UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - Departamento de Psicologia e Educação

Programa de Pós-Graduação em PSICOBIOLOGIA

Simulação Computacional do Sistema Olfativo de Vertebrados

Fábio Marques Simões de Souza

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
como parte das exigências para a obtenção do
título de MESTRE EM CIÊNCIAS.
Área: PSICOBIOLOGIA.**

Ribeirão Preto –SP

2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP – Departamento de Psicologia e Educação

Programa de Pós-Graduação em PSICOBIOLOGIA

Simulação computacional do sistema olfativo de vertebrados

**Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS.
Área: PSICOBIOLOGIA.**

**Aluno: Fábio Marques Simões de Souza
Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Roque da Silva Filho**

Ribeirão Preto –SP

2002

Faço uma homenagem as cobaias utilizadas nos trabalhos experimentais, sem as quais o meu trabalho não seria possível.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Lista de Abreviações	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	xi
Lista de Equações e de Reações Químicas	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>O Sistema Olfativo</i>	1
1.2 <i>Modelos Computacionais para o Sistema Olfativo</i>	6
1.3 <i>A Contribuição deste Trabalho</i>	8
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 <i>Equipamentos Computacionais e Programas</i>	9
2.2 <i>Neurosimulador GENESIS</i>	9
2.2.1 <i>Modelagem Compartmental</i>	10
2.2.2 <i>Correntes Iônicas dependentes de Cálcio e da Voltagem</i>	12
2.2.3 <i>Correntes Sinápticas</i>	12
2.2.4 <i>Reações Bioquímicas</i>	13
2.2.5 <i>Métodos Numéricos</i>	15
III - MODELAGEM DO SISTEMA OLFATIVO	16
3.1 <i>Modelagem das Células Receptoras</i>	16
3.1.1 <i>Detalhamento da Simulação da Via Bioquímica do Olfato</i>	17
3.1.2 <i>Detalhamento do Canal de Cloreto Ativado por Cálcio</i>	19
3.1.3 <i>Detalhamento dos Canais Iônicos Utilizados no Corpo Celular</i>	20
3.2 <i>Modelagem das Células Mitrals</i>	21
3.3 <i>Modelagem das Células Granulares</i>	23
3.4 <i>Modelagem do Epitélio Olfativo</i>	27
3.5 <i>Modelagem do Bulbo Olfativo</i>	30
3.6 <i>Modelagem das Conexões entre o Epitélio e o Bulbo</i>	30
IV - RESULTADOS.....	32
4.1 <i>Células Receptoras</i>	32
4.2 <i>Células Mitrals</i>	38
4.3 <i>Células Granulares</i>	40
4.4 <i>Epitélio e Bulbo</i>	43
V – DISCUSSÃO	53
5.1 <i>Células Receptoras</i>	53
5.2 <i>Células Mitrals</i>	55
5.3 <i>Células Granulares</i>	56
5.4 <i>Epitélio e Bulbo</i>	57
VI - CONCLUSÃO	60
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Souza, Fábio Marques Simões de

Simulação computacional do sistema olfativo de vertebrados.

Ribeirão Preto, 2002.

85 p.: il. ; 31cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão

Preto/USP – Departamento de Psicologia e Educação.

Orientador: Antonio Carlos Roque da Silva Filho

1. Neurociência Computacional. 2.Sistema Olfativo. 3. Redes Neurais

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, dando o apoio necessário para que este trabalho se concretizasse...

Especialmente:

à Gabriela,

aos meus pais Márcio e Neusa,

ao meu orientador Roque,

aos meus colegas do Laboratório de Redes Neurais e Neurociência Computacional.

Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho, concedido através da bolsa de mestrado e da reserva técnica.

Lista de Abreviações

AMPA: Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metilsoxazol-4-propionico.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

GABA: Ácido γ -amino-butírico.

AC3: Adenilato ciclase 3.

AMPC: Adenosina monofosfato cíclica.

PKA: Proteína quinase ativada por AMPC.

PDE: Fosfodiesterase.

CaM: Ca^{2+} /Camodulina.

CaMKII: Camodulina kinase II.

IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina.

EOG: Eletroolfatograma.

Lista de Figuras

- Figura 1.1. Sistema Olfativo de Vertebrados: As células receptoras do epitélio convergem seus axônios em filetes para os glomérulos do bulbo; esses, por sua vez, conectam-se com o córtex piriforme através do trato olfativo lateral. **A:** mucosa olfativa; **B:** glomérulo; **C:** células mitrais; **D:** células granulares; **E:** trato olfativo lateral; **F:** células piramidais da área piriforme. As setas indicam a direção do fluxo de corrente. Modificada de Ramón y Cajal (1904) 1
- Figura 1.2. **A:** Esquema do epitélio olfativo mostrando as células de suporte, as células basais e os neurônios receptores olfativos com seus prolongamentos ciliares imersos no muco olfativo. **B:** Detalhamento do cílio de uma célula receptora, mostrando as vias bioquímicas de transdução olfativa. Os odorantes ligam-se aos receptores de membrana ligados a proteína G, ativando a AC que converte ATP em AMPc, o que leva a abertura dos canais catiônicos abertos por AMPc. O fluxo de cálcio por esses canais leva à abertura dos canais de cloreto abertos pelo cálcio e à despolarização da membrana celular. Modificada de Kurahashi e Yau (1994) 2
- Figura 1.3. Circuito de inibição lateral entre dois glomérulos bulbares. As células mitrais possuem sinapses dendrodendríticas entre seus dendritos e os espinhos das células granulares e periglomerulares (PG) do mesmo glomérulo. As células periglomerulares também possuem sinapses axo-dendríticas entre seus axônios e os dendritos das células mitrais dos glomérulos adjacentes. As setas brancas indicam sinapses excitatórias e as pretas inibitórias. Modificada de Morri et al (1998) 5
- Figura 1.4. Esquema das sinapses dendrodendríticas. O glutamato liberado pelo dendrito da célula mitral abre os canais de cálcio do tipo NMDA do espinho da célula granular. O fluxo de cálcio por estes canais leva à liberação de GABA, que leva a uma hiperpolarização da célula mitral 5
- Figura 2.1: Circuito elétrico equivalente representando um compartimento neuronal genérico. V_m representa a diferença de potencial elétrico entre o interior da célula e o seu exterior, onde, por definição, o potencial é nulo. C_m representa a capacitância da membrana. A resistência R_m , representando a resistência da membrana, colocada em série com a bateria E_m , representam o efeito combinado dos canais passivos da membrana. Os canais iônicos ativos são modelados por uma condutância variável G_k em série com uma bateria E_k , a qual representa o potencial de equilíbrio para um dado íon. Uma fonte externa de injeção de

corrente é representada por I_{externa} . Os compartimentos adjacentes são representados pelos potenciais de membrana V_m' and V_m'' e pelas resistências axiais R_a' e R_a'' . Modificada de Bower e Beeman (1998)	10
Figura 2.2. Exemplo de representação compartimental de uma célula piramidal. A célula possui 3 compartimentos representando os dendritos apicais, 1 representando o soma, e 2 representando os dendritos basais. O axônio é representado por uma função que ativa uma sinapse quando ocorre um disparo no soma. Modificado de Bower e Beeman (1998)	11
Figura 2.3. Diagrama representando uma sinapse. Um potencial de ação propaga-se até o terminal pré sináptico, causando a liberação de neurotransmissores, resultando em uma mudança na condutância pós sináptica $G(t)$. Modificada de Bower e Beeman (1998)	13
Figura 3.1: A: Morfologia bipolar da célula receptora olfativa modelada. B: Imagem em contraste de fase de uma célula receptora olfativa real de salamandra. Modificada de Zufall et al. (2000). Cada célula possui um soma, um dendrito e uma protuberância dendrítica de onde partem vários cílios	16
Figura 3.2: Vias bioquímicas dos cílios das células receptoras. Os balões elípticos são enzimas, círculos são mensageiros e retângulos são os receptores, bombas e canais iônicos. As reações inibitórias estão em setas verdes e as reações excitatórias em setas pretas. AC3 : Adenilato Ciclase 3, PKA : Proteína Kinase ativada por AMPc, PDE : Fosfodiesterase, CaM : Ca^{2+} /Calmodulina, CaMKII : Proteína kinase II dependente de CaM, AMPc : Adenosina Monofosfato Cíclica, Ca^{2+} : Cálcio. G_{olf} : subunidade da proteína G	18
Figura 3.3. A: Modelo de célula mitral com 7 compartimentos. B: Morfologia de uma célula mitral real de rato marcada com biocitina. Modificada de Chen et. al. (1997). Cada célula mitral possui um soma, um tufo, dendritos secundários e um dendrito primário	21
Figura 3.4. A: Modelo de célula granular com 12 compartimentos. B: Morfologia de uma célula granular real de camundongo obtida através da técnica de impregnação de Golgi e desenhada em câmara lúcida. Modificada de Woolf et. al. (1991). Cada célula granular possui um soma, um tronco, dendritos profundos e periféricos com espinhos	23
Figura 3.5. As três pequenas áreas do epitélio real mapeadas por Ma e Shepherd (2000) foram arranjadas adequadamente para formar uma única área maior (200 μm x 200 μm). O epitélio simulado foi dividido ao meio para formar duas grandes áreas respondentes a odores (400 μm x 400 μm) idênticas a esse arranjo. A, B, C correspondem respectivamente às figuras 4B, 5B e 6 do artigo de Ma e Shepherd (2000). Cada círculo corresponde a uma célula receptora e as	

diferentes cores representam os diferentes tipos de odores para os quais essas células são capazes de responder. As setas em A são para destacar a presença de cluster de células respondentes a um mesmo odor, como foi observado por Ma e Shepherd (2000) 28

Figura 3.6. Representação esquemática das 8 moléculas odorantes, do epitélio olfativo e do bulbo olfativo com seus 8 glomérulos. As cores identificam os diferentes odorantes percebidos pelo modelo do sistema olfativo. A,B,C,D,E,F,G,H são respectivamente as moléculas odorantes n-amyl acetato, acetophenona, cineole, 3-heptanona, octanol, octanal, ácido octanóico e benzaldeído. I é um esquema do epitélio olfativo, representando as células que não respondem aos odores em preto e branco e em diferentes cores as células que respondem aos odores de mesma cor. J: Esquema do bulbo olfativo, com suas células granulares em preto e mitrais em cores. As células granulares fazem sinapses dendrodendríticas com os dendritos secundários das células mitrais vizinhas. As células receptoras olfativas que respondem a um mesmo odorante convergem seus axônios para o mesmo glomérulo no bulbo olfativo, representados por células mitrais da mesma cor 29

Figura 4.1. A: Padrão de disparos espontâneos da célula receptora simulada (A1) comparado com o de uma célula real de camundongo (A2) (Modificada de Ma et al, 1999). B: Padrão de disparos da célula receptora simulada (B1), comparado com o padrão de uma célula real de camundongo (B2), em resposta a uma corrente de 6pA injetada por 2,5s (Modificada de Ma et al, 1999). Todos gráficos estão na mesma escala 32

Figura 4.2. Curva de frequência de disparos em função da corrente injetada (F-I) da célula receptora simulada (círculos), da célula de camundongo real (triângulo) (Ma et al, 1999) e da célula de rato real (quadrado) (Ma et al, 1999) 34

Figura 4.3. As curvas mostram a variação da concentração de cálcio nos cílios da célula simulada em função de diferentes concentrações de odores aplicados: 0 μM (círculo), 1 μM (mais), 10 μM (triângulo), 30 μM (quadrado) e 300 μM (xis) de odor 35.

