC permanece despolarizado também em idade maiores (P5-P8: $-28,00 \pm 1,23$ mV; $n=5$ células vs. P14-P17: $-26,67 \pm 1,67$ mV; $n=3$ células; $t(6)=0,65$; $p=0,54$; t Student test) (Tabela 3.2).

Figura 3.9. Efeitos da privação olfatória inicial no desenvolvimento nas correntes pós-sinápticas miniatura (mIPSC).



Em **A**, traçados representativos de sIPSC e mIPSC nas duas idades para sham, lado contralateral e ipsilateral (fixação de voltagem em 0 mV). **B**, probabilidade acumulativa de intervalo inter-eventos em *sham*, contralateral e ipsilateral. Note que com a idade a curva de probabilidade acumulada em P14-P17 em sham (**B1**) ($n=1110-1182$ eventos; $p<0,0001$; $K-S$ test) e contralateral (**B2**) ($n=1178-1199$ eventos; $p<0,0001$; $K-S$ test) está deslocada para valores mais rápidos de intervalos inter-eventos em relação ao período P5-P8; enquanto que o deslocamento da curva no lado ipsilateral é muito discreto (**B3**) ($n=1227-1398$; $p<0,0001$; $K-S$ test). **C**, gráfico da média (\pm EP) da frequência mIPSC no *sham*, lados contra e ipsilateral (Two-way ANOVA, efeito principal da idade, $p<0,05$). **D-F**, gráfico da média (\pm EP) da amplitude, 10-90% *rise time constant* e *deay time constant* das mIPSC em *sham*, contra e ipsilateral que não mostra efeitos da privação e não mudanças com a idade (Anova 2-vias, $p>0,05$). Cada quadrado triângulo e círculo representam os valores de uma célula.

4. Discussão

O objetivo do presente estudo foi examinar o perfil eletrofisiológico basal da transmissão sináptica GABAérgica nas células piramidais da camada 2/3 do aPC em dois

períodos do desenvolvimento pós-natal (P5-P8 e P14-P17) e se esse perfil de desenvolvimento é modulado pela experiência olfatória na caixa-ninho onde os filhotes permanecem com a mãe. Aqui nos provemos a primeira evidência de que a inibição GABAérgica nas células piramidais do aPC se incrementa de P5-P8 a P14-P17, com aumento nas frequências de sIPSC e mIPSC e com cinéticas rápidas das mIPSC e com potenciais de reversão das sIPSC mais hiperpolarizantes. A privação olfatória parcial no início do desenvolvimento pós-natal por oclusão nasal unilateral induz pequenas mudanças no perfil do desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica, reduzindo o incremento com a idade da frequência das sIPSC e mIPSC, prolongando a cinética das sIPSC em P5-P8 e mantendo o potencial de reversão das sIPSC despolarizado em P14-P17. Além disso, o procedimento leva a um incremento maior da amplitude e da frequência das sIPSC no lado contralateral com a idade.

4.1. Perfil de desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica no aPC

Nós registramos uma resposta fisiológica inibitória nas células piramidais das camadas 2/3 do aPC em ausência de estímulos evocados e nós encontramos que a frequência das sIPSC mediada por receptores GABA_A se incrementa em 65% entre a primeira e a terceira semana de vida pós-natal, sem mudanças significativas paralelas na amplitude ou na cinética.

O aumento na frequência da sIPSC pode ser atribuído ao incremento com o desenvolvimento da densidade de contatos sinápticos inibitórios sobre as células piramidais L2/3 ou a um incremento na excitabilidade de interneurônios GABAérgicos para os *inputs* excitatórios. Para distinguir um do outro, registramos IPSC nas células piramidais L2/3 após eliminar qualquer efeito eventual de potenciais de ação espontâneos mediante o bloqueio com TTX. Se a maturação é que leva a um incremento na densidade dos contatos sinápticos inibitórios sobre a camada L2/3, logo a frequência das mIPSC deverá mudar de modo semelhante à frequência das sIPSC. Em favor dessa hipótese, continuamos a observar um incremento de 59% na frequência das mIPSC em P14-P17 sobre o período de idade P5-P8, sem mudanças na amplitude. Os nossos resultados são consistentes com prévios estudos de imunohistoquímica no aPC em camundongos (SARMA *et al.*, 2011) e ratos (WESTRENBROEK *et al.*, 1998), os quais reportam um incremento na densidade dos contatos sinápticos sobre as células piramidais L2/3 durante as três primeiras semanas pós-natais. Nossos achados são também consistentes com estudos eletrofisiológicos que reportam

o aparecimento de um perfil semelhante ao adulto de inibição cortical no aPC em resposta à estimulação elétrica no LOT ao redor de P14 (SCHWOB *et al.*, 1984).

Os nossos achados sugerem um ganho progressivo no input inibitório nas células piramidais L2/3 com o desenvolvimento em condições fisiológicas normais. Porém, como as células piramidais da L2/3 recebem *input* inibitório de interneurônios da camada L1a e da camada L2/3 no aPC (SUZUKI; BEKKERS, 2010b; BEKKERS; SUZUKI, 2013), é difícil determinar a fonte de interneurônios que está contribuindo com o ganho de *input* inibitório nas células piramidais da camada 2/3. Contudo, análise imunohistoquímica da densidade de sinapses inibitórias na camada L1a do aPC de camundongos tem reportado o primeiro aparecimento de contatos sinápticos GABAérgicos em P7, o qual permanece sem mudanças até P14, porém com rápido incremento depois dessa idade (SARMA *et al.*, 2011). Outro estudo de imunohistoquímica em combinação com análise ultraestrutural do córtex piriforme em ratos tem reportado o primeiro aparecimento de sinapses simétricas de células GAD positivas na camada L1a em P6, o qual se incrementa ligeiramente nas seguintes semanas estabelecendo um perfil adulto ao redor do P21 (WESTRENBROEK *et al.*, 1998). Por outro lado, enquanto os contatos sinápticos inibitórios aparecem em P6 na camada L1a e L2/3 esses já se encontram presentes em P2, as quais se alteram em distribuição, forma, tamanho nas semanas seguintes nesses mesmos animais (WESTRENBROEK *et al.*, 1998). Isso fortemente sugere que o *input* inibitório que nós observamos nas células piramidais da camada L2/3 em P5-P8 pode representar, principalmente, a contribuição do *input* inibitório de interneurônios da camada L2/3, uma vez que as sinapses inibitórias na camada L1a não estão ainda funcionais nesse período de idade. Enquanto que a inibição observada em P14-P17 pode ter uma contribuição tanto dos *inputs* inibitórios de interneurônios GABAérgicos das camadas L1a como das L2/3. Para distinguir a contribuição das duas fontes de inibição no desenvolvimento do *input* inibitório nas células piramidais da camada 2/3, sugerimos futuros estudos *in vitro* com bloqueio farmacológico de uma das fontes de inibição, medindo os parâmetros das IPSC para estimulação do LOT ou dos *inputs* associativos.

Outros achados de nosso estudo foram as mudanças na cinética das mIPSC nas células piramidais L2/3. Nas mIPSC, mas não nas sIPSC, houve diminuição no 10-90% *rise time* e no *decay time constant* com a idade. Os estágios de maturação de diferentes subunidades do receptor GABA_A modificam a cinética das IPSC, desde que o *rise time* e o *decay time constant* das IPSC refletem a ativação e inativação dos receptores GABA_A pelo neurotransmissor GABA (FARRANT; NUSSER, 2005). As mudanças do desenvolvimento

das cinéticas das mIPSC de lentas para rápidas, as quais nós observamos aquisição presumivelmente mediadas pelas mudanças maturacionais nas subunidades α dos receptores GABA_A, assim como está bem documentado que ocorre para outras regiões cerebrais (BOSMAN *et al.*, 2005, PEDEN *et al.*, 2008; EHRLICH *et al.*, 2012). Parece ser que em estágios iniciais do desenvolvimento, a predominância de subunidades $\alpha 2$ (Peden *et al.*, 2008), e $\alpha 3$ (BOSMAN *et al.*, 2002; 2005) e um gradual incremento das subunidades $\alpha 1$ (BOSMAN *et al.*, 2002,2005; PEDEN *et al.*, 2008; EHRLICH *et al.*, 2012) medeiam a mudança gradual de cinéticas lentas a rápidas, atingindo padrão semelhante ao adulto na terceira semana pós-natal.

Nós esperávamos encontrar também uma diminuição consistente com o desenvolvimento na cinética das sIPSC, porém observamos apenas uma redução de 6%. Provavelmente, a conexão GABAérgica nas células piramidais L2/3 com interneurônios, com distinto perfil de maturação, pode explicar esse achado. O aPC tem pelo menos cinco classes de interneurônios GABAérgicos distribuídos nas diferentes camadas, cada um tem diferente padrão de disparo e diferentes compartimentos sinápticos com as células piramidais (SUZUKI; BEKKERS, 2010a; 2012). Se cada população de interneurônios contribuiu igualmente para a geração de mIPSC (independente de potencial de ação) e sIPSC (combinação dependente e independente de potencial de ação), tais mudanças na cinética das mIPSC, mas não nas sIPSC, pode sugerir um efeito contrabalanceado das propriedades pré ou pós-sinápticas das sinápticas GABAérgicas. As propriedades pré-sinápticas poderiam ser resultantes de uma maturação seletiva da população de interneurônios com distintos *inputs* sinápticos nas células piramidais.

Adicionalmente, encontramos que os potenciais de reversão (E_{GABA}) das sIPSC se encontram despolarizados no início do desenvolvimento, os quais se tornam hiperpolarizados com o incremento da idade. A despolarização do E_{GABA} pode caracterizar a sinalização do GABA_A em estágios iniciais do desenvolvimento (BEN-ARI *et al.*, 2012; KILB *et al.*, 2013), tipicamente um resultado da mudança maturacional dos co-transportadores NKCC1 (que facilita a acumulação de cloreto) para KCC2 (que transporta cloreto para fora da célula) (KIRMSE *et al.*, 2018). No neocórtex, a mudança gradual para respostas hiperpolarizantes de GABA é observada ao redor do final da primeira semana pós-natal (YAMADA *et al.*, 2004). Os nossos resultados também sugerem que no córtex piriforme, a sinalização do GABA_A gradualmente se desenvolve para respostas hiperpolarizantes da primeira para a terceira semana pós-natal. Isso é suportado por um estudo ultraestrutural em ratos, mostrando um

gradual incremento pós-natal na distribuição de proteína KCC2 em todas as camadas do córtex piriforme, atingindo perfil de distribuição de adulto no final da segunda semana pós-natal (KOVÁCS *et al.*, 2014). Nas células piramidais do neocórtex maduro, o E_{GABA} se encontra perto do potencial de membrana de repouso, o qual principalmente medeia a hiperpolarização da célula (BEN-ARI, 2002). Nós mostramos aqui que o E_{GABA} é mais despolarizado em P5-P8 e se torna mais hiperpolarizado em P14-P17, sugerindo que GABA tem diferentes funções nas células piramidais da camada 2/3 do aPC nesses dois períodos de idade.

4.2. A privação olfatória tem efeito leve no desenvolvimento da transmissão GABAérgica

O circuito cortical inibitório no aPC é formado pela combinação de mudanças intrínsecas neuronais e estímulos ambientais. Portanto, nós realizamos a oclusão nasal unilateral para isolar as modificações que poderiam ter sido conduzidas pela maturação no aPC, no lado ipsilateral à oclusão, ou pela interação com o ambiente e maturação no aPC, no lado contralateral. Além disso, usamos animais *sham* para controlar efeitos específicos de procedimentos cirúrgicos e manipulação dos animais. Uma vez que a nossa hipótese era que o estímulo olfatório seria necessário para a maturação do circuito inibitório no aPC, nós esperávamos encontrar alterações significativas nas propriedades maturacionais das sIPSC e mIPSC nas células piramidais das camadas 2/3 em P14-P17. Encontramos que, depois de uma privação olfatória parcial em P3, a frequência das sIPSC e mIPSC segue um incremento de P5-P8 a P14-P17, porém o incremento no lado contralateral foi maior e no lado ipsilateral menor, principalmente nas mIPSC. Parece que depois de alguns dias de oclusão nasal esse perfil já se encontra presente. Pois, embora a análise da média das frequências em P5-P8 não foi significativa, a probabilidade de encontrar eventos IPSC rápidos foi maior no lado contralateral e menor no lado ipsilateral, os dois em relação aos animais *sham*. Semelhante ao observado para os animais controle, a amplitude não mudou significativamente com o desenvolvimento em *sham* e no lado ipsilateral, porém, no lado contralateral a amplitude das sIPSC se incrementou de maneira importante (25,14%) com a idade. Isso pode sugerir que a maturação da inibição sináptica nas células piramidais L2/3 é levemente afetada pelo odor da caixa-ninho, onde os filhotes se encontram com a mãe.

Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar porque o perfil geral do desenvolvimento da inibição no aPC foi levemente afetado pela privação olfatória (desde P3).

Por exemplo, a privação nasal unilateral representa um estado de redução e não um bloqueio total da passagem de odor no nariz ocluído (PHILPOT *et al.*, 1997). Portanto, um mínimo *input* olfatório ao aPC pode ser necessário para um adequado desenvolvimento das sinapses inibitórias. Alternativamente, o aPC recebe *inputs* do lado contralateral através da comissura anterior e, talvez, essa inervação possa ser suficiente para um normal desenvolvimento das sinapses inibitórias nas células piramidais L2/3. Porém, é importante mencionar que a projeção contralateral parece não atingir a camada L1a do aPC até a segunda semana pós-natal (cerca de P12), devido a projeção comissural não se encontrar completamente desenvolvida nesse período (SCHWOB; PRICE, 1984).

Interessantemente, encontramos mudanças maturacionais na cinética das sIPSC, mas não das mIPSC. O *decay time constant* das sIPSC teve uma grande redução nos lados contra e ipsilateral, enquanto que a diminuição nos animais *sham* foi de apenas 1%, conforme foi observado para animais controle. Embora houvesse essa redução na cinética das sIPSC, em P5-P8 a cinética nos lados contra e ipsilateral foram muito mais lentas do que no *sham*, porém, a probabilidade de encontrar cinéticas mais rápidas no lado ipsilateral nessa idade foi menor do que no lado contralateral. Esses efeitos não foram mais observados em P14-P17. Isso nós sugere que a oclusão nasal unilateral prolonga o *decay time constant* das sIPSC nas células piramidais L2/3, principalmente durante o período P5-P8.

Vários fatores podem influenciar o prolongamento do *decay time constant* das sIPSC (eventos dependentes e independentes de potenciais de ação), incluindo: a difusão de GABA, recaptação, e propriedades cinéticas dos receptores pós-sinápticos (FARRANT; NUSSER, 2005). No momento, nós não temos evidências para confirmar ou descartar tais alternativas. Porém, considerando que o *input* inibitório na camada 2/3 é dado por diferentes subtipos de interneurônios (SUZUKI; BEKKERS, 2012), uma possibilidade é que cada subtipo com sua própria propriedade intrínseca poderia contribuir com a cinética de *decay time* heterogênea. Nos ratos, na primeira semana pós-natal, o *input* inibitório dominante nas células piramidais da L2/3 é dado principalmente pelos interneurônios GABAérgicos dentro da própria camada 2/3 do aPC (WESTRENBROEK *et al.*, 1998; SARMA *et al.*, 2011), os quais são células multipolares de rápido disparo (SUZUKI; BEKKERS, 2010b; SUZUKI; BEKKERS, 2012) excitadas pelas células semilunares (SUZUKI; BEKKERS, 2012, CHOY *et al.*, 2017), a primeira população de neurônios excitatórios que recebem *input* direto do LOT (SUZUKI; BEKKERS, 2010b). Períodos prolongados de oclusão nasal unilateral (de P1 até P30) levam a uma redução nas ramificações dos dendritos das células semilunares (WILSON

et al., 2000). A redução dos *inputs* excitatórios nas células semilunares e, conseqüentemente, o *input* sobre os interneurônios de rápido disparo, na camada 2/3, poderia reduzir as respostas inibitórias pós-sinápticas com cinéticas rápidas nas células piramidais 2/3. O *decay time constant* das sIPSC nas células piramidais 2/3 em P14-P17 não foi alterado, sugerindo que exista mecanismos compensatórios ocorrem depois da oclusão nasal com impacto no *input* inibitório.

Interessantemente, encontramos que o E_{GABA} na condição ipsilateral permanece sem alteração (mais despolarizado) com a idade quando comparado com a condição contralateral e *sham*, sugerindo que a privação olfatória inicial retarda a mudança maturacional da hiperpolarização do E_{GABA} nas células piramidais da camada 2/3. Embora o E_{GABA} tenha sido registrado em apenas três células de três distintos animais para a condição ipsilateral em P14-P17, esses valores são muito consistentes e homogêneos. Futuros estudos são necessários para verificar esse achado e determinar os possíveis efeitos na sinalização do GABA.

Assim, diferente da sinalização glutamatérgica no aPC que depende da atividade olfatória inicial para desenvolvimento adequado nas sinapses do LOT-L1a, mas não das sinapses associativas nas camadas L1b e L2/3 (FRANKS; ISAACSON, 2005), a privação parcial olfatória nos estágios iniciais do desenvolvimento não leva a impactos substanciais no desenvolvimento da transmissão sináptica GABAérgica no aPC. Nossos resultados indicam que o curso geral do desenvolvimento da inibição nas células piramidais L2/3 foi afetado em certo grau.

4.3. Privação olfatória unilateral incrementa a frequência e amplitude das sIPSC no lado contralateral à oclusão nasal

Estudos iniciais têm sugerido que o lado contralateral à oclusão nasal pode representar uma condição de sobre estimulação uma vez que o lado aberto do nariz recebe mais influxo de ar e odor, quando comparado com animais não ocluídos (revisado em DIAZ *et al.*, 2013). Além disso, depois da oclusão nasal unilateral, as áreas olfatórias periféricas e centrais passam por severas mudanças estruturais, moleculares e funcionais nos lados ipsi e contralateral à oclusão (revisado em COPPOLA, 2012; DIAZ *et al.*, 2013).

Interessantemente, nossos resultados indicam que a frequência e amplitude das sIPSC e a frequência das mIPSC no lado contralateral se incrementam com a idade do mesmo modo que no *sham*, porém, em P14-P17, a frequência e amplitude das sIPSC e mIPSC foram muito

mais incrementadas e semelhantes, respectivamente, em relação ao *sham*. Esses resultados sugerem que a privação olfatória parcial não altera o desenvolvimento normal da inibição sobre as células piramidais das camadas 2/3 no lado contralateral à oclusão, entretanto em P14-P17 parece promover um melhoramento na probabilidade de liberação de GABA e na eficácia da transmissão sináptica de uma maneira dependente do *input* excitatório. Possivelmente, esse melhoramento seja atribuído a um incremento no *input* olfatório para o aPC no lado contralateral por mudanças nos padrões de excitabilidade na membrana nos interneurônios GABAérgicos em desenvolvimento em P14-P17. Esse período de idade é caracterizado por uma sinaptogênese ativas dos interneurônios GABAérgicos na camada L1a e L2/3 (WESTRENBROEK *et al.*, 1998; SARMA *et al.*, 2011). Portanto, é possível que esses interneurônios das duas fontes tenham sido afetados na excitabilidade das suas membranas, seja por *input* olfatório direto ou indireto.

4.4. Relevância para o processamento do odor no desenvolvimento inicial pós-natal

Estudos prévios em roedores, em idades maiores que P9, têm mostrado que a inibição GABAérgica no aPC está envolvida na integração de *inputs* do LOT e na sincronia de disparo de potenciais de ação nas células piramidais da camada 2/3 (FRANKS; ISAACSON, 2006; LUNA; SCHOPPA, 2008; POO; ISAACSON, 2009). Especificamente, as respostas sinápticas GABAérgicas ocorrem em torno de 10 ms depois do início da estimulação elétrica no LOT e essa resposta tende a truncar as respostas excitatórias nas células piramidais, limitando a janela temporal para a integração sináptica dos *inputs* das células mitrais sobre as células piramidais. Esses *inputs* entrantes dentro dessa janela temporal favorecem na célula o disparo de potencial de ação (FRANKS; ISAACSON, 2006; LUNA; SCHOPPA, 2008). Nós mostramos, neste trabalho que a transmissão sináptica GABAérgica em P5-P8 é diferente de P14-P17, sugerindo que as sinapses inibitórias podem operar distintivamente em cada período dessas duas idades, sustentando dois mecanismos neurais diferentes para o processamento de odor. Possivelmente, esses dois perfis distintos de inibição provêm duas janelas temporais diferentes para a integração do *input* de odor nas células piramidais das camadas 2/3.

No neocórtex, uma inibição GABAérgica débil permite uma janela temporal de integração, na qual tanto os potenciais excitatórios pós-sinápticos chegando em grupos temporalmente coincidentes quanto os não-coincidentes, podem se integrar nas células piramidais para atingir o limiar de disparo de potencial de ação em uma janela temporal mais ampla. Por outro lado, uma inibição mais forte permite uma janela temporal de integração

mais estreita e possibilita que somente os potenciais excitatórios pós-sinápticos, que chegam em grupos temporalmente coincidentes, são os mais prováveis de serem integrados na célula piramidal para atingir o limiar de disparo (KUHLMAN *et al.*, 2010). Nós especulamos que o incremento na função inibitória no aPC em filhotes maiores pode prover uma janela de tempo mais abreviada para a integração de *inputs* do LOT evocados pelo odor nas células piramidais da camada 2/3, mediante a restrição da integração e geração de potenciais de ação dos *inputs* chegando em grupos temporalmente não-coincidentes. Por outro lado, uma função inibitória fraca no aPC de filhotes neonatos pode providenciar uma janela temporal mais ampla para a integração e geração de potenciais de ação de *inputs* chegando em grupos temporalmente coincidentes e não-coincidentes nas células piramidais da camada 2/3. Esses dois perfis inibitórios no aPC poderiam suportar diferentes mecanismos para o processamento de odor e aprendizado de preferência olfatória em roedores infantis.

Agradecimentos

A reprodução e cuidado dos animais, bem como uma parte da padronização da oclusão nasal unilateral foram realizados no laboratório do Professor Aldo Bolten Lucion, Departamento de Fisiologia, UFRGS. Os experimentos de eletrofisiologia foram realizados no laboratório da professora Maria Elisa Calcagnotto, no Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Meus sinceros agradecimentos a Clarissa de Azevedo Carmona Bellagamba pela sua ajuda na padronização da oclusão nasal unilateral e nas perfusões dos cérebros. Igualmente meus agradecimentos para Andréa Dolor Finkler, Izabela Amaro Espíndula e Bruna Medeiros de Oliveira pela ajuda na perfusão, dissecação e histologia dos cérebros.

Os resultados eletrofisiológicos baseados neste capítulo foram publicados como **Pardo, GE**, Lucion, AB, Calcagnotto, ME. *Postnatal development of inhibitory synaptic transmission in the anterior piriform cortex*. International Journal of developmental Neuroscience 71 (2018) 1-9 (em **ANEXO**).

Capítulo 4

Maturação das propriedades intrínsecas passivas e ativas de membrana das células piramidais do córtex piriforme anterior

1. Introdução

No **Capítulo 3**, mostramos que a inibição GABAérgica nas células da camada 2/3 do aPC e o potencial de reversão das correntes inibitórias pós-sinápticas (E_{GABA}) são diferentes em P15-P8 e P14-P17. Para explorar se essas diferentes características integradas em um circuito neural, contribuem com um padrão de processamento neural diferencial em cada período (pergunta 2 de pesquisa) precisamos integrar esses dados (nível microcircuito) no processamento da célula piramidal (nível neurônio). Assim, nesse trabalho, nós examinamos as características das propriedades ativas e passivas da membrana das células piramidais da camada 2/3 do aPC nos períodos P15-P8 e P14-P17.

Foi mensurada a atividade elétrica das células piramidais para injeção de pulsos de corrente hiperpolarizante e despolarizante, utilizando estratégia eletrofisiológica *patch-clamp whole-cell* em configuração *current clamp* em fatias de cérebro de filhotes de rato em períodos de idade P5-P8 e P14-P17. A partir dessas respostas, nós calculamos os parâmetros de propriedades passivas (potencial de membrana em repouso, resistência ao *input*, constante de tempo da membrana) e ativas (limiar de disparo, amplitude e duração de potencial de ação, bem como características de tipo de disparo) das células piramidais da camada 2/3 do aPC.

2. Método

2.1. Ética

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com o número da carta de aprovação 27961 do dia 27 de novembro de 2014 e do ADENDO aprovado em fevereiro de 2016 pelo mesmo CEUA.

2.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas e machos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Todos os cuidados com os animais referentes a: alojamento, reprodução, gestação, traslado de fêmeas grávidas do biotério setorial de Fisiologia para o biotério de Bioquímica, bem como o parto e padronização das ninhadas foram realizados como descrito no **Capítulo 3**. Filhotes de rato (machos e fêmeas) nos períodos P5-P8 e P14-P17 foram estudados.

2.3. Eletrofisiologia *in vitro*

2.3.1. Preparo de fatias

Após serem anestesiados com xilazina/cetamina (100 mg/10 mg por kg) os filhotes de rato foram decapitados e os cérebros rapidamente extraídos (<60 segundos) e colocados em solução aCSF fria (2-4°C) com alto teor de sacarose, contendo: 220 mM de sacarose; 3 mM de KCl; 1,25 mM de NaH₂PO₄-H₂O; 2 mM de MgSO₄-7H₂O; 26 mM de NaHCO₃ e 10 mM de dextrose. Após 10 minutos de borbulhar a solução com gás carbogênio (mistura 95%O₂ - 5% CO₂), foi incluída 1 mM de CaCl₂ na solução aCSF fria. Em seguida, o cérebro foi colado sobre uma plataforma e rapidamente colocado no vibrátomo (Leica Microsystems, Bannockburn, IL), para o corte das fatias na mesma solução aCSF fria. Fatias coronais de 300 µm contendo o córtex piriforme anterior foram obtidas. Após o corte, as fatias foram incubadas à 37 °C em banho maria por 45 minutos em uma solução aCSF normal contendo os seguintes componentes: 124 mM de NaCl; 3 mM de KCl; 1,25 mM de NaH₂PO₄.H₂O; 2 mM de MgSO₄.7H₂O; 26 mM de NaHCO₃ e 10 mM de dextrose. Antes de colocar as fatias, 1 mM de CaCl₂ foi adicionada após 10 min de borbulhar a solução com gás 95%O₂-5% CO₂. Após o período de incubação, as fatias foram retiradas do banho e deixadas para se recuperarem a temperatura ambiente por 60 minutos, continuamente oxigenadas (95%O₂-5% CO₂), antes do início dos registros.

Uma vez finalizado o período de incubação, as fatias foram transferidas para a câmara de registro. Foram visualizadas em microscópio equipado com contraste de interferência diferencial e padrão de iluminação infravermelho (IR-DIC) e sistema de vídeo com objetiva de imersão 40X (Olympus BX51WI). As identificações da camada 2/3 do córtex piriforme e das células piramidais foram realizadas usando objetivas 5X e 40X, respectivamente. Na

câmara, a fatia foi mantida em contínua perfusão com solução aCSF normal borbulhada com 95% O₂-5% CO₂ a uma taxa de aproximadamente 2 mL/ min.

2.3.2. Registro *whole-cell patch clamp*

Para os registros *whole-cell* das células piramidais, as pipetas foram preparadas a partir de capilares de vidro de borosilicato (1.5/1.12 OD/ID, WPI, Sarasota, FL) usando um estirador de pipetas (P-1000, Sutter instruments, Novato, CA). Após o preparo, as pipetas foram polidas usando Micro Forge (MF-830, Narishige, Japan) com uma resistência final da ponta (1 µm) de 3-6 MΩ). Os registros foram realizados usando o amplificador Multiclamp 700 B (Molecular Devices, CA, USA).

2.3.3. *Current-clamp*

Para o registro das propriedades passivas e ativas da membrana das células piramidais da camada 2/3 do aPC, foi utilizada a configuração *current-clamp*. Para os registros de *current-clamp*, a pipeta foi preenchida com solução intracelular contendo: 120 mM de Kgluconato; 10 mM de KCl; 1 mM de MgCl₂; 0,025 mM de CaCl₂; 0,2 mM de EGTA; 2 mM de Na₂-ATP; 0,2 mM de Na₂-GTP; 10 mM de HEPES; pH a 7,2; ajustado com KOH 10 M, e osmolaridade de 285-295 mOsm. Os dados foram registrados através do amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, CA, USA), digitalizados em 10 Hz com Digidata 1440- A System (Molecular Devices, CA, USA), filtrado em 1 kHz (-3 dB, eight-pole Bessel) e analisados *off-line* usando o *software* pClamp 10.6 (Molecular Devices, CA, USA). O potencial de membrana foi fixado em -65 mV para todas as células. Para mensurar as propriedades intrínsecas passivas das células, uma série de pulsos de correntes despolarizantes e hiperpolarizantes (-180 pA a +300 pA) de onda quadrada (500 ms de duração) foram injetados nas células com intervalo de 500 ms, a cada 20 pA. Também registramos a atividade espontânea das células em modo *gap free*.

O potencial de membrana em repouso (V_m) foi medido dentro de alguns minutos depois de romper a membrana ceíçar e foi definido como o potencial de membrana estado-estável (obtido em modo de injeção de corrente 0). A resistência ao *input* (R_{in}) foi determinada a partir da resposta de voltagem para 1 s. de injeção de corrente hiperpolarizante de -100 pA e foi calculado como a proporção do pico da deflexão da voltagem para a corrente injetada. A constante de tempo da membrana (τ_m) foi definida como o tempo necessário para a célula atingir o 63,2% da sua máxima deflexão de voltagem em resposta a uma injeção de corrente

hiperpolarizante (-100 pA). A capacitância da membrana (C_m) foi calculada a partir dos dados de R_{in} e τ_m usando a fórmula $C_m = \tau_m / R_{in}$.

Para medir as propriedades do potencial de ação (PA), foram injetadas séries de correntes despolarizantes (onda quadrada) de 1 s. de duração em passos de 20 pA (+20 pA a +300 pA). A rheobase foi definida como a mínima corrente despolarizante injetada para gerar pelo menos 1 PA. O primeiro PA evocado pelo pulso de corrente despolarizante foi definido para a mensuração das propriedades de PA. Os PA com amplitude máxima abaixo de 10 pA não foram incluídos na análise. A média da amplitude do PA foi definida como a média do incremento de voltagem do limiar para disparo de PA ao pico da amplitude do primeiro PA para todas as injeções de correntes despolarizantes. A média da duração do PA foi definida como largura entre a metade máxima da amplitude do PA para o primeiro PA para todas as injeções de correntes despolarizantes. A média da latência do PA foi calculada como o tempo requerido para eliciar um PA depois do início da injeção das correntes despolarizantes. A frequência de PA foi calculada mediante a quantificação do número de *spikes* eliciados por injeção de correntes despolarizantes de 1 s. de duração.

2.4. Análise de dados

Todos os dados coletados provieram de um total de 21 células piramidais das camadas 2/3 de oito filhotes de ratos provenientes de cinco ninhadas diferentes (P5-P8 e P14-P18). As análises de estatística dos dados eletrofisiológicos foram realizadas usando o *two-side unpaired t Student test* após o teste de normalidade dos dados (*Kolmogorov-Smirnov test*). As comparações estatísticas e os gráficos foram realizados usando o *software* Graph Prisma 6 (GraphPad, LaJolla, CA). Todos os valores no texto, gráficos e tabela são apresentados como média \pm erro padrão (EP). Adicionalmente na tabela, também foi incluído o valor de desvio padrão (DP). O número de neurônios é expresso como “n”. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ e a significância dos dados em tabelas e gráficos é denotada com asterisco (*).

3. Resultados

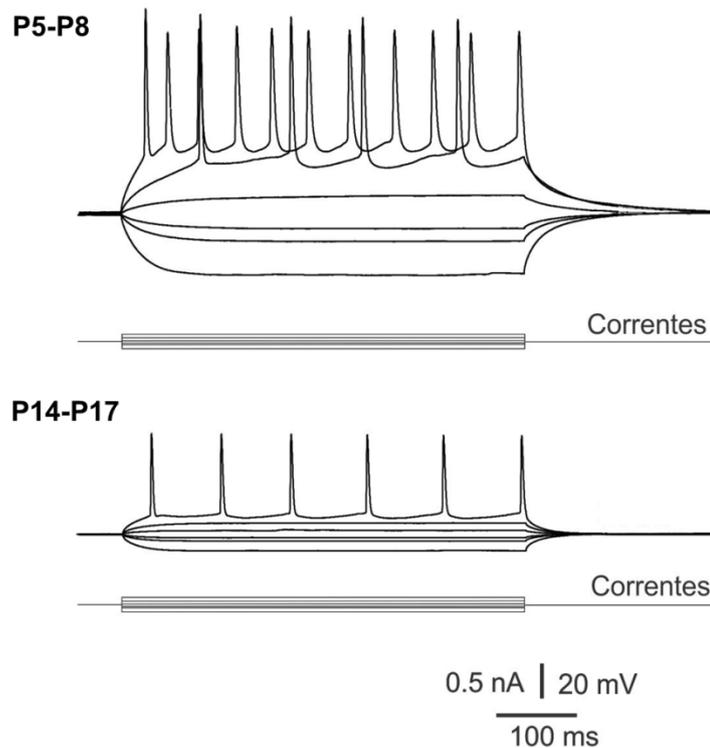
No **Capítulo 3** mostramos que a inibição GABAérgica nas células piramidais da camada 2/3 do aPC mudam significativamente entre P5-P8 a P14-P17. Aqui, nesse estudo, encontramos que as propriedades intrínsecas passivas e ativas da membrana das células

pirâmidas L2/3 também mudam significativamente durante esses dois períodos do desenvolvimento pós-natal.

3.1. Desenvolvimento pós-natal das propriedades passivas de membrana

Nós medimos as propriedades passivas das células piramidais da camada 2/3 do aPC. Na **Figura 4.1** se ilustram respostas típicas de voltagem para injeção intracelular de correntes hiperpolarizantes e despolarizantes em neurônios em P5-P8 e P14-P17.

Figura 4.1. Mudanças na resposta do potencial de membrana para injeção de corrente em células piramidais em P5-P8 e P14-P18.



A amplitude dos passos de correntes injetadas (traçados inferiores) foram -120 pA, -40 pA, -20 pA, +20 pA, +60 pA e +120 pA para os dois períodos. Houve uma diminuição progressiva na resistência ao input e na constante de tempo da célula com a idade.

3.1.1. Potencial de membrana em repouso

O potencial de membrana em repouso (V_m) foi medido imediatamente depois da configuração *whole-cell*. O V_m se torna mais negativo com o avanço da idade. Em P5-P8, o V_m foi $-39,22 \pm 5,66$ mV ($n=9$ células) e em P14-P17 foi mais negativo $-54,35 \pm 2,27$ mV ($n=12$ células) [$t(19)=8,45$, $p<0,0001$, t Student test]. Os resultados se encontram sumarizados na **Tabela 4.1**.