Figura 4.4. A: Resposta fluorescente da região da protuberância dendrítica e dos cílios de uma célula receptora de salamandra marcada com Fluo-3 AM (um marcador fluorescente de cálcio), durante uma estimulação com 8-Br-GMPc (ativador dos canais catiônicos ativados por AMPc), obtida através de um microscópio confocal de escaneamento a laser. Uma escala de cores foi utilizada para identificar as diferentes intensidades de fluorescência (0 a 60) na célula. B: Curvas que mostram a variação na fluorescência do cálcio em três cílios de uma

célula de salamandra marcada com Fluo-3 AM, durante uma estimulação com um inibidor de fosfodiesterase (IBMX) que simula a ação de um odor na célula. Modificada de Leinders-Zufall et. al. (1997)	36
Figura 4.5. Curvas de frequência de disparos de potenciais de ação em função da concentração de odor da célula receptora simulada (círculo), de uma célula receptora real de camundongo (cruz) (Reisert e Matthews, 2001), de uma célula receptora real de rato (quadrado) (Duchamp-Viret, et al, 1999), de outra célula receptora real de rato (triângulo) (Duchamp-Viret et al, 2000) e de uma célula receptora real de sapo (asterisco) (Duchamp-Viret et al, 2000)	37
Figura 4.6. Gráfico da simulação da variação temporal da voltagem no soma da célula receptora em resposta a um estímulo odorífero de 300 μ M	38
Figura 4.7. Resposta das células mitrais para uma injeção de corrente no soma com 0,5 nanoamperes de intensidade e duração de 200ms. A: Resposta do modelo simulado com 7 compartimentos. B: Resposta do modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos	39
Figura 4.8. Frequência de disparos de células mitrais simuladas em função de diferentes valores de corrente injetada. Com os pontos marcados com círculos está a curva referente ao modelo simulado com 7 compartimentos. Com os pontos marcados com triângulos está a curva referente ao modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos. Marcada com quadrados está a curva referente ao modelo com 4 compartimentos simulado por Davison e colaboradores (2000). As curvas marcadas com quadrados e triângulos foram geradas a partir de pontos retirados da figura 7 do trabalho de Davison e colaboradores (2000)	40
Figura 4.9. Resposta das células granulares para uma injeção de corrente no soma com 0,125 nanoamperes de intensidade e duração de 275ms. A: Resposta do modelo simulado com 12 compartimentos. B: Resposta do modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos	41
Figura 4.10. Frequência de disparos de células granulares simuladas em função de diferentes valores de corrente injetada. Com os pontos marcados com círculos está a curva referente ao modelo simulado com 12 compartimentos. Com os pontos marcados com triângulos estão as curvas referentes aos modelos simulados por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos e por Davison e colaboradores (2000) com 3 compartimentos (elas são	

idênticas). A curva marcada com triângulos foi gerada a partir de dados retirados da figura 1 do trabalho de Davison e colaboradores (2001)	42
Figura 4.11: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação sem a presença de odores. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor	43
Figura 4.12: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μ M do odor n-amyl acetato. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor	44
Figura 4.13: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μ M do odor acetophenona. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor	45
Figura 4.14: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μ M do odor cineole. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor	46
Figura 4.15: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μ M do odor 3-heptanona. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor	47

Figura 4.16: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor octanol. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitraais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor 48

Figure 4.17: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor octanal. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitraais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor 49

Figura 4.18. Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor ácido octanóico. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitraais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor 50

Figura 4.19: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor benzaldeído. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitraais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor 51

Figura 4.20: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM de estimulação com vários odores ao mesmo tempo (n-amyl acetato, acetophenona, cineole, 3-heptanona, octanol, octanal, ácido octanóico e benzaldeído). A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitraais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor 52

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Parâmetros das propriedades passivas das células receptoras	17
Tabela 3.2: Canais iônicos simulados e os respectivos canais presentes na célula real	20
Tabela 3.3: Propriedades passivas da célula mitral	22
Tabela 3.4: Tipos e densidades de canais iônicos na célula mitral em Siemens/m ² , retirados de Bhalla e Bower (1993). Na: canal de sódio; Kfast: corrente rápida de potássio, retificadora com atraso; LCa: corrente de cálcio tipo-L; K: corrente de potássio lenta e com atraso; KA: corrente retificadora anômala; KCa: canal de potássio dependente do cálcio	22
Tabela 3.5. G _{max} , condutância máxima do canal; E _{rev} , potencial de reversão do canal; τ_1 , constante temporal de abertura ; τ_2 , constante temporal de fechamento	23
Tabela 3.6. Propriedades passivas da célula granular	24
Tabela 3.7. Tipos e densidades de canais iônicos na célula granular em Siemens/m ² , retirados de Bhalla e Bower (1993). Na: canal de sódio do cérebro de rato; KM: canal de potássio muscarínico não inativante; K: corrente de potássio lenta e com atraso; KA: corrente retificadora anômala	24
Tabela 3.8. Parâmetros dos canais glutamatérgicos dos espinhos retirados do trabalho de De Schutter e Smolen (1998), que está atualmente disponível na forma de um tutorial para o GENESIS 2.2 (2002)	25
Tabela 3.9. Parâmetros da dinâmica de cálcio nos espinhos, retirados do trabalho de De Schutter e Smolen (1998): Head_dia e Head_len são, respectivamente, o diâmetro e o comprimento da concha em relação à cabeça do espinho; Neck_dia e Neck_len são, respectivamente, o diâmetro e o comprimento da concha em relação ao pescoço do espinho; Thick é a espessura de cada concha; [Ca ²⁺] é a concentração de cálcio basal; DCa é a constante de difusão de cálcio; [FB] é a concentração de tampão; kf e kb são as constantes de velocidade do tampão; kp é a constante da bomba de cálcio	27

Lista de Equações e de Reações Químicas

Equação 2.1: Correntes que fluem pela membrana de um compartimento neural	11
Equação 2.2: Equação que descreve o comportamento do equivalente elétrico de um compartimento da membrana	11
Equação 2.3: Equação que descreve o comportamento de um canal iônico dependente da voltagem e/ou do cálcio	12
Equação 2.4: Variável de estado dependente da voltagem	12
Equação 2.5: Variável de estado dependente do cálcio	12
Equação 2.6: Função alfa que descreve o comportamento da condutância pós-sináptica	13
Equação 2.7: Equação que descreve a variação temporal no fluxo de corrente iônica através de um canal sináptico	13
Equação 2.8: Equação diferencial que calcula a variação na concentração de um reagente em uma reação de equilíbrio químico	14
Equação 2.9: Equação diferencial que calcula a variação da concentração de uma enzima em uma reação química enzimática segundo o modelo de Michaelis e Menten (1913)	14
Equação 2.10: Equação diferencial que calcula a variação da concentração do substrato em uma reação química enzimática segundo o modelo de Michaelis e Menten (1913)	14
Equação 2.11: Equação diferencial que calcula a variação da concentração do produto em uma reação química enzimática segundo o modelo de Michaelis e Menten (1913)	14
Equação 3.1: Equação que descreve o comportamento das condutâncias dos canais de cloreto dependentes do cálcio	19
Equação 3.2: Equação que descreve o comportamento da variável de estado de ativação do canal de cloreto ativado por cálcio	19
Equação 3.3: Equação que descreve o comportamento das correntes iônicas que fluem pelos canais de cloreto dependentes do cálcio	20
Equação 3.4: Equação que descreve o comportamento das condutâncias dos canais sinápticos do tipo AMPA, segundo o modelo de Zador et. al (1990)	25
Equação 3.5: Equação que descreve o comportamento das condutâncias dos canais sinápticos do tipo NMDA, segundo o modelo de Zador et. al (1990)	25
Equação 3.6: Equação diferencial que calcula a variação na concentração de cálcio que entra na concha	26

Equação 3.7: Equação diferencial que calcula a concentração de cálcio que difundi para fora da concha	26
Equação 3.8: Equação diferencial que calcula a concentração de cálcio que é lançado para fora da célula pelas bombas de cálcio	26
Reação 2.1: Reação química de equilíbrio entre as massas	14
Reação 2.2: Reação química enzimática segundo o modelo de Michaelis e Menten (1913)	14
Reação 3.1: Reação química entre o tampão calmodulina e o íon cálcio	26

RESUMO

Este trabalho descreve uma simulação computacional biologicamente plausível do sistema olfativo de vertebrados. Ela reproduz aspectos da arquitetura e do funcionamento do epitélio receptor e o bulbo olfativo não presentes em outros modelos. Alguns desses aspectos são: (a) simulação das vias bioquímicas das células receptoras relacionadas com a recepção e a transdução da informação olfativa; (b) adição de espinhos e dinâmica de cálcio nas células granulares do bulbo; (c) representação anatomicamente realista da posição dos receptores no epitélio olfativo e dos glomérulos no bulbo; (d) simulação de glomérulos formados por várias células mitrais; e (e) inserção de junções comunicantes no epitélio e no bulbo olfativo. O modelo construído foi capaz de reproduzir satisfatoriamente características importantes observadas no sistema olfativo de vertebrados, incluindo a recepção de diferentes concentrações e tipos de odores no epitélio olfativo e a propagação dessa informação para o bulbo. Ele também tornou possível a observação de diferentes padrões de resposta odorífera, tanto no epitélio como no bulbo, associados a diferentes odores usados nas simulações.

ABSTRACT

This work describes a biologically plausible computational simulation of the olfactory system of vertebrates. It reproduces aspects of the architecture and of the operation of the epithelium and olfactory bulb not present in other models. Some of these aspects are: (a) simulation of the biochemical pathways in the receptor cells related with reception and transduction of olfactory information; (b) inclusion of dendritic spines and calcium dynamics in the granular cells of the bulb; (c) anatomically realistic representation of the positions of receptor cells in the epithelium and glomeruli in the bulb; (d) simulation of glomeruli formed by several mitral cells; and (e) introduction of gap junctions in the epithelium and olfactory bulb. The constructed model was capable of reproducing satisfactorily important characteristics observed in the vertebrate olfactory system, including the reception of different concentrations and odor types at the epithelium and the propagation of this information to the olfactory bulb. Also, it made possible the observation of the different response patterns, both in the epithelium as in the olfactory bulb, associated with the different odors used in the simulations.

I - INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Olfativo

O sentido olfativo sempre foi um importante canal pelo qual as informações referentes ao ambiente foram recebidas. Devido à sua antiga origem evolutiva, parece natural que os seus centros encefálicos constituam a base sobre a qual se construíram mecanismos correlativos e associativos mais elevados (Romero, 2000).

A principal via percorrida pela informação olfativa, provinda das moléculas odoríferas que entram pelas cavidades nasais junto com o ar aspirado inicia-se no epitélio olfativo, passa pelos bulbos olfativos e alcança o córtex olfativo (córtex piriforme) (Figura 1.1).

Figura 1.1. Sistema Olfativo de Vertebrados: As células receptoras do epitélio convergem seus axônios em filetes para os glomérulos do bulbo; esses, por sua vez, conectam-se com o córtex piriforme através do trato olfativo lateral. **A:** mucosa olfativa; **B:** glomérulo; **C:** células mitraes; **D:** células granulares; **E:** trato olfativo lateral; **F:** células piramidais da área piriforme. As setas indicam a direção do fluxo de corrente. Modificada de Ramón y Cajal (1904).

Apenas uma pequena porcentagem dessas moléculas acaba efetivamente entrando em contato com a mucosa do epitélio olfativa, por causa do turbilhonamento do ar aspirado, que faz as moléculas se dispersarem aleatoriamente.

O epitélio olfativo é uma estrutura composta por células de suporte, células basais, células microvilares e pelos neurônios receptores olfativos (Morrison e Costanzo, 1990) (Figura 1.2A). Os neurônios olfativos possuem morfologia bipolar e são os principais responsáveis pela recepção e transdução da informação odorífera. Existem aproximadamente 50 milhões de neurônios receptores bipolares no epitélio olfativo (Mori et al, 1998), sendo que cada uma dessas células é composta por um soma e um dendrito com uma protuberância terminal de onde partem de 5 a 40 prolongamentos ciliares (Schild e Restrepo 1998)

Figura 1.2. **A:** Esquema do epitélio olfativo mostrando as células de suporte, as células basais e os neurônios receptores olfativos com seus prolongamentos ciliares imersos no muco olfativo. **B:** Detalhamento do cílio de uma célula receptora, mostrando as vias bioquímicas de transdução olfativa. Os odorantes ligam-se aos receptores de membrana ligados a proteína G, ativando a AC que converte ATP em AMPc, o que leva a abertura dos canais catiônicos abertos por AMPc. O fluxo de cálcio por esses canais leva à abertura dos canais de cloreto abertos pelo cálcio e à despolarização da membrana celular. Modificada de Kurahashi e Yau (1994).

Cada cílio é repleto de receptores de membrana ligados à proteína G (Figura 1.2B), capazes de se ligar e reconhecer determinadas moléculas odoríferas (“odores”). Após a

ligação das moléculas odoríferas com o receptor, a subunidade G_{olf}^1 da proteína G ativa a enzima adenilato ciclase 3 (AC3), que passa a produzir o segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclica (AMPC). Em seguida, canais catiônicos ativados por AMPC e permeáveis ao cálcio e sódio passam a ser ativados. O fluxo de cálcio leva à abertura de canais de cloreto ativados por cálcio (Menini, 1999). Devido ao gradiente eletroquímico de cloreto entre o muco exterior ao cílio e o interior da célula (Nakamura et. al., 1997), este ânion apresenta um potencial de reversão acima do potencial de repouso da célula (Reuter et al, 1998). Como os canais de cloreto ativados por cálcio chegam a contribuir com mais de 85% da corrente receptora induzida por odores (Kurahashi e Yau, 1994), a abertura destes canais produz uma excitação celular (Menini, 1999). Os fluxos de sódio e de cálcio para o interior da célula também colaboram com uma pequena parcela da corrente receptora induzida por odores.

Ocorre também nos cílios um complexo mecanismo de adaptação (Zufall e Leinders-Zufall, 2000), onde o cálcio que se liga a calmodulina passa a inibir os canais de cálcio e de sódio. Esse sistema cálcio/calmodulina (Ca^{2+}/CaM) ativado, leva também a uma ativação da fosfodiesterase (PDE), que passa a inativar o AMPC, além de ativar a proteína kinase II ativada por Ca^{2+}/CaM (CaMKII), que por sua vez passa a inativar a AC3.

A ligação do AMPC com a proteína kinase ativada por AMPC (PKA) leva também a uma inibição dos receptores odoríferos por essas kinases.

É importante salientar que bombas de sódio e cálcio restauram as concentrações intracelulares de cálcio aos níveis basais, restabelecendo rapidamente a sensibilidade da membrana aos odorantes após a adaptação (Reisert e Matthews, 1998).

No soma das células bipolares existem diversos tipos de canais de potássio, de sódio e de cálcio (Schild e Restrepo, 1998), os quais produzem complexos padrões de potenciais de ação, incluindo disparos em rajada (*bursts*).

As breves despolarizações de membrana geradas nos cílios e protuberâncias dendríticas, resultantes da ligação das moléculas odoríferas aos receptores, propagam-se para o soma e passam a produzir potenciais de ação.

Trabalhos recentes têm demonstrado a existência de sinapses elétricas através de junções comunicantes entre os somas dessas células receptoras (Zhang et al, 2000). Essas junções comunicantes podem estar relacionadas com as oscilações na atividade neural observadas no epitélio (Dorries e Kauer, 2000).

¹ $G_{s(olf)}$ ou G_{olf} é uma subunidade do tipo G_s de proteína G heteromérica (Gold, 1999), expressada principalmente nos cílios das células receptoras olfativas.

Estima-se que o ser humano pode perceber mais de 400.000 componentes odoríferos, apesar de possuir apenas em torno de 1000 genes que codificam os diferentes receptores de membrana para odores (Morri et al, 1998). Além disso, cada célula receptora expressa poucos ou apenas um tipo de receptor de membrana. Apesar disso, evidências mostram que um mesmo receptor odorífero pode ser ativado por mais de um tipo de molécula odorífera e que um mesmo tipo de molécula odorífera pode se ligar a mais de um tipo de receptor. Assim, um mesmo receptor odorífero poderia ser utilizado várias vezes para codificar diferentes odores, possibilitando a discriminação de um vasto número de odorantes (Malnic et al, 1999).

Ademais, o fato de cada cheiro ser composto pela combinação de muitos de odores (o cheiro da rosa, por exemplo, é composto por uma combinação específica de dezenas de moléculas odoríferas (Morri et al, 1998)) permite variadas combinações de atividades entre os neurônios do epitélio olfativo para gerar um número enorme de cheiros, como palavras que podem codificar um número praticamente ilimitado de frases.

Os neurônios receptores convergem seus axônios para estruturas do bulbo olfativo denominadas glomérulos, que são estruturas compostas por dezenas de células mitrais e em tufo (Morri et al, 1998), onde fazem sinapses glutamatérgicas. O conjunto de todos os axônios provindos do epitélio compõe o nervo olfativo.

Os neurônios olfativos que expressam um mesmo tipo de receptor odorífero convergem seus axônios para os mesmos glomérulos no bulbo olfativo, formando no bulbo uma representação topográfica odorífera (Meister e Bonhoeffer, 2001; Belluscio e Katz, 2001), onde cada glomérulo responde mais a um determinado tipo de odor.

Como só existem em torno de 2400 glomérulos em cada bulbo olfativo (Meister e Bonhoeffer, 2001), ocorre uma grande convergência de conexões das células receptoras olfativas nos neurônios bulbares.

O bulbo olfativo é composto por vários tipos de interneurônios inibitórios. As células sem axônio de morfologia granular são os interneurônios granulares que possuem sinapses dendrodendríticas entre seus espinhos e os dendritos das células mitrais do bulbo, formando um circuito de inibição lateral. Este circuito de inibição lateral também é composto pelos interneurônios periglomerulares, que possuem sinapses dendrodendríticas entre seus espinhos e os dendritos das células mitrais do mesmo glomérulo e sinapses axo-dendríticas entre seus axônios e os dendritos das células mitrais dos glomérulos adjacentes (Figura 1.3).

Figura 1.3. Circuito de inibição lateral entre dois glomérulos bulbares. As células mitrais possuem sinapses dendrodendríticas entre seus dendritos e os espinhos das células granulares e periglomerulares (PG) do mesmo glomérulo. As células periglomerulares também possuem sinapses axo-dendríticas entre seus axônios e os dendritos das células mitrais dos glomérulos adjacentes. As setas brancas indicam sinapses excitatórias e as pretas inibitórias. Modificada de Morri et al (1998).

As sinapses dendrodendríticas são glutamatérgicas no sentido mitral-granular e gabaérgicas no sentido granular-mitral (Isaacson 2001) (Figura 1.4).

Figura 1.4. Esquema das sinapses dendrodendríticas. O glutamato liberado pelo dendrito da célula mitral abre os canais de cálcio do tipo NMDA do espinho da célula granular. O fluxo de cálcio por estes canais leva à liberação de GABA, que leva a uma hiperpolarização da célula mitral.

Como os sítios de liberação de GABA são adjacentes aos sítios receptores glutamatérgicos pós-sinápticos, há sugestões na literatura de que a liberação de GABA nos espinhos das células granulares possa ser guiada apenas por despolarizações locais, na ausência de potenciais de ação (Schoppa et al, 1998). A liberação de GABA é estimulada principalmente pelo cálcio que flui através dos canais de NMDA (Isaacson, 2001).

As sinapses dendrodendríticas têm sido relacionadas com a geração e sincronização das oscilações observadas no bulbo olfativo (Yokoi et al, 1995; Kashiwadani et al, 1999; Desmaisons et al, 1999). Além disso, a existência de junções comunicantes entre os espinhos das células granulares e os dendritos das células mitrais e entre os soma das células granulares (Reyher et al, 1991), pode ter um papel importante na geração dessas oscilações.

Do bulbo, a informação olfativa “pré-interpretada” segue pelos axônios provenientes das células mitrais, formando o trato olfativo lateral, até o córtex piriforme. Os axônios provenientes do trato olfativo lateral fazem sinapses com um grande número de neurônios piramidais presentes no córtex piriforme, gerando uma grande divergência (Freeman, 1991).

1.2 Modelos Computacionais para o Sistema Olfativo

A neurociência computacional teve seu surgimento a partir do grande acúmulo de dados experimentais nas últimas décadas e do desejo de implementar modelos matemático-computacionais que pudessem levar a um melhor entendimento desses dados (Bower e Beeman, 1998). Utilizando-se de equações biofísicas, como as do modelo de Hodgkin-Huxley (1952), e de modelos compartimentais, como os propostos por Rall (1995), a neurociência computacional tornou-se uma área de integração de informações, que vão desde o nível molecular até o nível de sistemas neurais (Koch e Segev, 1998). Mais do que simples ferramentas para testes de teorias, os modelos da neurociência computacional são geradores de novas hipóteses sobre o funcionamento do sistema nervoso (Bower e Beeman, 1998).

No sistema olfativo, a maior parte das simulações computacionais relatadas na literatura limita-se ao córtex piriforme (Hasselmo e Bower, 1990; Hasselmo e Bower, 1992; Hasselmo et.al, 1992; Barkai e Hasselmo, 1994; Barkai et.al., 1994; Wilson e Bower, 1992). Nessas simulações, o bulbo é representado apenas por uma fonte de padrões aleatórios de entrada.

Um dos primeiros trabalhos encontrados na literatura relatando uma tentativa de modelagem biologicamente plausível do bulbo e do epitélio olfativo de vertebrados foi o de

White e colaboradores (1992), que fizeram um modelo utilizando a linguagem C em um computador 80486, compatível com o IBM-PC. Este modelo simulava 4,5s de tempo real da atividade do epitélio e do bulbo olfativo, sendo composto por milhares de células e conexões bastante simplificados. As células mitrais tinham 3 compartimentos e as demais, granulares, periglomerulares e receptoras, continham apenas 1 único compartimento. Esse modelo conseguiu reproduzir de maneira bastante simplificada as atividades das células no bulbo, para duas intensidades de estímulos odoríferos e para diferentes interferências nos pesos das conexões laterais inibitórias.

Linster e Hasselmo (1997) também desenvolveram um modelo de bulbo olfativo, contendo células receptoras, mitrais, granulares e periglomerulares. Todas as células tinham 1 compartimento, exceto a mitral, que tinha 3. Esse modelo apresentava 15 glomérulos, cada um composto por uma única célula mitral e capaz de representar um odor. Esse trabalho foi capaz de explorar os mecanismos de modulação colinérgica e noradrenérgica dos circuitos de inibição lateral do bulbo.

As simulações do bulbo olfativo mais recentes, como as realizadas por Davison e colaboradores (1999, 2001), contêm dezenas de células mitrais de 4 compartimentos (Davison et al, 2000) e centenas de células granulares de 3 compartimentos. Esse modelo foi capaz de explorar os mecanismos de sincronização de disparos relacionados com os circuitos de inibição lateral.

Existem também na literatura complexos modelos de uma única célula, preocupados em explorar mais profundamente o papel da morfologia e da distribuição dos canais iônicos nas células mitrais, em tufo e granulares. No trabalho de Bhalla e Bower (1997), foram construídas células mitrais com até 286 compartimentos e 718 canais e células granulares com 530 compartimentos e 182 canais.

Davison e colaboradores (2000) desenvolveram simplificações das células mitrais desenvolvidas por Bhalla e Bower (1997). Para isso, eles diminuíram o número de compartimentos utilizados para 4, 3 ou 2, mas mantiveram as densidades de canais e as dimensões espaciais da célula, preservando as propriedades básicas das células.