A resistência ao *input* (R_{in}) e a constante de tempo da membrana (τ_m) foram estimados com injeção de pulsos de corrente hiperpolarizante (-100 pA) de 500 ms de duração.

3.1.2. Resistência ao *input* e Constante de tempo da membrana

Encontramos uma grande redução (147%) na R_{inp} das células piramidais da camada 2/3 com a idade. Em P5-P8, a R_{in} foi de $438,6 \pm 99,44 \text{ M}\Omega$ (n= 9 células) o qual se reduziu significativamente em P14-P18 para $177,1 \pm 50,02 \text{ M}\Omega$ [$t(19)=7,91$, $p<0,0001$, t Student test] (Tabela 4.1). A τ_m também se reduz com o avanço da idade (41%). Em P5-P8 a τ_m foi de $42,78 \pm 4,17 \text{ ms}$ e em P14-P18 se reduziu para $30,33 \pm 1,69 \text{ ms}$ [$t(19)=3,04$, $p=0,007$, t Student test)] (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Propriedades passivas e ativas das células piramidais da camada 2/3 do aPC

Parâmetros	P5-P8 (n=9 células)		P14-P17 (n=12 células)		$t(19)$	p
	Média \pm EP	DP	Média \pm EP	DP		
Propriedades Passivas						
Potencial de membrana em repouso (mV)	-39,22 \pm 1,89	5,66	-54,35 \pm 0,66	2,27	8,45	< 0,0001 ****
Resistência ao input (M Ω)	438,6 \pm 33,15	99,44	177,1 \pm 14,44	50,02	7,91	< 0,0001 ****
Constante de tempo da membrana (ms)	42,78 \pm 4,17	12,53	30,33 \pm 1,69	5,88	3,04	0,007**
Capacitância da membrana (pF)	98,21 \pm 7,16	21,48	178,1 \pm 10,83	37,51	5,70	< 0,0001 ****
Propriedades Ativas						
Limiar de disparo de AP (mV)	-36,63 \pm 1,35	4,04	-45,96 \pm 1,80	6,24	3,90	0,001**
Amplitude de AP (mV)	76,90 \pm 3,38	10,13	85,43 \pm 4,53	15,69	1,42	0,17
Duração do AP (ms)	4,32 \pm 0,33	0,98	2,97 \pm 0,09	0,34	4,46	0,0003***
Frequência máxima de AP (Hz)	11 \pm 2,36	7,07	21,50 \pm 2,53	8,79	2,94	0,0085**
Rheobase (pA)	48,89 \pm 6,76	20,28	95,00 \pm 11,04	38,26	3,27	0,004**
$V_{thres}-V_m$ (mV)	3,92 \pm 2,95	8,86	8,77 \pm 2,38	8,23	1,29	0,21

As propriedades intrínsecas foram mensuradas mediante *whole-cell current clamp* das células piramidais da camada 2/3 nos períodos de idade de P5-P8 e P14-P17. Os valores são descritos como Média \pm EP e DP. Os asteriscos representam significância estatística (*unpaired t* Student Test). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

3.1.3. Capacitância da membrana

Uma vez que a C_m foi calculada a partir dos dados de τ_m e R_{inp} , conseqüentemente se incrementa com a idade com os valores de $98,21 \pm 21,28$ pF em P5-P8 para $178,1 \pm 37,51$ pF em P14-P17 [$t(19)=5,70$, $p<0,0001$, t Student test] (**Tabela 4.1**).

3.2. Desenvolvimento pós-natal nas propriedades de potencial de ação

O limiar de disparo, amplitude, duração e frequência de disparo de potencial de ação foram mensurados a partir do primeiro potencial de ação para injeção de correntes despolarizantes (+20 pA-+300 pA) de 500 ms de duração.

3.2.1. Limiar de disparo de potencial de ação

Com a idade, o limiar de disparo de potencial de ação (V_{thres}) se torna mais negativo em aproximadamente 25%. Em P5-P8, o V_{thres} foi de $-36,63 \pm 4,04$ mV (n=9 células) passando para $-45,96 \pm 6,24$ mV em P14-P17 [$t(19)= 3,90$; $p=0,001$; t Student test] (**Tabela 4.1**). Também foi calculada a diferença entre o V_{thres} e o $V_m(V_{thres}-V_m)$ para determinar se a quantidade de despolarização requerida para atingir o limiar de disparo de potencial de ação nas células nas duas idades é estável. Em P5-P8, a diferença $V_{thres}-V_m$ foi de $3,92 \pm 8,86$ mV e em P14-P17 se incrementa ligeiramente para $8,77 \pm 8,23$ mV, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa [$t(19)= 1,29$, $p=0,21$; t Student test] (**Tabela 4.1**).

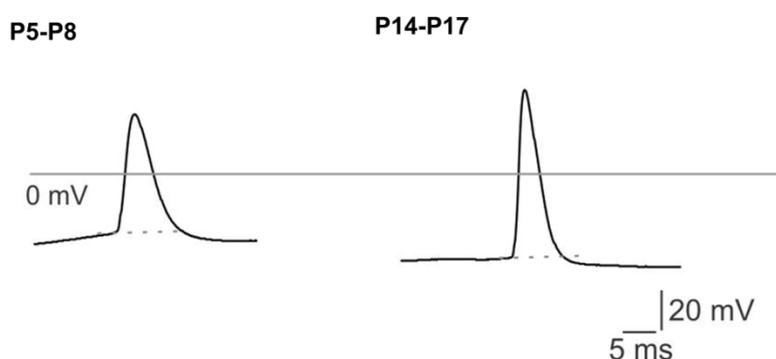
3.2.2. Amplitude do potencial de ação

Foi observado que o pico de amplitude se incrementa ligeiramente com a idade (aproximadamente em 11 %), de $79,90 \pm 10,13$ mV (n=9 células) em P5-P8 passa para $85,43 \pm 15,96$ (n=9 células) em P14-P17, porém, essa diferença não mostrou significância estatística [$t(19)= 4,46$, $p=0,17$, t Student test] (**Tabela 4.1**). Na **Figura 4.2** se mostram exemplos representativos da amplitude e duração de potenciais de ação nas duas idades.

3.2.3. Duração do potencial de ação (*half-width*)

Com o avanço da idade, a duração do potencial de ação se torna significativamente mais rápido (em aproximadamente 45%), de $4,32 \pm 0,98$ ms em P5-P8 passa para $2,97 \pm 0,34$ ms em P14-P18 [$t(19)= 4,46$, $p=0,0003$, t Student test] (**Tabela 4.1**; **Figura 4.2**).

Figura 4.2. Mudanças nos parâmetros de potencial de ação com a idade.



Exemplos de potenciais de ação registrados em P5-P8 e P14-P17. A linha horizontal sobrepassando os dois traçados indica 0 mV e o limiar de disparo de PA é mostrado com linha pontilhada em cada traçado (de -23 mV para P5-P8 e de -39 mV para P14-P17). A amplitude do PA se incrementa e a duração do PA de reduz com a idade.

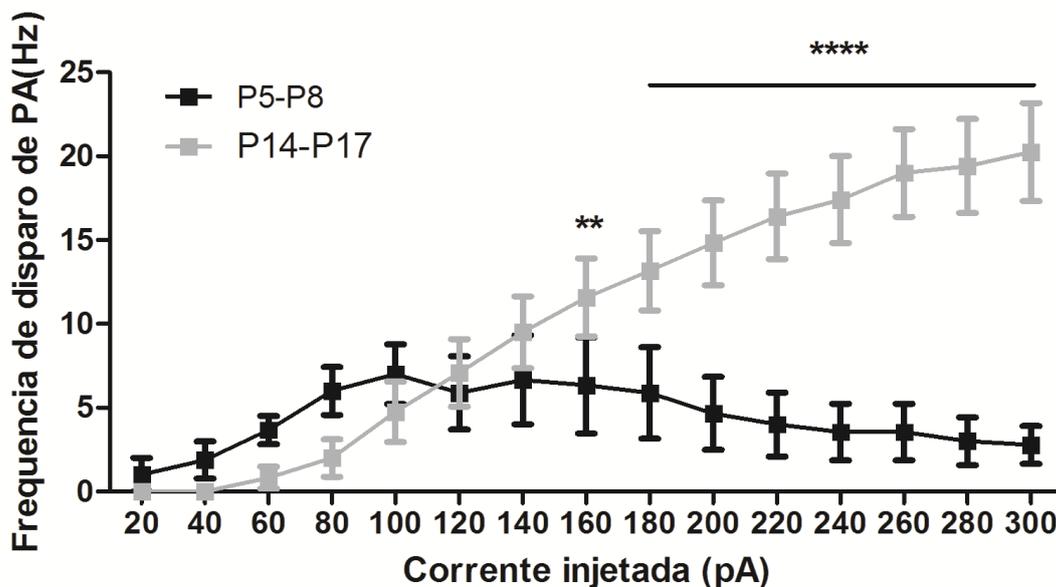
3.2.4. Frequência de disparo de potenciais de ação

A relação *input-output* da média de frequência de *spikes*⁴ versus a média de amplitude da corrente injetada também muda com a idade (**Figura 4.3**). Na **Figura 4.4** se ilustra exemplos de traçados da resposta de duas células em P5-P8 e P14-P17 para injeção de corrente despolarizante crescente. A corrente rheobase para evocar PA incrementa de $48,89 \pm 8,86$ pA em P5-P8 para $95 \pm 38,26$ pA em P14-P17 (**Tabela 4.1**). As células piramidais dos animais mais jovens (P5-P8) tiveram alta frequência de disparo de PA para injeções de correntes de menor intensidade (a partir de +20 pA), porém, também tiveram uma menor frequência máxima de disparo ($11 \pm 7,07$ Hz), a qual diminui para injeção de corrente de maior intensidade (+180 pA- 300 pA (**Figura 4.5**)). A frequência de disparo de PA em P4-P17 alcançou a disparar potenciais de ação para injeção de correntes de maior intensidade (a partir de +60 pA) e a sua frequência de disparo foram também maiores que nos animais jovens ($21,50 \pm 8,79$ Hz) [$t(19) = 2,29, p = 0,0085$; *t Student test*] (**Tabela 4.1**). Para injeção de corrente de +120 pA, a média de frequência de disparo das células nas duas idades é muito semelhante. A partir de injeção de corrente de +140 pA o número de *spikes* nas células em P14-P18 começa a se incrementar proporcional ao *input* de corrente, atingindo um número de *spikes* significativamente maior que em P5-P8 para injeção de corrente de +160 pA ($p < 0,01$).

⁴ É outro termo utilizado para descrever potenciais de ação, especialmente aqueles de mudança rápida na voltagem.

Injeções de corrente entre +180 e +300 pA induzem um incremento grande no número de *spikes* nas células em P14-P18 em relação às células em P5-P8 ($p < 0,0001$) (Figura 4.5).

Figura 4.3. Curva da relação corrente-resposta das células piramidais da camada 2/3 do AP em P5-P8 e P14-P17

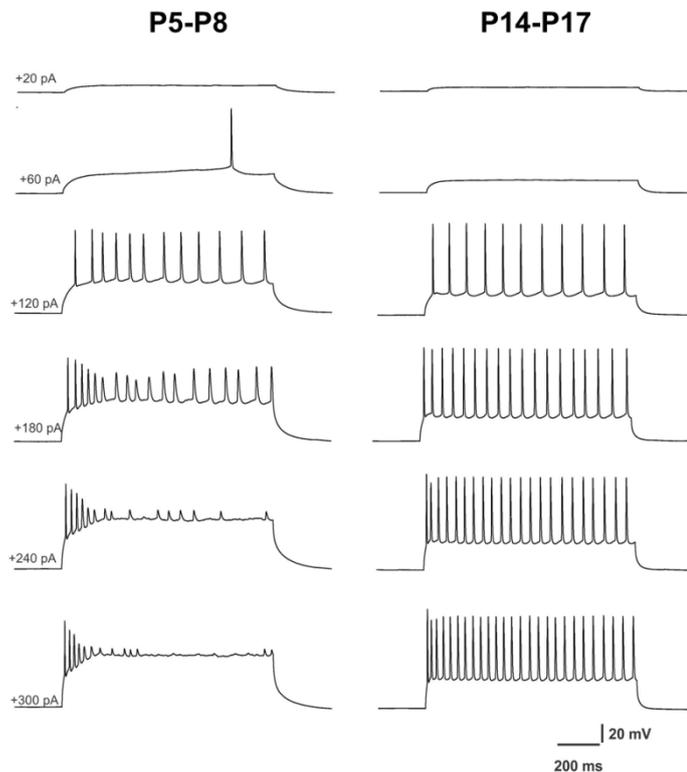


A diferença na frequência média (\pm EP) de disparo de PA das células entre 20-140 pA não mostra significância estatística ($p < 0,05$). Entre injeção de corrente de 160-300 pA, a frequência média de disparo nas células em P14-P17 incrementa-se proporcional ao incremento na corrente despolarizante e entanto que a frequência média de disparo diminui nas células em P5-P8 (P5-P8 vs P14-P17, $**p < 0,001$, $****p < 0,0001$, *unpaired t* Student Test).

Para as duas idades, nenhuma das células evocou PA para injeção de corrente de +20 pA. Na injeção de corrente de +60 pA, todas as células em P5-P8 mostraram pelo menos um potencial de ação (quatro células evocaram menos de três potenciais de ação e cinco células evocaram mais de seis potenciais de ação). Em P14-P17, para a mesma injeção de corrente, oito células não evocaram nenhum potencial de ação, duas células evocaram um potencial de ação e duas células evocaram oito e dez potenciais de ação, respectivamente. Para injeção de corrente de +120-+180 pA, mais da metade das células registradas (5/9) em P5-P8 foram capazes de gerar o primeiro *spike*, porém, o segundo e terceiro foram diminuídos em amplitude e prolongados em duração. Para injeção de corrente de +200 pA-+300 pA, todas as células mostraram esse perfil. Em P14-P17, a maioria das células começaram a evocar *spikes* para injeção de corrente de +120 pA. De um total de doze células, dez incrementaram o número de disparo com o aumento de injeção de corrente, porém houve uma célula que só

evocou *spikes* para corrente de +300 pA e o perfil de disparo foi semelhante às células em P5-P8. Uma célula começou a disparar trens de *spike* semelhante às células em P5-P8, com injeção de corrente $>+180$ pA.

Figura 4.4. Características de disparo de PA das células piramidais do aPC em P5-P8 e em P14-P18.



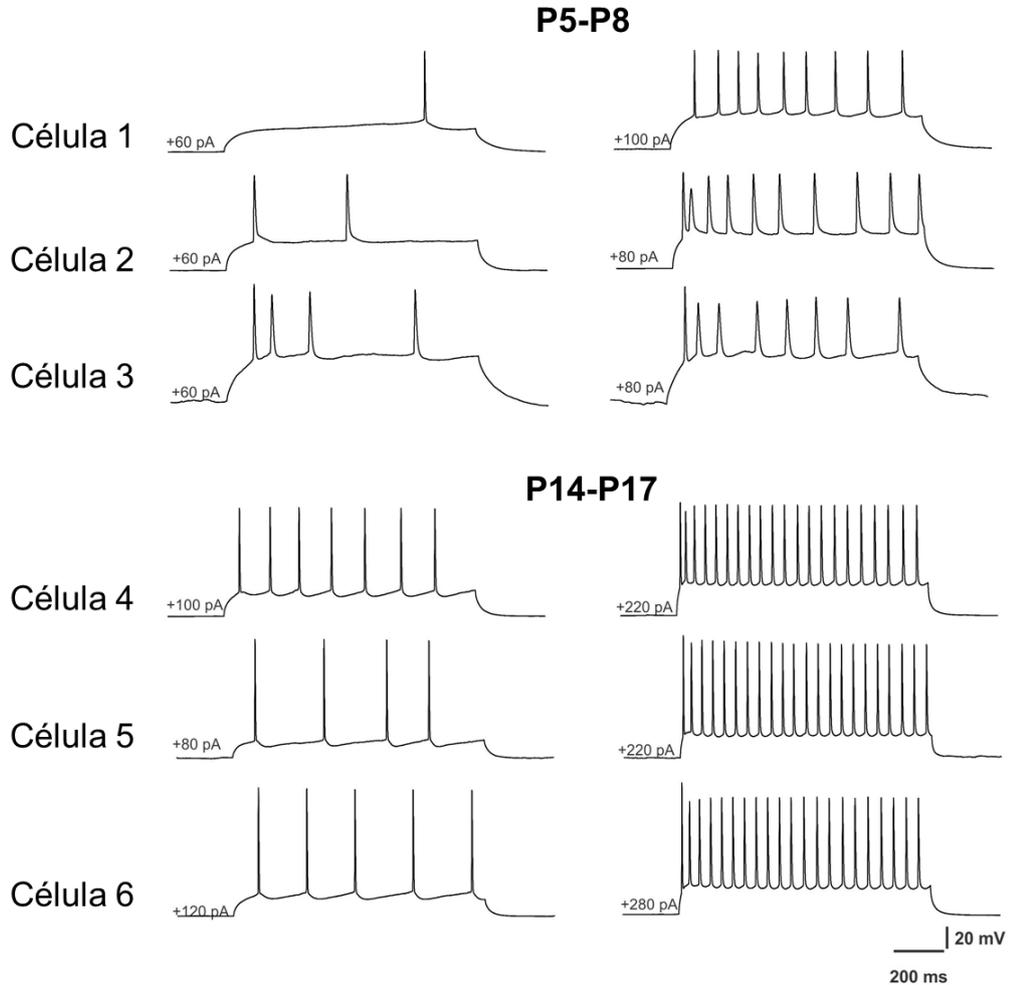
Traçado de duas células piramidais representativas para cada período de idade. Note como as duas células nas duas idades não disparam PA para injeção de corrente de +20 pA. A célula em P5-P8 mostra adaptação⁵ de disparo entre +180 pA e + 300 pA, enquanto que a célula em P14-P18 mostra disparo de regular, o qual se incrementa com o aumento da intensidade da corrente despolarizante. A amplitude das correntes injetadas é indicada no início de cada traçado.

3.2.5. Disparo em *burst*

Em P5-8, apenas um neurônio disparou potencial de ação em *bursts* em resposta a injeção de corrente, enquanto que em P14-P17 foram observados dois neurônios com esse tipo de disparo. Os disparos em *bursts* do potencial de ação foram observados no início dos trens de disparo.

⁵ Referido à diminuição ou cese de disparo de spikes durante estimulação constante.

Figura 4.5. Mudanças no padrão de disparo do potencial de ação com o desenvolvimento



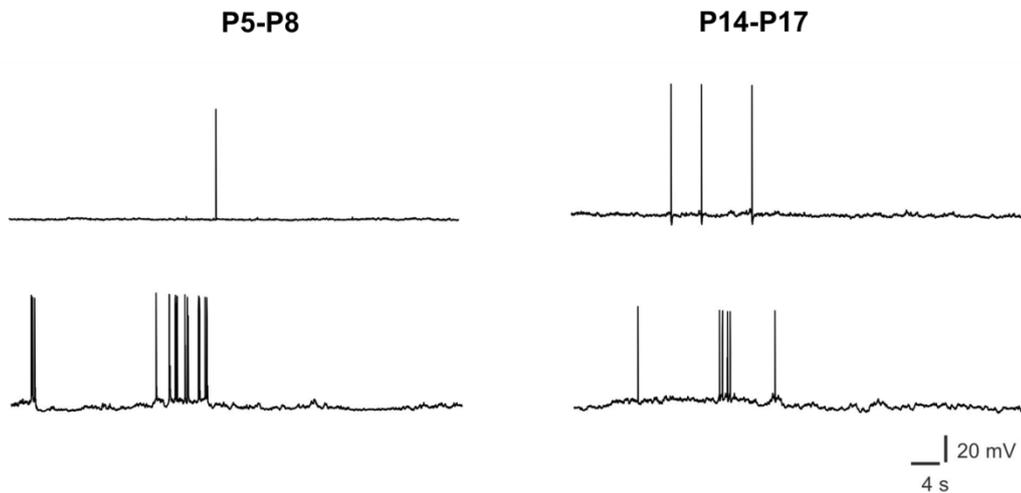
Respostas no potencial de membrana para pulsos de corrente de 500 ms de duração em 3 células piramidais em P5-P8 e P14-P17. O primeiro traçado (esquerda) é a frequência mínima de disparo da célula e o segundo traçado (direita) é a frequência máxima de disparo de PA da célula. A amplitude das correntes injetadas é indicada no início de cada traçado.

3.2.6. Disparo espontâneo

Após o registro de potenciais de ação com injeção de corrente de 500 ms e 1000 ms, as células foram registradas em modo *gap free* durante 1 minuto (sem fixação de corrente, com o potencial de membrana em -65 mV). Nessas condições, algumas células mostraram disparo espontâneo nas duas idades. Em P5-P8, seis células de nove (6/9) mostraram disparo espontâneo e em P14-P18, cinco células de doze (5/12) exibiram disparo espontâneo (**Figura**

4.6). Duas células com disparo espontâneo mostraram *burst* de potenciais de ação em P5-P8. Nas células dos filhotes maiores não foram observados disparos espontâneos em *burst*.

Figura 4.6. Disparo espontâneo de PA em células piramidais em P5-P8 e P14-P17



Traçados representativos de disparo espontâneo das células em cada período de idade. Os traçados foram obtidos de registros em modo *gap free* durante 60 segundos.

4. Discussão

Nesse estudo, nós mostramos que as propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais das camadas 2/3 do aPC passam por um processo de maturação importante entre a primeira e terceira semana de vida pós-natal. Esses resultados são consistentes com estudos eletrofisiológicos prévios reportados em roedores para outras regiões cerebrais e, inclusive, o próprio córtex piriforme de camundongos.

4.1. Desenvolvimento das propriedades passivas da célula piramidal

Os nossos resultados mostram que as propriedades intrínsecas das células piramidais da camada 2/3 do aPC se encontram em processo de maturação entre a primeira e terceira semana de vida pós-natal. De P5-P8 a P14-P17, o potencial de membrana em repouso (V_m), a resistência ao *input* (R_{in}) e a constante de tempo da membrana (τ_m) tiveram uma redução importante. Esses dados são coerentes com os dados reportados para outros córtices em desenvolvimento, como: córtex visual primário de camundongos (KASPER *et al.*, 1994), córtex auditivo primário (OSWALD; REYES, 2008), córtex somatosensorial (LORENZON;

FOEHRING,1993;MARAVALL *et al.*, 2004; VALIULLINA *et al.*, 2016) e córtex pré-frontal em ratos (ZHANG, 2004), nos quais as mudanças significativas nas propriedades intrínsecas passivas da célula piramidal ocorrem entre a primeira e terceira semana de vida pós-natal.

Interessantemente, parece que a hiperpolarização do V_m nas células piramidais 2/3 do córtex piriforme continua além da segunda semana pós-natal, enquanto que a R_{in} parece atingir o nível de maturação na segunda semana pós-natal. Um estudo de V_m e R_{in} para células piramidais do córtex piriforme em camundongos em P8-11 e P14-P21 mostra isso (GHOSH *et al.*, 2015).

As mudanças com o desenvolvimento nas propriedades intrínsecas passivas da membrana da célula piramidal parecem estar relacionadas com mudanças na morfologia das células. Por exemplo, no neocórtex a redução progressiva na R_{in} das células piramidais está relacionada com o incremento na área superficial do soma e prolongamento dos dendritos primários apicais (ZHANG, 2004). No córtex piriforme anterior, entre a primeira e terceira semana pós-natal acontece um incremento importante na espessura de todas as camadas (SCHWOB; PRICE, 1984, SARMA *et al.*, 2011), as quais refletem mudanças na morfologia das células, sendo que, uma das camadas superficiais (L1a) está formada na sua maior parte por dendritos apicais das células piramidais das camadas mais profundas (L2 e L3) (NEVILLE; HABERLY, 2004; WILSON; SULLIVAN, 2011; POO; ISAACSON, 2011; BEKKERS; SUZUKI, 2013). Assim, é altamente provável que a redução progressiva da R_{in} nas células piramidais do aPC com o incremento da idade esteja relacionada com mudanças na morfologia da célula piramidal. Por outro lado, uma diminuição importante na R_{in} com a idade pode ser também devido a um incremento na expressão da condutância de canais iônicos que suportam o potencial de membrana em repouso das células piramidais.

4.2. Desenvolvimento de propriedades de PA

Processos de maturação cortical, como: neurogênese, apoptose, migração neuronal, diferenciação neuronal e estabelecimento de redes neurais funcionais são influenciados, direta ou indiretamente, pelo padrão de atividade elétrica dos neurônios (KILB *et al.*, 2011). Assim, durante os períodos de maturação morfológica do sistema nervoso é comum também observar mudanças paralelas no padrão de atividade dos neurônios. Nos roedores (ratos e camundongos, os mais estudados), tais mudanças acontecem principalmente durante o primeiro mês de vida pós-natal, com mudanças mais dramáticas entre a primeira e segunda semana pós-natal. Por exemplo, nas células piramidais do neocórtex de ratos, o limiar de

disparo e duração do PA diminui, enquanto que sua amplitude aumenta entre a primeira e segunda semana pós-natal (LORENZON; FOEHRING, 1993; KASPER *et al.*, 1994; ZHANG, 2004; VALIULLINA *et al.*, 2016). Por outro lado, nas células piramidais do córtex auditivo primário (OSWALD; REYES, 2008) e do córtex piriforme em camundongos (GHOSH *et al.*, 2015) a diminuição do limiar de disparo e duração e o incremento na amplitude do PA vai além da terceira semana pós-natal. Neste estudo, nós encontramos que o PA das células piramidais da camada 2/3 do aPC em ratos, também diminui no limiar de disparo e se torna de duração mais breve entre P5-P8 e P14-P17, porém com ligeiro incremento na amplitude ($p=0,17$). Mudanças maturacionais na ativação e inativação de correntes de sódio dependentes de voltagem podem estar associadas com a diminuição na duração do potencial de ação com a idade, como se tem observado para as células piramidais do córtex visual em macacos (MARUYAMA *et al.*, 2007).

Entre P5-P8 e P14-P17, também observamos mudanças nas propriedades de disparo dos *spikes*. As células piramidais de animais mais jovens precisam de baixas correntes para gerar alta frequência de disparo de PA, enquanto que as células de animais mais velhos requerem correntes elevadas para gerar alta frequência de disparo de PA, porém a frequência máxima de disparo em P5-P8 foi menor que em P14-P17. Interessantemente, as células piramidais em P5-P8 diminuem significativamente a sua frequência de disparo com o incremento da intensidade de injeção de corrente e algumas não são sensíveis ao incremento de *input* despolarizante. Tais mudanças nas propriedades de disparo de PA das células piramidais do aPC sugerem incremento paralelo nas propriedades dos canais de sódio dependentes de voltagem.

Aponta-se que em paralelo ao desenvolvimento do sistema nervoso, a densidade das correntes de sódio dependentes de voltagem se incrementa (McCROMICK; PRINCE, 1987; WANG *et al.*, 2009). As correntes de sódio dependentes de voltagem são consideradas elementos-chaves para iniciação e propagação do PA nos neurônios e em outras células excitáveis (CATTERALL, 2000; COLBERT, 2002; BEAN, 2007), as quais resultam principalmente na ativação do canal, enquanto que sua inativação contribui na atenuação do PA (JUNG *et al.*, 1997; BEAN, 2007). É possível que aquelas células piramidais do aPC que só geram um PA ante o incremento da intensidade da corrente despolarizante, tenham uma lenta velocidade de recuperação da inativação de canais de sódio dependentes de voltagem. Por outro lado, células que inicialmente disparam PA, mas que rapidamente se adaptam (após o primeiro PA, os seguintes *spikes* mostram diminuição da amplitude e prolongamento da duração) devem ter uma recuperação um pouco mais lenta da inativação das correntes de

sódio que aquelas células que mostram um padrão de disparo de PA regular, como são a maioria das células em P14-P17. As correntes de potássio seguem também o mesmo curso paralelo de desenvolvimento do sistema nervoso e estão relacionados com o afinamento nas propriedades de disparo dos PA (LORENZON; FOEHRING, 1995; MASSENGILL *et al.*, 1997; GUAN *et al.*, 2011). Assim, é possível que a adaptação na frequência do disparo de PA nas células dos animais mais jovens e o encurtamento na duração do potencial de ação sejam também controlados por correntes de potássio.

Outro achado interessante foi que, embora o limiar de disparo de PA mudasse para valores mais hiperpolarizados de P5-P8 para P14-P17, a diferença entre o limiar de disparo (V_{thres}) e o potencial de membrana de repouso da célula (V_m) não muda significativamente com a idade. Isso sugere que a quantidade de despolarização requerida para que a célula piramidal gere PA é constante durante o desenvolvimento.

O fato com significância para o processamento do odor é que embora as células piramidais em P5-P8 respondam com disparos de potenciais de ação em trens para injeção de correntes mais baixas do que as células em P14-P17, essa resposta se incrementa até certo pulso de injeção de corrente despolarizante. Para pulsos de correntes altas, os disparos mostram adaptação. Entre P5-P8 e P14-P17 essa reduzida excitabilidade das células piramidais gradualmente desaparece. Em P14-P17, apenas duas células (de 12) foram observadas com características de disparo semelhante às células de P5-P8. É possível que as características na excitabilidade das células em P5-P8 sejam devidas às correntes imaturas de entrada e de saída, como se tem relacionado em outras regiões corticais (LORENZON; FOEHRING, 1993; MASSENGIL *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2009; GUAN *et al.*, 2011). É interessante destacar que a reduzida excitabilidade e rápida adaptação das células piramidais do aPC para o *input* despolarizante em P5-P8, um mecanismo de regulação da sua própria atividade, ocorre em um período em que o input GABAérgico inibitório é ainda fraco (nossos dados do **Capítulo 3**).

4.3. Relevância para o processamento de odor no aPC

As características particulares das células piramidais nas propriedades intrínsecas passivas e de disparo em P5-P8 e P14-P17 podem ser importantes para compreender como essas células respondem ao *input* sináptico proveniente do bulbo olfatório. Tem sido sugerido que as células piramidais com uma R_{in} alta e τ_m mais duradoura têm respostas de grande magnitude e de duração prolongada para o *input* sináptico (McCORMICK; PRINCE, 1987).

Assim, as células piramidais do aPC em P5-P8, com características de V_m menos hiperpolarizado, R_{in} alto e τ_m mais duradoura, podem responder melhor para pequenos *inputs* de correntes sinápticas de cinéticas lentas. Enquanto que as células piramidais em P14-P17, com características de V_m mais hiperpolarizado, R_{in} baixa e τ_m mais breve podem responder melhor para *inputs* de correntes sinápticas mais prolongadas de cinéticas rápidas. Essas duas formas de processamento do *input* sináptico podem ser importantes para entender as possíveis diferenças no processamento de odor e os mecanismos associativos de aprendizado em P5-P8 e P14-P18.

Agradecimentos

A reprodução e cuidado dos animais foram realizados no laboratório do Professor Aldo Bolten Lucion, Departamento de Fisiologia, UFRGS. Os experimentos de eletrofisiologia foram realizados no laboratório da professora Maria Elisa Calcagnotto, Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os resultados desse trabalho foram utilizados no estudo de simulação do **Capítulo 5**.

Capítulo 5

Diferenças no processamento do odor no córtex piriforme anterior em dois períodos do desenvolvimento pós-natal inicial. Um estudo computacional

1. Introdução

Nos **Capítulos 3 e 4**, mostramos que nos períodos P5-P8 e P14-P17 o aPC de filhotes de rato tem características marcadamente diferentes referentes à transmissão sináptica GABAérgica nas células piramidais da camada 2/3 do aPC e às propriedades intrínsecas passivas e ativas dessas células.

Nesse trabalho, exploramos se as características diferentes da transmissão sináptica GABAérgica em P5-P8 e P14-P17 contribuem com um padrão de processamento neural distinto em cada período. Especificamente, como é o processamento do odor no aPC em P5-P8 e P17-P18? Quais semelhanças e/ou diferenças caracterizam esses dois períodos de idade? Foram as perguntas a serem exploradas mediante simulação computacional em circuito neural artificial integrado do BO e aPC.

Primeiro, baseado em modelo computacional do circuito BO-aPC prévio (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b), foi modelado um circuito artificial BO-aPC para P5-P8 e P14-P17, usando os nossos dados experimentais eletrofisiológicos do aPC reportados nos dois capítulos anteriores. Além disso, para a modelagem também foi incluída a propriedade de plasticidade sináptica excitatória entre o LOT-aPC, a qual é característica dos roedores em desenvolvimento durante a primeira e terceira semana pós-natal (POO; ISAACSON, 2007). Segundo, para testar as características de processamento de odor, o modelo do sistema olfatório das duas idades foi simulado em duas condições de exposição ao odor que mimetizam condições etológicas significativas para os filhotes de rato e camundongo em P5-P8 e P14-P17: filhotes dentro do ninho expostos ao odor mãe/ninho constante. Uma condição de simulação foi de estimulação com um odor de baixa intensidade, que pretende representar o odor da mãe/ninho que pode estar distante do filhote ou bem pode

estar perto, mas ao qual o sistema sensorial olfatório se tem adaptado. A outra condição de simulação foi de estimulação com um odor de alta intensidade, que pretende representar o odor da mãe/ninho percebido pelo filhote junto com estimulação ou contato materno (lambidas, leite, tato).

As simulações de processamento do odor dessas duas condições foram realizadas mantendo o odor em constante disponibilidade. Assim, no circuito BO-aPC artificial a amostragem do odor foi realizada em cada ciclo respiratório do animal, onde os ritmos de atividade das células mitrais do BO estão acoplados ao ritmo da frequência respiratória, de aproximadamente 2 Hz (POO; ISAACSON, 2009). A simulação do odor de baixa e alta intensidade (com ação da NA) foi realizada em dois e seis ciclos respiratórios, respectivamente, correspondendo a 3.300 ms o tempo total de simulação, com 100 células de cada tipo no BO e no aPC.

O trabalho desse capítulo foi desenvolvido em colaboração com Enver Miguel Oruro Puma do Programa de Pós-graduação em Neurociências da UFRGS.