Um modelo de uma única célula que consegue simular as células mitrais utilizando apenas 11 compartimentos, mas mantendo uma morfologia mais realista que contém inclusive compartimentos axônicos mielinizados, foi construído recentemente por Shen e colaboradores (1999). Esse modelo foi utilizado para estudar principalmente a geração dos potenciais de ação nessas células, tanto nos axônios como nos dendritos secundários.

1.3 A Contribuição deste Trabalho

Os modelos de bulbo olfativo encontrados na literatura não possuem epitélios de entrada realistas, simplificando-os tanto ao nível celular como das conexões sinápticas. As sinapses dendrodendríticas destes modelos de bulbo também não simulam os mecanismos de difusão de cálcio envolvidos na liberação de GABA. Mesmo o modelo de Linster e Hasselmo (1997), que se propôs a estudar os mecanismos de modulação colinérgica e noradrenérgica que atuam nas sinapses dendrodendríticas, não simulou as vias de cálcio envolvidas na liberação de GABA, apesar dessas modulações acontecerem principalmente nessas vias (Brennan e Keverne, 1997).

Ao verificar que não existiam modelos computacionais que simulavam de maneira realista os mecanismos bioquímicos envolvidos na transdução e interpretação olfativa, tanto ao nível epitelial como bulbar, resolvemos construir tais modelos nesta dissertação. Para isso, construímos modelos de células receptoras contendo as vias bioquímicas de recepção olfativa e modelos de células granulares contendo espinhos compartimentais e mecanismos de difusão de cálcio envolvidos na liberação de GABA nas sinapses dendrodendríticas.

Os modelos existentes só utilizam uma célula mitral para simular cada glomérulo, além de não levarem em consideração a existência de junções comunicantes tanto no epitélio como no bulbo olfativo. Neste trabalho, utilizamos várias células mitrais para simular cada glomérulo, além de simular as junções comunicantes existentes entre as células epiteliais, entre os somas das células granulares e entre os espinhos das células granulares e os dendritos secundários das células mitrais.

Diferentemente dos trabalhos anteriores, nosso trabalho procurou reproduzir de maneira realista os padrões de distribuição dos diferentes receptores olfativos no epitélio, assim como seus padrões de conexões com os glomérulos no bulbo, formando verdadeiros mapas odotópicos, além de permitir a estimulação desses com diferentes concentrações e tipos de moléculas odoríferas.

Ao longo dos demais capítulos serão feitas descrições mais detalhadas dos modelos construídos e dos resultados obtidos. No capítulo final, retoma-se o tema das contribuições originais deste trabalho, tendo por base os resultados das simulações realizadas.

II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos Computacionais e Programas

Foi utilizado um microcomputador Pentium IV de 1,7Ghz com 768Mbytes de RAM, contendo o sistema operacional LINUX rodando o neurosimulador GENESIS (GEneral NEural Simulation System) (Bower e Beeman, 1998).

Os resultados das simulações foram salvos em disco e analisados com o uso do programa MATLAB[®] (MATrix LABoratory), cujas ferramentas foram utilizadas para a construção dos gráficos desta dissertação.

2.2 Neurosimulador GENESIS

O neurosimulador GENESIS (Bower e Beeman, 1998) teve sua base inicial construída durante a implementação de uma simulação computacional do córtex piriforme desenvolvida no Caltech (California Institute of Technology) durante a tese de doutorado de Wilson (1990).

Posteriormente, o projeto inicial ganhou uma interface gráfica e sofreu uma série de atualizações. Atualmente o programa GENESIS pode ser adquirido livremente através da internet (GENESIS, 2002), juntamente com seu guia do usuário.

O GENESIS possui um interpretador de linguagem orientado ao objeto que tem como base a linguagem C. Por adotar a filosofia de trabalho de orientação ao objeto, o GENESIS apresenta uma estrutura modular, contendo uma biblioteca interna com vários objetos, que executam funções e equações determinadas e podem ser interligados. Esses objetos permitem a simulação de modelos biofísicos que vão desde o nível microscópico até o macroscópico, como reações bioquímicas, complexos modelos de uma única célula e sistemas de redes neurais contendo vários tipos de células e suas conexões sinápticas.

Além dos objetos internos, o GENESIS também permite que o usuário crie e acrescente seus novos objetos ao sistema.

O neurosimulador GENESIS também possui alguns utilitários com plataformas gráficas como o neurokit e o kinetikit. O neurokit permite ao usuário visualizar e modificar todos os parâmetros de uma célula além de visualizá-la em 3 dimensões. Esse utilitário

também permite a realização de vários experimentos com a célula, como grampos de corrente por exemplo. Já o kinetikit permite ao usuário criar e testar reações bioquímicas complexas além visualizá-las graficamente.

2.2.1 Modelagem Compartmental

Um dos principais objetos da biblioteca do GENESIS é o que simula compartimentos neurais, utilizando para isso equações do tipo das de Hodgkin-Huxley (1952). Um compartimento modela as propriedades elétricas de um pedaço de membrana neuronal e pode ser representado por um equivalente elétrico (Figura 2.1).

Figura 2.1: Circuito elétrico equivalente representando um compartimento neuronal genérico. V_m representa a diferença de potencial elétrico entre o interior da célula e o seu exterior, onde, por definição, o potencial é nulo. C_m representa a capacitância da membrana. A resistência R_m , representando a resistência da membrana, colocada em série com a bateria E_m , representam o efeito combinado dos canais passivos da membrana. Os canais iônicos ativos são modelados por uma condutância variável G_k em série com uma bateria E_k , a qual representa o potencial de equilíbrio para um dado íon. Uma fonte externa de injeção de corrente é representada por $I_{externa}$. Os compartimentos adjacentes são representados pelos potenciais de membrana V_m' and V_m'' e pelas resistências axiais R_a' e R_a'' . Modificada de Beeman (2002).

Utilizando as leis de Kirchoff é possível estabelecer uma relação entre as correntes que fluem através da membrana do compartimento²:

$$I_C = I_m + I_k + I_m' + I_m'' + I_{\text{externa}} \quad (2.1)$$

Onde I_k representa as correntes iônicas ativas, I_m as correntes iônicas passivas, I_C as correntes capacitivas, I_m' e I_m'' as correntes axiais provenientes dos compartimentos adjacentes e I_{externa} as correntes provenientes de uma fonte externa de injeção de corrente.

Como,

$$I_C = C_m \frac{dV_m}{dt}, I_m = \frac{(E_m - V_m)}{R_m}, I_k = \sum_k [(E_k - V_m)G_k], I_m' = \frac{(V_m' - V_m)}{R_a'}, I_m'' = \frac{(V_m'' - V_m)}{R_a''}$$

As equações diferenciais para o circuito acima podem ser escritas da seguinte maneira (Koch, 1999; Beeman, 2002):

$$C_m \frac{dV_m}{dt} = \frac{(E_m - V_m)}{R_m} + \sum_k [(E_k - V_m)G_k] + \frac{(V_m' - V_m)}{R_a'} + \frac{(V_m'' - V_m)}{R_a''} + I_{\text{externa}} \quad (2.2)$$

Assim, um neurônio pode ser montado através da conexão entre vários compartimentos desse tipo (Rall, 1995) (Figura 2.2).

Figura 2.2. Exemplo de representação compartimental de uma célula piramidal. A célula possui 3 compartimentos representando os dendritos apicais, 1 representando o soma, e 2 representando os dendritos basais. O axônio é representado por uma função que ativa uma sinapse quando ocorre um disparo no soma. Modificado de Beeman (2002).

² Quando a membrana está no estado de repouso a resultante de todas as correntes que fluem através dela é igual a zero.

2.2.2 Correntes Iônicas dependentes de Cálcio e da Voltagem

Outro tipo importante de objeto é o que simula canais iônicos que podem ser dependentes tanto de cálcio e da voltagem, utilizando também equações do tipo das de Hodgkin e Huxley. Esses canais podem ser anexados aos compartimentos neurais.

A corrente que passa por um canal dependente da voltagem e/ou de cálcio é representada pela equação (Koch, 1999)

$$I(V, Ca^{2+}, t) = x^\alpha, y^\beta, z^\gamma g_{\max} (E_{rev} - V_m) \quad (2.3)$$

Onde I é a corrente que flui pelo canal iônico, x é a variável de estado de ativação dependente da voltagem, y é a variável de estado de inativação dependente da voltagem, z é a variável de estado dependente do cálcio, $g_{\max}$ é a condutância máxima do canal, E_{rev} é o potencial de reversão do canal, V_m é o potencial de membrana, e α , β e γ são os expoentes de x , y e z , respectivamente.

As variáveis de estado de ativação e inativação dependentes da voltagem são governadas por equações do tipo (Koch, 1999):

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(x_\infty - x)}{\tau} \quad (2.4)$$

Onde x_∞ é a constante de equilíbrio e τ é a constante temporal, todas dependentes da voltagem.

A variável de estado dependente do cálcio pode ser modelada por uma equação como a de Hill³ (Keener e Sneyd, 1998),

$$\frac{dz}{dt} = \frac{[Ca^{2+}]^n}{[Ca^{2+}]^n + k} \quad (2.5)$$

Onde $[Ca^{2+}]$ é a concentração de cálcio, n é a constante de Hill e k é uma constante.

2.2.3 Correntes Sinápticas

Existem também objetos que simulam canais sinápticos dos mais variados tipos, utilizando para isso condutâncias variáveis $G(t)$ (Figura 2.3).

³ A equação de Hill é definida a partir de uma transformação da equação de Michaelis e Menten (1913), para que esta possa ser aplicada em uma situação onde existem vários sítios ativos (alosterismo).

Figura 2.3. Diagrama representando uma sinapse. Um potencial de ação propaga-se até o terminal pré sináptico, causando a liberação de neurotransmissores, resultando em uma mudança na condutância pós sináptica $G(t)$. Modificada de Beeman (2002).

A mudança na condutância pós-sináptica, resultante da liberação de um *quantum* de neurotransmissor, é representada no GENESIS por uma função alfa (Bower e Beeman, 1998; Koch, 1999; Beeman, 2002),

$$G(t) = Cte^{-t/\tau} \quad (2.6)$$

Onde τ é uma constante temporal, C uma constante denominada peso sináptico que representa o número de canais sinápticos do mesmo tipo que ocorrem no compartimento.

A corrente iônica I resultante da variação temporal da condutância $G(t)$ é representada pela equação:

$$I(t) = G(t)(E_k - V_m) \quad (2.7)$$

e pode fluir para o interior ou para exterior da célula, dependendo do valor do potencial de equilíbrio E_k em relação ao potencial de membrana V_m . Valores de E_k positivos produzem sinapses excitatórias e valores negativos inibitórias.

2.2.4 Reações Bioquímicas

O GENESIS possui também uma grande quantidade de objetos que permitem simular reações químicas, utilizando equações da cinética química (Bhalla, 1998). O utilitário kinetikit facilita a utilização desses objetos através de uma interface amigável ao usuário.

Para simular a reação química:

Na qual A e B são os reagentes, C e D são os produtos, e k_f e k_b são as constantes de velocidade. Para resolver essa reação química o kinetikit utiliza equações diferenciais:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_b[C][D] - k_f[A][B] \quad (2.8)$$

Onde os termos entre colchetes são as concentrações químicas de cada molécula especificada.

Para simular reações de cinética enzimática o kinetikit utiliza o modelo de Michaelis e Menten (1913), que postula que uma reação química enzimática acontece em duas etapas. Na primeira etapa o substrato e o reagente reagem para formar, de forma reversiva, o complexo enzima-substrato. Na segunda etapa, o complexo enzima-substrato forma, de maneira irreversível, o produto da reação e a enzima torna-se livre para ligar-se novamente ao substrato.

O esquema da reação enzimática é o seguinte:

Onde Enz é a enzima, Sub é o substrato, Enz.Sub é o complexo enzima-substrato, Prd é o produto, e k_1 , k_2 e k_3 são as constantes de velocidade da reação.

Para resolver essa reação enzimática o kinetikit utiliza equações diferenciais (Bhalla e Iyengar, 2001):

$$\frac{d[Enz]}{dt} = -k_1[Enz][Sub] + (k_2 + k_3)[Enz.Sub] \quad (2.9)$$

$$\frac{d[Sub]}{dt} = -k_1[Enz][Sub] \quad (2.10)$$

$$\frac{d[Pr d]}{dt} = k_3[Enz.Sub] \quad (2.11)$$

Onde os termos entre colchetes são as concentrações químicas de cada molécula especificada.

2.2.5 *Métodos Numéricos*

O GENESIS possui vários métodos numéricos, tanto explícitos como implícitos, para a resolução das equações diferenciais.

Os métodos explícitos são mais sensíveis ao erro de arredondamento e não são auto-inicializados, isto é, precisam de um conjunto de pontos para que possam ser aplicados. Já os métodos implícitos usam menos informações que os explícitos, apresentam limites de erro de truncamento menores e são menos sensíveis ao arredondamento. (Cláudio e Marins, 1994)

Os métodos explícitos utilizados pelo GENESIS são o Forward Euler, Adams-Bahforth e Euler Exponencial. Os métodos implícitos são o Backward Euler e o Crank-Nicholson, que são utilizados em conjunção com o método de Hines através do objeto `hsolve` (Bower e Beeman, 1998).

Como nem todos os objetos do GENESIS utilizados neste trabalho são compatíveis com os métodos numéricos implícitos, optou-se por utilizar o método numérico explícito Forward Euler. Para compensar possíveis erros gerados por esse método numérico nós utilizamos um passo de integração temporal pequeno (10^{-5} segundos). Desta forma, foram simulados 10 segundos de tempo real de atividade neural do sistema olfativo em resposta aos odores, utilizando 1 milhão de passos de 10^{-5} segundos. Cada simulação levou aproximadamente 32 horas de tempo computacional para ser completada.

III - MODELAGEM DO SISTEMA OLFATIVO

3.1 Modelagem das Células Receptoras

A célula receptora simulada possui uma morfologia bipolar (Figura 3.1), sendo composta por 4 compartimentos denominados de cílios, protuberância dendrítica, dendrito e soma (Schild e Restrepo, 1998).

Figura 3.1: A: Morfologia bipolar da célula receptora olfativa modelada. B: Imagem em contraste de fase de uma célula receptora olfativa real de salamandra. Modificada de Zufall et al. (2000). Cada célula possui um soma, um dendrito e uma protuberância dendrítica de onde partem vários cílios.

As propriedades passivas e as dimensões espaciais de cada compartimento foram obtidas com base na literatura, com exceção da voltagem na malha de fuga e da resistência de membrana do dendrito e da protuberância dendrítica, que foram ajustadas com base em experimentos de controle de corrente realizados neste trabalho através do uso do Neurokit (Tabela 3.1).

COMPARTIMENTO	Parâmetro	Valor	Referência
Todos Compartimentos	Resistência Axial (Ra)	1 Ohm*m	Bower e Beeman (1998)
Todos Compartimentos	Capacitância de Membrana (CM)	0,01 F/m ²	Lynch e Barry (1989)
Todos Compartimentos	Potencial de Repouso (Erest)	-55mV	Ma et al (1999)
Todos Compartimentos	Potencial de Fuga (Eleak)	-60mV	*obtido com o neurokit
Soma	Resistência de Membrana (RM)	11 Ohms*m ²	Lynch e Barry (1989)
Soma	Diâmetro (d)	10 Micrometros	Schild e Restrepo (1998)
Soma	Comprimento (l)	13micrometros	Schild e Restrepo (1998)
Dendrito	Resistência de Membrana (RM)	0.1 Ohms*m ²	*obtido com o neurokit
Dendrito	Diâmetro (d)	2micrometros	Schild e Restrepo (1998)
Dendrito	Comprimento (l)	70micrometros	Schild e Restrepo (1998)
Protuberância Dendrítica	Resistência de Membrana (RM)	0.1 Ohms*m ²	Lynch e Barry (1989)
Protuberância Dendrítica	Diâmetro (d)	3micrometros	Schild e Restrepo (1998)
Protuberância Dendrítica	Comprimento (l)	3micrometros	Schild e Restrepo (1998)
Cílios	Volume (v) de 10 cílios	1e-16m ³	Schild e Restrepo (1998)

Tabela 3.1 Parâmetros das propriedades passivas das células receptoras.

O compartimento ciliar foi simulado como um compartimento bioquímico, contendo as vias bioquímicas do olfato (Figura 3.2). O compartimento dendrítico não possui canais ativos. O compartimento da protuberância dendrítica contém um canal de cloreto ativado por cálcio (Hallani et.al., 1998; Reuter et.al, 1998; Kurahashi e Yau, 1994). O soma contém canais de cálcio e sódio dependentes da voltagem e diversos tipos de canais de potássio, dependentes da voltagem e/ou de cálcio. Cada canal simulado no soma possui um equivalente na célula real (Schild e Restrepo, 1998; Maue e Dionne, 1987; Trombley e Westbrook, 1991).

Os odorantes servem como entrada ao sistema. A ligação entre as moléculas odorantes e os receptores de membrana produz um aumento na concentração intracelular de cálcio, ativando os canais de cloreto e levando a um aumento na condutância da membrana, o que culmina com a geração de disparos em rajada no soma.

3.1.1 Detalhamento da Simulação da Via Bioquímica do Olfato

A via bioquímica olfativa foi desenvolvida no kinetikit, tendo como base o trabalho de Bhalla e Iyengar (1998), que simulou no próprio kinetikit as vias bioquímicas relacionadas com a potencialização de longa duração (LTP) na região CA1 do hipocampo. Isso foi possível devido a várias homologias encontradas entre as vias bioquímicas olfativas e as da simulação realizada por Bhalla e Iyengar.

O esquema da via bioquímica olfativa simulada encontra-se na Figura 3.2.

Figura 3.2: Vias bioquímicas dos cílios das células receptoras. Os balões elípticos são enzimas, círculos são mensageiros e retângulos são os receptores, bombas e canais iônicos. As reações inibitórias estão em setas verdes e as reações excitatórias em setas pretas. **AC3**: Adenilato Ciclase 3, **PKA**: Proteína Kinase ativada por AMPc, **PDE**: Fosfodiesterase, **CaM**: Ca^{2+} /Calmodulina, **CaMKII**: Proteína kinase II dependente de CaM, **AMPc**: Adenosina Monofosfato Cíclica, **Ca^{2+}** : Cálcio. **G_{olf}** : subunidade da proteína G.

O odor conecta-se ao receptor de membrana ligado à proteína G heteromérica (Buck et.al., 1994), separando a subunidade G_{olf} das subunidades β e γ . A subunidade G_{olf} ativa a Adenilato Ciclase 3, o que faz aumentar rapidamente a quantidade intracelular de AMPc (Breer et.al., 1990). O AMPc abre o canal de cálcio ativado por AMPc⁴ e, ao mesmo tempo, ativa a proteína kinase A (Zufall e Leinders-Zufall, 2000). A proteína kinase A inativa o receptor ligado à proteína G, formando uma alça de retroalimentação negativa. O canal de cálcio aberto pelo AMPc, faz aumentar a quantidade de cálcio intracelular (Leinders-Zufall et.al., 1997; Leinders-Zufall et.al., 1998). Este cálcio ativa a calmodulina, que passa então a inativar o canal de cálcio (Chen e Yau, 1994), formando uma alça de retroalimentação negativa. A calmodulina também ativa a fosfodiesterase, que passa a inativar o AMPc (Zufall e Leinders-Zufall, 2000). A calmodulina ativa também a proteína kinase II dependente de

⁴ Os canais e as bombas catiônicas na célula real são permeáveis ao sódio e ao cálcio. Mas no modelo esses canais e bombas catiônicas foram simplificados como permeáveis apenas ao cálcio.

calmodulina (Wei, et.al., 1996), que passa a inativar a Adenilato Ciclase 3, formando assim outra alça de retroalimentação negativa.

Desta forma, o odor leva a um aumento rápido na concentração intracelular de cálcio, o que atua nas vias bioquímicas com suas alças de retroalimentação, produzindo um complexo mecanismo de adaptação. Mas as bombas de cálcio restauram as concentrações intracelulares de cálcio aos níveis basais, restabelecendo rapidamente a sensibilidade da membrana aos odorantes após a adaptação (Reisert e Matthews, 1998).

3.1.2 Detalhamento do Canal de Cloreto Ativado por Cálcio

Os dados experimentais utilizados na modelagem do canal de cloreto ativado por cálcio foram extraídos dos trabalhos de Hallani e colaboradores (1998), Reuter e colaboradores (1998) e Larson e colaboradores (1997).

Do trabalho de Hallani e colaboradores, utilizou-se a equação de Hill⁵ que descreve a curva de concentração de cálcio *versus* corrente de cloreto nas células receptoras olfativas de rato Wistar:

$$g_{Cl} = g_{Cl_{max}} \frac{[Ca^{2+}]^1}{([Ca^{2+}] + 26\mu M)} \quad (3.1)$$

Do trabalho de Reuter e colaboradores (1998), extraiu-se o valor do potencial de reversão do cloreto ($+6 \pm 12,5$ mV) nas células receptoras olfativas de ratos Dawley.

Do trabalho de Larson e colaboradores, utilizou-se o valor da condutância unitária do canal de cloreto (0,8pS) e a densidade de canais (70 canais/ μm^2) das células receptoras de sapos, obtidos através do método de análise de ruído, para calcular a densidade de condutância dos canais de cloreto (60 pS/ μm^2).

Finalmente, colocou-se as equações que regem o comportamento do canal de cloreto ativado por cálcio dentro do formalismo de Hodgkin-Huxley, utilizando uma variável de estado de ativação (m_∞) e uma constante temporal de ativação (τ_m):

$$m_\infty = \frac{[Ca^{2+}]}{([Ca^{2+}] + 26\mu M)} \quad (3.2)$$

e

$\tau_{m=0}$

⁵ Neste caso o coeficiente de Hill é igual a um.

A constante temporal de ativação foi considerada igual a zero porque o atraso que existe para que o canal de cloreto responda ao cálcio pode ser considerado desprezível.

Assim, a equação geral que descreve o comportamento da corrente que atravessa o canal de cloreto ativado por cálcio fica igual a:

$$I_{Cl} = gCl_{\max} \left(\frac{[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + 26\mu M} \right) (E_m - 6mV) \quad (3.3)$$

Onde I_{Cl} é a corrente de cloreto que atravessa o canal, $gCl_{\max} = 60pS/\mu m^2$ é a densidade de condutância dos canais de cloreto, $m_{\infty} = \frac{[Ca^{2+}]}{([Ca^{2+}] + 26\mu M)}$ é a variável de estado de ativação, E_m é o potencial de membrana e $E_{Cl} = +6mV$ é o potencial de reversão do cloreto.

3.1.3 Detalhamento dos Canais Iônicos Utilizados no Corpo Celular

O soma contém canais de cálcio e sódio dependentes da voltagem e diversos tipos de canais de potássio, dependentes da voltagem e/ou de cálcio (Tabela 3.2).