2. Método

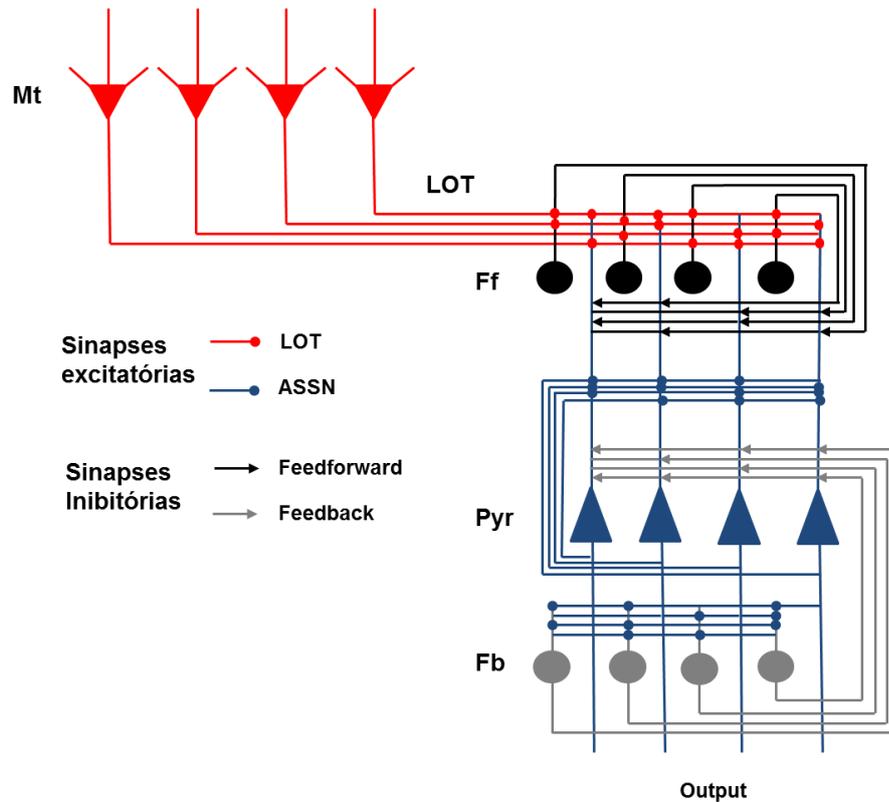
2.1. Modelagem

A modelagem do artificial circuito do BO-aPC para os períodos P5-P8 e P14-P17, integrando os dados experimentais, e as simulações foram realizadas no software NetLogo versão 6.0.4 (Wilensky, U. 1999. NetLogo. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/> June 4, 2018).

2.2. Arquitetura do modelo

A construção da arquitetura do circuito integrado do BO-aPC (duas redes neurais separadas) foi baseada no modelo computacional do circuito BO-aPC para filhote de rato <P10 desenvolvida por Enver Oruro (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b). O modelo canônico do neurônio piramidal do aPC integra as divisões das árvores dendríticas basal e apical, diferentes *inputs* sinápticos excitatórios e inibitórios ao longo dos dendritos apical e basal e também o envio de colaterais pelos axônios que fazem sinapses sobre outros neurônios vizinhos e distantes (recorrentes) (**Figura 5.1**). O modelo também integra vários níveis de organização prévios.

Figura 5.1. Arquitetura neural do circuito artificial do sistema olfatório



A figura é uma estrutura simplificada do bulbo olfatório (BO), contendo apenas as células mitrais (**Mt**, vermelho) e o cortex piriforme anterior (aPC) contendo os principais tipos celulares: células piramidais (**Pyr**, azul), interneurônios *feedforward* (**Ff**, preto) e *feedback* (**Fb**, cinza). Os axônios das células **Mt** se estendem para o aPC formando o trato olfatório lateral (**LOT**, vermelho). Os terminais do **LOT** estabelecem sinapses excitatórias (pontos vermelhos) com os dendritos apicais das células **Pyr** e com interneurônios **Ff**. Por sua vez, os interneurônios **Ff** estabelecem sinapses inibitórias nos dendritos das células **Pyr** (em preto). As células **Pyr** formam um importante *input* associativo estabelecendo sinapses excitatórias (**ASSN**, pontos azuis) com outras células **Pyr** adjacentes e com os interneurônios **Fb**. Por sua vez esses interneurônios estabelecem sinapses inibitórias com os dendritos basais e soma das células **Pyr** (setas cinza). As células **Mt** e **Pyr** são moduladas por noradrenalina.

2.2.1. Modelo do bulbo olfatório

Diferente do modelo computacional do circuito BO-aPC desenvolvido por Enver Oruro (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b), o circuito do nosso modelo tem só um tipo celular no BO, é a célula mitral (**Mt**) (**Figura 5.1**, vermelhas). Nós não incluímos os outros tipos neuronais do BO (neurônios olfatórios sensoriais, células periglomerulares e as células granulares) devido a que a inclusão desses outros tipos celulares geraria um ruído muito grande no *output* do sistema, o qual interfere com o objeto de observação. Sem os outros tipos neuronais do BO incluídos, o circuito ficou mais fino ou mais sensível para

especificar a contribuição das correntes inibitórias mediadas por GABA_A, sem as variações que esses outros tipos neuronais poderiam atribuir para o sistema.

Para determinar o número de células **Mt** no BO, partimos de um trabalho prévio que estimou o número de glomérulos (~1.800) e o número de sinapses que estabelecem os neurônios sensoriais olfatórios (OSN), expressando um único tipo de receptor olfatório, com as células **Mt** (aproximadamente 50-100) em um glomérulo (MOMBAERTS *et al.*, 1996). A partir desses dados, calculamos um número aproximado de células **Mt** de 90.000 a 180.000 no BO. No nosso modelo do circuito BO-aPC, incluímos apenas 100 células **Mt** que correspondem a aproximadamente 3 a 10 glomérulos. O disparo das células **Mt** foi modelado como um processo Poisson⁶ que gera potencial de ação em taxas específicas. A taxa basal de disparo foi de 2 Hz, sendo que esse valor passa para 100 Hz quando um odor é estimulado e depois decai para níveis basais com um tempo constante de 50 ms.

2.2.2. Modelo do aPC e conectividade

Semelhante ao modelo de Oruro (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b), o aPC também foi programado como outra sub-rede neural composta de três tipos celulares: as células piramidais (**Pyr**), os interneurônios *feedforward* (**Ff**) e os interneurônios *feedback* (**Fb**) (SUZUKI; BEKKERS, 2012; BEKKERS; SUZUKI, 2013) (**Figura 5.1, células representadas em azul, preto e cinza, respectivamente**).

O nosso modelo inclui 100 células de cada tipo neuronal (**Pyr**, **Ff** e **Fb**) do aPC. Para a conectividade entre o BO e o aPC, nós consideramos que cada célula **Pyr** está aleatoriamente conectada com aproximadamente o 10% das células **Mt** (FRANKS *et al.*, 2011), sendo que cada terminal axonal das células **Mt** estabelece em torno de cinco sinapses excitatórias (FRANKS; ISAACSON, 2006). Considera-se que os interneurônios da camada L1a (**Ff**) recebem cerca de seis vezes mais conexões do que as células **Pyr** (FRANKS; ISAACSON, 2006), de modo que no nosso modelo, cada interneurônio **Ff** recebe 40% das conexões sinápticas das células **Mt**. A conectividade dos interneurônios **Ff** e **Fb** com as células **Pyr** foi considerada que cada célula **Pyr** recebe o 37% de conexão dos interneurônios **Ff** e 45% dos interneurônios **Fb**; por outro lado cada um dos interneurônios **Ff** e **Fb** recebem conexões dos 40% das células **Pyr** (SUZUKI; BEKKERS, 2012). Para a conexão associativa entre as células **Pyr**, foi considerada que cada **Pyr** está interconectada aleatoriamente com 20% de

⁶ Referido a um processo estocástico simples utilizado para modelar o tempo aleatório em que os *inputs* sinápticos chegam a um neurônio piramidal.

outras células **Pyr**, sendo que essa conexão é uma à uma (FRANKS *et al.*, 2011). (**Tabela 5.1, em anexo**).

2.2.3. Parâmetros de dados experimentais adicionados ao modelo do aPC

Os parâmetros das células Pyr e da transmissão sináptica GABAérgica foram obtidos a partir de nossos dados experimentais em P5-P8 e P14-P17 (**Capítulo 3 e 4**). Para os dois períodos de idade, os seguintes parâmetros foram considerados:

1. Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC) (*decay time, rise time, frequência e amplitude*) e potencial de reversão das sIPSC (E_{GABA}). Esses dados correspondem ao registro de células piramidais no aPC de animais controle (**Capítulo 3**). Na construção do modelo artificial do aPC, os parâmetros das sIPSC e E_{GABA} foram considerados equivalentes para a inibição de Ff→Pyr e Fb→Pyr.
2. Propriedades intrínsecas passivas de membrana da célula piramidal: potencial de membrana em repouso, resistência ao *input*, constante de tempo e capacitância de membrana. Dados experimentais obtidos dos registros de células piramidais no aPC de animais controle (**Capítulo 4**).
3. Propriedades intrínsecas ativas de membrana da célula piramidal: limiar de disparo de potencial de ação, amplitude de potencial de ação, duração do potencial de ação, rheobase, frequência máxima de disparo de potencial de ação, etc. Dados experimentais obtidos via registros de células piramidais no aPC de animais controle (**Capítulo 4**).

2.2.4. Parâmetro de atividade dos neurônios e plasticidade sináptica

Todos os parâmetros de atividade dos neurônios e plasticidade sináptica foram modelados semelhantes ao modelo computacional do circuito BO-aPC descrito por Oruro (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b). A seguir descrevemos brevemente os parâmetros (**Tabela 5.1, no Anexo**).

2.2.4.1. Neurônios

Foi usado o modelo *integrate-and-fire*⁷ para simular dados de células reais, que define as mudanças da voltagem de membrana das células Mt e interneurônios Ff e Fb no tempo, em

⁷ É referido ao modelo que descreve o potencial de membrana de um neurônio em termos dos *inputs* sinápticos e da injeção de corrente. Um potencial de ação é gerado quando o potencial de membrana atinge o limiar, mas o

termos dos inputs sinápticos e a corrente injetada que a célula recebe (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b), o qual é descrito em cada compartimento pela seguinte equação:

$$V^t(t) = \frac{1}{C} (I_e(t) - G(V(t) - E_L)) \quad (1)$$

onde a voltagem do potencial de membrana $V(t)$ das células é a única variável de estado, como uma função da capacitância do neurônio (C), a condutância (G), potencial de repouso (E_L) e o tempo dependente de corrente externa entrante (I_e). A seguinte regra foi considerada quando o potencial de membrana se torna maior de um limiar, onde V_r é o potencial de membrana em repouso:

$$V(t) > \theta_\infty$$

$$V(t) \leftarrow V_r$$

O input externo (V^{ext}) de um neurônio pré-sináptico particular no tempo τ é uma função da força de conexão sináptica (W_{ij}), a mudança na condutância ($g_i(t)$) na célula (j) e diferença entre o potencial de equilíbrio (Nernst) ($E_{N_{ij}}$) de um tipo específico de canal e a corrente do potencial de membrana ($v_j(t)$) do neurônio pós-sináptico j no tempo t como descrito pela equação:

$$V_j^{ext}(t) = W_{ij}g_{ij}(t)[E_{N_{ij}} - v_j(t)] \quad (2)$$

A comunicação entre neurônios ocorre na rede neural mediante potenciais de ação discretos (para o disparo de todos os neurônios) ou mediante contínuo output, as duas formas ocorrem como uma função do potencial de membrana, como descrito pela seguinte equação:

$$F_i(V) = \begin{cases} 0 & \text{if } V \leq \theta^{min} \\ \left(\frac{V - \theta^{min}}{\theta^{max} - \theta^{min}}\right)^\beta & \text{if } \theta^{max} > V > \theta^{min} \\ 1 & \text{if } V \geq \theta^{max} \end{cases} \quad (3)$$

onde $F_i(V)$ representa a probabilidade instantânea de disparo (para todos os grupos neuronais). O θ^{min} e o θ^{max} representam o limiar mínimo e a saturação do limiar para a função de probabilidade/output, respectivamente; onde β define a não linearidade de $F_i(V)$. Para os neurônios pré-sinápticos contínuos $g_i(t) = g^{max} * F_i[V(t)]$ e para o disparo dos

modelo não considera as mudanças reais associadas com a voltagem da membrana e condutâncias que conduzem ao potencial de ação.

neurônios pré-sinápticos $g_i(t) = g(t - t_i^{fire})$, onde t_i^{fire} é o tempo do último potencial de ação do neurônio, com um tempo de curso da condutância representada pela seguinte equação:

$$g(t) = g^{max}(e^{-t/\tau_1} - e^{-t/\tau_2}) \quad (4)$$

onde, a dimensão constante de g^{max} representa a máxima condutância de um determinado canal e τ_1 e τ_2 são o tempo de subida e decaimento, respectivamente, da condutância. Depois do disparo, a voltagem de cada disparo dos neurônios é restabelecida para um potencial de hiperpolarização V^{hyper} e permanece inativo por um período refratário t^{refrac} .

No modelo também foi implementado um parâmetro de **adaptação neuronal** para as células piramidais como uma corrente hiperpolarizante que incrementa o limiar de disparo para os neurônios recentemente ativados. As mudanças na condutância das correntes pós-hiperpolarização V_i^{ahc} nos neurônios Pyr são descritos na seguinte equação:

$$\tau^{ahc} \frac{dV_i^{ahc}}{dt} + V_i^{ahc} = A^{ahc} X_i \quad (5)$$

onde X_i é igual a 1 no passo de tempo depois que o neurônio dispara i spikes e 0 quando não dispara potencial de ação. Portanto, o V^{ahc} incrementa com a constante A^{ahc} e decai com o tempo característico τ^{ahc} .

Os inputs excitatórios para as células **Mt** são modulados pela onda sinusoidal de 2 Hz que mimetiza a frequência respiratória (POO; ISAACSON, 2009).

2.2.4.2. Plasticidade sináptica

Para as modificações sinápticas das conexões Mt→Pyr e das conexões Pyr→Pyr, foi implementado um modelo de plasticidade sináptica excitatória dependente de atividade (Hebbiano⁸), semelhante ao que foi usado por Oruro (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b). O melhoramento na eficácia sináptica ocorrerá se tanto os neurônios pré e pós-sinápticos disparam juntos, entanto que se reduzirá se isso não ocorrer. Cada conexão Mt→Py ou Pyr→Pyr foi estabelecida com um peso sináptico⁹ inicial (W) de 0,02. No modelo,

⁸ Referido ao mecanismo de plasticidade proposto por Donald O. Hebb para a atividade coincidente de dois neurônios.

⁹ Na neurociência computacional o termo é referido à força ou amplitude de uma conexão sináptica, e é considerada como fonte de informação sobre plasticidade, e inclusive aprendizado, em um determinado circuito neuronal.

a ocorrência da plasticidade sináptica excitatória é dependente da ativação de receptores AMPA e NMDA, no qual foi assumido que as despolarizações pós-sinápticas são atribuídas à retropropagação do potencial de ação dos neurônios pós-sinápticos descritos pela seguinte equação (ORURO *et al.* 2016 a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b):

$$i^{post}(t) = \frac{t}{\tau^{post}} \exp\left(1 - \frac{t}{\tau^{post}}\right) \quad (6)$$

onde o tempo de curso dessa despolarização no neurônio pós-sináptico (τ^{post}) é de 2 ms. O tempo de curso da cinética dos canais de NMDA dependentes da ligação do glutamato nos receptores representado pela seguinte equação (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b):

$$b^{glu}(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau^{NMDAf}}\right) \left(1 - \exp\left(\frac{t}{\tau^{NMDAr}}\right)\right) \quad (7)$$

onde τ^{NMDAf} (7 ms) e τ^{NMDAr} (1 ms) caracterizam a cinética dos receptores de NMDA. Assim, o melhoramento da eficácia nas sinapses excitatórias entre os neurônios i e j é descrito pela seguinte equação (ORURO *et al.*, 2016a,b; 2017; PARDO *et al.*, 2017a,b):

$$\begin{aligned} \frac{dW_{ij}^{syn}}{dt} = & (1 - W_{ij}^{syn}) \frac{i^{post}(t - t_j^{fire}) b^{glu}(t - t_j^{fire} - t^{delay})}{\tau^{pp}} \\ & + (0 - W_{ij}^{syn}) \left(\frac{i^{post}(t - t_j^{fire})}{\tau^{npp}} + \frac{b^{glu}(t - t_j^{fire} - t^{delay})}{\tau^{npp}} \right) \end{aligned} \quad (8)$$

onde, t^{delay} é o tempo que o potencial de ação demora para percorrer do soma para as sinapses das colaterais recorrentes. Se i^{post} e b^{glu} tem o pico juntos, então o peso sináptico entre os neurônios i e j é conduzido com as características de tempo τ^{pp} (100 ms). Caso contrário, se os eventos ocorrem de modo não sincronizado, a eficácia sináptica é diminuída com o tempo τ^{npp} ($\tau^{npp} = \tau^{pp} = 200$ ms).

2.3. Simulações

2.3.1. Relação *input-output* das células piramidais artificiais do aPC

Considerando dados experimentais próprios (propriedades intrínsecas passivas e ativas) para as células Pyr da camada 2/3 do aPC reportados no **Capítulo 4 (Tabela 4.1)** modelamos células Pyr artificiais para P5-P8 e P14-P17. Para testar se as células Pyr artificiais mostram padrões de disparo de potencial de ação semelhante às células Pyr reais, registradas

experimentalmente, foi simulada a relação da injeção de corrente despolarizante vs. frequência de disparo de potencial de ação (*input-output*) nos dois períodos de idade, utilizando as equações 1 e 5 descritas na **seção 2.2.4.1**.

Foram simulados 200 experimentos, onde a injeção de corrente foi realizada a cada 1,5 pA (mínimo +1,5 e máximo +300 pA) e foi medida o número de potenciais de ação evocados pelas Pyr em resposta a cada passo de injeção de corrente despolarizante. As simulações da relação *input-output* foram realizadas durante 1.000 ms (bin de 0,5 ms) e os dados são reportados como traçados da resposta de potencial de ação das 200 células Pyr simuladas. A modelagem e as simulações foram realizadas em Netlogo. Os traçados foram realizados usando o *software* GraphPrisma 5.01, com os dados das simulações obtidas do NetLogo.

2.3.2. Processamento do odor no aPC artificial em P5-P8 e P14-P17

O passo seguinte foi explorar como o circuito do aPC processa o odor em cada período de idade pós-natal (P5-P8 e P14-P17). Para isso, o modelo foi construído considerando os dados experimentais de eletrofisiologia (propriedades intrínsecas de membrana e de transmissão sináptica GABAérgica) correspondente para cada período de idade. O número de cada tipo celular utilizado no modelo foi 100. Foram simuladas as seguintes condições: **1)** processamento de um odor de baixa intensidade e **2)** processamento de um odor de alta intensidade associada a ação de noradrenalina (NA).

2.3.2.1. Condições de processamento de odor simuladas

A **condição 1** representa a atividade de uma quantidade menor de neurônios do sistema olfatório (e.g. o odor da mãe é percebido como relativamente distante). Para isso, foram estimuladas dez (10) células Mt. A **condição 2** representa a atividade de uma quantidade maior de neurônios do sistema olfatório (e.g. o odor da mãe é percebido junto com o contato materno). Para isso, além de um incremento no número de células Mt estimuladas, foi adicionado no circuito a ação da NA representada pela redução do limiar de disparo dos neurônios de todos os tipos celulares no circuito. Para a simulação do odor de alta intensidade, foram estimuladas 60 células Mt aleatórias, diferente das dez anteriormente estimuladas. O disparo de potencial de ação das células Mt foi realizado mediante parâmetro de uma corrente dependente de disparo, sendo que o limiar foi randomizado entre os valores mínimo e o valor de limiar. O número de disparos de cada célula Mt foi aproximadamente cinco (5) *spikes* por cada fase de inalação.

Para as duas condições simuladas, também foi considerado no circuito a plasticidade sináptica excitatória intrínseca entre os terminais das células Mt e os dendritos das células Pyr; e entre as Pyr-Pyr (associativas ou recorrentes), que têm sido reportados como características nos roedores < P30 (FRANKS; ISAACSON, 2005; POO; ISAACSON, 2007).

2.3.2.2. Consideração do ritmo respiratório na simulação

Os roedores apresentam uma frequência respiratória basal de aproximadamente 2 Hz (UCHIDA; MAINEN, 2003; KEPECS *et al.*, 2007; WESSON *et al.*, 2008) e, assim como as células olfatórias sensoriais do epitélio olfatório, as células mitrais e as dos centros corticais olfatórios estão fortemente acopladas com a respiração (VERHAGEN *et al.*, 2007). Assim, as simulações foram realizadas em dois ciclos respiratórios de 400 ms de duração, com cada ciclo composto de duas fases (200 ms de fase de exalação seguido de 200 ms de fase de inalação). A determinação da duração de cada ciclo respiratório foi baseada em trabalhos experimentais com roedores *in vivo* (POO; ISAACSON, 2009; HADDAD *et al.*, 2013; STERN *et al.*, 2018). O início da estimulação do odor foi programado para coincidir com o início da fase de exalação. Uma vez iniciada a estimulação do odor, esta foi mantida constante: durante dois ciclos respiratórios para o odor de baixa intensidade e durante seis ciclos respiratórios para o odor de alta intensidade (+ NA).

2.3.2.3. Saídas das simulações e parâmetros de análises

A modelagem e as simulações foram realizadas usando o programa Netlogo 6.0.4. Para todas as simulações foram usadas as oito equações descritas acima (**seções 2.2.4.1 e 2.2.4.2**). Qualquer célula que dispara pelo menos um potencial de ação durante os 200 ms de inalação foi considerada como ativa. As duas condições (odor de concentração baixa e alta) foram simuladas em uma única corrida de 3.300 ms. Os dados são apresentados como *Raster-plot*. A medida da latência (ms) para atingir o pico máximo de disparo foi considerada desde o início da fase de inalação. A duração total do período de atividade foi determinada como o tempo total (ms) desde o início dos *spikes* até o final, dentro de uma fase de inalação. A taxa de disparo máximo foi determinada como o taxa de disparo que atinge o máximo número de disparos por segundo (Hz), dentro de uma fase de inalação. A sincronização de disparos foi considerada quando os disparos aparecem juntos, dentro de uma janela temporal <10 ms.

Os traçados de potencial de ação foram gerados usando o *software* GraphPrisma e o *Raster-plot* usando o NetLogo.

3. Resultados

3.1. Relação *input-output* das células piramidais

Nos gráficos da **Figura 5.2** se mostram as frequências de disparo de potenciais de ação em P5-P8 e P14-P17 para injeção de corrente despolarizante de +20 pA, +120 pA e +240 pA. Semelhante ao que foi observado para as células Pyr reais (**Capítulo 4**), as artificiais correspondentes ao período P5-P8 foram mais sensíveis à disparar potenciais de ação para injeção de corrente de baixa intensidade (+20 pA) do que as células Pyr em P14-P17 (+50 pA). Em P5-P8, as células Pyr mantiveram o número de disparo de *spikes* relativamente estável com o aumento da intensidade de corrente (3 *spikes* em +20 pA; 5 *spikes* em +120 pA; 6 *spikes* em +240 pA) (**Figura 5.2 A-C, traçado preto**), enquanto que em P14-P18 o número de *spikes* se incrementou com o aumento da intensidade de corrente (0 *spikes* em +20 pA; 12 *spikes* em +120 pA; 24 *spikes* em +240 pA) (**Figura 5.2 A-C, traçado vermelho**) para estimulação constante de 1.000 ms. Esse padrão de disparo das células Pyr (n= 200 células em cada idade), pode ser observado na curva da relação *input-output*, com injeção de corrente de 0 a +300 pA (passo de amplitude de corrente injetada: 0,5 pA) (**Figura 5.2 D**).

3.2. . Processamento do odor no aPC artificial em P5-P8 e P14-P17

3.2.1. Resposta das células piramidais individuais para estimulação de odor

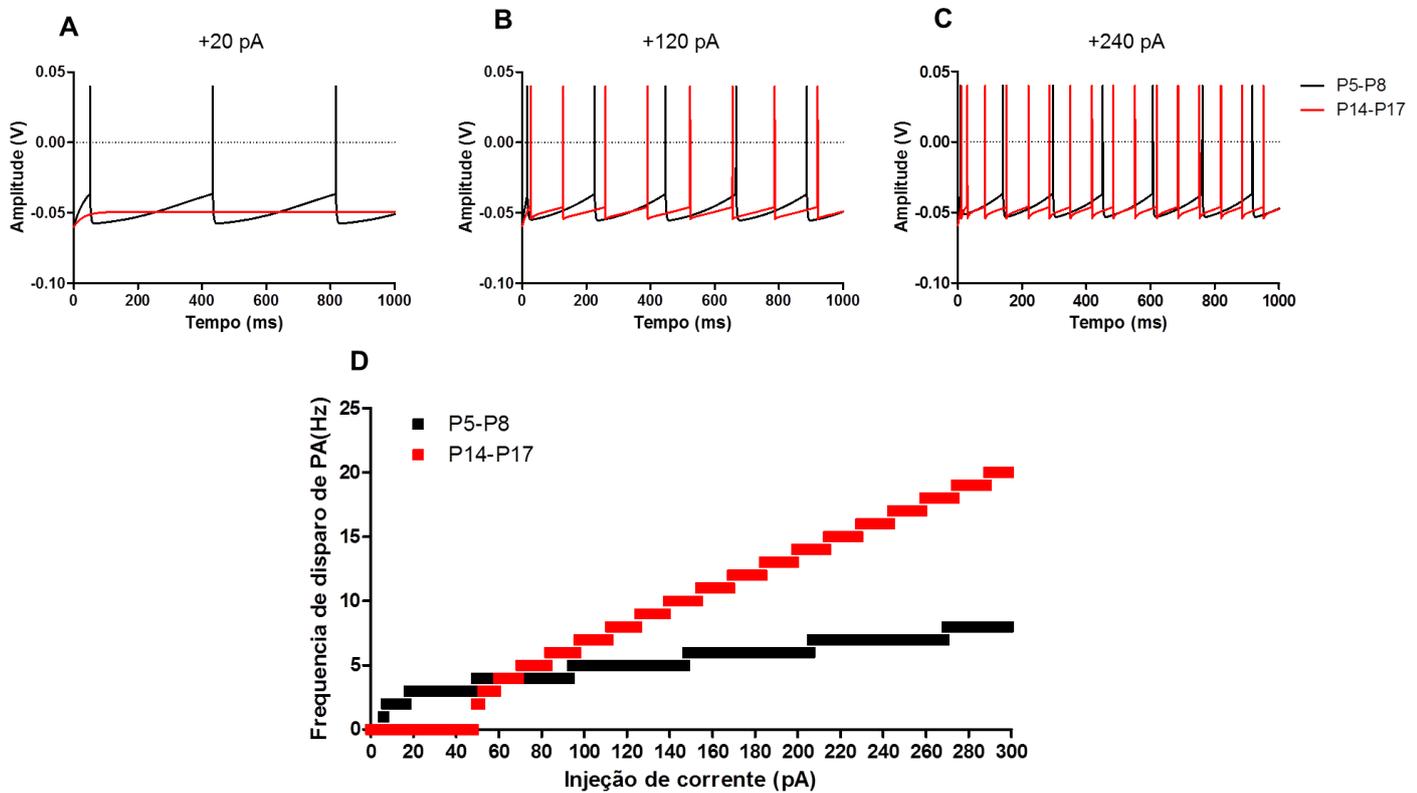
De um total de 100 células Pyr do modelo, foram registradas aleatoriamente cinco células individualmente em cada idade para verificar o padrão de disparo nas condições de odor de baixa e alta intensidade (mais ação da NA). As simulações das duas condições foram realizadas em um total de oito ciclos respiratórios (2 ciclos de odor baixa intensidade e 6 ciclos de odor alta intensidade), com duração de cada ciclo de 400 ms (exalação de 200 ms e inalação de 200 ms). Em cada idade, a resposta individual das células Pyr é representada por traçados de cores diferentes (**Figura 5.3**).

3.2.1.1. Odor de baixa intensidade

Na simulação do odor de baixa intensidade (0-800 ms, barra azul, dois ciclos respiratórios), apenas uma célula Pyr (traçado preto) disparou um potencial de ação no final da fase de inalação em P5-P8 (latência de 128,5 ms desde o início da fase de inalação)

(Figura 5.3A); enquanto que em P14-P17, nenhuma das cinco células Pyr evocou potencial de ação nessa condição (Figura 5.3B).

Figura 5.2. Relação input-output das células piramidais artificiais do aPC



Os gráficos A-C mostram o padrão de disparos de potenciais de ação (PA) de 200 células piramidais artificiais para injeção de corrente despolarizante em cada período de idade (P5-P8 e P14-P17). Observe que as células piramidais em P5-P8 disparam 3 potenciais de ação com intervalo inter-*spike* prolongados, enquanto que as células em P14-P18 não evocam nenhum PA (A). Para injeção de corrente de +120 pA, as células de P5-P8 mantêm o mesmo perfil de disparo que para injeção +20 pA, enquanto que as células em P14-P18 disparam PA com intervalo inter-*spike* mais curto (B). Quando se incrementa a intensidade da injeção de corrente (+240 pA), as células piramidais em P14-P17 incrementam o número de spikes, enquanto que as células em P15-P17 incrementam menos e mantêm o intervalo inter-*spike* prolongado. A relação injeção de corrente-potencial de ação foi plotada como uma curva frequência-injeção de corrente (D). Para injeção de corrente despolarizante de 0-50 pA, as células piramidais em P14-P17 não evocam PA; porém, o incremento de intensidade de corrente desde esse ponto evoca incremento proporcional no disparo de PA (curva vermelha). As células piramidais em P5-P8 disparam PA para injeção de corrente de intensidade menor; porém a máxima frequência de disparo é entre +120-+140 pA, a partir desse ponto o número de spikes com o incremento de corrente despolarizante não muda significativamente (curva preta). Foram realizadas 1000 simulações. A injeção de corrente foi realizada a cada 0,5 pA.

3.2.1.2. Odor de alta intensidade (com ação de NA)

3.2.1.2.1. Período P5-P8

A entrada do odor de alta intensidade estimulado junto com ação da NA evocou mudanças nas respostas de disparo das células Pyr nas duas idades (**Figura 5.3**, 800-3.300 ms, barra laranja, 6 ciclos respiratórios). Em P5-P8, em cada ciclo respiratório as células Pyr dispararam um potencial de ação na fase de inalação em resposta ao odor. A latência para o início de disparo dos potenciais de ação, desde o início da fase de inalação, variou de célula a célula e por cada ciclo respiratório simulado. A mesma célula Pyr que disparou na condição de odor de baixa intensidade (**traçado preto**), disparou potenciais nos dois primeiros ciclos respiratórios (800-1.600 ms) com uma latência cada vez reduzida de 118 ms (**primeiro ciclo**) e de 93 ms (**segundo ciclo**). As 4 células restantes responderam disparando potenciais de ação sincrônicos (*spikes* acontecendo dentro de uma janela temporal < 10 ms) com latências de 17 ms e 49,5 ms no primeiro e segundo ciclo, respectivamente.

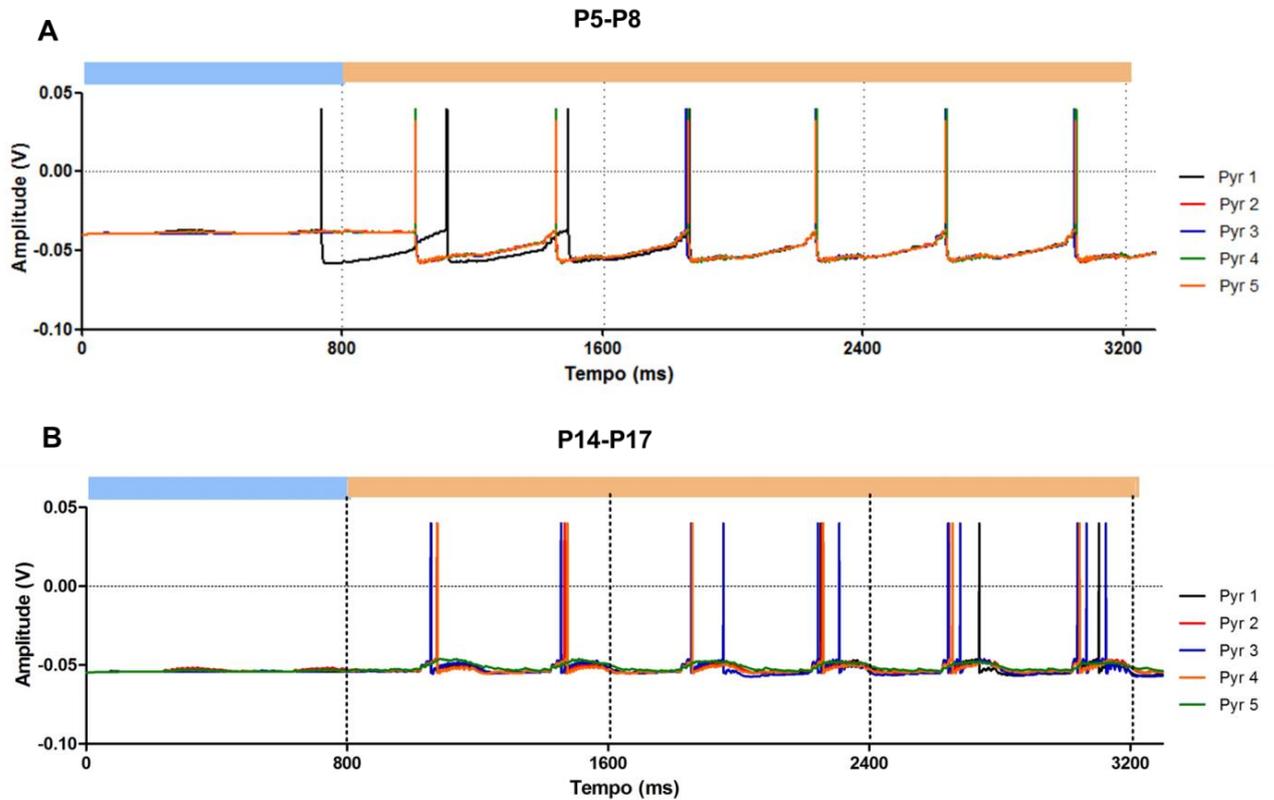
Nos quatro ciclos respiratórios seguintes (1.600-3.300 ms), as cinco células Pyr responderam ao odor de alta intensidade (+NA) disparando potenciais de ação sincrônicos e com progressiva redução na latência para o início do disparo em cada avanço da simulação [**terceiro ciclo**: 65,5 ms; **quarto ciclo**: 52,5 ms; **quinto ciclo**: 47,5 ms; **sexto ciclo**: 43 ms] (**Figura 5.3A**).

3.2.1.2.2. Período P14-P17

Em P14-P17, nos ciclos respiratórios iniciais de estimulação de odor de alta intensidade quatro das cinco células Pyr evocaram um potencial de ação em cada fase de inalação. Nos ciclos respiratórios seguintes, a metade dessas células Pyr incrementa seu disparo para dois ou três potenciais de ação por cada fase de inalação. Com o avanço do ciclo respiratório simulado, também a latência para o início de disparo de potencial de ação se reduziu e, assim como foi observado para as células em P5-P8, algumas células Pyr em P14-P17 também dispararam sincronicamente (**Figura 5.3B**).

No **primeiro ciclo** respiratório de estimulação do odor (800-1.200 ms), quatro células dispararam um potencial de ação em cada fase de inalação, sendo que três células Pyr dispararam sincronicamente com latência de 40 ms e uma disparou a uma latência de 61 ms.

Figura 5.3. Registro de atividade de cinco células piramidais artificiais aleatórias do córtex piriforme anterior para a estimulação de odor baixa e alta intensidade (+NA) em P5-P8 e em P14-P17



O gráfico mostra a simulação do padrão de disparo de cinco células piramidais (**Pyr**) artificiais aleatórias de um conjunto de 100 células no córtex piriforme anterior em resposta a estimulação de um odor de **baixa intensidade** durante 2 ciclos respiratório (0-800 ms, **barra azul**) e em resposta a um odor de **alta intensidade (com ação de NA)** durante 3 ciclos respiratórios (800-3300 ms, **barra laranja**). O córtex piriforme artificial tem a propriedade de plasticidade sináptica excitatória. **A**, na simulação em P5-P8 observamos que, ao final da apresentação do odor baixa intensidade (segundo ciclo respiratório, fase de inalação, 600-800 ms), algumas células **Pyr** evocam disparo sincrônico, nos seguintes dois ciclos respiratórios (800-1.600) algumas células **Pyr** disparam sincronicamente formando uma frequência de disparo ~20 Hz. Nos últimos quatro ciclos respiratórios todas as células disparam sincronicamente, mantendo a mesma frequência de disparo de 20 Hz. **B**, as células **Pyr** em P14-P17 também disparam em um tempo próximo com uma frequência de ~20 Hz; porém, nos quatro ciclos seguintes a frequência de disparo de algumas células se incrementa (~ 40 Hz) e o disparo não se mostra mais sincrônico.

No **segundo ciclo** respiratório (1.200-1.600 ms), as quatro células responderam com disparos sincrônicos de um potencial de ação, com latências 40 ms e de 64 ms, respectivamente. No **terceiro ciclo** respiratório (1.600- 2.000 ms) as quatro células evocaram disparo sincrônico na latência de 39 ms, e uma dessas células evocou um potencial de ação

adicional com latência de 134 ms, na mesma fase de inalação. No **quatro ciclo** respiratório (2.000-2.400 ms), três células Pyr continuam disparando um potencial de ação sincronicamente com latência de 41 ms e uma células evocou dois potenciais de ação na mesma fase de inalação com latências de 27 ms e 97 ms. No **quinto ciclo** respiratório (2.400-2.800 ms), uma célula Pyr continuou a evocar um potencial de ação com latência de 43,5 ms e três células Pyr evocaram um potencial de ação sincronicamente com latência de 27 ms. Duas dessas três células evocaram mais um potencial de ação na mesma fase de inalação com latências de 61 ms e 121 ms. No **sexto ciclo** respiratório (2.800-3.200 ms), as quatro células Pyr evocaram o primeiro potencial de ação sincronicamente (latência de 26 ms). Dessas células, uma disparou um potencial de ação adicional com latência de 88 ms e, outra célula disparou mais dois potenciais de ação com latências de 54 ms e 112,5 ms, dentro de uma mesma fase de inalação.

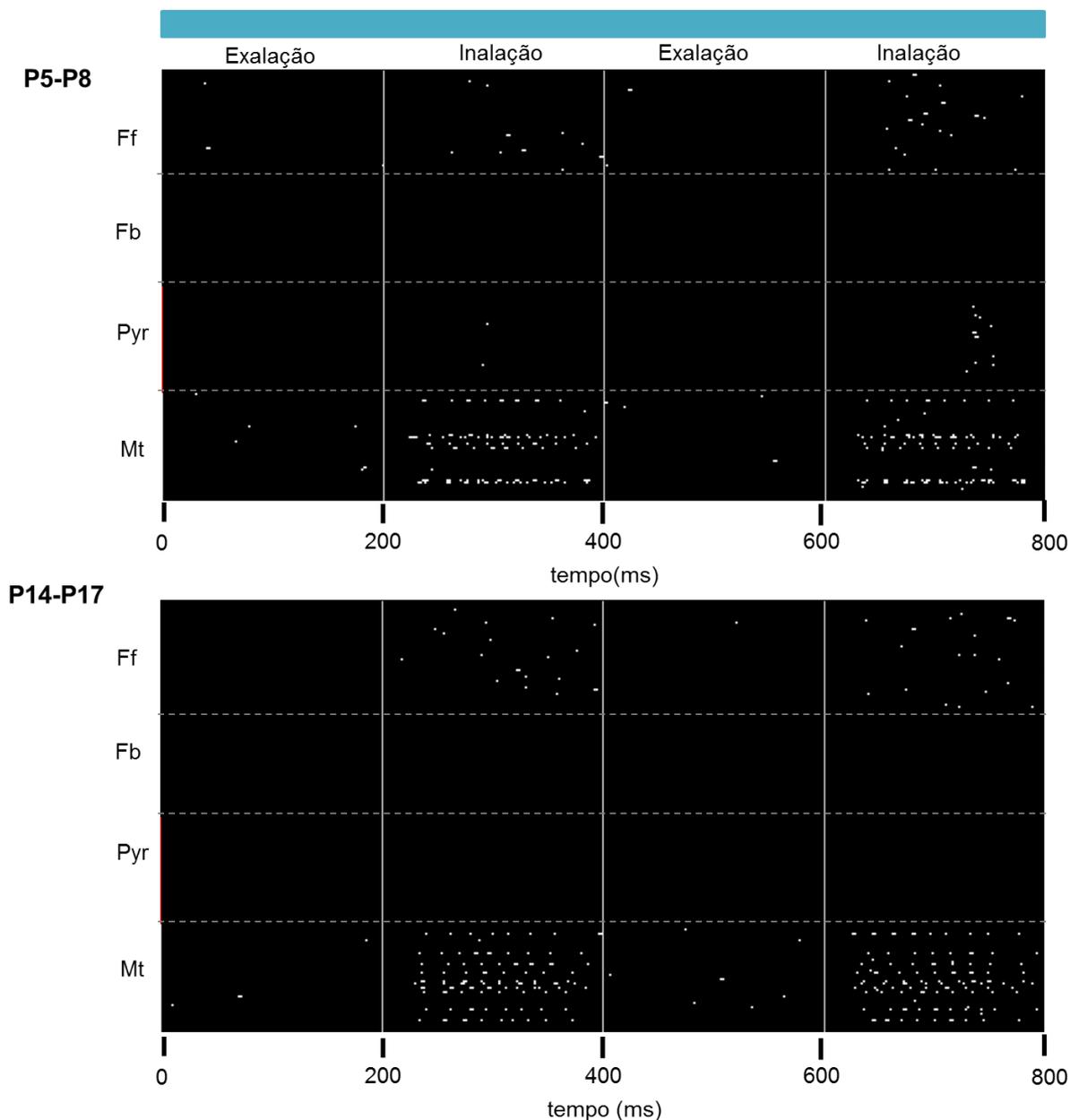
Uma vez caracterizadas as respostas individuais das células Pyr para estimulação do odor de baixa e alta intensidade (+NA), a seguir foi realizada uma simulação computacional para explorar as respostas de uma população de células Pyr no aPC para os mesmos estímulos.

3.2.2. Padrão de atividade do aPC em resposta ao odor em P5-P8 e P14-P17

Depois de mensurar as características de padrão de disparo de uma amostra aleatória de cinco células Pyr artificiais nas duas idades, realizamos a simulação das duas condições (odor de baixa e alta intensidade) considerando o número total de células do modelo (100 células de cada tipo celular). No modelo também foi incluída a propriedade de plasticidade sináptica excitatória entre Mt→Pyr (LOT) e Pyr→Pyr (associativa), semelhantes para os dois períodos de idade.

Com tais condições da arquitetura e conectividade neural do modelo, foi simulado o processamento de um odor de baixa intensidade em dois ciclos respiratórios (**Figura 5.4**), seguido da condição de odor de alta intensidade estimulado junto com a ação da NA (que simula o contato materno) em seis ciclos respiratórios (**Figura 5.5**). Para gerar o odor de baixa intensidade, um grupo de dez células Mt foram ativadas aleatoriamente e para gerar a estimulação do odor de alta intensidade, um outro grupo de 60 células Mt (odor de maior intensidade), diferentes das células anteriores, foi também estimulada de forma aleatória. Os resultados da simulação são mostrados em gráficos *Raster-plot*, onde cada ponto representa o disparo de um potencial de ação de uma célula.

Figura 5.4. Raster-plot do processamento de um odor de baixa intensidade no circuito olfatório artificial representativo para P5-P8 e P14-P17



A figura mostra a atividade das células mitral (**Mt**) no BO e a atividade das células piramidais (**Pyr**) e os interneurônios *feedforward* (**Ff**) e *feedback* (**Fb**) no aPC em resposta à estimulação de odor de baixa intensidade em 2 ciclos respiratórios (exalação/inalação) (0-800 ms). O aPC artificial tem a propriedade de plasticidade sináptica excitatória. A **barra azul** no topo dos gráficos indica a presença de odor constante. A atividade de cada tipo celular está separada por linhas cinza pontilhadas horizontais. Maior atividade é observada na fase de inalação. Em P5-P8 se observa atividade de um grupo pequeno de células **Pyr** na fase de inalação dos 2 ciclos respiratórios, o qual não é observado em P14-P17. Nas duas idades, durante toda a fase de inalação, nos dos 2 ciclos respiratórios é observada atividade de células **Mt** e interneurônios **Ff**. Cada ponto de representa uma célula com disparo de um potencial de ação.

3.2.2.1. Odor de baixa intensidade

Nos dois períodos de idade se observou escassa ou nula presença de disparo de todos os tipos celulares durante as fases de exalação (0-200 ms, 400-600 ms) e uma maior atividade celular nas fases de inalação (200-400 ms, 600-800 ms) (**Figura 5.4**). Tanto em P5-P8 como em P14-P17, as células **Mt** evocaram disparos em *bursts*, mantendo uma periodicidade de intervalo curto durante toda a fase de inalação. Também foram observados disparos de alguns interneurônios **Ff** durante a fase de inalação, porém sem um ritmo aparente.

Interessantemente, apenas em P5-P8 se observa alguma atividade dispersa de células **Pyr** nas duas fases de inalação, sendo que uma maior atividade foi observada na última fase de inalação (600-800 ms), com latência para o pico máximo de 165 ms. Por outro lado, em nenhuma das idades foi observado atividade dos interneurônios **Fb** em resposta ao odor de baixa intensidade.

3.2.2.2. Odor de alta intensidade (com ação de NA)

Nos dois períodos de idade, foi observada uma maior atividade de todos os tipos celulares nas fases de inalação, e escassa ou nula nas fases de exalação (**Figura 5.5**).

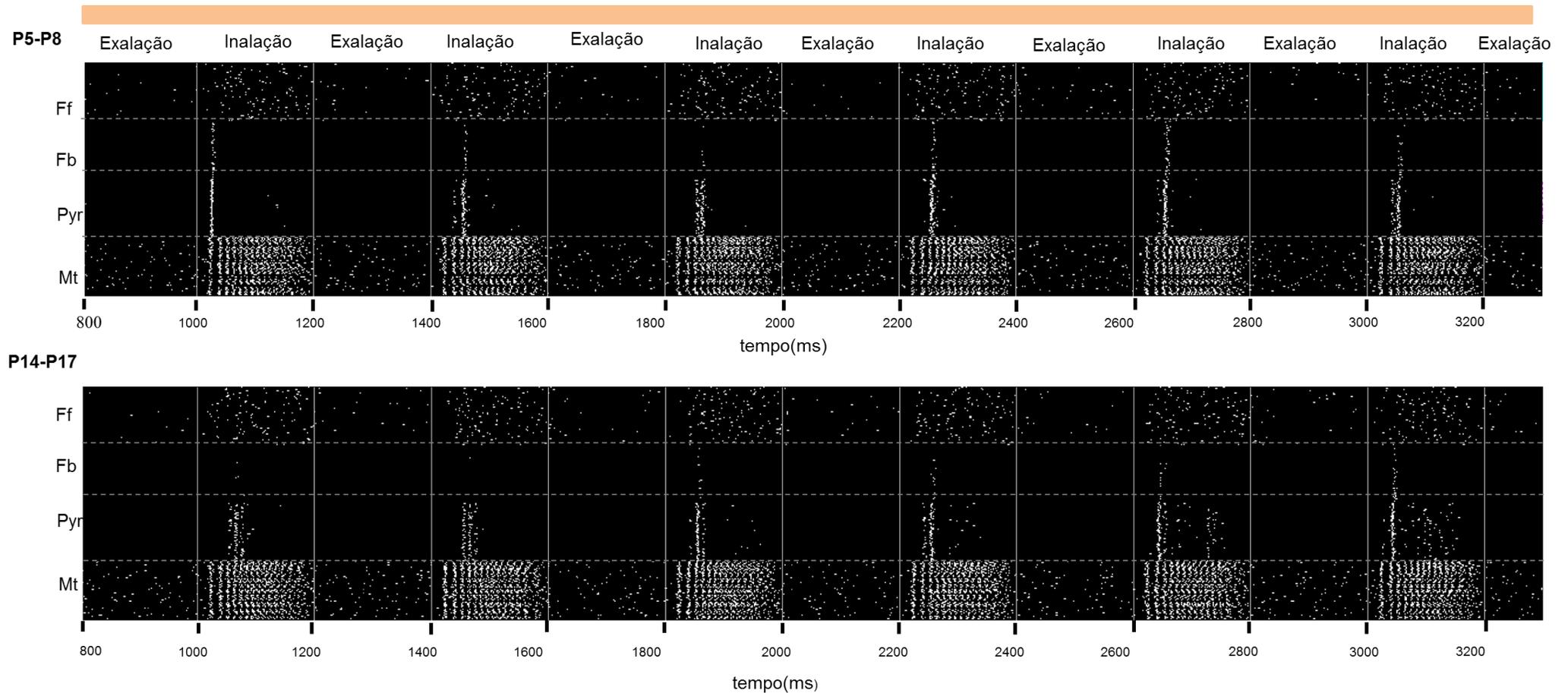
3.2.2.2.1. Atividade das células Mitral

As células **Mt** evocaram disparos em *bursts* mantendo uma periodicidade (~ 16 períodos de disparo durante toda a fase de inalação) (**Figura 5.5, fila inferior**). Esse padrão de atividade se manteve estável durante todas as fases de inalação (**Figura 5.6; traçado preto**), com picos de atividade máxima em todos os ciclos respiratórios semelhantes nas duas idades (**Figura 5.7; traçado preto**).

3.2.2.2.2. Atividade das células Piramidais

Por outro lado, a estimulação do odor de alta intensidade (com ação da NA) evocou resposta de elevada atividade das células **Pyr**, a qual aparece restrita dentro de um único período de curta duração, principalmente nas fases iniciais da inalação. Em **P5-P8**, a latência para atingir o pico de alta atividade, bem como a duração da atividade total ficaram progressivamente prolongadas na sequência dos ciclos respiratórios simulados, enquanto que a taxa de disparo máximo se incrementou (**Figura 5.5; Figura 5.6 A; traçado vermelho**).

Figura 5.5. Raster-plot do processamento de odor de alta intensidade (com ação de NA) no circuito olfatório artificial representativo para P5-P8 e P14-P17



A figura mostrando a continuação da atividade das células mitral (**Mt**) no bulbo olfatório e a atividade das células piramidais (**Pyr**) e os interneurônios *feedforward* (**Ff**) e *feedback* (**Fb**) no aPC em resposta à estimulação de **odor de alta intensidade (+ NA)**. O aPC tem a propriedade de plasticidade sináptica excitatória, características do circuito nas duas idades. A **barra laranja** no topo dos gráficos indica a

presença constante do odor de alta intensidade (800- 3300 ms). A atividade de cada tipo celular está separada por linhas cinza pontilhadas horizontais. Em P5-P8, nos primeiros ciclos respiratórios, uma única alta atividade de células **Pyr**, seguida das células **Fb** é observada imediatamente após a atividade das células **Mt**, esse padrão de atividade se continua nos ciclos respiratórios seguintes, com variação apenas na prolongação no tempo de início dessa atividade relativo ao início de atividade das células **Mt**. Em P14-P17, a latência para observar uma atividade alta das células **Pyr**, após a atividade das células **Mt**, é mais prolongada. Essa atividade ocorre em um período mais amplo do que observado para as células **Pyr** em P5-P8; além disso, com o passar do tempo da simulação, nos ciclos respiratórios seguintes, a atividade das células **Pyr** é mais dispersa na fase de inalação e nos dois últimos ciclos respiratórios se observa um e até dois momentos desse padrão de atividade. A atividade das células **Fb** inicialmente não acompanha à atividade das **Pyr**. Aparece um padrão de atividade dos interneurônios **Fb** a partir do segundo ciclo respiratório e se mantém em padrão e latência nos seguintes ciclos. Cada ponto de representa uma célula com disparo de um potencial de ação.

No **primeiro ciclo** respiratório (100-1200 ms), as células Pyr em P5-P8 evocaram disparos bem acoplados ao início da atividade das células Mt com uma latência para atingir o pico de atividade máxima de 35 ms (coincidente com a fase de subida da atividade das células Mt) e a duração total do período de atividade foi de 45 ms (desde o início de atividade até a caída à zero) (**Figuras 5.5, 5.7 A,B**). Por outro lado, as células Pyr em P14-P17, atingem o pico de atividade 80 ms depois do início da fase de inalação, com duração total de 75 ms (**Figuras 5.5, 5.6 B, 5.7**). A taxa de disparo máximo para as células Pyr das duas idades foi de 1 Hz (**Figura 5.6**). Como pode ser observado nos *Raster-plot* da **Figura 5.5**, esse perfil mudou nos ciclos respiratórios simulados seguintes.

No **segundo ciclo** respiratório (1.200-1.600 ms), a latência para atingir o pico máximo de atividade nas células Pyr nas duas idades foi semelhante (65 ms), com duração de atividade total de 60 ms em P5-P8 e de 75 ms em P14-P17 (**Figura 5.7**) e taxa de disparo máximo de 1,55 Hz e 1 Hz, respectivamente (**Figura 5.6**).

No **terceiro ciclo** respiratório (1.600-2.000 ms), a latência para o pico máximo de atividade em P5-P8 foi de 80 ms, com duração de 60 ms do período de atividade e taxa de disparo máximo de 2 Hz (**Figura 5.7 A**). Por outro lado, em P14-P17 a latência para atingir o pico máximo de atividade foi de 65 ms, com duração total do período de atividade de 75 ms e taxa de disparo máximo de 1, 15 Hz (**Figura 5.7 B**).

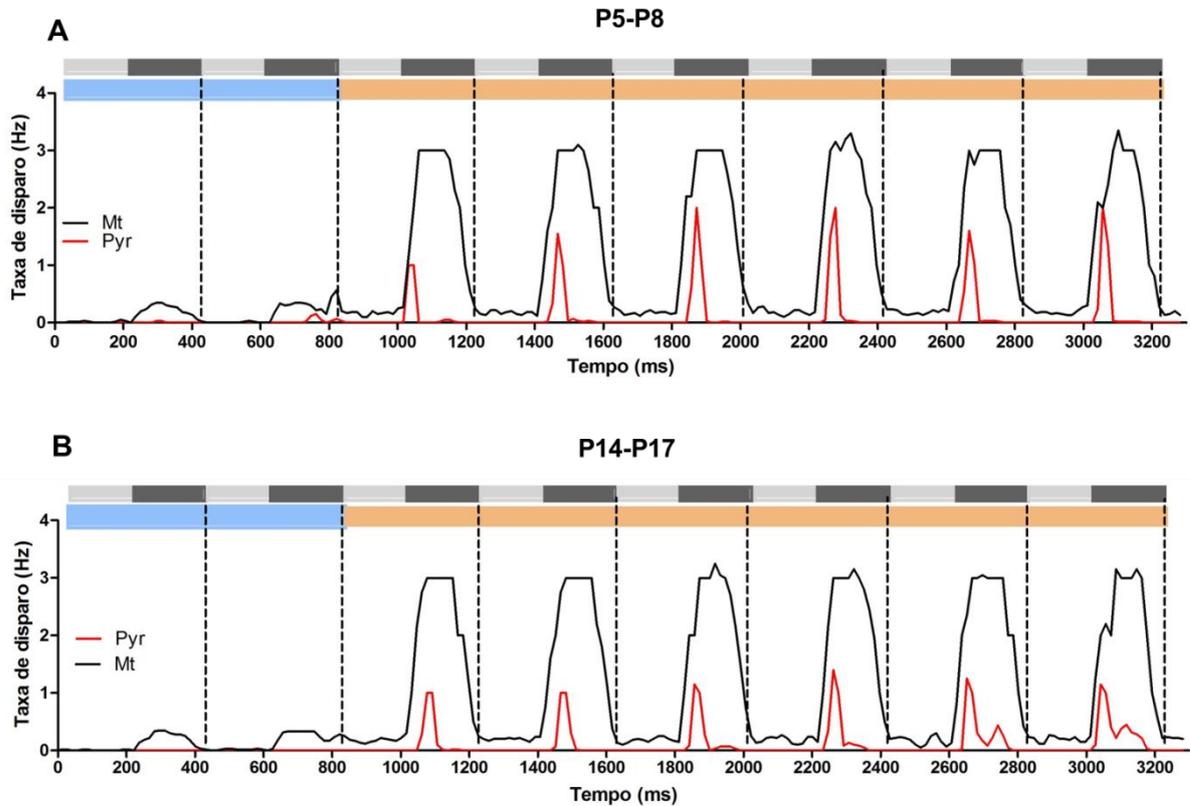
No **quarto ciclo** respiratório (2.000-2.400 ms), a latência para atingir o pico de atividade máxima, duração total do período de atividade e taxa de disparo máximo em P5-P8 e P14-P17 foram semelhantes aos valores para as mesmas idades no terceiro ciclo respiratório (P5-P8: 80 ms, 60 ms, e 2 respectivamente; P14-P17: 65 ms, 75 ms, 1,4; respectivamente) (**Figura 5.7 B**)

Nos **dois últimos ciclos** respiratórios da simulação, as células Pyr em P5-P8 continuaram respondendo com um padrão de alta atividade restrita a um período, com duração da taxa de disparo máximo estável (**Figuras 5.5, 5.6, 5.7**). No entanto, as células Pyr em P14-P17 responderam com um segundo período de atividade, de duração maior e taxa de disparo menor em relação à atividade do primeiro período. No **quinto ciclo** respiratório (2.400-2.800 ms), a latência para o pico de máxima atividade foi de 65 ms, com duração de 60 ms e taxa máxima de disparo de 1,6 Hz para P5-P8 (**Figuras 5.5; 5.6 A, 5.7**); enquanto em P14-P17, a latência para atingir o pico máximo de atividade, duração do período e taxa de máximo disparo para o primeiro e segundo períodos foi de 50 ms e 159 ms, 75 ms e 75 ms e,

1,25 Hz e 0,43 Hz; respectivamente (**Figuras 5.5; 5.6 B, 5.7**). No **sexto ciclo** respiratório (2.800-3.200 ms), a latência para o pico de máxima atividade para P5-P8 foi de 65 ms, com duração do período total de atividade de 60 ms e taxa de disparo máximo de 2 Hz (**Figuras 5.5; 5.6 A, 5.7**). Em P14-P17, as células Pyr responderam com dois períodos de atividade, o primeiro período com latência para atingir o pico máximo de atividade de 50 ms, duração do período total da atividade de 75 ms e taxa de disparo máximo de 1,15 Hz; enquanto que o segundo período teve a latência para o pico máximo de atividade de 125 ms, com duração da atividade total de 90 ms e taxa de disparo máximo de 0,45 Hz (**Figuras 5.5; 5.6 B, 5.7**).

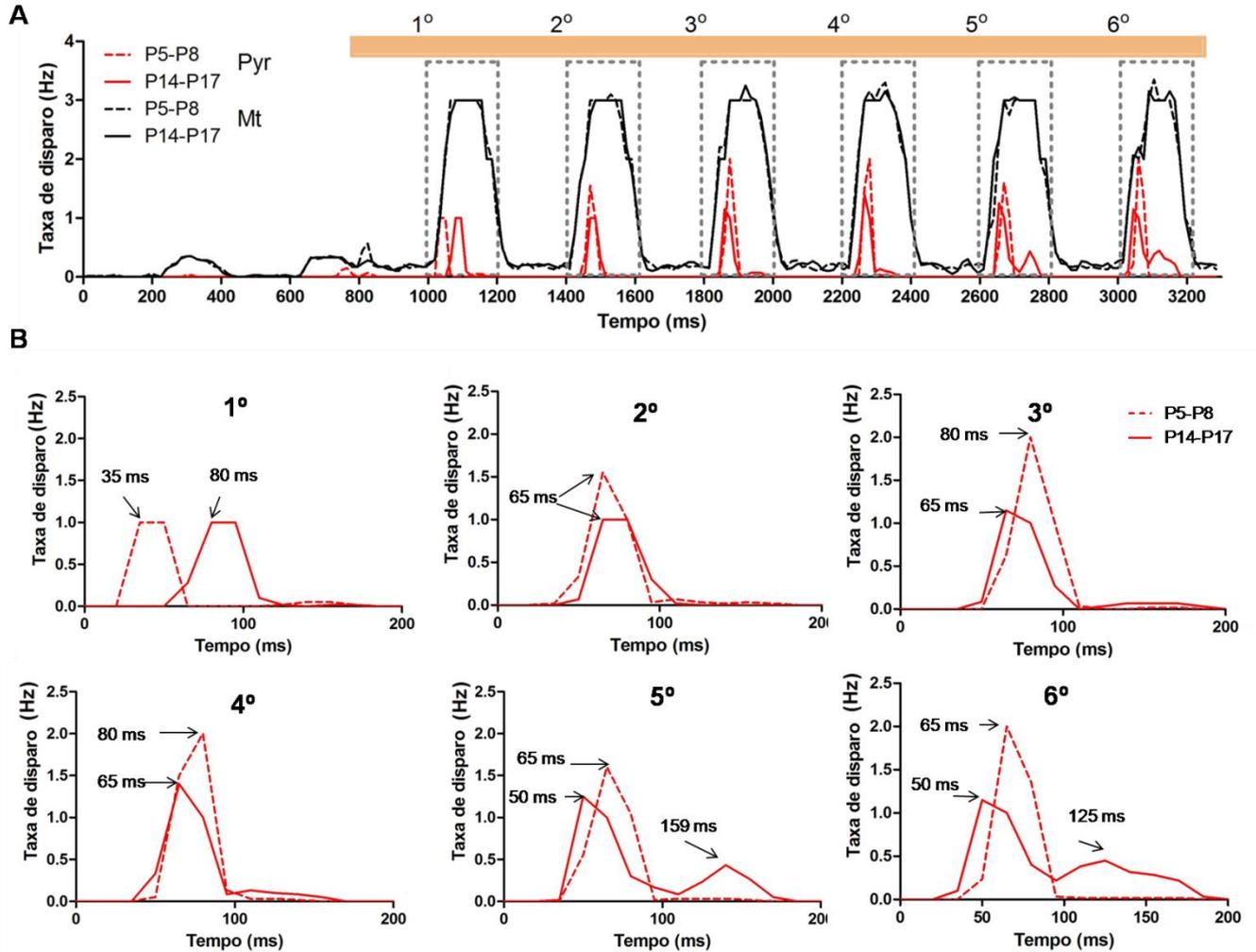
Nos **dois últimos ciclos** respiratórios da simulação, as células Pyr em P5-P8 continuaram respondendo com um padrão de alta atividade restrita a um período, com duração da taxa de disparo máximo estável (**Figuras 5.5, 5.6, 5.7**). No entanto, as células Pyr em P14-P17 responderam com um segundo período de atividade, de duração maior e taxa de disparo menor em relação à atividade do primeiro período. No **quinto ciclo** respiratório (2.400-2.800 ms), a latência para o pico de máxima atividade foi de 65 ms, com duração de 60 ms e taxa máxima de disparo de 1,6 Hz para P5-P8 (**Figuras 5.5; 5.6 A, 5.7**); enquanto em P14-P17, a latência para atingir o pico máximo de atividade, duração do período e taxa de máximo disparo para o primeiro e segundo períodos foi de 50 ms e 159 ms, 75 ms e 75 ms e, 1,25 Hz e 0,43 Hz; respectivamente (**Figuras 5.5; 5.6 B, 5.7**). No **sexto ciclo** respiratório (2.800-3.200 ms), a latência para o pico de máxima atividade para P5-P8 foi de 65 ms, com duração do período total de atividade de 60 ms e taxa de disparo máximo de 2 Hz (**Figuras 5.5; 5.6 A, 5.7**). Em P14-P17, as células Pyr responderam com dois períodos de atividade, o primeiro período com latência para atingir o pico máximo de atividade de 50 ms, duração do período total da atividade de 75 ms e taxa de disparo máximo de 1,15 Hz; enquanto que o segundo período teve a latência para o pico máximo de atividade de 125 ms, com duração da atividade total de 90 ms e taxa de disparo máximo de 0,45 Hz (**Figuras 5.5; 5.6 B, 5.7**).

Figura 5.6. Taxa de disparo das células Mitral e Piramidal artificial durante o processamento de odor baixa e alta intensidade no sistema olfatório artificial correspondente a P5-P8 e P14-P17



Os gráficos mostram a taxas de disparo das células **Mt** e **Pyr** durante a simulação do odor de baixa e alta intensidade reportados nos *Raster-plot* das Figuras 5.4 e 5.5. Durante a apresentação do odor de baixa intensidade (**barra azul**) as células **Mt** (curva preta) e **Pyr** (curva vermelha) artificiais mostram semelhante taxa de disparo nas duas idades, com maior taxa de disparo das células **Mt** nas fases de inalação (barra cinza escura). No início da apresentação do odor de alta intensidade (+NA), a taxa de disparo das células **Mt** se incrementa em $\sim 300\%$ e é sustentada durante toda a fase de inalação, e esse padrão se mantém constante nos seguintes ciclos respiratórios para as duas idades (**A** e **B**, curva preta). O incremento da taxa de disparo das células **Pyr** em P5-P8 é observado quase em seguida do início da atividade das células **Mt**. A taxa de disparo se incrementa em $\sim 100\%$, o qual continua a se incrementar $\sim 10\%$ nos seguintes ciclos respiratórios, e se restringe a um único período, de duração < 50 ms, da fase de inalação. Esse padrão se mantém durante os seguintes ciclos respiratórios (**A**). Em P14-P17, a taxa de atividade das células **Pyr** se observa depois de um período prolongado do início de atividade das células **Mt**, nos ciclo seguintes esse período se encurta consideravelmente. O primeiro evento da taxa de atividade ($\sim 100\%$ de incremento da atividade para odor de baixa intensidade) é mais prolongado que para as células **Pyr** em P5-P8 (**B**); além disso, nos últimos ciclos respiratórios é observado mais de um evento de alta atividade em uma fase de inalação, sendo que o segundo evento é mais disperso que o primeiro e, portanto, mais duradouro.

Figura 5.7. Gráfico superposto das taxas de disparo das células Mitril e Piramidal artificiais durante o processamento de odor baixa e alta intensidade no sistema olfatório artificial entre P5-P8 e P14-P17



Superposição dos gráficos 5.6 A e B para distinguir as diferenças no incremento na taxa de de disparo das **Mt** e **Pyr** durante a simulação do odor de baixa e alta intensidade no aPC em P5-P8 e P14-P17. Em **A**, note que a taxa de disparo das células Mt (curva preta) é maior que das células Pyr (curva vermelha) para o odor baixa intensidade (0-800 ms). Na simulação de odor de alta intensidade (800-3300 ms) a taxa de disparo das células Mt (curva preta) é maior do que as células Pyr, e é semelhante para as duas idades (curva preta delineada vs curva preta reta). A taxa de disparo das células Pyr é maior em P5-P8 (curva vermelha ponteadada) que em P14-P17 (curva vermelha reta). Em **B**, é possível observar diferenças no tempo de latência para atingir o pico de taxa máxima de atividade das células Pyr nos seis ciclos respiratórios simulados para a estimulação do odor de alta intensidade nas duas idades. A comparação em cada ciclo respiratório foi ajustada para 200 ms da fase inalação (0-200 ms) e a latência para atingir o pico foi medido desde o início da fase de inalação (0 ms).

3.2.2.2.3. Atividade dos interneurônios *feedforward* e *feedback*

Os **interneurônios Ff** também incrementaram o padrão de disparo em relação à estimulação do odor de baixa intensidade. A principal característica da atividade dos interneurônios **Ff** nas duas idades foi que o disparo é constante e sem periodicidade aparente da atividade, durante toda a fase de inalação (**Figura 5.5**).

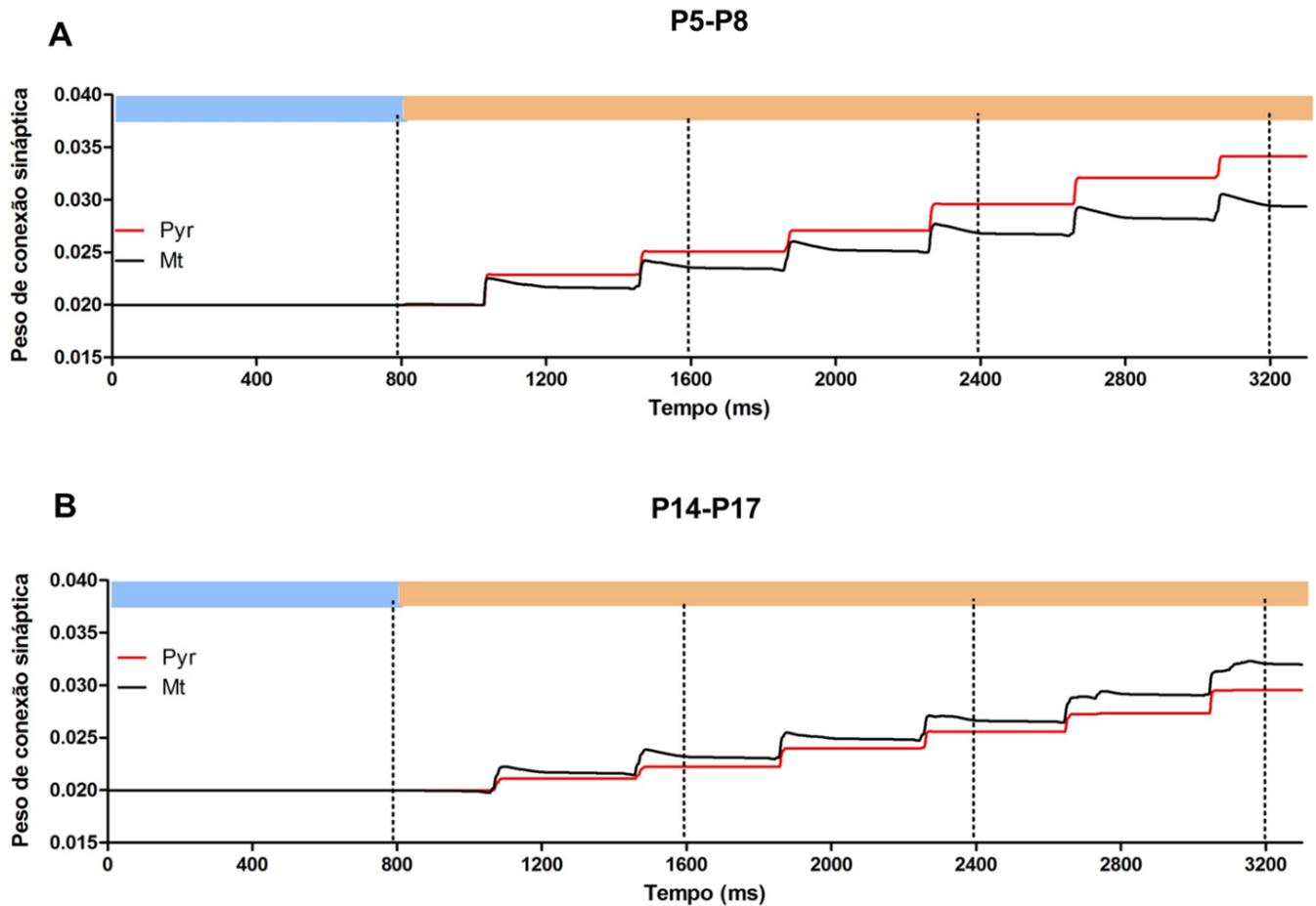
Por outro lado, a atividade dos **interneurônios Fb** só foi observada na estimulação do odor de alta intensidade e não na estimulação do odor de baixa intensidade. A dependência do *input* excitatório das células Pyr desses interneurônios foi evidenciado pela atividade acoplada ao período de atividade dessas células. Para as duas idades, a atividade dos interneurônios Fb foi observada nas etapas finais do período de atividade das células Pyr, restrito a um único período.