CÉLULA REAL	MODELO ESCOLHIDO
CANAIS DE POTÁSSIO	CANAIS DE POTÁSSIO
130pS, canal de potássio ativado por cálcio com cinética dependente da voltagem (Maue e Dionne, 1987). Possivelmente do tipo BK (Schild e Restrepo, 1998).	BK(Ca^{2+}): (Moczydlowski e Latorre, 1983), implementado para o GENESIS por Erik De Schutter.
80pS, canal de potássio ativado por cálcio com cinética independente da voltagem (Maue e Dionne, 1987). Possivelmente do tipo SK (Schild e Restrepo, 1998).	AHP(Ca^{2+}): Corrente de potássio dependente do cálcio e independente da voltagem; de longa duração; após-hiperpolarização (Traub 91).
Canal de potássio, com atraso, grande e retificador, (Trombley e Westbrook, 1991)	DR(V): Corrente de potássio retificadora com atraso (Traub 91).
25pS, canal de potássio com propriedades semelhantes ao canal de potássio retificador (Maue e Dionne 1987). Possivelmente do tipo gH, com condutância catiônica retificadora, com corrente para dentro da célula, permeável a potássio e sódio e ativada por potenciais hiperpolarizantes (Schild e Restrepo, 1998).	H(V): Ativado por hiperpolarização (McCormick, 1991)
40pS, canal de potássio ativado e, posteriormente, inativado por despolarizações rápidas.	A(V): Transiente, com corrente de potássio para fora da célula (Traub 91).
CANAIS DE SÓDIO	CANAIS DE SÓDIO
Corrente de sódio ativada por voltagem, ativada a $-45mV$ (Schild e Restrepo, 1998)	Na(V): Corrente de sódio rápida (Traub 91).
CANAIS DE CÁLCIO	CANAIS DE CÁLCIO
16pS, corrente de cálcio ativada por altas voltagens (HVA). $\tau_{off} = 3min$, ativada a -40 e $-30 mV$. (Schild e Restrepo, 1998 e Maue e Dionne, 1987).	Ca(V): Corrente de cálcio rápida, ativada a altas voltagens, vagarosamente inativante. (Traub 91)

Tabela 3.2: Canais iônicos simulados e os respectivos canais presentes na célula real.

A modelagem dos canais foi realizada através da escolha de tipos equivalentes aos encontrados na célula real disponíveis na biblioteca de canais do GENESIS.

No caso da escolha de canais de potássio equivalentes ao BK e SK, ela baseou-se na classificação adotada por Mainen e Sejnowski (1998), onde correntes do tipo I_C são geradas por canais do tipo BK e correntes I_{AHP} por canais SK.

Também de acordo com Mainen e Sejnowski (1998), as correntes de potássio podem ser classificadas em 3 grandes grupos de acordo com a sua função: geradoras de repolarização de disparos (I_A , I_{DR} , I_C), geradoras de adaptação na frequência de disparos (I_{AHP}) e retificadoras anômalas (I_H).

As correntes de sódio e de cálcio do tipo HVA têm função despolarizante.

3.2 Modelagem das Células Mitrais

A célula mitral simulada possui 7 compartimentos: 1 soma, 4 dendritos secundários, 1 dendrito primário e 1 tufo (Figura 3.3).

Figura 3.3. A: Modelo de célula mitral com 7 compartimentos. B: Morfologia de uma célula mitral real de rato marcada com biocitina. Modificada de Chen et. al. (1997). Cada célula mitral possui um soma, um tufo, dendritos secundários e um dendrito primário.

As propriedades passivas e as dimensões espaciais de cada compartimento foram obtidas com base nos trabalhos de Bhalla e Bower (1993) e Shen e colaboradores (1999) (Tabela 3.3).

COMPARTIMENTO	Parâmetro	Valor	Referência
Todos Compartimentos	Resistência de Membrana (RM)	10 Ohms*m ²	Bhalla e Bower (1993)
Todos Compartimentos	Resistência Axial (Ra)	2 Ohms*m	Bhalla e Bower (1993)
Todos Compartimentos	Capacitância de Membrana (CM)	0,01 F/m ²	Bhalla e Bower (1993)
Todos Compartimentos	Potencial de Repouso (Erest)	-65mV	Bhalla e Bower (1993)
Soma	Diâmetro (d)	32 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Soma	Comprimento (l)	32 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Dendrito Primário	Diâmetro (d)	7.9micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Dendrito Primário	Comprimento (l)	370micrometros	Shen et al (1999)
Dendritos Secundários	Diâmetro (d)	5.8 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Dendritos Secundários	Comprimento (l)	500 micrometros	Shen et al (1999)
Tufo	Diâmetro (d)	3.5 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Tufo	Comprimento (l)	180 micrometros	Shen et al (1999)

Tabela 3.3. Propriedades passivas da célula mitral.

Todos os parâmetros referentes aos tipos de canais iônicos da célula foram obtidos do trabalho de Bhalla e Bower (1993) (Tabela 3.4). O soma e o dendrito primário contêm apenas canais de sódio e de potássio. Os compartimentos do tufo e os dendritos secundários contêm canais de sódio e potássio, além de canais sinápticos gabaérgicos e glutamatérgicos.

COMPARTIMENT O	Na	Kfast	LCa	K	KA	KCa
Soma	1532	1956	40	28	58,7	142
Dendrito Primário	13,4	12,3	22	17,4	0	0
Dendritos Secundários	330	226	4	8,5	0	0
Tufo	0	0	95	28	0	0

Tabela 3.4. Tipos e densidades de canais iônicos na célula mitral em Siemens/m², retirados de Bhalla e Bower (1993). Na: canal de sódio; Kfast: corrente rápida de potássio, retificadora com atraso; LCa: corrente de cálcio tipo-L; K: corrente de potássio lenta e com atraso; KA: corrente retificadora anômala; KCa: canal de potássio dependente do cálcio.

Os parâmetros dos canais sinápticos gabaérgicos e glutamatérgicos foram obtidos da biblioteca de canais do GENESIS (Tabela 3.5).

PARÂMETRO	Gabaérgico	Glutamatérgico
$G_{\max}$	50e-9 Siemens	50e- Siemens
E_{rev}	-90 mV	45 mV
τ_1	2ms	20ms
τ_2	2ms	20ms

Tabela 3.5. $G_{\max}$, condutância máxima do canal; E_{rev} , potencial reverso do canal; τ_1 , constante temporal de abertura ; τ_2 , constante temporal de fechamento.

3.3 Modelagem das Células Granulares

A célula granular simulada possui 12 compartimentos que são: 1 soma, 1 tronco, 1 dendrito profundo e 1 dendrito periférico contendo 4 espinhos. Cada espinho é formado por 2 compartimentos chamados de pescoço e cabeça (Figura 3.4).

Figura 3.4. A: Modelo de célula granular com 12 compartimentos. B: Morfologia de uma célula granular real de camundongo obtida através da técnica de impregnação de Golgi e desenhada em câmara lúcida. Modificada de Woolf et. al. (1991). Cada célula granular possui um soma, um tronco, dendritos profundos e periféricos com espinhos.

As propriedades passivas e as dimensões espaciais de cada compartimento foram obtidas com base no trabalho de Bhalla e Bower (1993) (Tabela 3.6).

COMPARTIMENTO	Parâmetro	Valor	Referência
Todos compartimentos	Resistência de Membrana (RM)	12 Ohms*m ²	Bhalla e Bower (1993)
Todos compartimentos	Resistência Axial (Ra)	0,5 Ohms*m	Bhalla e Bower (1993)
Todos compartimentos	Capacitância de Membrana (CM)	0,01 F/m ²	Bhalla e Bower (1993)
Todos compartimentos	Potencial de Repouso (Erest)	-65Mv	Bhalla e Bower (1993)
Soma	Diâmetro (d)	6 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Soma	Comprimento (l)	8 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Dendrito Periférico	Diâmetro (d)	1,25micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Dendrito Periférico	Comprimento (l)	200micrometros	Shen et al (1999)
Dendrito Profundo	Diâmetro (d)	1 micrometro	Bhalla e Bower (1993)
Dendrito Profundo	Comprimento (l)	100 micrometros	Shen et al (1999)
Tronco	Diâmetro (d)	2 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Tronco	Comprimento (l)	200 micrometros	Shen et al (1999)
Cabeça dos Espinhos	Diâmetro (d)	1 micrometro	Bhalla e Bower (1993)
Cabeça dos Espinhos	Comprimento (l)	3 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Pescoço dos Espinhos	Diâmetro (d)	0,2 micrometros	Bhalla e Bower (1993)
Pescoço dos Espinhos	Comprimento (l)	1 micrometro	Bhalla e Bower (1993)

Tabela 3.6. Propriedades passivas da célula granular.

A célula granular foi modelada a partir de uma redução no número de compartimentos que compõem a célula do modelo de Bhalla e Bower (1993), inspirada no trabalho de Davison e colaboradores (2000, 2001).

Todas os parâmetros referentes aos tipos de canais iônicos da célula foram obtidos do trabalho de Bhalla e Bower (1993) (Tabela 3.7). O soma e o dendrito primário contêm apenas canais de sódio e potássio. Os compartimentos do tufo e os dendritos secundários contêm canais de sódio e potássio, além de canais sinápticos gabaérgicos e glutamatérgicos.

COMPARTIMENT O	Na	K	KM	KA
Soma	1611	1313	1334	88
Dendrito Profundo	0	0	0	0
Tronco	0	71	0	0
Dendrito Periférico	1355	243	0	0

Tabela

3.7.

Tipos e densidades de canais iônicos na célula granular em Siemens/m², retirados de Bhalla e Bower (1993). Na: canal de sódio do cérebro de rato; KM: canal de potássio muscarínico não inativante; K: corrente de potássio lenta e com atraso; KA: corrente retificadora anômala.

Os espinhos da célula granular contêm canais glutamatérgicos do tipo NMDA e AMPA. O glutamato que se difunde pela fenda sináptica liga-se aos receptores de tipo AMPA e NMDA. A ligação com os receptores de tipo AMPA causa uma abertura dos respectivos canais, provocando uma despolarização da membrana. Essa despolarização leva à liberação do magnésio que bloqueava os canais NMDA⁶, provocando um influxo de cátions e despolarizando ainda mais a célula.

Zador e colaboradores (1990), desenvolveram equações para modelar este tipo de processo. A equação para a condutância do canal AMPA é,

$$G_{AMPA}(V, t) = \frac{g_{ampa} t e^{\left(1 - t/\tau_1\right)}}{\tau_1} \quad (3.4)$$

Onde G_{AMPA} é a variação da condutância do canal AMPA, g_{AMPA} é a condutância máxima e τ_1 é a constante temporal. Já a equação para a condutância do canal NMDA é,

$$G_{NMDA}(V, t) = g_{NMDA} \left(\frac{e^{-t/\tau_1} - e^{-t/\tau_2}}{1 + \eta [Mg^{2+}] e^{-\gamma V}} \right) \quad (3.5)$$

Onde G_{NMDA} é a variação da condutância do canal NMDA, g_{NMDA} é a condutância máxima, τ_1 e τ_2 são constantes temporais, $[Mg^{2+}]$ é a concentração de magnésio e η e γ são constantes (Tabela 3.8).

PARÂMETRO	AMPA	NMDA
G_{max}	5e-12 Siemens	50e-12 Siemens
E_{rev}	0 mV	0 mV
τ_1	2ms	20ms
τ_2	9ms	40ms
$[Mg^{2+}]$	0	1.2 mM
η	0	0.2801mM ⁻¹
γ	0	62V ⁻¹

Tabela 3.8. Parâmetros dos canais glutamatérgicos dos espinhos retirados do trabalho de De Schutter e Smolen (1998), que está atualmente disponível na forma de um tutorial para o GENESIS 2.2 (2002).

⁶ De acordo com o modelo proposto por Zador e colaboradores (1990) os canais sinápticos do tipo NMDA são obstruídos por cátions de magnésio $[Mg^{2+}]$ quando a membrana está no estado de repouso. Porém, quando a membrana é despolarizada, principalmente pela ativação dos canais do tipo AMPA pelo glutamato, o magnésio se desliga do canal NMDA, desobstruindo-o.

O cálcio que entra pelos canais NMDA desobstruídos flui para os compartimentos internos da célula. Esses compartimentos internos foram representados no modelo através de volumes cilíndricos denominados conchas. Nas conchas existem concentrações de tampão calmodulina que fixam uma parte do cálcio. Outra parte difunde-se para regiões exteriores à concha, e ainda outra parte é lançada para fora da célula por bombas de cálcio.