Interessantemente, em P5-P8, uma forte atividade dos interneurônios Fb, de duração curta, segue ao período de alta atividade das células Pyr em toda simulação do odor de alta intensidade, porém em P14-P17, uma elevada atividade de interneurônios Fb não foi observada após o período de alta atividade das células Pyr. O que se observou foi uma atividade bastante reduzida durante os primeiros dois ciclos respiratórios. Só nos seguintes ciclos respiratórios foi observada uma alta atividade dos interneurônios Fb após o período de elevada atividade das células Pyr (**Figura 5.5**).

3.2.3. Ganho na força de conexão sináptica

Outra característica distintiva do circuito do aPC artificial que foi observada entre as duas idades foi o ganho da força de conexão sináptica (peso) das células Pyr que se estabelecem ao longo da simulação em cada ciclo respiratório para a estimulação do odor de alta intensidade (**Figura 5.8**).

Figura 5.8. Variação do peso de conexão sináptica nas células mitrais e piramidais do circuito olfatório artificial para o processamento de odor baixa e alta intensidade correspondente a P5-P8e P14-P17.



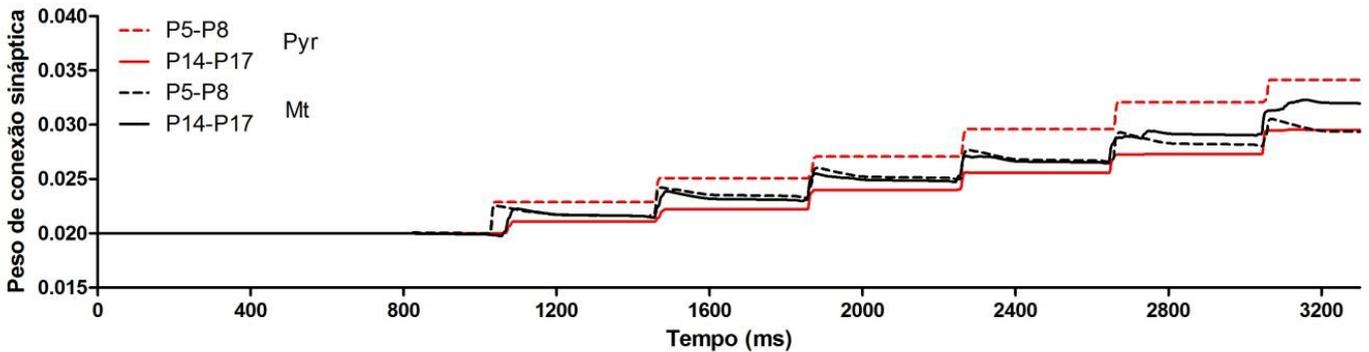
Durante o processamento do odor de baixa intensidade (barra azul) tanto as células Mt, quanto as células Pyr não mostram variação no peso de conexão sináptica. Nos primeiros ciclos respiratórios da apresentação do odor de alta intensidade (com ação de NA), a força de conexão sináptica das células Pyr e Mt se incrementam, os quais progressivamente continuam a se incrementar nos ciclos respiratórios seguintes, com maior peso sináptico observado para as células Pyr em P5-P8 que nas células Mt (**A**). Em P14-P17, os dois tipos celulares incrementam no peso de conexão sináptica, porém um ligeiro incremento das células Mt sobre as Pyr se acompanha pelo resto dos ciclos respiratórios simulados (**B**). Note que o incremento na conexão sináptica das células Pyr e P5-P8 é maior que em das células Pyr em P14-P17.

3.2.3.1. Na simulação do processamento de odor de baixa intensidade

Na simulação do odor de baixa intensidade, a força de conexão sináptica das células Mt e Pyr permaneceram estáveis nos dois ciclos respiratórios (Md:0,020), sem diferenças aparentes entre as idades (**Figura 5.8, 5.9**).

Figura 5.9. Gráfico superposto da variação no peso de conexão sináptica nas células mitrais e piramidais do circuito olfatório artificial para o processamento de odor de baixa e alta intensidade em P5-P8 e P14-P17.

O gráfico mostra uma superposição dos gráficos 5.8 A e B para distinguir melhor as



diferenças no peso de conexão sináptica para as células **Mt** e **Pyr** durante a simulação do odor de baixa e alta intensidade reportados nos dois períodos de idade. Durante a simulação do odor de baixa intensidade (0-800 ms), as células **Mt** e **Pyr** mantêm sem mudanças o peso de conexão sináptica (0,020). Durante a estimulação de odor de alta intensidade (800-3300 ms), as células **Mt** (curva preta) mostram ganho de peso de conexão sináptica constante durante cada ciclo respiratório simulado o qual é semelhante nos dois períodos de idade. O ganho de peso de conexão sináptica das células **Pyr** (curva vermelha) também mostra um ganho em cada ciclo respiratório simulado, porém o ganho é maior para P5-P8 (curva vermelha pontilhada) que para P14-P17 (curva vermelha reta).

3.2.3.2. Na simulação do processamento do odor de alta intensidade (com ação de NA)

Na simulação do odor de alta intensidade, a força de conexão sináptica das células **Pyr** e **Mt** incrementou seu valor progressivamente em cada ciclo respiratório na simulação do odor de baixa intensidade. A seguir, o ganho no peso na conexão sináptica na condição de odor de alta intensidade, refere-se a um incremento na porcentagem do peso de conexão sináptica a partir do valor na condição do odor de baixa intensidade (0,020 = 100%).

O ganho do peso de conexão sináptica das células **Mt** foi muito parecido ao longo da simulação dos ciclos respiratórios para as duas idades. No primeiro, segundo, terceiro e quarto ciclos respiratórios (800-2.400 ms) foi de 10% (Md: 0,022), 15% (Md: 0,023), 25% (Md: 0,025) e 30% (Md: 0,026), respectivamente, para os dois períodos de idade. O ganho do peso de conexão sináptica no quinto e sexto ciclos respiratórios foram de 40% (Md:0,028) e 45% (Md: 0,029) para P5-P8 e de 45% (Md: 0,029) e 60% (Md: 0,032) para P14-P17 (**Figura 5.8**).

Os ganhos no peso de conexão sináptica das células **Pyr** foram mais pronunciados em P5-P8 ao longo dos ciclos respiratórios [primeiro ciclo: 15% (Md: 0,023); segundo ciclo: 25%

(Md:0,025); terceiro ciclo: 35% (Md: 0,027); quarto ciclo: 45% (Md:0,029); quinto ciclo: 60% (Md:0,032); sexto ciclo: de 70% (Md: 0,034)] (**Figura 5.8 A**) do que os ganhos nos pesos de conexão sináptica em P14-P18 [primeiro ciclo: 5% (Md:0,021); segundo ciclo: 10% (Md: 0,022); terceiro ciclo: 15% (Md:0,023); quarto ciclo: 25% (Md: 0,025); quinto ciclo: 35% (Md: 0,027); sexto ciclo: 45% (Md: 0,029)] (**Figura 5.8 B**). O ganho no peso de conexão sináptica das **Pyr** em P14-P17 foi inclusive menor que o das células **Mt** nesse mesmo período de idade, em cada ciclo respiratório simulado (**Figura 5.9**). Os resultados se encontram resumidos na **Tabela 5.2**.

Tabela 5.2. Resultados da simulação do processamento do odor de alta intensidade (com ação de NA) para as células piramidais em P5-P8 e P14-P17 em cada ciclo respiratório

	1°	2°	3°	4°	5°	6°
P5-P8						
Latência para o pico (ms)	35	65	80	80	65	65
Duração total de atividade (ms)	45	60	60	60	60	60
Taxa de atividade máxima (Hz)	1	1,55	2	2	1,6	2
Ganho de peso sináptico (%) *	15	25	35	45	60	70
P14-P17						
Latência para o pico (1° período) (ms)	80	65	65	65	50	50
Latência para o pico (2° período) (ms)	-	-	-	-	159	125
Duração total de atividade(1° período) (ms)	75	75	75	75	75	75
Duração total de atividade(2° período) (ms)	-	-	-	-	75	90
Taxa de atividade máxima(1° período) (Hz)	1	1	1,5	1,4	1,25	1,15
Taxa de atividade máxima(2° período)(Hz)	-	-	-	-	0,43	0,45
Ganho de peso sináptico (%)*	5	10	15	25	35	45

Os valores são a média da população de células piramidais que ficaram ativas para a estimulação do odor de alta intensidade em cada ciclo respiratório simulado (1°-6°). Período é referido ao padrão de atividade rápida e transitória que caracteriza a resposta dessas células ao longo da simulação nos 6 ciclos respiratórios. * A porcentagem do ganho do peso foi estimada a partir do peso de conexão sináptica na simulação da condição de odor de baixa intensidade (100%).

4. Discussão

Estudos eletrofisiológicos *in vivo* com roedores adultos, ratos e camundongos, têm mostrado que o odor evoca a atividade de um pequeno grupo de células piramidais no córtex piriforme, a qual se caracteriza por ter um padrão de resposta de alta atividade acoplada ao início da fase de inalação do ciclo respiratório (dentro dos primeiros 100 ms) (BUONVISO *et al.*, 2006; RENNAKER *et al.*, 2007; STETTLER; AXEL, 2009; POO; ISAACSON, 2009; ZHAN; LUO, 2010; MIURA *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2013; BOLDING; FRANKS, 2017; STERN *et al.*, 2018). Essa alta atividade evocada pelo odor é de natureza transitória

(MIURA *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2013; BOLDING; FRANKS, 2017; STERN *et al.*, 2018), pois é seguida por um período sustentado de supressão, o qual é atribuído principalmente ao papel da inibição *feedback* intracortical (STERN *et al.*, 2018). Os resultados dos nossos estudos de simulação sugerem que tais características de resposta das células piramidais evocadas pelo odor estão presentes no aPC nos períodos de idade P5-P8 e P14-P17, porém a estratégia (ou mecanismo) de implementação desse padrão de atividade parece ser diferente em cada período de idade.

A seguir, se discute as semelhanças e diferenças encontradas no processamento do odor em cada período de idade e, depois se discute a significância desses achados, após uma breve consideração das limitações do modelo computacional.

4.1. Diferenças no processamento do odor no aPC em P5-P8 e P14-P17

4.1.1. No processamento de células piramidais individuais do aPC

Do total de 100 células Pyr artificiais, cinco células Pyr foram aleatoriamente selecionadas para registro de atividade em resposta a estimulação de odor baixa e alta intensidade.

As células Pyr artificiais individuais dos dois períodos de idade responderam para estimulação de um odor de alta intensidade (com ação conjunta de NA), melhorando a resposta dos potenciais de ação evocados (diminuindo a latência de evocação de potencial de ação) e a organização temporal das respostas evocadas (sincronizando os disparos de potenciais de ação de várias células). Porém, a frequência de disparo em resposta para o odor de alta intensidade foi de aproximadamente 10 Hz para todas as células em P5-P8, e a célula que disparou nessa frequência em resposta ao odor de baixa intensidade também manteve esse padrão de resposta para o odor de alta intensidade. Em P14-P18, algumas células mantiveram também a frequência de disparo em 10 Hz, outras incrementam para 20 ou 30 Hz em resposta ao odor de alta intensidade e uma não evocou nenhum potencial de ação durante todo o período de estimulação. Esses achados são coerentes com os achados de um estudo *in vivo* no córtex piriforme em ratos > P16. Apenas 10% da população de células piramidais registradas com estimulação de odor artificial (durante dois segundos) evocou resposta. As células responsivas evocaram disparos de potenciais de ação com frequências entre 0,05 e 24,5 Hz, fortemente acoplados ao ritmo respiratório (POO; ISAACSON, 2009).

Assim, a principal diferença, na resposta evocada pelo odor nas células piramidais individuais entre os períodos de idade é que enquanto em P5-P8 parece predominar um melhoramento na organização temporal dos disparos de várias células, em P14-P17, embora também se observe essa característica para algumas células, o que prevalece é o melhoramento na resposta para o odor, o qual é evidenciado pela diminuição mais pronunciada da latência para evocar o potencial de ação e o incremento no número de disparos, mais do que na sincronização deles. Além disso, o melhoramento na evocação de disparos nos últimos ciclos respiratórios do período de estimulação de odor de alta intensidade (com ação de NA) em algumas células em P14-P17 sugere uma facilitação sináptica de curta duração nas células piramidais. Parece que em P5-P8 a atividade evocada pelo odor de alta intensidade (com ação de NA) nas células piramidais é determinada pelas características intrínsecas de disparo das células piramidais em maior grau que em P14-P17.

No **Capítulo 4** foi mostrado que as células piramidais reais em P5-P8 exibem uma rápida adaptação no padrão de disparo com o incremento do *input* despolarizante, enquanto que as células em P14-P17 aumentam o número de disparos com o incremento do *input* despolarizante, sugerindo um menor grau de adaptação na frequência de disparo de potencial de ação. Essa característica das propriedades do potencial de ação das células piramidais também pode ser atribuída à evocação de um potencial de ação de uma célula para o odor de baixa intensidade em P5-P8, pois as células piramidais reais nessa idade são mais sensíveis aos *inputs* despolarizantes de baixa intensidade do que as células piramidais em P14-P17. Porém, só a partir dos resultados do comportamento do conjunto da população de células no circuito integrado do aPC, em resposta ao odor, poderemos elaborar uma melhor aproximação das diferenças e/ou semelhanças no processamento do odor entre os dois períodos de idade.

4.1.2. No processamento da população de células piramidais no circuito integrado do aPC

4.1.2.1. Processamento de odor de baixa intensidade

A característica diferente entre os dois períodos de idade para a estimulação do odor de baixa intensidade foi que enquanto em P14-P17 a redução da atividade das células Pyr foi completa em P5-P8 um grupo pequeno de células Pyr mostrou atividade no final da segunda fase de inalação, o qual sugere uma maior excitabilidade celular nesse período de idade para o odor de baixa intensidade.

4.1.2.2. Processamento de odor de alta intensidade (com ação de NA)

Nos dois períodos de idade, a mudança rápida da condição de odor de baixa para alta intensidade (com ação de NA) evocou um dramático incremento na atividade das células Mt (~300%), o qual se manteve sustentado ao longo das fases de inalação. A mudança na atividade das células Pyr se caracterizou por um incremento rápido e transitório (60-75 ms) acoplado na fase de inalação (dentro dos primeiros 100 ms), com queda brusca, seguido de um período de silenciamento ou de atividade dispersa no final da fase de inalação. Tais características de resposta para estimulação de odor são semelhantes aos achados em experimentos eletrofisiológicos *in vivo* com animais acordados (BUONVISO *et al.*, 2006; RENNAKER *et al.*, 2007; STETTLER; AXEL, 2009; POO; ISAACSON, 2009; ZHAN; LUO, 2010; MIURA *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2013; BOLDING; FRANKS, 2017; STERN *et al.*, 2018), que sugere que o aPC de filhotes de rato em P5-P8 e em P14-P17 possuem padrões semelhantes de resposta ao odor e esses são coerentes aos reportados para o roedor adulto ou > P18. Por outro lado, uma análise do *output* da simulação de cada ciclo respiratório para estimulação do odor de alta intensidade (com ação de NA) mostra diferenças relevantes entre os dois períodos de idade, as quais sugerem estratégias ou mecanismos de implementação diferentes do padrão de processamento de odor em P5-P8 e P14-P17.

Na organização do microcircuito do aPC, um pequeno grupo de células Pyr recebe fortes *inputs* excitatórios convergentes de células Mt em resposta ao odor, as primeiras por sua vez ativam outras células Pyr e a chegada coincidente dos *inputs* das Mt e das recorrentes resulta em uma amplificação na atividade de mais células Pyr e também no recrutamento de interneurônios Fb, os quais produzem uma forte inibição e truncam a excitação recorrente (POO; ISAACSON, 2009; STOKES; ISAACSON, 2010; FRANKS *et al.*, 2011; MIURA *et al.*, 2012; HADDAD *et al.*, 2013; BOLDIN; FRANKS, 2017; STERN *et al.*, 2018). Em P5-P8, foi observado um progressivo incremento na taxa de disparo e um ganho maior na força de conexão sináptica das células Pyr ao longo dos ciclos respiratórios simulados, sugerindo uma rápida capacidade de melhoramento na eficácia sináptica para o *input* entrante nesse grupo de células. É possível que as particularidades do *input* GABAérgico para as células Pyr, nas duas idades, tenham contribuído para esse perfil. Nos dois períodos de idade, a conectividade dos interneurônios Ff e Fb com as células Pyr do nosso modelo foi de 37% e a diferença dos potenciais para o limiar de disparo e o de reversão do GABA foi positivo para os dois períodos de idade, sendo maior para P5-P8 (13,63 mV) do que para P14-P17 (5,58 mV). Assim, um perfil de *input* GABAérgico com resultado despolarizante para as células Pyr

em P5-P8, principalmente nas que convergem com o *input* das células Mt, poderia ter contribuído para uma acelerada amplificação da excitação recorrente das células Pyr.

Um trabalho recente, combinando estratégia eletrofisiológica *in vivo* em roedor adulto e modelagem computacional do córtex piriforme, mostra que a atividade tardia das células Pyr, após o truncamento do período de alta atividade, é mantida estável pelo lento incremento na atividade dos interneurônios Ff, o qual cancela o incremento do *input* total das células Mt, que mantém uma resposta sustentada ao longo da fase de inalação (STERN *et al.*, 2018). No nosso estudo, nem o truncamento da alta atividade transitória das células Pyr e nem o silenciamento posterior parecem ser mediados pela inibição, mas sim pelas propriedades intrínsecas de disparo das células Pyr em cada período de idade. Assim, sugerimos que no circuito aPC em P5-P8 acontece um forte *input* das células Mt, evocado por odor de alta intensidade (com ação de NA), ativando um grupo de células Pyr, as quais, por sua vez, ativam outras Pyr que também recebem *inputs* das células Mt, amplificando a atividade de várias outras Pyr. Essa amplificação leva a duas consequências: 1) ativação de um grupo interneurônios Ff e 2) adaptação na resposta de disparo das células Pyr em resposta ao *input* entrante das Mt e das próprias recorrentes. As duas levam a uma queda brusca na atividade das células Pyr, porém a adaptação celular mantém o período de silenciamento total, pois nenhuma célula Pyr ativa outra Pyr ao longo do resto da fase de inalação. No perfil de P14-P17, o grau de adaptação das células Pyr para o incremento do *input* excitatório foi menor que em P5-P8, assim após a queda brusca do período de alta atividade das células Pyr, essas continuam responsivas para o *input* entrante das células Mt e mantém a excitação recorrente Pyr-Pyr. Uma prova disso são os dois últimos ciclos respiratórios, onde a atividade desas células é mais pronunciada.

4.2. Limitações do modelo computacional

4.2.1. Representação de uma população variável de células piramidais

Uma limitação do nosso circuito é o uso de valores da média das propriedades intrínsecas passivas e ativas das células Pyr. No **Capítulo 4**, foi mostrado que as células Pyr registradas nos dois períodos de idade têm uma variabilidade grande nos parâmetros de potencial de membrana em repouso, resistência ao *input*, constante de tempo de membrana, limiar de disparo de potencial de ação e frequência de disparo de potencial de ação para injeções de corrente despolarizante. Provavelmente, essa variabilidade atribuída algumas diferenças mais acentuadas em alguns parâmetros que descrevemos nesse estudo ou outras

diferenças adicionais relevantes para o processamento do odor entre os dois períodos de idade.

4.2.2. Representação de duas fontes de inibição confiáveis no circuito aPC

Trabalhos de imunohistoquímica têm mostrado que a densidade sináptica inibitória na camada L1a (inibição Ff) é estabelecida a partir da segunda semana pós-natal (WESTRENBROEK *et al.*, 1998; SARMA *et al.*, 2011), enquanto que contatos sinápticos inibitórios na camada 2/3 (inibição Fb) já se encontram presentes desde o início da primeira semana pós-natal (WESTRENBROEK *et al.*, 1998). No adulto, é considerado que a conectividade entre as duas fontes de inibição é, de fato, diferente (SUZUKI; BEKKERS, 2012), sendo mais forte a inibição Fb do que a Ff (STERN *et al.*, 2018). Porém, por não contarmos com dados eletrofisiológicos dessas possíveis diferenças na inibição Ff e Fb nas idades de interesse, o nosso circuito considerou a mesma porcentagem de conectividade (37%) para a inibição Ff-Pyr e Fb-Pyr nas duas idades, valor obtido a partir de registros eletrofisiológicos com roedor >P12 para conectividade Ff-Pyr (SUZUKI; BEKKERS, 2012). No entanto, considerando que a resultante da transmissão sináptica GABAérgica tem um efeito despolarizante nos dois períodos de idade (P5-P8 > P14-P17), uma porcentagem de conectividade diferenciada para Ff e Fb não iria mudar o perfil para o processamento do odor que mostramos aqui.

4.2.3. Representação do ritmo de amostragem pela maturação do *sniffing*

Nos roedores, a percepção de mudança de estímulos olfatórios no ambiente induz uma alteração no ritmo respiratório para um padrão mais rápido e regular, chamado de *sniffing* (ALBERTS; MAY, 1980; WALCHOWIAK, 2011). O *sniffing* melhora a amostragem de moléculas odorantes do ambiente que é levado para dentro do nariz e isso se traduz no incremento da frequência de resposta das células Mt no BO (VERHAGEN *et al.*, 2007; BATHELLIER *et al.*, 2008) e em nível cortical na latência para atingir o pico de disparo da população de células Pyr responsivas para esse odor (POO; ISAACSON, 2009; STERN *et al.*, 2018). O *sniffing* se desenvolve durante as três primeiras semanas de vida pós-natal no rato, incrementado na frequência respiratória e na duração do *sniffing* (ALBERTS; MAY, 1980). Tais características não foram consideradas no nosso modelo entre as idades. Possivelmente, a realização dessa distinção teria permitido observar diferenças na velocidade de processamento. Entretanto, como o objetivo da nossa simulação foi observar as diferenças

gerais no processamento de odor entre as duas idades, a simulação dentro de um ciclo respiratório (um *sniffing*) foi o mais adequado.

4.3. Significância para os mecanismos do aprendizado de preferência do odor

Tem sido proposto que a representação do odor pode ser armazenada em sinapses entre células piramidais mutuamente conectadas (HABERLY; BOWER, 1989), através de plasticidade sináptica Hebbiana (WILSON; STEVENSON, 2003). Os nossos resultados sugerem que o processamento do odor no aPC em P5-P8 para a condição de um odor de alta intensidade, que tenta representar uma condição em que o filhote percebe o odor da mãe junto com o contato materno (ação de NA), tem uma maior capacidade para um rápido melhoramento na eficácia sináptica excitatória que o aPC em P14-P17, o qual é suportado por mecanismos maturacionais de inibição intracortical e das propriedades passivas e ativas das células piramidais. Essas diferenças no processamento do odor nos dois períodos de idade podem contribuir para um rápido armazenamento de memória do odor reforçado no aPC em P5-P8, enquanto que no aPC em P14-P17 precise de um tempo maior.

Agradecimentos

A implementação do modelo, desenho dos experimentos de simulação e a simulação computacional reportada aqui foram realizados em colaboração com Enver Miguel Oruro Puma, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS.

Capítulo 6

Conclusões

Nesse capítulo são sumarizados os principais achados dos estudos desenvolvidos nesse trabalho e são discutidos à luz das perguntas que guiaram o presente trabalho de tese. São também discutidas as contribuições para o aprendizado do apego, limitações e direções futuras para o trabalho e contribuições para abordagem metodológica para esse tipo de estudo.

1. Sumarização dos principais achados

1.1. As características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC durante o período sensível e pós-sensível do aprendizado do apego são diferentes

Mediante estudo eletrofisiológico (*patch-clamp whole-cell*) em fatias de cérebro de ratos, no períodos P5-P8 (sensível) e P14-P17 (pós-sensível), foram determinadas as características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC, via registro de correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSC, mediadas por receptor GABA_A) das células piramidais da camada L2/3. Nas células piramidais do período P5-P8 predomina um perfil de *input* inibitório reduzido, caracterizado por transmissão sináptica GABAérgica menos frequente, com cinéticas de ativação e inativação das sIPSC mais lentas e potenciais de reversão dessas correntes (E_{GABA}) menos hiperpolarizados. Em P14-P17, todas essas características mudam, contribuindo para um *input* inibitório mais forte em relação ao período anterior. A transmissão sináptica GABAérgica nas células piramidais bem como a ativação e inativação das sIPSC se tornam mais rápidas e E_{GABA} se torna mais hiperpolarizado.

No capítulo 3, discutimos que tais diferenças no *input* inibitório sobre as células piramidais da camada L2/3 em P5-P8 e P14-P17 poderiam contribuir para duas formas de integração do *input* sensorial excitatório. Um *input* inibitório mais fraco em P5-P8 poderia contribuir com uma janela temporal de integração de potenciais pós-sinápticos excitatórios na célula piramidal para atingir o disparo do potencial de ação mais amplo, enquanto que um *input* inibitório mais forte em P14-P17 poderia reduzi-la. A janela temporal é fechada pelo aparecimento das correntes inibitórias pós-sinápticas, que são capazes de contribuir para a

geração de potencial inibitório pós-sináptico que trunca a formação de potenciais de ação seguintes.

1.2. As propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais no aPC durante o período sensível e pós-sensível do aprendizado do apego são diferentes

Mediante registro *patch-clamp whole-cell* das células piramidais da camada L2/3 do aPC, também em fatias, foram determinadas as propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais em P5-P8 e P14-P17. Em P14-P17, predominam células piramidais com resistência ao *input* e constante de tempo de membrana reduzida, e o potencial de membrana em repouso mais negativo que em P5-P8. Essas diferenças também se refletem nas propriedades de disparos das células em cada período. Em P5-P8, predominam células piramidais com limiar de disparo de PA mais despolarizado e duração do PA mais prolongado que as células em P14-P17. Quando estimuladas com intensidades crescentes de correntes despolarizantes, essas células mostram também diferentes comportamentos. Em P5-P8, predominam células piramidais que disparam trens de PA para *inputs* de baixa intensidade, porém após atingir a frequência de disparo máximo se adaptam rapidamente para *input* de correntes despolarizantes de intensidades fortes. Em P14-P17, predominam células piramidais que precisam de um maior *input* despolarizante para disparar potenciais de ação e mostram menor grau de adaptação que as células em P5-P8, pois a maioria incrementa a frequência de disparo de PA proporcional à intensidade de corrente despolarizante injetada.

No capítulo 4, foi discutido que a reduzida excitabilidade e rápida adaptação das células piramidais em P5-P8 poderia ser um mecanismo de regulação da sua própria atividade em um período em que o *input* GABAérgico inibitório ainda é fraco. Também que as células piramidais no aPC em P5-P8 poderiam ser mais responsivas para pequenos *inputs* de correntes sinápticas de cinéticas lentas, enquanto que as células piramidais em P14-P17 responderiam melhor para *inputs* de correntes sinápticas mais prolongadas de cinéticas rápidas.

1.3. O processamento do odor em condições etológicas no circuito integrado aPC durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego são diferentes

Um circuito neural artificial do BO-aPC foi construído para explorar se as diferenças nas características de transmissão sináptica GABAérgica entre P5-P8 e P14-P17 contribuem

com um padrão de processamento neural diferenciado. Para testar esses padrões de processamento neural nos dois períodos de idade, foram desenhadas duas condições de simulação de processamento de odor (odor constante de baixa intensidade e odor constante de alta intensidade com ação de NA). Nessas condições de processamento, os circuitos neurais dos dois períodos mostram diferenças. Um odor de baixa intensidade evoca resposta em algumas células em P5-P8, mas nenhuma resposta em P14-P17. Um odor de alta intensidade, com ação de NA, evoca um evento de intensa atividade das células piramidais nos dois períodos, porém em P5-P8 as respostas evocadas estão mais fortemente acopladas ao início da fase de inalação, com a repetição da exposição ao odor (e a ação da NA) mostrando um rápido incremento da eficácia sináptica para *input* entrante. Em P14-P17, algumas células piramidais mostram também as características do período P5-P8, mas a maioria exibe um melhoramento na resposta para o odor, evidenciado pela diminuição na latência para evocar o potencial de ação e o incremento no número de disparos com a repetição de exposição ao odor (e a ação da NA), mais do que na sincronização deles. Depois de repetida estimulação do odor de alta intensidade + NA, as células piramidais em P14-P17 também mostraram uma facilitação sináptica.

2. Contribuição da transmissão sináptica GABAérgica nos perfis de processamento neural de odor durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego

A segunda pergunta principal do presente estudo foi se as diferenças nas características da transmissão sináptica GABAérgica no aPC nos períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego, integrados em um circuito neural, contribuem com um padrão de processamento neural diferencial em cada período. A partir do trabalho de simulação podemos dizer que o recrutamento do *input* GABAérgico pelo *input* excitatório do odor contribui, nos dois períodos, excitando as células piramidais e não inibindo-as. A diferença do potencial de limiar de disparo de PA e o potencial de reversão do GABA foi positiva para os dois períodos de idade, sendo quase três vezes maior em P5-P8 que em P14-P18. Assim, nos dois períodos o perfil inibitório GABAérgico que descrevemos para essas células tem um efeito despolarizante, de um grau maior em P5-P8 do que em P14-P17.

Toda vez que a ativação do *input* GABAÉRGICO sobre a célula piramidal tem um retardo temporal (aproximadamente 5-10 ms em roedores adultos) para *input* entrante do

LOT, o efeito despolarizante do *input* GABAérgico em P5-P8 poderia contribuir acelerando a rápida adaptação das células piramidais. Como vimos nesse período de idade, as células piramidais mostram uma rápida adaptação para *inputs* despolarizantes de alta intensidade. Diferente do que tínhamos discutido no capítulo 3, propondo para o *input* GABAérgico um efeito inibitório (fraco em P5-P8 e forte em P14-P17) para a integração de *inputs* excitatórios na célula piramidal, parece que o *input* GABAérgico contribui indiretamente para o truncamento da geração de PA, incrementando a excitação no momento pico de máxima atividade das células piramidais pela ação das recorrentes. Nesse momento, a atividade excitatória é truncada pela propriedade de adaptação da própria célula piramidal e não por efeito de um forte *input* inibitório como acontece no aPC do adulto para o processamento de odor (LUNA; SCHOOPA, 2008; POO; ISAACSON, 2009; STERN *et al.*, 2018).

Em P14-P17, parece predominar uma ação combinada da propriedade intrínseca da célula de adaptação rápida (uma pequena proporção) e *input* GABAérgico inibitório. A maior proporção de células piramidais em P14-P17 não mostra adaptação rápida, ao contrário mostra incremento na taxa de disparo com o aumento de intensidade do *input* excitatório. Se a ação do *input* GABAérgico fosse despolarizante, como temos descrito no cenário para as células piramidais em P5-P8, a ação GABAérgica, após a atividade forte devido às recorrentes, continuaria a despolarizar a célula de modo patológico, mas isso não sucede. Assim, consideramos que uma contribuição inibitória do *input* GABAérgico deva estar presente. Isso é possível de ocorrer, pois a diferença de potencial entre o limiar de disparo das células piramidal e o E_{GABA} em P14-P17 é bem menor que em P5-P8. Assim, em P14-P17, uma ação combinada do *input* GABAérgico inibitório e as propriedades intrínsecas de adaptação de disparo das células piramidais parece dar conta do *dumping* ou *shunting* do potencial de ação nas células piramidais no processamento de odor no aPC.

3. Contribuições para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no apego

Tem sido apontado o envolvimento do aPC no aprendizado de preferência olfatória condicionada em roedores infantis (pareamento odor-*stroke*) (FONTAINE *et al.*, 2013; MORRISON *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015) e esse aprendizado se encontra limitado a uma faixa do desenvolvimento (<P10) e, semelhante ao que tem sido descrito para o BO, presume-se que o período sensível termina quando a estimulação tátil não elicita mais a liberação suficiente de NA (YUAN *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2017). Reportase-se também

que a atividade dos receptores β -adrenérgicos no aPC é tanto necessária quanto suficiente para esse aprendizado (MORRISON *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2015; GHOSH *et al.*, 2017). Porém, não se sabe se o pareamento odor-ativação dos receptores β -adrenérgicos no aPC ainda induz preferência olfatória condicionada em filhotes > P10. Os trabalhos nessa linha são poucos e os grupos que trabalham estão focando nos mecanismos celular e sináptico que suportam a memória do aprendizado odor-*stroke* no período sensível (MODARRESI *et al.*, 2016; GHOSH *et al.*, 2017; MUKHERJEE *et al.*, 2017; BHATTACHARYA *et al.*, 2017; 2018).

Algumas discussões desse fenômeno poderiam ser aportadas a modo de contribuição para a área em base aos dados aqui obtidos.

Primeiro. Nesse trabalho mostramos pela primeira vez que importantes diferenças na transmissão sináptica GABAérgica e nas propriedades intrínsecas passivas e ativas das células piramidais do aPC ocorrem durante os períodos sensível e pós-sensível do aprendizado do apego. Isso sugere que qualquer modulação noradrenérgica ou de outros neuromoduladores nesses períodos deva acontecer sobre um circuito neural intrínseco em constante mudança, além das próprias mudanças do sistema LC-NA. Um entendimento integral do estado de desenvolvimento do circuito neural nesses períodos associado ao fenômeno comportamental pode permitir gerar hipóteses mais claras sobre os mecanismos implicados e também entender a trajetória desse circuito.

Segundo. Tem sido sugerido que, semelhante ao reportado para o BO, uma grande liberação de NA no aPC é necessária para o aprendizado da preferência olfatória no período sensível. É provável que uma forte ação modulatória de NA seja necessária para ativar as células piramidais que têm alta adaptação na sua frequência de disparo nesse período. Em um cenário de condicionamento clássico odor-*stroke* em P5-P8, a estimulação de um odor no filhote pode evocar vários potenciais excitatórios pós-sinápticos nas células piramidais do aPC e eventualmente esses potenciais podem superar o limiar e a célula piramidal pode disparar trens de potenciais de ação. Essa atividade pode progressivamente ativar correntes que medeiam a adaptação da frequência de disparo nas células (e.g. correntes de potássio ativadas por cálcio ou voltagem) e, assim, embora a célula se encontre recebendo *inputs* excitatórios que evocam potenciais pós-sinápticos excitatórios, esses não são capazes de atingir o limiar de disparo e as células eventualmente podem parar de disparar. Nesse cenário, a liberação de NA (*stroke*) pode reduzir as correntes de potássio e, conseqüentemente,

melhorando a resposta das células piramidais diminuindo a adaptação da sua frequência de disparo e também movendo o potencial de membrana da célula próximo ao seu limiar de disparo. Podemos incluir nesse cenário a ação despolarizante dos *inputs* GABAérgicos que poderiam acelerar os ritmos em que esses eventos ocorrem. A repetição desses eventos modifica a eficácia das sinapses excitatórias e, como tem sido reportado em estudos comportamentais e com manipulação farmacológica, o filhote aprende com bastante rapidez (em poucos ensaios) a associação entre o odor e a estimulação tátil.

Considerando que o aPC em P14-P17 ainda conta com células piramidais com características de P5-P8 e que na nossa simulação de odor de alta intensidade + NA a eficácia sináptica se incrementa com mais lentidão e em menor magnitude, é possível que maior número de repetições de pareamento odor-*stroke* seja necessário para induzir um aprendizado. Futuros trabalhos com maior tempo de simulação, considerando o tempo real da apresentação de cada estímulo (odor-*stroke*) utilizado nos paradigmas de condicionamento, poderão permitir gerar maiores esclarecimentos sobre esse ponto.

Terceiro. Consideramos também que a abordagem metodológica seja uma contribuição na área da neurobiologia do aprendizado do apego. Aqui exploramos uma pergunta em nível do circuito com integração de estudos eletrofisiológicos e de modelagem e simulação computacional. O desenho experimental para as simulações são condições etológicas em que o animal < P10 vive dentro do ninho com sua mãe, permitindo explorar a função de uma variável em um circuito que integra vários níveis de organização biológica. Consideramos que essa abordagem é ideal para explorar a relação de circuito com um ou dois níveis, por baixo ou por cima, da organização biológica e gerar perguntas e hipóteses mais apuradas para serem abordadas experimentalmente, o que é o principal valor da modelagem e simulação computacional.

Em suma, a transmissão sináptica GABAérgica no aPC, registrada eletrofisiologicamente em condição basal, nos períodos sensível e pós-sensível para o aprendizado de apego, fornece de dois *inputs* inibitórios diferenciais, fraco e forte respectivamente. Porém, quando integrados em um circuito neural artificial para processamento de odor, junto com ação da NA, a função do *input* GABAérgico sugere um papel despolarizante, sendo essa característica mais predominante no período sensível. Assim, as características maturacionais do *input* GABAérgico, junto com as propriedades intrínsecas das células piramidais, sugerem ser mecanismos neurobiológicos importantes no aPC no suporte do rápido aprendizado do apego dos roedores infantis para o odor da sua mãe.

Referências

- Abel RA, Ronca AE, Alberts JR. Perinatal stimulation facilitates suckling onset in newborn rats. *Dev Psychobiol.* 1998;32(2):91–9.
- Al Aïn S, Perry RE, Nuñez B, Kayser K, Hochman C, Brehman E, et al. Neurobehavioral assessment of maternal odor in developing rat pups: implications for social buffering. *Soc Neurosci.* 2017;12(1):32–49.
- Alberts JR, May B. Development of nasal respiration and sniffing in the rat. *Physiol Behav.* 1980;24(5):957–63.
- Alberts JR, Ronca AE. The experience of being born: a natural context for learning to suckle. *Int J Pediatr. Egypt;* 2012;2012:129328.
- Alberts JR. Learning as adaptation of the infant. *Acta Pædiatrica.* 1994;83:77–85.
- Alberts JR. The nature of nurturant niches in ontogeny. *Philos Psychol.* 2008;21(3):295–303.
- Alvarez-Dolado M, Calcagnotto ME, Karkar KM, Southwell DG, Jones-Davis DM, Estrada RC, et al. Cortical Inhibition Modified by Embryonic Neural Precursors Grafted into the Postnatal Brain. *J Neurosci.* 2006;26(28):7380–9.
- Apicella A, Yuan Q, Scanziani M, Isaacson JS. Pyramidal Cells in Piriform Cortex Receive Convergent Input from Distinct Olfactory Bulb Glomeruli. *J Neurosci.* 2010;30(42):14255–60.
- Aston-Jones G, Bloom FE. Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci.* 1981;1(8):887–900.
- Balu R, Pressler RT, Strowbridge BW. Multiple Modes of Synaptic Excitation of Olfactory Bulb Granule Cells. *J Neurosci.* 2007;27(21):5621–32.
- Bathellier B, Buhl DL, Accolla R, Carleton A. Dynamic Ensemble Odor Coding in the Mammalian Olfactory Bulb: Sensory Information at Different Timescales. *Neuron.* 2008;57(4):586–98.
- Bathellier B, Margrie TW, Larkum ME. Properties of Piriform Cortex Pyramidal Cell Dendrites: Implications for Olfactory Circuit Design. *J Neurosci.* 2009;29(40):12641–52.
- Bean BP. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(6):451–465.
- Bekkers JM, Suzuki N. Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. Vol. 36, *Trends in Neurosciences.* 2013. p. 429–38.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. Vol. 18, *Neuroscientist.* 2012. p. 467–86.
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. Vol. 3, *Nature Reviews Neuroscience.* 2002. p. 728–39.
- Bertolus JB, Mouly AM, Sullivan RM. Ecologically relevant neurobehavioral assessment of the development of threat learning. *Learn Mem.* 2016;23(10):556–66.
- Bhattacharya S, Mukherjee B, Blundell J, Harley CW, Yuan Q. Revisiting metaplasticity: The roles of calcineurin and histone deacetylation in unlearning odor preference memory in rat pups. *Neurobiology of Learning and Memory.* 2018;

- Bhattacharya S, Mukherjee B, Doré JJE, Yuan Q, Harley CW, McLean JH. Histone deacetylase inhibition induces odor preference memory extension and maintains enhanced AMPA receptor expression in the rat pup model. *Learn Mem.* 2017;24(10):543–51.
- Bolding KA, Franks KM. Complementary codes for odor identity and intensity in olfactory cortex. *Elife.* 2017;6.
- Bosman LWJ, Heinen K, Spijker S, Brussaard AB. Mice lacking the major adult GABAA receptor subtype have normal number of synapses, but retain juvenile IPSC kinetics until adulthood. *J Neurophysiol.* 2005;94(1):338–46.
- Bosman LWJ, Rosahl TW, Brussaard AB. Neonatal development of the rat visual cortex: synaptic function of GABAa receptor subunits. *J Physiol.* 2002;545(1):169–81.
- Bouret S, Sara SJ. Network reset: A simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. Vol. 28, *Trends in Neurosciences.* 2005. p. 574–82.
- Bowlby, J. *Apego.* São Paulo: Martins Fontes. 1984
- Buonviso N, Amat C, Litaudon P. Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. Vol. 31, *Chemical Senses.* 2006. p. 145–54.
- Camp LL, Rudy JW. Changes in the categorization of appetitive and aversive events during postnatal development of the rat. *Dev Psychobiol.* 1988;21(1):25–42.
- Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms. *Neuron.* 2000;26(1):13–25.
- Chen WR, Xiong W, Shepherd GM. Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at olfactory bulb reciprocal synapses. *Neuron.* 2000;25(3):625–33.
- Choy JMC, Suzuki N, Shima Y, Budisantoso T, Nelson SB, Bekkers JM. Optogenetic Mapping of Intracortical Circuits Originating from Semilunar Cells in the Piriform Cortex. *Cereb Cortex.* 2017;27(1):589–601.
- Colbert CM, Pan E. Ion channel properties underlying axonal action potential initiation in pyramidal neurons. *Nat Neurosci.* 2002;5(6):533–8.
- Coppola DM. Studies of olfactory system neural plasticity: The contribution of the unilateral naris occlusion technique. Vol. 2012, *Neural Plasticity.* 2012.
- Cornwell-Jones C, Sobrian SK. Development of odor-guided behavior in Wistar and Sprague-Dawley rat pups. *Physiol Behav.* 1977;19(5):685–8.
- Davison IG, Ehlers MD. Neural Circuit Mechanisms for Pattern Detection and Feature Combination in Olfactory Cortex. *Neuron.* 2011;70(1):82–94.
- Debiec J, Sullivan RM. The neurobiology of safety and threat learning in infancy. Vol. 143, *Neurobiology of Learning and Memory.* 2017. p. 49–58.
- Díaz D, Gómez C, Muñoz-Castañeda R, Baltanás F, Alonso JR, Weruaga E. The olfactory system as a puzzle: Playing with its pieces. *Anat Rec.* 2013;296(9):1383–400.
- Do JT, Sullivan RM, Leon M. Behavioral and neural correlates of postnatal olfactory conditioning: II. Respiration during conditioning. *Dev Psychobiol.* 1988;21(6):591–600.
- Domjan M. *The Principles of Learning and Behavior.* Wadsworth, Cengage Learning. 2010. (6th). 515 p.
- Duveau A, Godinot F. Influence of the odorization of the rearing environment on the development of odor-guided behavior in rat pups. *Physiol Behav.* 1988;42(3):265–70.

- Ehrlich DE, Ryan SJ, Hazra R, Guo J-D, Rainnie DG. Postnatal maturation of GABAergic transmission in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol* . 2013;110(4):926–41.
- Ehrlich DE, Ryan SJ, Rainnie DG. Postnatal development of electrophysiological properties of principal neurons in the rat basolateral amygdala. *J Physiol*. 2012;590(19):4819–38.
- Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA receptors. Vol. 6, *Nature Reviews Neuroscience*. 2005. p. 215–29.
- Fontaine CJ, Harley CW, Yuan Q. Lateralized Odor Preference Training in Rat Pups Reveals an Enhanced Network Response in Anterior Piriform Cortex to Olfactory Input That Parallels Extended Memory. *J Neurosci* [Internet]. 2013;33(38):15126–31.
- Franks KM, Isaacson JS. Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex: Implications for olfactory coding. *Neuron*. 2006;49(3):357–63.
- Franks KM, Isaacson JS. Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: A critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron*. 2005;47(1):101–14.
- Franks KM, Russo MJ, Sosulski DL, Mulligan AA, Siegelbaum SA, Axel R. Recurrent Circuitry Dynamically Shapes the Activation of Piriform Cortex. *Neuron*. 2011;72(1):49–56.
- Fowler SJ, Kellogg C. Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1975;89(7):738–46.
- Gainey MA, Wolfe R, Pourzia O, Feldman DE. Whisker deprivation drives two phases of inhibitory synapse weakening in layer 4 of rat somatosensory cortex. *PLoS One*. 2016;11(2).
- Ghosh A, Mukherjee B, Chen X, Yuan Q. β -Adrenoceptor activation enhances L-type calcium channel currents in anterior piriform cortex pyramidal cells of neonatal mice: Implication for odor learning. *Learn Mem*. 2017;24(3):132–5
- Ghosh A, Purchase NC, Chen X, Yuan Q. Norepinephrine Modulates Pyramidal Cell Synaptic Properties in the Anterior Piriform Cortex of Mice: Age-Dependent Effects of β -adrenoceptors. *Front Cell Neurosci* . 2015;9, 450.
- Gordon CJ. *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*. New York. Cambridge University Press, 1993
- Gregory EH, Pfaff DW. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiol Behav* 1971;6(5):573–6.
- Guan D, Horton LR, Armstrong WE, Foehring RC. Postnatal development of A-type and Kv1- and Kv2-mediated potassium channel currents in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2011;105(6):2976–88.
- Gunnar MR, Sullivan RM. The neurodevelopment of social buffering and fear learning: integration and crosstalk. *Social Neuroscience*. 2017;12(1):1–7.
- Haberly LB, Bower JM. Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? Vol. 12, *Trends in Neurosciences*. 1989. p. 258–64.
- Haddad R, Lanjuin A, Madisen L, Zeng H, Murthy VN, Uchida N. Olfactory cortical neurons read out a relative time code in the olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2013;16(7):949–57.
- Hagiwara A, Pal SK, Sato TF, Wienisch M, Murthy VN. Optophysiological analysis of associational circuits in the olfactory cortex. *Front Neural Circuits* . 2012;6.

- Hájos N, Ellender TJ, Zemankovics R, Mann EO, Exley R, Cragg SJ, et al. Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: Importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci.* 2009;29(2):319–27.
- Happe HK, Coulter CL, Gerety ME, Sanders JD, O'Rourke M, Bylund DB, et al. Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: An autoradiographic study. *Neuroscience.* 2004;123(1):167–78.
- Hofer MA. Developmental neuroscience. In: *Handbook of neuroscience for the behavioral sciences*, Vol 1 . 2009. p. 12–31.
- Hu R, Zhang J, Luo M, Hu J. Response Patterns of GABAergic Neurons in the Anterior Piriform Cortex of Awake Mice. *Cereb Cortex.* 2017;27(6):3110–24.
- Illig KR. Developmental changes in odor-evoked activity in rat piriform cortex. *Neuroscience.* 2007;145(1):370–6.
- Imai T, Sakano H. Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. Vol. 17, *Current Opinion in Neurobiology.* 2007. p. 507–15.
- Imai T. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. Vol. 35, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2014. p. 180–8.
- Isaacson JS, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity. Vol. 72, *Neuron.* 2011. p. 231–43.
- Isaacson JS. Odor representations in mammalian cortical circuits. Vol. 20, *Current Opinion in Neurobiology.* 2010. p. 328–31.
- Ishikawa A, Maruyama A, Hosoyoma D, Yoshimura Y, Tamura H, Sato H, et al. Comparison of electrophysiological properties of layer III pyramidal neurons between cortical areas V1 and TE of the macaque. *Neurosci Res.* 2007;58(11):S37.
- Jiao Y. Major Effects of Sensory Experiences on the Neocortical Inhibitory Circuits. *J Neurosci.* 2006;26(34):8691–701.
- Johanning FW, Beed PS, Trimbuch T, Bendels MHK, Winterer J, Schmitz D. Dendritic Compartment and Neuronal Output Mode Determine Pathway-Specific Long-Term Potentiation in the Piriform Cortex. *J Neurosci.* 2009;29(43):13649–61.
- Jung HY, Mickus T, Spruston N. Prolonged sodium channel inactivation contributes to dendritic action potential attenuation in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 1997;17(17):6639–46.
- Jung MW, Larson J, Lynch G. Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro. *Synapse.* 1990;6(3):279–83.
- Kanter ED, Haberly LB. Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABAA blockade. *J Neurosci.* 1993;13(6):2477–82.
- Kanter ED, Haberly LB. NMDA-dependent induction of long-term potentiation in afferent and association fiber systems of piriform cortex in vitro. *Brain Res.* 1990;525(1):175–9.
- Kasper EM, Larkman a U, Lübke J, Blakemore C. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. II. Development of electrophysiological properties. *J Comp Neurol.* 1994;339(4):475–94.
- Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF. Rapid and Precise Control of Sniffing During Olfactory Discrimination in Rats. *J Neurophysiol.* 2007;98(1):205–13.

- Kilb W, Kirischuk S, Luhmann HJ. Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front Neural Circuits* . 2013;7.
- Kimura F, Nakamura S. Locus coeruleus neurons in the neonatal rat: electrical activity and responses to sensory stimulation. *Brain Res* . 1985;355(2):301–5.
- Kimura F, Nakamura S. Postnatal development of alpha-adrenoceptor-mediated autoinhibition in the locus coeruleus. *Brain Res*. 1987;432(1):21–6.
- Kirmse K, Hübner CA, Isbrandt D, Witte OW, Holthoff K. GABAergic Transmission during Brain Development: Multiple Effects at Multiple Stages. *Neurosci* . 2017;107385841770138.
- Kobayashi M, Hamada T, Kogo M, Yanagawa Y, Obata K, Kang Y. Developmental profile of GABAA-mediated synaptic transmission in pyramidal cells of the somatosensory cortex. *Eur J Neurosci*. 2008;28(5):849–61.
- Kosaka K, Kosaka T. Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: Compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* . 2005;80(2):80–90.
- Kovács K, Basu K, Rouiller I, Sík A. Regional differences in the expression of K⁺-Cl⁻ 2 cotransporter in the developing rat cortex. *Brain Struct Funct*. 2014;219(2):527–38.
- Kreczko A, Goel A, Song L, Lee HK. Visual deprivation decreases somatic GAD65 puncta number on layer 2/3 pyramidal neurons in mouse visual cortex. *Neural Plast*. 2009;2009.
- Kucharski D, Hall WG. New routes to early memories. *Science*. 1987;238(4828):786–8.
- Kucharski D, Hall WG. Developmental Change in the Access to Olfactory Memories. *Behav Neurosci*. 1988;102(3):340–8.
- Kuhlman SJ, Lu J, Lazarus MS, Huang ZJ. Maturation of GABAergic inhibition promotes strengthening of temporally coherent inputs among convergent pathways. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(6):1–19.
- Languille S, Richer P, Hars B. Approach memory turns to avoidance memory with age. *Behav Brain Res*. 2009;202(2):278–84.
- Large AM, Kunz NA, Mielo SL, Oswald A-MM. Inhibition by Somatostatin Interneurons in Olfactory Cortex. *Front Neural Circuits* . 2016;10 (a).
- Large AM, Vogler NW, Mielo S, Oswald A-MM. Balanced feedforward inhibition and dominant recurrent inhibition in olfactory cortex. *Proc Natl Acad Sci* . 2016;113(8):2276–81. (b).
- Lethbridge R, Hou Q, Harley CW, Yuan Q. Olfactory bulb glomerular nmda receptors mediate olfactory nerve potentiation and odor preference learning in the neonate rat. *PLoS One*. 2012;7(4).
- Liu S, Puche AC, Shipley MT. The Interglomerular Circuit Potently Inhibits Olfactory Bulb Output Neurons by Both Direct and Indirect Pathways. *J Neurosci* . 2016;36(37):9604–17.
- López-Mascaraque L, De Carlos JA, Valverde F. Early onset of the rat olfactory bulb projections. *Neuroscience*. 1996;70(1):255–66.
- Lorenzon NM, Foehring RC. Characterization of pharmacologically identified voltage-gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. II. Postnatal development. *J Neurophysiol*. 1995;73(4):1443–51.
- Lorenzon NM, Foehring RC. The ontogeny of repetitive firing and its modulation by norepinephrine in rat neocortical neurons. *Dev Brain Res*. 1993;73(2):213–23.

- Lucion AB, Bortolini MC. Mother-pup interactions: Rodents and humans. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(FEB).
- Luna VM, Schoppa NE. GABAergic Circuits Control Input-Spike Coupling in the Piriform Cortex. *J Neurosci* . 2008;28(35):8851–9.
- Maravall M. Development of Intrinsic Properties and Excitability of Layer 2/3 Pyramidal Neurons During a Critical Period for Sensory Maps in Rat Barrel Cortex. *J Neurophysiol* . 2004;92(1):144–56.
- Martin-Lopez E, Ishiguro K, Greer CA. The Laminar Organization of Piriform Cortex Follows a Selective Developmental and Migratory Program Established by Cell Lineage. *Cereb Cortex* . 2017;1–16.
- Massengill JL, Smith MA, Son DI, ODowd DK. Differential expression of K4-AP currents and Kv3.1 potassium channel transcripts in cortical neurons that develop distinct firing phenotypes. *Struct Large-Scale Synchronized Firing Primate Retin* . 1997;17(9):3136–47.
- Mazo C, Grimaud J, Shima Y, Murthy VN, Geoffrey Lau C. Distinct projection patterns of different classes of layer 2 principal neurons in the olfactory cortex. *Sci Rep*. 2017;7(1).
- McCormick DA, Prince DA. Postnatal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J Physiol*. 1987;393(1):743–62.
- McLean JH, Shipley MT. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *J Comp Neurol*. 1991;304(3):467–77.
- Meisami E. A proposed relationship between increases in the number of olfactory receptor neurons, convergence ratio and sensitivity in the developing rat. *Dev Brain Res*. 1989;46(1):9–19.
- Meisami E. Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res*. 1976;107(2):437–44.
- Meyer PM, Alberts JR. Non-nutritive, thermotactile cues induce odor preference in infant mice (*Mus musculus*). *J Comp Psychol*. 2016;130(4):369–79.
- Miura K, Mainen ZF, Uchida N. Odor Representations in Olfactory Cortex: Distributed Rate Coding and Decorrelated Population Activity. *Neuron*. 2012;74(6):1087–98.
- Modarresi S, Mukherjee B, McLean JH, Harley CW, Yuan Q. CaMKII mediates stimulus specificity in early odor preference learning in rats. *J Neurophysiol*. 2016;116(2):404–10.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, et al. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 1996;87(4):675–86.
- Mori K, Sakano H. How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annu Rev Neurosci* . 2011;34(1):467–99.
- Moriceau S, Roth TL, Sullivan RM. Rodent model of infant attachment learning and stress. *Dev Psychobiol*. 2010;52(7):651–60.
- Moriceau S, Sullivan RM. Corticosterone Influences on Mammalian Neonatal Sensitive-Period Learning. *Behav Neurosci*. 2004;118(2):274–81 (b).
- Moriceau S, Sullivan RM. Neurobiology of infant attachment. Vol. 47, *Developmental Psychobiology*. 2005. p. 230–42.
- Moriceau S, Sullivan RM. Unique neural circuitry for neonatal olfactory learning. *J Neurosci*. United States; 2004 Feb;24(5):1182–9 (a).

- Moriizumi T, Sakashita H, Furukawa M, Kawano J, Okoyama S, Kitao Y, et al. Electron microscopic study of synaptogenesis and myelination of the olfactory centers in developing rats. *Exp Brain Res*. 1995;103(3):385–92.
- Morrison GL, Fontaine CJ, Harley CW, Yuan Q. A role for the anterior piriform cortex in early odor preference learning: evidence for multiple olfactory learning structures in the rat pup. *J Neurophysiol* . 2013;110(1):141–52.
- Moyer JR, Brown TH. Patch-Clamp Techniques Applied To Brain Slices. *Techniques*. 2002;35:135–193. eds Boulton A. A., Baker G. B., Walz W., editors (Totowa, NJ: Humana Press).
- Mukherjee B, Harley CW, Yuan Q. Learning-Induced Metaplasticity? Associative Training for Early Odor Preference Learning Down-Regulates Synapse-Specific NMDA Receptors via mGluR and Calcineurin Activation. *Cereb Cortex*. 2017;27(1):616–24.
- Mukherjee B, Yuan Q. NMDA receptors in mouse anterior piriform cortex initialize early odor preference learning and L-type calcium channels engage for long-term memory. *Sci Rep*. 2016;6.
- Murphy GJ, Darcy DP, Isaacson JS. Intraglomerular inhibition: Signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci*. 2005;8(3):354–64.
- Nakamura S, Sakaguchi T. Development and plasticity of the locus coeruleus: A review of recent physiological and pharmacological experimentation. Vol. 34, *Progress in Neurobiology*. 1990. p. 505–26.
- Neville KR, Haberly LB. Olfactory cortex. In: *The synaptic organization of the brain*. 2004. p. 415–54. Fifth Edition. Oxford University Press.
- Okada M, Onodera K, Van Renterghem C, Sieghart W, Takahashi T. Functional correlation of GABA(A) receptor alpha subunits expression with the properties of IPSCs in the developing thalamus. *J Neurosci*. 2000;20(6):2202–8.
- Oruro PE, Pardo, GE, Calcagnotto, ME, Idiart, M. Computational model of early odor preference learning. Pôster apresentado em: Brain Congress Brain, Behavior and Emotions, junho de 2017a, Porto Alegre.
- Oruro PE, Pardo, GE, Calcagnotto, ME, Idiart, M. Contato materno seleciona neurônios preferentes ao odor no córtex piriforme de filhotes de rato. Pôster apresentado em: XXIV Encontro Anual de Etologia, novembro de 2016b, São Paulo.
- Oruro PE, Pardo, GE, Calcagnotto, ME, Idiart, M. The Operant/respondent distinction: An analysis in artificial piriform cortex. Pôster apresentado em: 2nd FALAN congress, 2016a, Buenos Aires.
- Oswald A-MM, Reyes AD. Maturation of Intrinsic and Synaptic Properties of Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Mouse Auditory Cortex. *J Neurophysiol* . 2008;99(6):2998–3008.
- Pandipati S, Gire DH, Schoppa NE. Adrenergic Receptor-Mediated Disinhibition of Mitral Cells Triggers Long-Term Enhancement of Synchronized Oscillations in the Olfactory Bulb. *J Neurophysiol* . 2010;104(2):665–74.
- Pandipati S, Schoppa NE. Age-dependent adrenergic actions in the main olfactory bulb that could underlie an olfactory-sensitive period. *J Neurophysiol*. 2012;108(7):1999–2007.
- Pardo, GE, Espindula IA, Oruro PE. Computational Simulation of Maternal Odor on Neonatal Learning in the Nest. Pôster apresentado em: SfN's 47th annual meeting, Neuroscience, Novembro de 2017b, Washington, D.C

- Pardo, GE, Espindula IA, Oruro PE. Neurocomputational Simulation of Natural Olfactory Learning in the Neonatal Rat. Pôster apresentado em: 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences, Agosto de 2017a, Rio de Janeiro.
- Peden DR, Petitjean CM, Herd MB, Durakoglugil MS, Rosahl TW, Wafford K, et al. Developmental maturation of synaptic and extrasynaptic GABA receptors in mouse thalamic ventrobasal neurones. *J Physiol*. 2008;586(4):965–87.
- Pedersen PE, Williams CL, Blass EM. Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 1982;8(4):329–41.
- Perry RE, Al Ain S, Raineki C, Sullivan RM, Wilson DA. Development of Odor Hedonics: Experience-Dependent Ontogeny of Circuits Supporting Maternal and Predator Odor Responses in Rats. *J Neurosci*. United States; 2016 Jun;36(25):6634–50.
- Phifer CB, Terry LM. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav*. 1986;38(6):887–90.
- Philpot BD, Foster TC, Brunjes PC. Mitral/tufted cell activity is attenuated and becomes uncoupled from respiration following naris closure. *J Neurobiol*. 1997;33(4):374–86.
- Polan HJ, Hofer MA. Maternally directed orienting behaviors of newborn rats. *Dev Psychobiol*. 1999;34(4):269–79.
- Polan HJ, Hofer MA. Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Dev Psychobiol*. 1998;33(1):5–20.
- Polan HJ, Milano D, Eljuga L, Hofer MA. Development of rats' maternally directed orienting behaviors from birth to day 2. *Dev Psychobiol*. 2002;40(2):81–103.
- Poo C, Isaacson JS. A Major Role for Intracortical Circuits in the Strength and Tuning of Odor-Evoked Excitation in Olfactory Cortex. *Neuron*. 2011;72(1):41–8.
- Poo C, Isaacson JS. An early critical period for long-term plasticity and structural modification of sensory synapses in olfactory cortex. *J Neurosci*. United States; 2007 Jul;27(28):7553–8.
- Poo C, Isaacson JS. Odor Representations in Olfactory Cortex: “Sparse” Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron*. 2009;62(6):850–61.
- Raineki C, Lucion AB, Weinberg J. Neonatal handling: An overview of the positive and negative effects. Vol. 56, *Developmental Psychobiology*. 2014. p. 1613–25.
- Raineki C, Shionoya K, Sander K, Sullivan RM. Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: Similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learn Mem*. 2009;16(2):114–21.
- Rangel S, Leon M. Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Dev Brain Res*. 1995;85(2):187–91.
- Rennaker RL, Chen C-FF, Ruyle AM, Sloan AM, Wilson DA. Spatial and Temporal Distribution of Odorant-Evoked Activity in the Piriform Cortex. *J Neurosci*. 2007;27(7):1534–42.
- Richard MB, Taylor SR, Greer CA. Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(35):15613–8.
- Ronca a E, Abel R a, Alberts JR. Perinatal stimulation and adaptation of the neonate. *Acta Paediatr Suppl*. 1996;416:8–15.

- Ronca AE, Ronan PJ, Abel RA, Renner KJ, Alberts JR. Effects of labor contractions on catecholamine release and breathing frequency in newborn rats. *Behav Neurosci.* 2006;120(6):1308–14.
- Rosselli-Austin L, Altman J. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol.* 1979;1(4):295–313.
- Roth TL, Rainecki C, Salstein L, Perry R, Sullivan-Wilson TA, Sloan A, et al. Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: A mouse model. *Genes, Brain Behav.* 2013;12(7):673–80.
- Roth TL, Sullivan RM. Memory of early maltreatment: Neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol Psychiatry.* 2005;57(8):823–31.
- Royet JP, Souchier C, Jourdan F, Ploye H. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: Numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol.* 1988;270(4):559–68.
- Santiago A, Aoki C, Sullivan RM. From attachment to independence: stress hormone control of ecologically relevant emergence of infants' responses to threat. Vol. 14, *Current Opinion in Behavioral Sciences.* 2017. p. 78–85.
- Sarma A a, Richard MB, Greer C a. Developmental Dynamics of Piriform Cortex. *Cereb Cortex.* 2011;21:1231–1245.
- Schoppa NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, Westbrook GL. Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J Neurosci.* 1998;18(17):6790–802.
- Schwob JE, Haberly LB, Price JL. The development of physiological responses of the piriform cortex in rats to stimulation of the lateral olfactory tract. *J Comp Neurol.* 1984;223(2):223–37.
- Schwob JE, Price JL. The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J Comp Neurol.* 1984;223(2):177–202.
- Shepherd GM, Chen WR, Greer CA. Olfactory Bulb. In: *The Synaptic Organization of the Brain.* 2004. Fifth Edition. Oxford University Press
- Shepherd GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer CA. The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing. Vol. 55, *Brain Research Reviews.* 2007. p. 373–82.
- Shepherd GM. Introduction to Synaptic Circuits. In *The Synaptic Organization of the Brain.* 2004; .p. 1–38.
- Shiple MT, Ennis M, Puche AC. Olfactory System. In: *The Rat Nervous System.* 2004. p. 923–64.
- Shiple MT, Halloran FJ, de la Torre J. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 1985;329(1–2):294–9.
- Sosulski DL, Lissitsyna Bloom M, Cutforth T, Axel R, Datta SR. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature.* 2011;472(7342):213–9.
- Stern M, Bolding KA, Abbott LF, Franks KM. A transformation from temporal to ensemble coding in a model of piriform cortex. *Elife.* 2018;7.
- Stettler DD, Axel R. Representations of Odor in the Piriform Cortex. *Neuron.* 2009;63(6):854–64.
- Stokes CCA, Isaacson JS. From Dendrite to Soma: Dynamic Routing of Inhibition by Complementary Interneuron Microcircuits in Olfactory Cortex. *Neuron.* 2010;67(3):452–65.

- Stokes CCA, Teeter CM, Isaacson JS. Single dendrite-targeting interneurons generate branch-specific inhibition. *Front Neural Circuits*. Switzerland; 2014;8:139.
- Sullivan RM, Hofer MA, Brake SC. Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Dev Psychobiol*. 1986;19(6):615–23.
- Sullivan RM, Holman PJ. Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: The role of corticosterone. Vol. 34, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2010. p. 835–44.
- Sullivan RM, Landers M, Yeaman B, Wilson DA. Neurophysiology: Good memories of bad events in infancy. *Nature*. 2000;407(6800):38–9.
- Sullivan RM, Leon M. Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. *Dev Brain Res*. 1986;27(1):278–82.
- Sullivan RM, Leon M. One-trial olfactory learning enhances olfactory bulb responses to an appetitive conditioned odor in 7-day-old rats. *Dev Brain Res*. 1987;35(2):307–11.
- Sullivan RM, McGaugh JL, Leon M. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Dev Brain Res*. 1991;60(2):219–28.
- Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA. 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. *Behav Neurosci*. 2000;114(5):957–62 (a).
- Sullivan RM, Wilson D a, Leon M. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci*. 1989;9(11):3998–4006 (b).
- Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res*. 1994;643(1–2):306–9.
- Sullivan RM, Wilson DA, Leon M. Associative processes in early olfactory preference acquisition: Neural and behavioral consequences. *Psychobiology*. 1989;17(1):29–33 (a).
- Sullivan RM, Wilson DA, Wong R, Correa A, Leon M. Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. *Dev Brain Res*. 1990;53(2):243–7.
- Sullivan RM, Wilson DA. Dissociation of behavioral and neural correlates of early associative learning. *Dev Psychobiol*. 1995;28(4):213–9.
- Sullivan RM, Wilson DA. Neural Correlates of Conditioned Odor Avoidance in Infant Rats. *Behav Neurosci*. 1991;105(2):307–12 (b).
- Sullivan RM, Wilson DA. The role of norepinephrine in the expression of learned olfactory neurobehavioral responses in infant rats. *Psychobiology*. 1991;19(4):308–12 (a).
- Sullivan RM, Zyzak DR, Skierkowski P, Wilson DA. The role of olfactory bulb norepinephrine in early olfactory learning. *Dev Brain Res*. 1992;70(2):279–82.
- Sullivan RM. Attachment Figure's Regulation of Infant Brain and Behavior. *Psychodyn Psychiatry*. 2017;45(4):475–98.
- Sullivan RM. Developmental changes in olfactory behavior and limbic circuitry. In: *Chemical Senses*. 2005.Jan;30 Suppl 1:i152-3.
- Sullivan RM. Unique Characteristics of Neonatal Classical Conditioning: The Role of the Amygdala and Locus Coeruleus. *Integr Physiol Behav Sci*. 2001;36(4):293–307.
- Suzuki N, Bekkers JM. Distinctive classes of GABAergic interneurons provide layer-specific phasic inhibition in the anterior piriform cortex. *Cereb Cortex*. 2010;20(12):2971–84 (b)

- Suzuki N, Bekkers JM. Inhibitory interneurons in the piriform cortex. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007. p. 1064–9.
- Suzuki N, Bekkers JM. Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers. *J Comp Neurol*. 2010;518(10):1670–87 (a)
- Suzuki N, Bekkers JM. Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *J Neurosci*. 2012;32(3):919–31.
- Suzuki N, Bekkers JM. Neural coding by two classes of principal cells in the mouse piriform cortex. *J Neurosci* . 2006;26(46):11938–47.
- Suzuki N, Bekkers JM. Two Layers of Synaptic Processing by Principal Neurons in Piriform Cortex. *J Neurosci* . 2011;31(6):2156–66.
- Szerzenie V, Hsiao S. Development of locomotion toward home nesting material in neonatal rats. *Dev Psychobiol*. 1977;10(4):315–21.
- Takeuchi H, Sakano H. Neural map formation in the mouse olfactory system. Vol. 71, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014. p. 3049–57.
- Teicher MH, Blass EM. First suckling response of the newborn albino rat: The roles of olfaction and amniotic fluid. *Science* (80-). 1977;198(4317):635–6.
- Terry LM, Johanson IB. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. *Dev Psychobiol*. 1996;29(4):353–77.
- Trombley PQ, Shepherd GM. Noradrenergic inhibition of synaptic transmission between mitral and granule cells in mammalian olfactory bulb cultures. *J Neurosci*. 1992;12(10):3985–91.
- Uchida N, Mainen ZF. Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci*. 2003;6(11):1224–9.
- Upton KJ, Sullivan RM. Defining age limits of the Sensitive Period for attachment learning in rat pups. *Dev Psychobiol*. 2010;52(5):453–64.
- Valiullina F, Akhmetshina D, Nasretdinov A, Mukhtarov M, Valeeva G, Khazipov R, et al. Developmental Changes in Electrophysiological Properties and a Transition from Electrical to Chemical Coupling between Excitatory Layer 4 Neurons in the Rat Barrel Cortex. *Front Neural Circuits*. 2016;10.
- Valverde F, Santacana M. Development and early postnatal maturation of the primary olfactory cortex. *Dev Brain Res*. 1994;80(1–2):96–114.
- Vankov A, Hervé-Minvielle A, Sara SJ. Response to Novelty and its Rapid Habituation in Locus Coeruleus Neurons of the Freely Exploring Rat. *Eur J Neurosci*. 1995;7(6):1180–7.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuñez JM, Vosshall LB, Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*. 1994;79(6):981–91.
- Verhagen J V., Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M. Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2007;10(5):631–9.
- Wachowiak M. All in a Sniff: Olfaction as a Model for Active Sensing. Vol. 71, *Neuron*. 2011. p. 962–73.
- Wang K, Cui J, Cai Y, Wang F, Li Y, Tao W, et al. Critical roles of voltage-dependent sodium channels in the process of synaptogenesis during the postnatal cortical development of rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(8):1131–42.