A concentração de cálcio na concha (Bower e Beeman, 1998) é regida por uma equação do tipo:

$$\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} = BI_{Ca} - \frac{[Ca^{2+}]}{\tau} \quad (3.6)$$

Onde $[Ca^{2+}]$ é a concentração de cálcio na concha, I_{Ca} é o fluxo de cálcio que entra pelo canal NMDA, τ é uma constante temporal e B é uma constante dada por $B=5,2 \cdot 10^{-6}/(a \cdot L)$, sendo a a área da superfície da concha e L a sua espessura.

A difusão do cálcio para fora da concha é regida por uma equação de difusão unidimensional (Yamada et al, 1998):

$$\frac{dr[Ca^{2+}]}{dt} = D_{Ca} \frac{d^2r[Ca^{2+}]}{dr^2} \quad (3.7)$$

Onde $[Ca^{2+}]$ é a concentração de cálcio na concha, r é o raio da concha e D_{Ca} é a constante de difusão do cálcio.

O cálcio que é fixado pelo tampão calmodulina (Yamada et al, 1998) tem a sua concentração regida pela seguinte reação química:

Onde $[FB]$ é a concentração do tampão calmodulina livre do cálcio, $[Ca^{2+}]$ é a concentração de cálcio livre da calmodulina, $[Ca^{2+}FB]$ é a concentração de cálcio ligado a calmodulina e k_f e k_b são as constantes de velocidade da reação.

O cálcio que é lançado para fora da célula pelas bombas de cálcio possui uma dinâmica de Michaelis-Menten (1913) regida por uma equação do tipo (Zador et al, 1990; De Schutter e Smolen, 1998):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{bomba}}{dt} = -K_{max} P_s \frac{a}{V} \frac{[Ca^{2+}]}{K_d + [Ca^{2+}]} \quad (3.8)$$

Onde $K_{\max}$ é a taxa máxima de bombeamento, P_s é a densidade superficial de bombas, a é a área da superfície da concha, V é o volume da concha, $[Ca^{2+}]_{\text{bomba}}$ é a concentração de cálcio bombeada, $[Ca^{2+}]$ é a concentração de cálcio na concha e K_d é a constante de dissociação.

Os parâmetros (Tabela 3.9) e os objetos que simularam as equações da dinâmica de cálcio no espinho foram tirados do modelo de De Schutter e Smolen (1998), que atualmente estão disponíveis na forma de um tutorial para o GENESIS 2.2 (2002).

PARÂMETRO	Valor
Head_dia	0,5 μm
Head_len	0,5 μm
Neck_dia	0,1 μm
Neck_len	0,7 μm
Thick	0,1 μm
$[Ca^{2+}]$	0,02 μM
DCa	$6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
[FB]	0,2mM
KF	$5 \cdot 10^{+5} (\text{mM} \cdot \text{s})^{-1}$
Kb	500 sec^{-1}
Kp	1,4e-5

Tabela 3.9. Parâmetros da dinâmica de cálcio nos espinhos, retirados do trabalho de De Schutter e Smolen (1998): Head_dia e Head_len são, respectivamente, o diâmetro e o comprimento da concha em relação à cabeça do espinho; Neck_dia e Neck_len são, respectivamente, o diâmetro e o comprimento da concha em relação ao pescoço do espinho; Thick é a espessura de cada concha; $[Ca^{2+}]$ é a concentração de cálcio basal; DCa é a constante de difusão de cálcio; [FB] é a concentração de tampão; kf e kb são as constantes de velocidade do tampão; kp é a constante da bomba de cálcio.

3.4 Modelagem do Epitélio Olfativo

A simulação do epitélio foi feita através da montagem de uma matriz de modelos de células receptoras bipolares (50 x 50) contendo um total de 2500 células (Figura 3.6I), com dimensão espacial de 400 μm x 400 μm . A distância determinada entre uma célula e outra foi de 8 μm . As concentrações de cálcio nos cílios de cada célula foram adicionadas a valores randômicos, permitindo a obtenção da atividade individual das células em resposta aos odores.

A resposta da rede aos diferentes odores foi feita com base no trabalho de Ma e Shepherd (2000). Nesse trabalho, as células receptoras de uma determinada área do epitélio recebiam um marcador de cálcio e depois eram estimuladas por diferentes odores, de forma que as células que respondiam aos odores mudavam de cor e podiam ser individualmente identificadas e ter sua posição mapeada.

Como Ma e Shepherd (2000) só mapearam 3 pequenas áreas do epitélio em seu trabalho, o que foi insuficiente para preencher a área total do epitélio simulado ($160.10^3 \mu\text{m}^2$), nós tivemos que arranjá-las adequadamente para formar uma única área maior ($200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$), além de ter que dividir o epitélio simulado em duas partes idênticas respondentes aos mesmos odores para formar o epitélio de $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ (Figura 3.5). Desta forma, foi possível determinar dentro da matriz de células simulada a distribuição aproximada das células que respondiam a pelo menos 8 tipos diferentes de moléculas odorantes⁷ utilizadas por Ma e Shepherd (2000), sendo que 60 células respondem ao n-amyl acetato (Figura 3.6A), 44 a acetophenona (Figura 3.6B), 22 a cineole (Figura 3.6C), 26 ao 3-heptanona (Figura 3.6D), 4 ao octanol (Figura 3.6E), 14 ao octanal (Figura 3.6F), 12 ao ácido octanóico (Figura 3.6G) e 8 ao benzaldeído (Figura 3.6H). Algumas dessas células são capazes de responder a 2 ou 3 tipos de odores diferentes, como foi verificado no trabalho de Ma e Shepherd (2000).

Figura 3.5. As três pequenas áreas do epitélio real mapeadas por Ma e Shepherd (2000) foram arranjadas adequadamente para formar uma única área maior ($200\mu\text{m}$

x 200 μ m). O epitélio simulado foi dividido ao meio para formar duas grandes áreas respondentes a odores (400 μ m x 400 μ m) idênticas a esse arranjo. A, B, C correspondem respectivamente às figuras 4B, 5B e 6 do artigo de Ma e Shepherd (2000). Cada círculo corresponde a uma célula receptora e as diferentes cores representam os diferentes tipos de odores para os quais essas células são capazes de responder. As setas em A são para destacar a presença de cluster de células respondentes a um mesmo odor, como foi observado por Ma e Shepherd (2000).

Simulou-se também a existência de junções comunicantes no epitélio olfativo (Zhang et al, 2000) conectando-se o soma de cada célula receptora com o soma de suas células vizinhas através de uma resistência de 300 Mohms (Traub et al, 1999).

Figura 3.6. Representação esquemática das 8 moléculas odorantes, do epitélio olfativo e do bulbo olfativo com seus 8 glomérulos. As cores identificam os diferentes odorantes percebidos pelo modelo do sistema olfativo. A,B,C,D,E,F,G,H

⁷ n-amyl acetato, 3-heptanona, octanol, octanal, ácido octanóico são odorantes alifáticos; acetophenona e

são respectivamente as moléculas odorantes n-amyl acetato, acetophenona, cineole, 3-heptanona, octanol, octanal, ácido octanóico e benzaldeído. I é um esquema do epitélio olfativo, representando as células que não respondem aos odores em preto e branco e em diferentes cores as células que respondem aos odores de mesma cor. J: Esquema do bulbo olfativo, com suas células granulares em preto e mitrais em cores. As células granulares fazem sinapses dendrodendríticas com os dendritos secundários das células mitrais vizinhas. As células receptoras olfativas que respondem a um mesmo odorante convergem seus axônios para o mesmo glomérulo no bulbo olfativo, representados por células mitrais da mesma cor.

3.5 Modelagem do Bulbo Olfativo

A simulação do bulbo olfativo foi feita com duas camadas de células formadas por duas matrizes de células (Figura 3.6J). Uma matriz contendo 64 células mitrais (8 x 8) e outra contendo 100 células granulares (10 x 10). A distância entre as células mitrais é de 400µm e entre as células granulares de 800µm. Cada dendrito secundário da célula mitral faz uma sinapse dendrodendrítica com o espinho de uma célula granular adjacente, formando um circuito de auto inibição e de inibição lateral. Os espinhos das células granulares e os dendritos secundários das células mitrais também estão conectados através de junções comunicantes (Reyher et al, 1991), que foram simuladas através de resistências de 300 MΩ (Traub et al, 1999). O soma de cada célula granular também foi conectado com o soma de suas vizinhas através de junções comunicantes (Reyher et al, 1991).

3.6 Modelagem das Conexões entre o Epitélio e o Bulbo

Como o epitélio simulado é capaz de responder a 8 tipos diferentes de odores, dividiu-se o bulbo olfativo em 8 glomérulos compostos de 8 células mitrais cada (Figura 3.6J). Todas as células do epitélio que respondem ao mesmo tipo de odor convergem para o mesmo glomérulo no bulbo olfativo. Assim, cada odor possui seu próprio glomérulo característico no bulbo.

benzaldeído são odorantes cíclicos e cineole é um odorante bicíclico.

Os trabalhos de Meister e Bonhoeffer (2001) e Belluscio e Katz (2001) mostram que existe uma distribuição topográfica antero-posterior dos glomérulos no bulbo que respondem a odores alifáticos, formando um mapa odotópico. Quanto maior a cadeia de carbonos da molécula odorífera alifática à qual o glomérulo responde, mais anterior é a sua posição no bulbo.

Para simular esta situação (Figura 3.6J), convergiu-se os axônios das células receptoras respondentes aos odores não alifáticos para os glomérulos isolados em uma região mais anterior do bulbo. Os axônios das células receptoras respondentes aos odores alifáticos foram convergidos para os demais glomérulos, de maneira a respeitar uma posição topográfica dependente do número de cadeias de carbono na molécula odorífera à qual eles respondem, seguindo um sentido antero (mais carbonos) - posterior (menos carbonos).

IV - RESULTADOS

4.1 Células Receptoras

Simulações computacionais reproduzindo experimentos de controle de corrente (Figuras 4.1 e 4.2) e estimulação por odor (Figuras 4.3, 4.4 e 4.5) foram realizadas para validar o modelo da célula receptora. Os experimentos de controle de corrente foram realizados no neurokit, onde foi possível obter as taxas e os padrões de disparo da célula. Os experimentos de estimulação por odor foram feitos com auxílio do kinetikit. Sempre que possível essas medidas simuladas computacionalmente foram comparadas com medidas experimentais retiradas da literatura.

Na figura 4.1 é possível observar os padrões de resposta de uma célula receptora simulada e de uma célula real de camundongo (Ma et al, 1999), para estímulos de corrente de 0 e 6pA.

Figura 4.1. A: Padrão de disparos espontâneos da célula receptora simulada (A1) comparado com o de uma célula real de camundongo (A2) (Modificada de Ma et al, 1999). B: Padrão de disparos da célula receptora simulada (B1), comparado com o padrão de uma célula real de camundongo (B2), em resposta a uma corrente de 6pA injetada por 2,5s (Modificada de Ma et al, 1999). O número acima de um disparo indica a sua ordem de ocorrência dentro da sequência de disparos.

A atividade espontânea da célula receptora simulada foi de 12 disparos em 2,5 s (Figura 4.1 A1), já a da célula real de camundongo (Ma et al, 1999) foi de 17 disparos em 2,5 s (Figura 4.1 A2). Em ambos os casos foi possível observar oscilações sub limiares (Figura 4.1 A).