- Wesson DW, Donahou TN, Johnson MO, Wachowiak M. Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem Senses*. 2008;33(7):581–96.
- Westenbroek RE, Westrum LE, Hendrickson AE, Wu J -Y. Ultrastructural localization of immunoreactivity in the developing piriform cortex. *J Comp Neurol*. 1988;274(3):319–33
- Westrum LE. Electron microscopy of synaptic structures in olfactory cortex of early postnatal rats. *J Neurocytol*. 1975;4(6):713–32.
- Wilson D a, Sullivan RM, Leon M. Single-unit analysis of postnatal olfactory learning: modified olfactory bulb output response patterns to learned attractive odors. *J Neurosci*. 1987;7(10):3154–62.
- Wilson DA, Best AR, Brunjes PC. Trans-neuronal modification of anterior piriform cortical circuitry in the rat. *Brain Res*. 2000;853(2):317–22.
- Wilson DA, Stevenson RJ. Olfactory perceptual learning: The critical role of memory in odor discrimination. Vol. 27, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003. p. 307–28.
- Wilson DA, Sullivan RM. Cortical processing of odor objects. Vol. 72, *Neuron*. 2011. p. 506–19
- Wilson DA, Sullivan RM. Neurobiology of associative learning in the neonate: Early olfactory learning. Vol. 61, *Behavioral and Neural Biology*. 1994. p. 1–18.
- Winzer-Serhan UH, Leslie FM. Alpha2B adrenoceptor mRNA expression during rat brain development. *Brain Res*. 1997;100(1):90–100.
- Woo CC, Leon M. Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors. *Dev Brain Res*. 1987;36(2):309–13.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol*. 2004;557(3):829–41.
- Yuan Q, Harley CW, McLean JH. Mitral cell α 1 and 5-HT_{2A} receptor colocalization and camp coregulation: A new model of norepinephrine-induced learning in the olfactory bulb. *Learn Mem*. 2003;10(1):5–15.
- Yuan Q, Shakhawat AMD, Harley CW. Chapter 5 - Mechanisms Underlying Early Odor Preference Learning in Rats. In: *Odor Memory and Perception* . 2014. p. 115–56.
- Yuan Q. Theta bursts in the olfactory nerve paired with β -adrenoceptor activation induce calcium elevation in mitral cells: A mechanism for odor preference learning in the neonate rat. *Learn Mem*. 2009;16(11):676–81.
- Zapiec B, Mombaerts P. Multiplex assessment of the positions of odorant receptor-specific glomeruli in the mouse olfactory bulb by serial two-photon tomography. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(43):E5873–82.
- Zhan C, Luo M. Diverse Patterns of Odor Representation by Neurons in the Anterior Piriform Cortex of Awake Mice. *J Neurosci* . 2010;30(49):16662–72.
- Zhang Z. Maturation of Layer V Pyramidal Neurons in the Rat Prefrontal Cortex: Intrinsic Properties and Synaptic Function. *J Neurophysiol* . 2004;91(3):1171–82.
- Zou DJ, Chesler A, Firestein S. How the olfactory bulb got its glomeruli: A just so story? Vol. 10, *Nature Reviews Neuroscience*. 2009. p. 611–8.

Anexos

Tabela 5.1. Parâmetros de simulação do circuito olfatório para P5-P8 e P14-P17

Neurônios	P5-P8	P14-P17
Células Mitrals (Mt) (n=100)	$\tau=20$ ms; Wplast i from Mt:0.02; Vlimiar: 0.009; Vhyper:-0.01; Tgpa_inicial: 4000; Tgpa2_inicial: 4000 gmax Mt-Pyr: 15000 gmax Mt-Ff: 0.1 Tempo de Hyper:-10	
Células Piramidais (Pyr) (n=100)	$\tau=10$ ms gmax Pyr-Pyr: 3000 gmax Pyr-Fb: 8 Vlimiar: 0.015 Vhyper:-0.040 Wplast i from Pyr:0.02 Tgpa_inicial: 4000; Tgpa2_inicial: 4000 Tempo de Hyper:-10 Vleak: -0.03922 Vlimiar: -0.03663 Vamp: 0.0769 V_PA max Vamp+ (Vleak) V_inicial: -0.04 e_Pyr- Ff: -0.02167 e_Pyr-Fb: -0.02167 Cte tempo de membrana: 42.78 Membrane capacitance: 98.21 Rm membrane-Time constate / membrane capaditance Epahp: -0.060 Tau: 100 Apahp: 3000 From Pyr n of 50 other Pyr From Mt n of 10 Mt From Ff of 37 Ff From Fb n of 45 Fb	$\tau=10$ ms gmax Pyr-Pyr: 3000 gmax Pyr-Fb: 8 Vlimiar: 0.015 Vhyper:-0.055 Wplast i from Pyr:0.02 Tgpa_inicial: 4000; Tgpa2_inicial: 4000 Tempo de Hyper:-10 Vleak: -0.05435 Vlimiar: -0.04596 Vamp: 0.07690 V_PA max Vamp+ (Vleak) V_inicial: -0.055 e_Pyr- Ff: -0.040 e_Pyr-Fb: -0.040 Cte tempo de membrana: 30.33 Membrane capacitance: 178.1 Rm membrane-Time constate / membrane capaditance Epahp: -0.060 Tau: 100 Apahp: 400 From Pyr n of 50 other Pyr From Mt n of 10 Mt From Ff of 37 Ff From Fb n of 45 Fb
Interneurônios Feedback (Fb) (n=100)	$\tau=5$ ms gmax Fb-Pyr: 0.55 Vlimiar: 0.015 Vhyper:-0.01; Tgpa_inicial: 4000 From Pyr of 40 Pyr Tempo de Hyper:-10 gmax Fb-Pyr: 600 Rise time Fb-Pyr: 4.88 ms Decay time Fb-Pyr: 5.36 ms	
Interneurônios Feedforward (Ff) (n=100)	$\tau=15$ ms gmax Ff-Pyr: 0.055 Vlimiar: 0.015 Vhyper:-0.01; Tgpa_inicial: 4000 From Mt of 40 Pyr Tempo de Hyper:-10 gmax Ff-Pyr: 150 Rise time Ff-Pyr: 4.88 ms Decay time Ff-Pyr: 5.36 ms	



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijdevneu

Postnatal development of inhibitory synaptic transmission in the anterior piriform cortex

Grace Violeta Espinoza Pardo^{a,b}, Aldo Bolten Lucion^a, Maria Elisa Calcagnotto^{b,*}^a Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^b Neurophysiology and Neurochemistry of Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Olfactory cortex
GABAergic transmission
Development
Unilateral nasal occlusion
Odor preferences

ABSTRACT

The morphological and functional development of inhibitory circuit in the anterior piriform cortex (aPC) during the first three postnatal weeks may be crucial for the development of odor preference learning in infant rodents. As first step toward testing this hypothesis, we examined the normal development of GABAergic synaptic transmission in the aPC of rat pups during the postnatal days (P) 5–8 and 14–17. Whole cell patch-clamp recordings of layer 2/3 (L2/3) aPC pyramidal cells revealed a significant increase in spontaneous (sIPSC) and miniature (mIPSC) inhibitory postsynaptic current frequencies and a decrease in mIPSC rise and decay-time constant at P14–P17. Moreover, as the development of neocortical inhibitory circuit can be driven by sensory experience, we recorded sIPSC and mIPSC onto L2/3 aPC pyramidal cells from unilateral naris-occluded animals. Early partial olfactory deprivation caused by naris occlusion do not affected the course of age-dependent increase IPSC frequency onto L2/3 aPC pyramidal cell. However, this age-dependent increase of sIPSC and mIPSC frequencies were lower on aPC pyramidal cells ipsilateral to the occlusion side. In addition, the age-dependent increase in sIPSC frequency and amplitude were more pronounced on aPC pyramidal cells contralateral to the occlusion. While mIPSC kinetics were not affected by age or olfactory deprivation, at P5–P8, the sIPSC decay-time constant on aPC pyramidal cells of both hemispheres of naris-occluded animals were significantly higher when compared to sham. These results demonstrated that the GABAergic synaptic transmission on the aPC changed during postnatal development by increasing inhibitory inputs on L2/3 pyramidal cells, with increment in frequency of both sIPSC and mIPSC and faster kinetics of mIPSC. Our data suggested that the maturation of GABAergic synaptic transmission was little affected by early partial olfactory deprivation. These results could contribute to unravel the mechanisms underlying the development of odor processing and olfactory preference learning.

1. Introduction

Postnatal development is characterized by behavioral transitions in learning. During early stages of postnatal development, rodent pups (< P10) have increased ability to acquire odor preferences paired with tactile stimuli (that mimics the stimuli from the mother) (Moriceau and Sullivan, 2005; Roth et al., 2013; Ghosh et al., 2015), or paired with noxious stimuli (Moriceau and Sullivan, 2005; Raineki et al., 2009; Roth et al., 2013). As pups gain mobility and leave the nest (> P10), they easily learn to avoid the latter (Moriceau and Sullivan, 2005; Raineki et al., 2009; Roth et al., 2013), and the former fails to produce

preferences (Moriceau and Sullivan, 2005; Roth et al., 2013; Ghosh et al., 2015). These developmental transitions in odor preference learning suggest a parallel refinement in the developing centers of odor processing and odor perception.

The perception of odors requires the integration of sensory information in cortical centers of odor processing. The anterior piriform cortex (aPC) has been suggested to play a critical role in recognition, memory, and odor perception (Wilson and Sullivan, 2011). The encoding of odor in the aPC lies on the L2/3 pyramidal cells. These cells receive olfactory sensorial input directly from mitral and tufted cells by the LOT; excitatory associative inputs from other co-activated

Abbreviations: aPC, Anterior piriform cortex; GABA_AR, GABA_A receptor; K-S, Kolmogorov-Smirnov test; LOT, Lateral olfactory tract; mIPSC, Miniature inhibitory postsynaptic current; P, Postnatal day; sIPSC, Spontaneous inhibitory postsynaptic current; TTX, Tetrodotoxin; KyA, kynurenic acid; BMI, bicuculline methiodine

* Corresponding author at: Neurophysiology and Neurochemistry of Neuronal, Excitability and Synaptic Plasticity Laboratory (NNNESP Lab), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Rua Ramiro Barcelos 2600, Anexo 21111, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: elisa.calcagnotto@ufrgs.br (M.E. Calcagnotto).

<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.07.008>

Received 7 June 2018; Received in revised form 9 July 2018; Accepted 23 July 2018

Available online 25 July 2018

0736-5748/ © 2018 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

pyramidal cells (Luna and Morozov, 2012); and other cortical regions and inhibitory input via local feedforward and feedback GABAergic circuits (for revision see Neville and Haberly, 2004; Wilson and Sullivan, 2011; Poo and Isaacson, 2011; Bekkers and Suzuki, 2013). Immunohistochemistry and calcium imaging studies shown that an odorant activate sparsely and randomly distributed cells across the aPC (Illig and Haberly, 2003; Rennaker et al., 2007; Stettler and Axel, 2009), suggesting a sparse representation of odor. *in vitro* electrophysiological studies of synaptic transmission have also show that a given odor evokes a firing activity of spatially dispersed L2/3 cells in the aPC (Poo and Isaacson, 2009). This sparse cortical representation of odor is characterized by a specific activity of individual L2/3 aPC pyramidal cell and non-specific and broadly tuned activity of interneurons in response to a given odor (Poo and Isaacson, 2009). It has been suggested that the selective excitation and the broadly inhibition of L2/3 cells underlie the sparse representation of odor in the aPC (Poo and Isaacson, 2009; Isaacson, 2010). Moreover, the GABAergic inhibitory circuit regulates the integration of LOT inputs and the spike-timing in the piriform cortex (Franks and Isaacson, 2006; Luna and Schoppa, 2008; Poo and Isaacson, 2009; Isaacson, 2010).

The sparse pattern of representation of odor is observed at early postnatal stages (Illig, 2007). The progressive postnatal development of the inhibitory circuit may support, at least in part, the mechanisms of odor behavioral preferences transition in infant rodents. Studies using immunohistochemistry has shown that the number of GABAergic interneurons in all layers of aPC is higher between P0 and P4 and then rapidly reduces to half at P7, remaining stable after P14 (Sarma et al., 2011). Even though, the density of inhibitory synapse at L1a increases progressively from P14 to adulthood, with no synapses detected prior to P7 (Sarma et al., 2011). Parallel to the increment of inhibitory synapses density, the cortical inhibition in the aPC, evoked by electrical LOT stimulation, reaches an adult-like profile by P17 (Schwob et al., 1984). The transition period in the conditioned odor preferences (> P10) (Moriceau and Sullivan, 2005; Raineki et al., 2009; Roth et al., 2013; Ghosh et al., 2015) in infant rodents are coincident with the period of intense increase in synaptic inhibition in aPC (P14–P60) (Sarma et al., 2011; Schwob et al., 1984).

The progressive morphological and functional development of inhibitory circuit in the aPC during the first three postnatal weeks, suggest that inhibitory synapse may operate differently in neonate rats (< P10) and older pups (> P10). This support two different neural mechanisms for odor processing, which in its turn could contribute to the neural mechanisms underlying the developmental transition in the odor preference learning in infant rodents. In this study, as first step to test this hypothesis, we examined the developmental profile of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) at L2/3 pyramidal cells using *in vitro* electrophysiology. We focused on two periods of postnatal development (P5–P8 and P14–P17) in order to depict the transition in the odor preferences. We also measured the miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) to test whether the increase in inhibitory synaptic density (Sarma et al., 2011) could also reflects an increase in local number of sites of GABAergic synapses. Moreover, as development of inhibitory circuit in neocortex can be driven by sensory experience, and the sensory-deprived animals often show a weaker inhibition and persistence of immature synaptic phenotypes (Jiao et al., 2006; Kreczko et al., 2009; Gainey et al., 2016), we also studied the GABAergic synaptic transmission after early postnatal olfactory deprivation. Therefore, considering that the inhibitory cortical circuits in the aPC can be formed via combination of intrinsic neuronal and environmental changes during the maturation process, we evaluated the sIPSC and mIPSC in aPC of both hemispheres of unilateral naris-occluded rats. Thus, we isolated the changes driven by maturation evaluating the aPC cells at ipsilateral side and driven by the interaction of environment and maturation evaluating the aPC cells the contralateral side to the occluded naris.

2. Materials and methods

Animal care and all experimental protocols were performed in accordance with the Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (2011) and approved by the Ethics Committee in Use of Animals (CEUA) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (No 27961/2014).

2.1. Animals

Male and female Wistar rat's offspring were obtained from the Center for Reproduction and Animal Experimentation Laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. All animals were housed in Plexiglas transparent cages (44 × 20 × 21 cm) covered with shavings in a temperature (21 ± 1 °C) and humidity-controlled (60%) animal facility. The dams were maintained on a 12-h light/dark schedule (lights on at 08:00 h) with access to water and rodent chow (Nuvilab Cr2, Colombo, Brazil) *ad libitum*. Day of parturition was considered 1 day of age (P1). On P2, litters were culled to 8–10 pups, and on P3, irreversible unilateral naris closure was begun by cauterization the right external naris. Male and female pups at age P5–8 or P14–17 were used for experimentation. Animal care and protocols were approved by the Ethics Committee in Use of Animals (CEUA) of the UFRGS (No 27961/2014) in accordance with the Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (2011).

2.2. Naris occlusion

On P3, half of litter were removed from the nest and transported into a small cage with clean gauzes to the surgical room. The cage containing the pup remained under warm pad (30–33 °C) before and after the naris occlusion procedure. The pups were anesthetized with hypothermia, wrapping in gauze and immersing in crushed ice (2–3 °C) for 8–10 minutes (Phifer and Terry, 1986). The external nose surface was sterilized and after lidocaine was applied in the region. One group of pups had the right naris occluded by cauterization and other group, sham, received cauterization on the dorsal nose surface (Meisami, 1976). After warming up, the cauterized region was gently disinfected locally by applying ointment containing antibiotics, the pups were returned to their mothers, and the other half of the litters underwent the same procedure. The pup's recovery was verified diary, and the antibiotic was applied every two days until the injury was completely healed. The naris occlusion was verified on P5–8 and P14–17 before each electrophysiology experiment. Under a magnifying glass, a neutral liquid soap diluted in warm water was passed with a cotton swab over the cauterized naris. The observation of bubbled was considered no closed. Otherwise, the naris was considered completely closed.

2.3. *In vitro* electrophysiology

2.3.1. Slice preparation

Pups at P5–P8 and P14–17 control, sham or occluded were deeply anesthetized with xylazine and ketamine (100 mg/10 mg x Kg i.p) followed by decapitation. Brain were quickly removed and immersed in cold sucrose-based solution containing (in mM): 220 sucrose; 3 KCl; 1.25 NaH₂PO₄·H₂O; 2 MgSO₄·7H₂O; 26 NaHCO₃; 10 dextrose; 1 CaCl₂ bubbled with 95%O₂ -5% CO₂. Coronal slices (300 μm) containing the aPC were cut with a Leica VTS-1000 vibrating blade microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) and incubated at 37 °C for 45 min in an artificial CSF (aCSF) solution containing (in mM): 124 NaCl; 3 KCl; 1.25 NaH₂PO₄·H₂O; 2 MgSO₄·7H₂O; 26 NaHCO₃; 10 dextrose; 1 CaCl₂, bubbled with 95%O₂ -5% CO₂. After incubation, the slices remained in the same solution at room temperature for 1 h before recording.

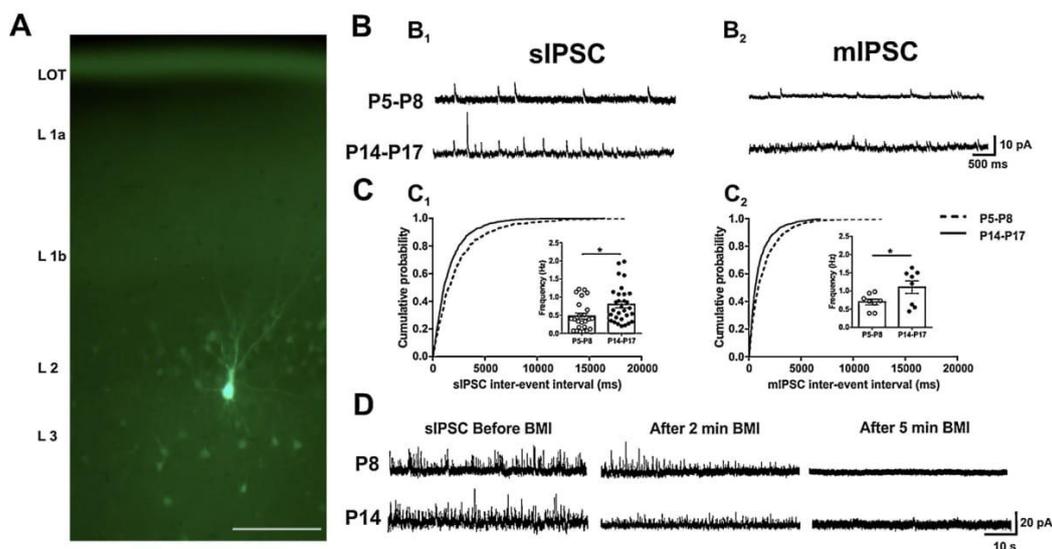


Fig. 1. Postnatal development of spontaneous and miniature IPSC onto pyramidal cells from anterior piriform cortex in acute brain slices.

(A) A layer 2/3 anterior piriform cortex pyramidal cell filled with Lucifer yellow through the recording pipette of animal at P7, visualized under an IR-DIC and epifluorescence microscope. Scale bar 100 μm . (B) Representative traces of sIPSC (B1) and mIPSC (B2) (at h.p. = 0 mV) from P5-P8 and P14-P17 animals, illustrating a developmental increase in IPSC frequencies. (C) Cumulative distribution of inter-event intervals and data plots (\pm SEM, inset graphs) depicting postnatal increase in IPSC frequencies with age. (C1) Plots for sIPSC (P5-P8, $n = 559$ events vs. P14-P17, $n = 877$ events, $p < 0.0001$; K-S test). (C2) Plots for mIPSC (P5-P8, $n = 1031$ vs. P14-P17, $n = 1151$ events, K-S test $p < 0.0001$). (C1, inset) Data plots (\pm SEM) of sIPSC frequency comparing P5-P8 and P14-P17 (P5-P8, $n = 30$ cells vs P14-P17, $n = 24$ cells); and (C2, inset) mIPSC frequency (P5-P8, $n = 8$ cells vs P14-P17, $n = 8$ cells) analyzed by non-paired Student t -test. $^*p < 0.05$. Each circle corresponds to each analyzed cell. (D) sIPSC recording from a L2/3 pyramidal cell in P8 and P14 animal showing the change in the inhibitory synaptic current one minute before, and 2 and 5 min after the of 10 μM bicuculline (BMI) bath application. Bin: 20 ms.

2.3.2. Whole-cell patch-clamp

Each slice was transferred to a submerge-type chamber continuously perfused with aCSF bubbled with 95%O₂ -5% CO₂ at a rate approximately of 2 mL/min. The slices were visualized first at 4X objective magnification, and the piriform cortex was localized below the LOT. The L2/3 of the aPC was visualized under infrared differential interference contrast (IR-DIC) video microscopy system with 40X water-immersion objective (Olympus BX51WI). The L2/3 pyramidal neurons were identified based in their soma location (L2b) and their large size, oval soma and apical dendrite perpendicular to LOT (Suzuki and Bekkers, 2006).

Spontaneous and miniature inhibitory postsynaptic current (sIPSC and mIPSC, respectively) were recorded onto L2/3 pyramidal neurons using whole-cell patch-clamp technique. Patch pipettes (final resistances 3–6 M Ω) were pulled from thick wall borosilicate glass (1.5/1.12 OD/ID, WPI, Sarasota, FL) on a horizontal Flaming/Brown micropipettes puller (P-1000, Sutter instruments, Novato, CA) and fire polished with Micro Forge (MF-830, Narishige, Japan). The patch pipette was filled with solution containing (in mM): 117.5 Cs-gluconate; 11 CsCl₂; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 11 EGTA; 2 Na₂ATP; 0.5 Na₂GTP; 1.25 QX-314 (lidocaine); adjusted to a pH of 7.25 with 10 M CsOH; 292 mOsm. The chloride equilibrium potential under these conditions (-43 mV) was calculated using the Nernst Equation. To isolate sIPSC and mIPSC, the membrane potential was held at 0 mV, near the equilibrium potential for excitatory postsynaptic currents. One minute after breaking the membrane patch and obtaining the whole cell condition, the sIPSC and mIPSC were recorded in gap free mode during 5 min, using a Multiclamp 700B Amplifier (Molecular Devices, CA, USA) in the presence of aCSF containing kynurenic acid (1 mM, KyA) to block ionotropic excitatory currents. In some experiments, Lucifer Yellow (Sigma-Aldrich) was added to the internal solution, and fluorescence images were acquired during and after recordings. All recordings were performed at room temperature (22–25 $^{\circ}\text{C}$). The mIPSC was recorded under bath application of tetrodotoxin (1 μM , TTX). At the end of some

experiments, bicuculline methiodine (10 μM , BMI) was added to the bathing medium, to verify the involvement of GABA_A receptors. Series resistance and whole cell capacitance were continually monitored throughout the course of the experiment. Recordings were rejected if values of whole-cell access resistance changed by $> 20\%$ (or exceeded 25 M Ω). Whole-cell voltage-clamp data were low-pass filtered at 1 kHz (-3 dB, eight-pole Bessel), digitally sampled at 10 kHz with Digidata 1440-A System (Molecular Devices, CA, USA), monitored with an oscilloscope and pClamp 10.6 software (Molecular Devices, CA, USA) and data were stored in a computer.

2.3.3. Drugs

All drugs used were added to the aCSF perfusion system with the final concentration. KyA (Sigma –Aldrich) BMI (Sigma –Aldrich) and TTX (Tocris Bioscience) were prepared from their respective stock solution at the day of the experiment (KyA 26 mM in dimethyl sulfoxide; BMI 5 mM in distilled water; TTX 1 mM in distilled water)

2.4. Data analysis

All data were collected from a total 245 pyramidal neurons from 52 rats on postnatal day P5, P6, P7 and P8 (20 females and 32 males) and from 53 rats on postnatal day P14, P15, P16 and P17 (31 females and 22 males). Each IPSC event was manually selected, and a mean of 100 individual events or 1 min of recording was analyzed for each cell (Cobos et al., 2005). The sIPSC and mIPSC frequency, inter-events interval, amplitude, decay-time constant and 10–90% rise-time were measured using Mini Analysis 6.0.3 (Synaptosoft, Inc, Fort Lee, NJ, USA). Statistical comparisons and data plotting were performed using SPSS and Graph Prisma 6 (GraphPad, LaJolla, CA). All data sets with $n > 30$ were tested for normality using one-sample D'agostino-Pearson (K2) test. Statistical comparison of sIPSC and mIPSC parameters between two age groups was made using an unpaired two-tailed Student's t test or using two-way ANOVA (age \times experimental condition),

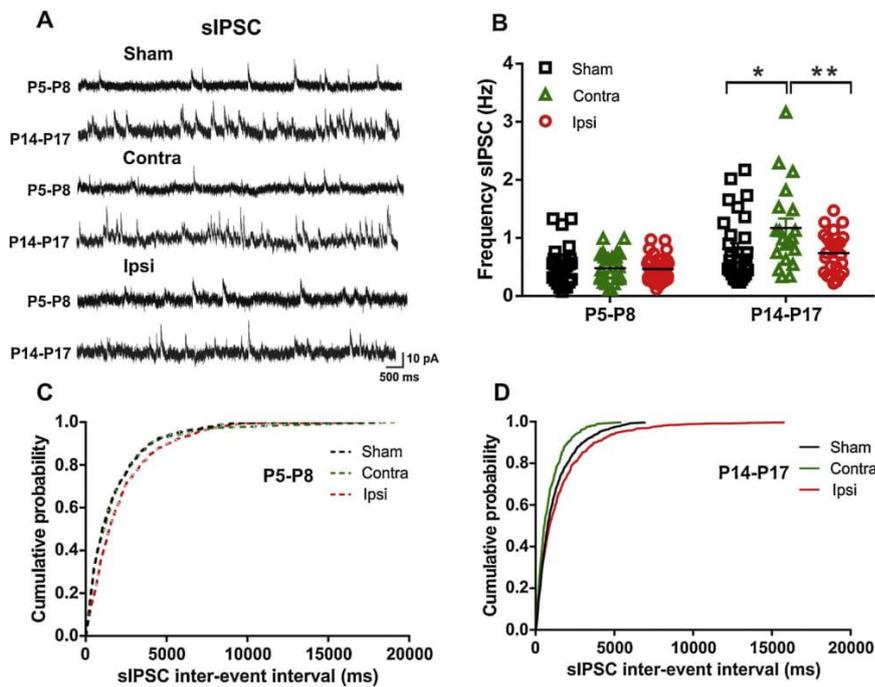


Fig. 2. Unilateral olfactory deprivation from P3 increases sIPSC frequency onto pyramidal cells from anterior piriform cortex contralateral side while increases the inter-event interval in the ipsilateral side during development.

(A) Representative sIPSC recordings (at h.p. = 0 mV) in P5-P8 and P14-P17 sham, contralateral and ipsilateral side illustrating a development increase of frequencies with age. (B) Data plot (\pm SEM) showing an increase in sIPSC frequency with development. Note that the sIPSC frequency increases even more with unilateral nasal occlusion at P14-P17 in contralateral side. Cumulative distributions of sIPSC inter-event interval at pyramidal cells in P5-P8 (C), and P14-P17 (D) for sham, contralateral, and ipsilateral side. Note the larger inter-event interval in the ipsilateral side at P5-P8 compared to sham ($n = 752$ – 1031 events from 10 to 11 cells per condition) and contralateral side ($n = 752$ – 784 events from 8 to 11 cells per condition; both $p < 0.0001$, K-S test). At P14-P17 the inter-event intervals are shorter for the contralateral side and larger for ipsilateral side, both compared to sham (Contralateral, $n = 832$ – 1365 events from 6 cells per condition; $p < 0.0001$, K-S test. Ipsilateral, $n = 997$ – 1365 events from 6 to 11 cells per condition; $p = 0.002$, K-S test). The inter-event intervals in the contralateral side

shifted toward shorter values compared to ipsilateral ($n = 832$ – 997 events from 6 to 11 cells per condition; $p < 0.0001$, K-S test). The mean of sIPSC frequency were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Each square, triangle and circle correspond to each analyzed cell. Bin: 20 ms.

followed Tukey's *post hoc* test. Omnibus test results (F values) are reported in the text. To compare the cumulative curves of the inter-event interval of sIPSC and mIPSC among the groups, the two-sample Kolmogorov-Smirnov (K-S) test was used. All data are presented as means \pm SEM and the number of neurons is expressed as "n". In all cases, a significance was defined at $\alpha = 0.05$ and a significant result for Student's t test and significant interaction for two-way ANOVA were denoted by asterisk in associated figures and tables.

3. Results

3.1. Changes in GABAergic synaptic transmission during normal postnatal development

We characterize the normal development of GABAergic synaptic transmission by measuring the properties of sIPSC and mIPSC onto L2/3 pyramidal cells of the aPC, obtained from infant rats in two periods of development (P5-P8 and P14-P17). Fig. 1 (A) show an example of L2/3 pyramidal cell recorded and examples of traces of sIPSC (B1) and mIPSC (B2).

3.1.1. Spontaneous inhibitory postsynaptic currents

We observed a significant increase in the mean frequency of sIPSC by 65% from P5-P8 (0.48 ± 0.08 Hz, $n = 24$ cells) to P14-P17 (0.79 ± 0.09 Hz, $n = 30$ cells) [$t(52) = 2.14$, $p = 0.01$, t Student-test] (Fig. 1 C1, inset graph). Consistently, there was a significant decrease in sIPSC inter-event interval at P14-P17 compared to P5-P8 plotted as a cumulative distribution ($p < 0.0001$, K-S test) (Fig. 1 C1).

On the other hand, no significant age-dependent changes were observed in other sIPSC parameters ($p > 0.05$; t Student test) (P5-P8 vs P14-P17: Amplitude, 11.61 ± 0.59 pA vs 12.81 ± 0.75 pA; 10–90% rise-time, 4.88 ± 0.26 ms vs 4.35 ± 0.24 ms; decay-time constant, 5.36 ± 0.43 ms vs 5.06 ± 0.44 ms). Bath application of bicuculline (BMI, $10 \mu\text{M}$) blocked sIPSC (Fig. 1 D), confirming the GABA_AR-

mediated IPSC.

3.1.2. Miniature inhibitory postsynaptic currents

To determine whether the increase in inhibitory synaptic density reported during the two postnatal weeks reflects the increase functional GABA synapses as a function of age, we recorded mIPSC by applying TTX on the slice perfusion. Similar to sIPSC, we found a significant increase of 59% in mIPSC frequency from P5-P8 (0.69 ± 0.08 Hz, $n = 8$ cells) to P14-P17 (1.10 ± 0.17 Hz, $n = 8$ cells) [$t(14) = 2.14$, $p = 0.04$, t Student-test] (Fig. 1 C2, inset graph). This result was also confirmed by the significant decrease in the mIPSC inter-event interval at P14-P17 plotted as a cumulative distribution ($p < 0.0001$, K-S test). (Fig. 1 C2). Similar that was observed to sIPSC, the mean mIPSC amplitude (P5-P8 vs P14-P17: 9.81 ± 0.30 pA vs 8.87 ± 0.27 pA) had no shown significant change with age ($p > 0.05$). However, differently from sIPSC, the kinetics properties of mIPSC speeded up with age. Mean of mIPSC 10–90% rise-time decrease significantly from P5-P8 (5.79 ± 0.32 ms) to P14-P17 (4.53 ± 0.39 ms) [$t(14) = 2.52$, $p = 0.02$, t Student-test]. In addition, the mean of mIPSC decay-time constant decreases significantly from P5-P8 (2.63 ± 0.25 ms) to P14-P17 (1.81 ± 0.12 ms) ($t(14) = 2.99$, $p = 0.01$, t Student-test).

Interestingly there was no significant difference between sIPSC and mIPSC frequencies on aPC pyramidal cell at the two ages (P5-P8: $t(30) = 1.48$; $p = 0.149$; t Student-test]; and P14-P17 [$t(36) = 1.56$; $p = 0.128$; t Student-test] (Table 2).

3.1.3. Effect of unilateral olfactory deprivation on maturation of GABAergic synaptic transmission

The inhibitory cortical circuits in the aPC are formed via combination of intrinsic neuronal and environmental changes. Therefore, we performed a unilateral naris occlusion to isolate the changes driven by maturation in the aPC ipsilateral to the occluded naris and to isolate the changes by the interaction of environment and maturation in the aPC contralateral to the occluded naris. In addition, we used a sham group

Table 1
Summary of Two-way ANOVA results on sIPSC and mIPSC parameters as a function of age and deprivation.

	Factors						Interaction		
	Age			Deprivation			Age × Deprivation		
sIPSC	F(1,152)	<i>p</i>	η^2	F(2,152)	<i>p</i>	η^2	F(2,152)	<i>p</i>	η^2
Frequency, Hz	36.27	< 0.001	0.19	3.45	0.034	0.04	3.81	0.02	0.05
Amplitude, pA	9.34	0.003	0.06	1.54	0.22	0.02	0.76	0.47	0.01
10-90% Rise-Time, ms	3.56	0.06	0.02	0.09	0.91	< 0.01	1.23	0.29	0.02
Decay-Time Constant, ms	17.79	< 0.001	0.11	0.96	0.39	0.01	5.00	0.008	0.06
mIPSC	F(1,56)	<i>p</i>	η^2	F(2,56)	<i>p</i>	η^2	F(2,56)	<i>p</i>	η^2
Frequency, Hz	12.57	0.001	0.19	0.64	0.53	0.04	0.53	0.59	0.05
Amplitude, pA	0.03	0.88	< 0.01	1.72	0.19	0.06	0.94	0.39	0.03
10-90% Rise-Time, ms	0.84	0.36	0.02	0.00	0.99	< 0.01	2.20	0.12	0.07
Decay-Time Constant, ms	0.29	0.59	0.11	0.34	0.71	0.01	0.51	0.60	0.06

Statistical table showing Two-way ANOVA results for analysis of sIPSC and mIPSC with age and deprivation as main factors. Bold text denotes $p < 0.05$. η^2 (eta partial). All parameters except 10–90% rise-time of sIPSC and only frequency of mIPSC were changed as a function of age. Deprivation had effect only on frequency of sIPSC. Deprivation had no effect on all parameters of mIPSC.

to control specific effects from surgical procedures and manipulation of the animals.

3.1.4. Spontaneous inhibitory postsynaptic currents

To understand how olfactory sensory experience affects postnatal development of GABAergic synaptic transmission in the L2/3 of aPC, we recorded sIPSC onto pyramidal cells in the region from unilaterally naris-occluded pups (from P3) in two periods of the postnatal development (P5–P8 and P14–P17). Fig. 2A shows representative traces of sIPSC from sham, contralateral and ipsilateral side to the occlusion at two postnatal periods. We found that the sIPSC frequency increased significantly with age, it was affected by olfactory deprivation and there was an interaction between age and deprivation (Table 1; Fig. 2; two-way ANOVA). That is, the sIPSC frequency on pyramidal cells from sham, contralateral and ipsilateral side increased with age, from P5–P8 to P14–P17 (52%, 143%, and 57%, respectively) (Table 2). At P5–P8, the mean of sIPSC frequency was similar in all three groups (Tukey's *post hoc* multiple comparison test) (Fig. 2 B; Table 2). However, at P5–P8 the cumulative distribution of inter-event intervals of sIPSC onto cell from ipsilateral side was little shifted to longer intervals compared to sham and contralateral side ($p < 0.0001$, K–S test) (Fig. 2 C). At P14–P17, sIPSC onto cell from contralateral side have significantly higher frequency than sham and ipsilateral side (Tukey's *post hoc* multiple comparison test) (Fig. 2 B; Table 2). The plots of cumulative probability distribution illustrate the shortening of sIPSC inter-event intervals in the contralateral side when compared to sham and ipsilateral side

($p < 0.0001$, K–S test) (Fig. 2 D).

The sIPSC amplitude increased significantly with age, but it was not affected by olfactory deprivation and there was no interaction between olfactory deprivation and age (Table 1; two-way ANOVA). The increase of sIPSC amplitude from P5–P8 to P14–P17 was more pronounced on the cell from the contralateral side (25.14%) when compared to sham and ipsilateral side (< 13.5% of increment in both) (Table 2). The sIPSC 10–90% rise-time did not change with age and had no effect of interaction (Table 1; Table 2; two-way ANOVA). However, decay-time constant of sIPSC on aPC pyramidal cells significantly reduced with age and there was an interaction between age and deprivation (Table 1; Fig. 3 B; two-way ANOVA). At P5–P8 sIPSC decay-time constant on cells of ipsilateral and contralateral side was significantly higher when compared to sham (Fig. 3 B; Table 2; Tukey's *post hoc* multiple comparison test), and reduces with age (40% and 48%, respectively), when compared to sham (< 1%) (Fig. 3 B; Table 2). The cumulative distribution of IPSC decay-time constant showing a shift to higher values on cell from contralateral and ipsilateral side relative to sham (Fig. 3 C1, Left; $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, K–S test). The superimposed of normalized individual representative sIPSC traces (Fig. 3 C1, Middle and Right) illustrate these differences. These changes were not evident at P14–P17 (Fig. 3 C2, Left). The individual representative traces sIPSC also illustrate this result (Fig. 3 C2, Middle and Right).

3.1.5. Miniature inhibitory postsynaptic currents

Next, we measured frequency, amplitude, and kinetics of activity-

Table 2
Properties of sIPSC and mIPSC from occluded animals.

Age	Condition Group	sIPSC and mIPSC parameters					
		No Cells	Frequency, Hz	Amplitude, pA	10-90% Rise-Time, ms	Decay-Time Constant, ms	
P5-P8	Sham	27	0.53 ± 0.07	13.73 ± 0.79	4.09 ± 0.24	4.16 ± 0.40 ^{a,b}	
		25	0.48 ± 0.05	14.20 ± 0.65	4.38 ± 0.38	5.40 ± 0.33 ^a	
		33	0.47 ± 0.04	13.85 ± 0.79	4.44 ± 0.26	5.34 ± 0.30 ^b	
	P14-P17	Sham	29	0.81 ± 0.10 ^a	15.09 ± 0.94	4.10 ± 0.28	4.20 ± 0.30
		Contralateral	20	1.17 ± 0.16 ^{a,b}	17.77 ± 1.23	3.90 ± 0.28	3.64 ± 0.24
		Ipsilateral	24	0.74 ± 0.07 ^b	15.72 ± 1.02	3.59 ± 0.23	3.80 ± 0.21
P5-P8	Sham	13	0.58 ± 0.10	8.89 ± 0.35	5.31 ± 0.43	2.81 ± 0.37	
		9	0.65 ± 0.14	8.42 ± 0.48	4.49 ± 0.31	2.90 ± 0.15	
		8	0.74 ± 0.11	9.22 ± 0.27	5.08 ± 0.49	2.99 ± 0.30	
	P14-P17	Sham	12	1.06 ± 0.17	9.37 ± 0.36	4.38 ± 0.44	2.72 ± 0.23
		Contralateral	11	1.35 ± 0.24	8.59 ± 0.27	5.10 ± 0.35	3.09 ± 0.57
		Ipsilateral	8	1.03 ± 0.22	8.71 ± 0.36	4.56 ± 0.50	2.41 ± 0.23

Values are given as mean (± SEM). sIPSC, spontaneous inhibitory postsynaptic current; mIPSC, miniature spontaneous inhibitory postsynaptic current. Superscript letters represent pairs of statistically significant *post hoc* comparisons (Tukey's test). Significance level at $p < 0.05$.

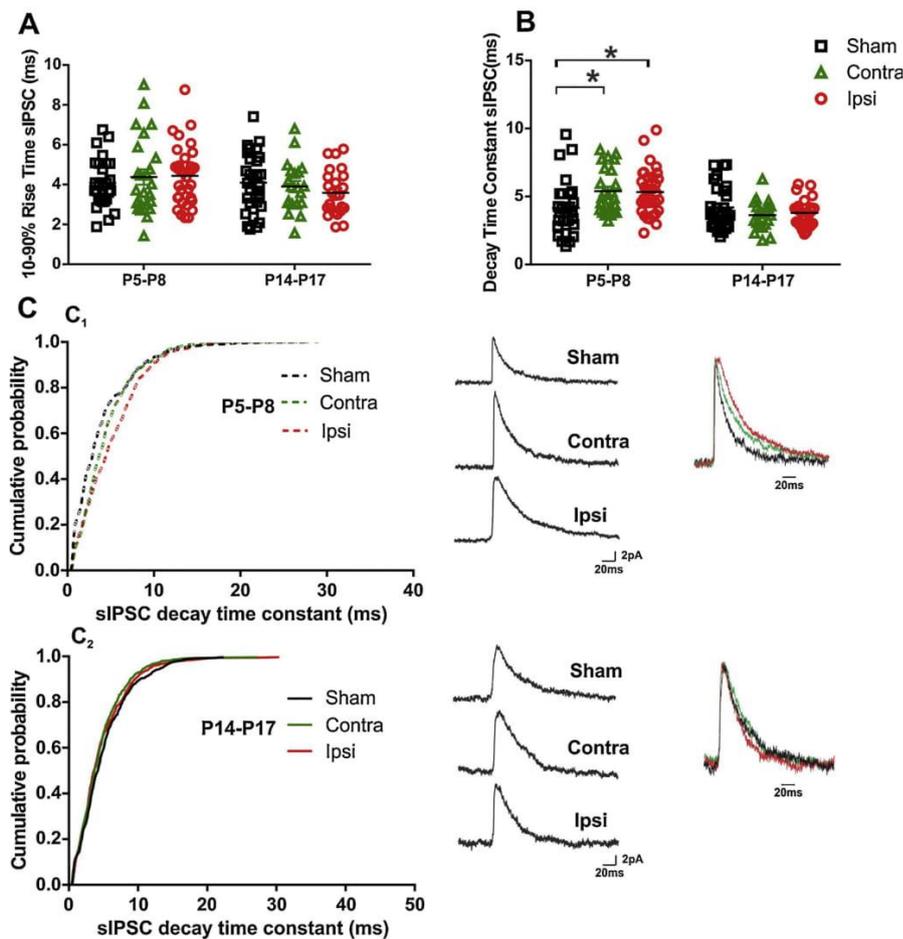


Fig. 3. Unilateral factory deprivation from P3 alters the sIPSC decay-time constant onto pyramidal cells from anterior piriform cortex ipsilateral side to the occlusion at P5-P8.

(A) Data plot (\pm SEM) of sIPSC 10–90% rise-time showing no changes with age and no effect of partial olfactory deprivation. (B) Data plot (\pm SEM) showing an age-dependent decrease of sIPSC decay-time constant. Note that the mean of sIPSC decay-time constant increased in the contralateral and ipsilateral side of the nasal occlusion at P5–P8 compared to sham (Tukey's *post hoc* test, both $p = 0.01$). (C) Cumulative distribution of sIPSC decay-time constant and representative recording at different age and groups. (C1) Left, cumulative distributions of sIPSC decay-time constant in P5–P8 showing the larger values in the ipsilateral side compared to contralateral side ($n = 646$ – 692 events from 7 to 8 cells per condition, $p < 0.0001$, *K-S* test) and sham ($n = 634$ – 692 events from 7 to 11 cells per condition, $p < 0.0001$, *K-S* test). The sIPSC decay-time constant in the contralateral side shifted to larger values when compared to sham ($D = 0.16$, $n = 634$ – 646 events from 8 to 11 cells per condition, $p < 0.0001$, *K-S* test). Middle, individual sIPSC recordings showing kinetic differences for the three groups. Right, superimposed traces normalized for sIPSC amplitude showing longer decay-time on pyramidal cells from both, contralateral and ipsilateral sides (C2) Left, cumulative distributions of sIPSC decay-time constant in P14–P17 is similar for all three groups (*K-S* test, $p < 0.05$). Middle, individual sIPSC recordings on pyramidal cells in the contralateral and ipsilateral sides. Right,

superimposed traces normalized for sIPSC amplitude showing kinetics for the three groups. The mean of sIPSC were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test; $^*p < 0.05$. Each square, triangle and circle correspond to each analyzed cell. Bin: 1 ms.

independent mIPSC (Fig. 4 A). The mIPSC frequency on L2/3 aPC pyramidal cells changed in an age-dependent manner, but it was not affected by deprivation and no interaction between age and deprivation was observed (Table 1; Fig. 4B; two-way ANOVA). The increase in the mIPSC frequency on cells at P5–P8 to P14–P17 from sham (82%) and contralateral (107%) side was higher than in the ipsilateral side (39%) (Table 2). The plots of cumulative probability distribution of mIPSC inter-event intervals confirm this finding (Fig. 4 C). We did not find significant main effect of age, olfactory deprivation or interaction of these variables on mIPSC amplitude, 10–90% rise-time or decay-time constant (Table 1; two-way ANOVA). Mean values are reported in Table 2.

4. Discussion

The purpose of this study was to examine the developmental profile of the GABAergic synaptic transmission on aPC L2/3 pyramidal cells, and to evaluate whether this developmental profile could be driven by home-cage olfactory experience. Here we provided the first evidence that the GABAergic synaptic transmission on L2/3 aPC pyramidal cells increases in an age-dependent manner, from P5–P8 to P14–P18, with increment in frequency of both sIPSC and mIPSC and faster kinetics of mIPSC. Early olfactory partial deprivation by unilateral naris occlusion had little effect on this developmental profile of GABAergic synaptic

transmission by reducing the increment of sIPSC and mIPSC frequencies with age and speeding up the sIPSC kinetics at P5–P8.

4.1. Developmental pattern of GABAergic synaptic transmission in the anterior piriform cortex

We recorded a physiological inhibitory response on the L2/3 aPC pyramidal cells in absence of evoked stimulus. We observed that the frequency of sIPSC increased by 65% from P5–P8 to P14–P17, without parallel significant changes in sIPSC amplitude or kinetics.

The increment of sIPSC frequency could be attributed to a developmental increase in the density of inhibitory synaptic contacts on the L2/3 cells or to an increase in the excitability of GABAergic interneurons by excitatory input. To distinguish one to another, we also recorded mIPSC in L2/3 pyramidal cells. If the maturation leads to an increased density of inhibitory synaptic contact on L2/3, then the frequency of mIPSC should change similarly to the sIPSC frequency. In favor to this hypothesis, we observed a 59% increase in the mIPSC frequency at P14–P17 over the age period P5–P8 without changes in amplitude. We did not observe the sIPSC frequency surpassing mIPSC frequency, suggesting that most currents are not action potential-mediated or independent of input. Therefore, it seems that the developmental changes in GABAergic system, was mainly due to the contribution of the increased local synapses on pyramidal cells reader than

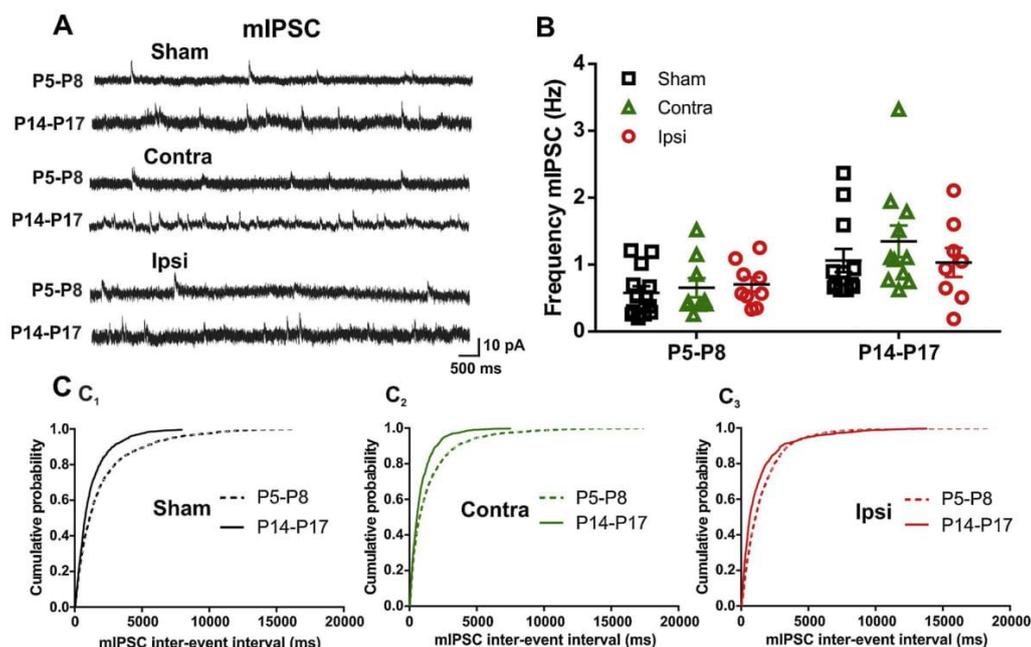


Fig. 4. mIPSC frequency on the anterior piriform cortex pyramidal cells increases with age with no effects of partial olfactory deprivation.

(A) Representative mIPSC recordings (at h.p. = 0 mV) at P5-P8 and P14-P17 in sham, contralateral and ipsilateral side illustrating an increase of frequencies with development. (B) Data plot (\pm SEM) showing the increment of mIPSC frequency with age. (C) Cumulative distribution of mIPSC inter-event interval depicting postnatal increment of mIPSC on aPC pyramidal cell for different groups. (C1) Sham (P5-P8 vs, $n = 1110$ events vs. P14-P17, $n = 1182$ events, $p < 0.0001$; K-S test); (C2) contralateral side (P5-P8 vs, $n = 1178$ events vs. P14-P17, $n = 1199$ events, $p < 0.0001$; K-S test); and (C3) ipsilateral side (P5-P8 vs, $n = 1398$ events vs. P14-P17, $n = 1227$ events, $p < 0.0001$; K-S test). The mIPSC were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests; significant difference when $p < 0.05$. Each square, triangle and circle correspond to each analyzed cell. Bin: 20 ms.

increased spontaneous spiking activity of interneurons. Our results are consistent with previous studies using immunohistochemistry of aPC in mice (Sarma et al., 2011) and rats (Westenbroek et al., 1988), reporting a developmental increase in density of inhibitory synaptic contacts on L2/3 pyramidal cells during the three postnatal weeks. Similarly, previous electrophysiological study reported the appearance of adult like profile of cortical inhibition in the aPC in response to electrical stimulation of LOT by P17 (Schwob et al., 1984). Our results suggest a progressive age-dependent gain of inhibitory input on L2/3 pyramidal cells under normal physiological conditions.

We also found changes in the mIPSC kinetics on L2/3 aPC pyramidal cells. The 10–90% rise-time and decay-time constant of mIPSC but not sIPSC decreased with age. The maturational stages of different subunits of GABA_A receptor modifies IPSC kinetics, as the rise-time and decay-time constant of IPSC reflect the activation and inactivation of GABA_A receptors by GABA (Farrant and Nusser, 2005). The developmental changes from slow to fast mIPSC kinetics, which we observed here, are presumably mediated by maturational changes in GABA_A receptor α subunits, as is well documented in other brain regions (Bosman et al., 2002, 2005; Peden et al., 2008; Ehrlich et al., 2012). It seems that, at early stages of development, the predominance of $\alpha 2$ subunit mediate the slow kinetics of IPSC (Bosman et al., 2002, 2005; Peden et al., 2008; Ehrlich et al., 2012). The downregulation of $\alpha 2$ (Peden et al., 2008), $\alpha 3$ (Bosman et al., 2002, 2005), and the up-regulation of $\alpha 1$ subunit mediates the gradually switching to faster kinetics (Bosman et al., 2002, 2005; Peden et al., 2008; Ehrlich et al., 2012).

We expected to find also a consistent developmental speed-up in the sIPSC kinetics, but it only changed in 6%. Probably the GABAergic synapses at L2/3 aPC pyramidal cells with distinct maturational profile of interneurons could explain this result. The aPC have at least five main classes of GABAergic interneurons distributed in the different layers, each of those with different firing pattern and distinct synaptic

compartments onto pyramidal cells (Suzuki and Bekkers, 2010, 2012). If each population of interneurons have contributed equally to the generation of mIPSC (independent of action potential) and sIPSC (combination of dependent and independent of action potential), these changes in the mIPSC kinetic but not in the sIPSC could suggest a counterbalancing effect of pre- or postsynaptic properties of the GABAergic synapses. The presynaptic properties might be the result from selective maturation of different interneuronal populations with distinct synaptic inputs onto pyramidal cells.

4.2. Olfactory deprivation has little effect on GABAergic transmission development

Since we have hypothesized that the olfactory stimulus is necessary for the maturation of the inhibitory circuit in the aPC, we expected to find significant alterations in the maturational properties of sIPSC and mIPSC on L2/3 pyramidal cell of the ipsilateral side at P14-P17. After early partial naris occlusion, the IPSC frequency (sIPSC and mIPSC) increased in an age-dependent manner from P5-P8 to P14-P17. However, the IPSC frequency increment was higher on cells from contralateral side and lower on cell from the ipsilateral side was, particularly for mIPSC. This suggest that the maturation of synaptic inhibition on the L2/3 pyramidal cells from P5-P8 to P14-P17 is slight affected by partial olfactory deprivation.

Several hypotheses may explain why the general developmental pattern of inhibition on aPC pyramidal cells was slightly affected by early olfactory deprivation (from P3). For example, the unilateral nasal deprivation represents a state of reduction and not a total blocked passage of odors in the occluded naris (Philpot et al., 1997). Therefore, a minimal olfactory input to aPC might be necessary to proper develop the inhibitory synapses. Alternatively, the aPC receives contralateral input via the anterior commissure, and perhaps this innervation might

be sufficient to establish the normal development of inhibitory synapses onto the L2/3 pyramidal cells. However, it is important to mention that the contralateral projection does not seem to reach the L1b of aPC until the second postnatal week (about P12), since the commissural projection are not fully developed at the time (Schwob and Price, 1984).

We found developmental changes in kinetics properties of sIPSC but not in mIPSC. The sIPSC decay-time constant reduced significantly on cells from contralateral and ipsilateral side with age, whereas this reduction in sham animals was only in < 1%. In addition, the sIPSC kinetics, at P5-P8 on cell from contra and ipsilateral side were slower than sham. Interestingly, these effects were no longer observed at P14-P17. These suggest that the partial nasal occlusion prolongs the sIPSC decay-time constant in the L2/3 pyramidal cells mainly during the period of P5-P8. Several factors can be responsible to the prolonged decay-time constant of sIPSC, including GABA diffusion, reuptake, and kinetic properties of the postsynaptic receptors (for revision see Farrant and Nusser, 2005). At the present, we have no evidence to confirm or rule out those alternatives. However, considering that the inhibitory input onto L2/3 are given by different interneuron subtypes (Suzuki and Bekkers, 2012), one possibility is that each interneuron subtype with its own intrinsic property could contribute with heterogeneous decay kinetics. In rats, during the first postnatal weeks, the dominant inhibitory input onto L2/3 pyramidal cells is given mainly by GABAergic interneurons within the L2/3 aPC (Westenbroek et al., 1988; Sarma et al., 2011). These interneurons are fast spiking multipolar cells (Suzuki and Bekkers, 2010, 2012) and are excited mainly by the semilunar cells (SL) (Suzuki and Bekkers, 2012; Choy et al., 2017), which are the first population of excitatory neurons receiving direct input from Lateral Olfactory Tract (LOT) (Suzuki and Bekkers, 2010). Longer period of unilateral nasal occlusion (from P1 to P30) reduces dendritic branches of SL (Wilson et al., 2000). The reduction of excitatory input onto SL cells and consequently the input onto fast spiking interneurons at L2/3 could reduce the inhibitory postsynaptic response with faster kinetics onto the L2/3 pyramidal cells. The sIPSC decay-time constant onto L2/3 pyramidal cells at P14-P17 was not altered, suggesting a compensatory mechanism after nasal occlusion with impact on the inhibitory input.

Overall, different from glutamatergic signaling in the aPC that depends of early olfactory activity to proper develop at the LOT-L1a synapses but not in the associative synapses (Franks and Isaacson, 2005), the olfactory partial deprivation at early postnatal stages does not lead to substantial impacts on the developmental changes of GABAergic synaptic transmission in the aPC. Our results indicate that the general course of developmental changes in the inhibition on the L2/3 pyramidal cells was little affected.

4.3. Unilateral olfactory deprivation increases frequency and amplitude of sIPSC in the contralateral side to the naris occlusion

Remarkably, our results indicate that the age-dependent increment of sIPSC and mIPSC frequency onto aPC L2/3 pyramidal cells from the contralateral was more pronounced (sIPSC 143%, mIPSC 107%) than cells from sham or ipsilateral side. In addition, sIPSC amplitude on pyramidal cells from contralateral side increased with age more than sham animals. These suggest that the partial olfactory deprivation leads to an age-dependent improvement of GABAergic input on the aPC L2/3 pyramidal cells in the contralateral side to the occlusion. Earlier studies have suggested that the contralateral side to the occlusion may represent a condition of overstimulation, since the open naris receives more airflow and thus more odor influx, when compared with non-deprived animals (for revision see Díaz et al., 2013). Moreover, after unilateral naris occlusion the peripheral and central olfactory areas from the ipsi and contralateral side undergo several structural, molecular, and functional changes (for revision see Coppola, 2012; Díaz et al., 2013). The period of P14-P17 is characterized by active inhibitory synaptogenesis at L1a and L2/3 (Westenbroek et al., 1988;

Sarma et al., 2011). Early unilateral olfactory deprivation might had improved the synaptic transmission at P14-P17 in an input-dependent manner. That could be attributed to the improvement of olfactory input to aPC contralateral to the occlusion by changing the membrane excitability of aPC developing GABAergic interneurons at this age.

4.4. Relevance for odor processing at early postnatal development

Here we showed that the GABAergic synaptic transmission at P5-P8 is different from P14-P17. These suggest that inhibitory synapses may operate differently at these two postnatal periods. GABAergic inhibition in aPC is involved in the integration of LOT inputs and spike-timing of L2/3 pyramidal cells (Franks and Isaacson, 2006; Luna and Schoppa, 2008; Poo and Isaacson, 2009). Possibly, these distinct inhibitory profiles could provide two distinct time-windows for odor input integration in the L2/3 pyramidal cells. We speculate that the increased inhibitory function in the aPC of older pups could provide a more abbreviated time-window for odor evoked inputs integration onto L2/3 pyramidal cells, by limiting the integration and spike generation of inputs arriving in temporally non-coincident clusters from the olfactory bulb. On the other hand, reduced inhibitory function in the aPC of younger pups could provide a wide temporal time-window for integration and spike generation of inputs arriving in temporally non-coincident or coincident groups onto L2/3 pyramidal cells. These two different inhibitory profiles in the aPC could highlight different consecutive neural mechanism for odor processing and early odor preferences learning.

Financial support

G. E. P is supported by a doctoral scholarship from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Process number: 141727/2014-4). A.B.L. and M.E.C are funded by CNPq (Process number: 465671/2014-4)

Acknowledgments

We would like to thank Clarissa Carmona de Azevedo Bellagamba for her technical assistance with unilateral nasal occlusion procedures. We also would like to thank Enver Miguel Oruro Puma for helpful discussions.

References

- Bekkers, J.M., Suzuki, N., 2013. Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends Neurosci.* 36, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.005>.
- Bosman, L.W.J., Rosahl, T.W., Brussaard, A.B., 2002. Neonatal development of the rat visual cortex: synaptic function of GABA α receptor α subunits. *J. Physiol. (Paris)* 545, 169–181. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.026534>.
- Bosman, L.W.J., Heinen, K., Spijker, S., Brussaard, A.B., 2005. Mice lacking the major adult GABA α receptor subtype have normal number of synapses, but retain juvenile IPSC kinetics until adulthood. *J. Neurophysiol.* 94, 338–346. <https://doi.org/10.1152/jn.00084.2005>.
- Choy, J.M.C., Suzuki, N., Shima, Y., Budisantoso, T., Nelson, S.B., Bekkers, J.M., 2017. Optogenetic mapping of intracortical circuits originating from semilunar cells in the piriform cortex. *Cereb. Cortex* 27 (1), 589–601. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv258>.
- Cobos, I., Calcagnotto, M.E., Vilaythong, A.J., Thwin, M.T., Noebels, J.L., Baraban, S.C., Rubenstein, J.L.R., 2005. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.* 8, 1059–1068. <https://doi.org/10.1038/nn1499>.
- Coppola, D.M., 2012. Studies of olfactory system neural plasticity: the contribution of the unilateral naris occlusion technique. *Neural Plast.* 2012, 351752. <https://doi.org/10.1155/2012/351752>.
- Díaz, D., Gómez, C., Muñoz-Castañeda, R., Baltanás, F., Alonso, J.R., Weruaga, E., 2013. The olfactory system as a puzzle: playing with its pieces. *Anat. Rec.* 296, 1383–1400. <https://doi.org/10.1002/ar.22748>.
- Ehrlich, D.E., Ryan, S.J., Rainnie, D.G., 2012. Postnatal development of electrophysiological properties of principal neurons in the rat basolateral amygdala. *J. Physiol.* 590, 4819–4838. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.237453>.
- Farrant, M., Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA α receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229. <https://doi.org/10.1038/nrn1625>.

- Franks, K.M., 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, 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.024>.
- Franks, K.M., Isaacson, J.S., 2006. Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex: implications for olfactory coding. *Neuron* 49, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.026>.
- Gainey, M.A., Wolfe, R., Pourzia, O., Feldman, D.E., 2016. Whisker deprivation drives two phases of inhibitory synapse weakening in layer 4 of rat somatosensory cortex. *PLoS One* 11, e0148227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148227>.
- 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>.
- Illig, K.R., 2007. Developmental changes in odor-evoked activity in rat piriform cortex. *Neuroscience* 145, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.049>.
- Illig, K.R., Haberly, L.B., 2003. Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *J. Comp. Neurol.* 457 (4), 361–373. <https://doi.org/10.1002/cne.10557>.
- Isaacson, J.S., 2010. Odor representations in mammalian cortical circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 328–331. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.02.004>.
- Jiao, Y., Zhang, C., Yanagawa, Y., Sun, Q.Q., 2006. Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits. *J. Neurosci.* 26 (34), 8691–8701. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2478-06.2006>.
- Kreczko, A., Goel, A., Song, L., Lee, H.K., 2009. Visual deprivation decreases somatic GAD65 puncta number on layer 2/3 pyramidal neurons in mouse visual cortex. *Neural Plast.* 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/415135>.
- Luna, V.M., Morozov, A., 2012. Input-specific excitation of olfactory cortex microcircuits. *Front. Neural Circuits* 6. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00069>.
- Luna, V.M., Schoppa, N.E., 2008. GABAergic circuits control input-spike coupling in the piriform cortex. *J. Neurosci.* 28 (35), 8851–8859. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2385-08.2008>.
- Meisami, E., 1976. Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res.* 107, 437–444. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90243-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90243-2).
- Moriceau, S., Sullivan, R.M., 2005. Neurobiology of infant attachment. *Dev. Psychobiol.* 47 (3), 230–242. <https://doi.org/10.1002/dev.20093>.
- Neville, K.R., Haberly, L.B., 2004. Olfactory cortex. *The Synaptic Organization of the Brain*. pp. 415–454. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0010>.
- Peden, D.R., Petitjean, C.M., Herd, M.B., Durakoglugil, M.S., Rosahl, T.W., Wafford, K., Homanics, G.E., Bellelli, D., Fritschy, J.M., Lambert, J.J., 2008. Developmental maturation of synaptic and extrasynaptic GABA receptors in mouse thalamic ventrobasal neurons. *J. Physiol.* 586, 965–987. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145375>.
- Phifer, C.B., Terry, L.M., 1986. Use of hypothermia for general anesthesia in preweaning rodents. *Physiol. Behav.* 38, 887–890. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90058-2).
- Philpot, B.D., Foster, T.C., Brunjes, P.C., 1997. Mitral/tufted cell activity is attenuated and becomes uncoupled from respiration following naris closure. *J. Neurobiol.* 33, 374–386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199710\)33:4<374::AID-NEU3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199710)33:4<374::AID-NEU3>3.0.CO;2-7).
- Poo, C., Isaacson, J.S., 2009. Odor representations in olfactory cortex: “Sparse” coding, global inhibition, and oscillations. *Neuron* 62, 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.022>.
- Poo, C., Isaacson, J.S., 2011. A major role for intracortical circuits in the strength and tuning of odor-evoked excitation in olfactory cortex. *Neuron* 72, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.015>.
- 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 (2), 114–121. <https://doi.org/10.1101/lm.977909>.
- Rennaker, R.L., Chen, C.-F.F., Ruyle, A.M., Sloan, A.M., Wilson, D.A., 2007. Spatial and temporal distribution of odorant-evoked activity in the piriform cortex. *J. Neurosci.* 27 (7), 1534–1542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4072-06.2007>.
- 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.* 12, 673–680. <https://doi.org/10.1111/gbb.12067>.
- Sarma, A.a., Richard, M.B., Greer, C.a., 2011. Developmental dynamics of piriform cortex. *Cereb. Cortex* 21, 1231–1245. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq199>.
- Schwob, J.E., Price, J.L., 1984. The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J. Comp. Neurol.* 223, 177–202. <https://doi.org/10.1002/cne.902230204>.
- Schwob, J.E., Haberly, L.B., Price, J.L., 1984. The development of physiological responses of the piriform cortex in rats to stimulation of the lateral olfactory tract. *J. Comp. Neurol.* 223, 223–237. <https://doi.org/10.1002/cne.902230206>.
- Stettler, D.D., Axel, R., 2009. Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron* 63 (6), 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.005>.
- Suzuki, N., Bekkers, J.M., 2006. Neural coding by two classes of principal cells in the mouse piriform cortex. *J. Neurosci.* 26 (46), 11938–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3473-06.2006>.
- Suzuki, N., Bekkers, J.M., 2010. Distinctive classes of GABAergic interneurons provide layer-specific phasic inhibition in the anterior piriform cortex. *Cereb. Cortex* 20 (12), 2971–2984. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq046>.
- Suzuki, N., Bekkers, J.M., 2012. Microcircuits mediating feedforward and feedback synaptic inhibition in the piriform cortex. *J. Neurosci.* 32 (3), 919–931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4112-11.2012>.
- Westenbroek, R.E., Westrum, L.E., Hendrickson, A.E., Wu, J.-Y., 1988. Ultrastructural localization of immunoreactivity in the developing piriform cortex. *J. Comp. Neurol.* 274 (3), 319–333. <https://doi.org/10.1002/cne.902740303>.
- Wilson, D.A., Sullivan, R.M., 2011. Cortical processing of odor objects. *Neuron* 72, 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.027>.
- Wilson, D.A., Best, A.R., Brunjes, P.C., 2000. Trans-neuronal modification of anterior piriform cortical circuitry in the rat. *Brain Res.* 853, 317–322. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02287-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02287-8).