É interessante notar a semelhança nos intervalos entre os disparos e entre os pacotes de disparos ocorridos tanto na situação experimental como na simulada (Figura 4.1 A). Em ambas situações ocorre um pacote de disparos formado pelos disparos 1 a 4 (Figura 4.1 A), apesar do pacote formado na situação experimental (Figura 4.1 A2) ocorrer antes e apresentar uma latência maior entre o primeiro e segundo disparo do que na situação simulada (Figura 4.1 A1). Depois é possível observar um longo intervalo entre os disparos 4 e 5 na situação experimental (Figura 4.1 A2), diferentemente da situação simulada (Figura 4.1 A1) onde este intervalo é menor. Mas é possível notar que nos instantes que ocorrem os disparos 5 e 6 na situação simulada (Figura 4.1 A1) quase ocorrem dois disparos na situação experimental (*, ** na Figura 4.1 A2), que se tivessem ocorrido tornariam as situações experimental e simulada mais semelhantes.

Existe um outro pacote de 9 disparos formado entre os disparos 5 a 13 na situação experimental (Figura 4.1 A2) e um pacote de 4 disparos formado entre os disparos 7 a 10 na situação simulada (Figura 4.1 A1). Após estes pacotes de disparos existe novamente uma latência maior entre os disparos 13 e 14 na situação experimental (Figura 4.1 A2), e 10 e 11 na situação simulada (Figura 4.1 A1). Após esta latência ocorre um terceiro pacote de 4 disparos formado entre os disparos 14 e 17 na situação experimental (Figura 4.1 A2) e de 2 disparos formado entre os disparos 11 e 12 na situação simulada (Figura 4.1 A1).

Já a resposta da célula receptora simulada a um estímulo de corrente de 6pA mantido por 2,5s foi de 51 disparos (Figura 4.1 B1), enquanto na célula real de camundongo (Ma et al, 1999) foi de 52 disparos (Figura 4.1 B2), o que são números bastante próximos. Em ambos os casos foi possível observar oscilações sub limiares (Figura 4.1 B).

Para o estímulo de 6pA de corrente mantido por 2,5s, observa-se 3 latências maiores entre os disparos na situação experimental (Figura 4.1 B2), enquanto na situação simulada ocorrem apenas 2 latências mais acentuadas (Figura 4.1 B1). Mas é interessante ressaltar que os instantes em que ocorrem as latências entre os disparos 24 e 25 e entre os disparos 48 e 49 na situação experimental (Figura 4.1 B2), são muito semelhantes aos instantes em que ocorrem as latências entre os disparos 20 e 21 e entre os disparos 44 e 25 na situação simulada (Figura 4.1 B1), respectivamente.

Na figura 4.2 é possível observar as frequências de resposta de uma célula receptora simulada e de uma célula real de camundongo e uma célula real de rato (Ma et al, 1999), para estímulos de corrente entre 0 e 14pA.

Figura 4.2. Curvas de frequência de disparos em função da corrente injetada (F-I) da célula receptora simulada (círculos), da célula de camundongo (triângulo) (Ma et al, 1999) e da célula de rato (quadrado) (Ma et al, 1999).

As frequências de resposta da célula simulada para correntes entre 0 e 2 pA aproximam-se mais das frequências de resposta da célula de rato. Para correntes entre 2 e 6,5 pA a frequência de resposta da célula simulada tende a aproximar-se mais das frequências da célula de camundongo. Para correntes acima de 6,5 pA as frequências de resposta da célula simulada ficam acima das respostas das células de rato e camundongo, chegando a alcançar o valor de 35 Hz para a corrente de 14pA.

Mas tanto nas situações simuladas como nas situações experimentais ocorreram aumentos nas frequências de disparos da célula em resposta a aumentos na intensidade do estímulo de corrente.

Na figura 4.3 é possível observar as variações nas concentrações intracelulares de cálcio nos cílios das células simuladas em resposta a diferentes concentrações de um estímulo

odorante. É possível verificar uma relação dose-resposta bastante clara, onde quanto maior é a concentração de odor maior é o pico na concentração de cálcio intracelular.

Figura 4.3. As curvas mostram a variação da concentração de cálcio nos cílios da célula simulada em função de diferentes concentrações de odores aplicados: 0 μM (círculo), 1 μM (cruz), 10 μM (triângulo), 30 μM (quadrado) e 300 μM (xis) de odor.

Os comportamentos das curvas simuladas de resposta das concentrações intracelulares de cálcio para as concentrações de odores de 30 e 300 μM (Figura 4.3 quadrado e xis, respectivamente) assemelham-se às curvas experimentais (Figura 4.4B) obtidas através da medida da fluorescência do cálcio nos cílios da célula de salamandra (Figura 4.4A), durante estimulações com um inibidor de fosfodiesterase (IBMX), que simula a ação de um odor (Leinders-Zufall et al, 1997).

Figura 4.4. A: Resposta fluorescente da região da protuberância dendrítica e dos cílios de uma célula receptora de salamandra marcada com Fluo-3 AM (um marcador fluorescente de cálcio), durante uma estimulação com 8-Br-GMPc (ativador dos canais catiônicos ativados por AMPc), obtida através de um microscópio confocal de escaneamento a laser. Uma escala de cores foi utilizada para identificar as diferentes intensidades de fluorescência (0 a 60) na célula. B: Curvas que mostram a variação na fluorescência do cálcio em três cílios de uma célula de salamandra marcada com Fluo-3 AM, durante uma estimulação com um inibidor de fosfodiesterase (IBMX) que simula a ação de um odor na célula. Modificada de Leinders-Zufall et. al. (1997).

É possível verificar, tanto nas curvas de resposta das concentrações intracelulares de cálcio simuladas (Figura 4.3) como obtidas experimentalmente (Figura 4.4B), que ocorre um aumento gradual na concentração de cálcio até alcançar um valor de pico, seguido posteriormente por um decrescimento na concentração. A duração total da resposta do cálcio ao estímulo demora por volta de 15 a 20s em ambos os casos.

Nas simulações computacionais que produziram curvas de frequência de disparos de potenciais de ação em função das concentrações de odores (Figura 4.5), foi possível verificar um comportamento do tipo dose-resposta, onde para maiores concentrações de odores maiores são os valores das frequências de disparos, aproximando-se cada vez mais de uma frequência máxima de disparos.

As curvas experimentais (Figura 4.5) de frequência de disparos de potenciais de ação em função das concentrações de odores obtidas em células receptoras de camundongo (Reisert e Matthews, 2001), de rato (Duchamp-Viret, et al, 1999 ; Duchamp-Viret et al, 2000) e de sapo (Duchamp-Viret et al, 2000), apresentam comportamentos tipo dose-resposta bastante diversificados. Os valores máximos das frequências de disparos nas curvas experimentais (Figura 4.5, quadrado: 86Hz, triângulo: 160Hz, asterisco: 90Hz e cruz: 260Hz) foram mais altos que o valor obtido para a célula simulada (Figura 4.5, círculo: 30Hz), apesar dos valores obtidos para as células reais serem bastante diversificados, inclusive entre animais pertencentes ao mesmo táxon (Figura 4.5, triângulo e quadrado).

Figura 4.5. Curvas de frequência de disparos de potenciais de ação em função da concentração de odor da célula receptora simulada (círculo), de uma célula receptora de camundongo (cruz) (Reisert e Matthews, 2001), de uma célula receptora de rato (quadrado) (Duchamp-Viret, et al, 1999), de outra célula receptora de rato (triângulo) (Duchamp-Viret et al, 2000) e de uma célula receptora de sapo (asterisco) (Duchamp-Viret et al, 2000).

Na figura 4.6 temos o padrão de disparos de uma célula receptora simulada para um estímulo odorífero de 300 μM . Neste caso a frequência de disparos medida foi de 30 Hz. É possível verificar uma pequena adaptação entre os instantes de 10 e 15s.

Figura 4.6. Gráfico da simulação da variação temporal da voltagem no soma da célula receptora em resposta a um estímulo odorífero de 300 μM .

4.2 Células Mitrais

Simulou-se experimentos de controle de corrente (Figuras 4.7 e 4.8) com o auxílio do neurokit para validar a célula mitral modelada com 7 compartimentos.

A curva de disparos da célula modelada com 7 compartimentos foi traçada (Figura 4.7 A) em resposta a um estímulo de corrente no soma, com 0,5 nanoamperes de intensidade e 200ms de duração. Esta curva foi comparada com a resposta da célula modelada por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos (Figura 4.7 B) para o mesmo estímulo.

A resposta do modelo com 7 compartimentos (Figura 4.7 A) apresentou 6 disparos, enquanto a resposta do modelo com 286 compartimentos (Figura 4.7 B) apresentou apenas 5 disparos. Foi possível verificar que os disparos do modelo com 7 compartimentos (Figura 4.7 A) ficaram adiantados em relação aos disparos do modelo com 286 compartimentos (Figura 4.7 B), de forma que ocorreu um disparo do modelo com 286 compartimentos (Figura 4.7 B) entre cada intervalo entre os disparos do modelo com 7 compartimentos (Figura 4.7 A).

Apesar da ocorrência de intervalos maiores entre os disparos no modelo com 286 compartimentos (Figura 4.7 B), a forma e a duração dos disparos mostrou-se semelhante em ambos os modelos (Figura 4.7 A e B).

Figura 4.7. Resposta das células mitrais para uma injeção de corrente no soma com 0,5 nanoampères de intensidade e duração de 200ms. A: Resposta do modelo simulado com 7 compartimentos. B: Resposta do modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos.

A curva de frequência de disparos da célula modelada com 7 compartimentos foi traçada (Figura 4.8 - círculos) em resposta a diferentes intensidades de estímulo de corrente aplicados ao soma. Esta curva foi comparada com a resposta, para o mesmo estímulo, da célula modelada por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos (Figura 4.8 - triângulos) e por Davison e colaboradores (2000) com 4 compartimentos (Figura 4.8 – quadrado).

Figura 4.8. Frequência de disparos de células mitrais simuladas em função de diferentes valores de corrente injetada. Com os pontos marcados com círculos está a curva referente ao modelo simulado com 7 compartimentos. Com os pontos marcados com triângulos está a curva referente ao modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos. Marcada com quadrados está a curva referente ao modelo com 4 compartimentos simulado por Davison e colaboradores (2000). As curvas marcadas com quadrados e triângulos foram geradas a partir de pontos retirados da figura 7 do trabalho de Davison e colaboradores (2000).

A curva de frequência de disparos da célula modelada com 7 compartimentos (Figura 4.8 - círculos) apresentou respostas próximas às dos modelos com 286 compartimentos (Figura 4.8 - triângulos) e com 4 compartimentos (Figura 4.8 – quadrado) entre os estímulos de 0,2 e 0,8 nA, distanciando-se dessas curvas entre os estímulos de 1 e 1,6 nA. Para o estímulo de 1,6 nA a frequência de disparos da célula modelada com 7 compartimentos (Figura 4.8 - círculos) foi 50 Hz maior que as frequências apresentadas pelos outros modelos (Figura 4.8 – quadrado e triângulo).

4.3 Células Granulares

Simulou-se experimentos de controle de corrente (Figuras 4.9 e 4.10) com o auxílio do neurokit para validar a célula granular modelada com 12 compartimentos.

A curva de disparos da célula modelada com 12 compartimentos foi traçada (Figura 4.9 A) em resposta a um estímulo de corrente no soma, com 0,125 nanoamperes de intensidade e 275ms de duração. Esta curva foi comparada com a resposta da célula modelada por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos (Figura 4.9 B) para o mesmo estímulo.

A resposta do modelo com 12 compartimentos (Figura 4.9 A) apresentou apenas 2 disparos, enquanto a resposta do modelo com 530 compartimentos (Figura 4.9 B) apresentou 3 disparos. Foi possível verificar que o primeiro disparo dos dois modelos ocorreram no mesmo instante (Figura 4.9 A e B), porém o segundo disparo do modelo com 12 compartimentos (Figura 4.9 A) ocorreu defasado em relação ao segundo disparo do modelo com 530 compartimentos, ficando entre o intervalo do segundo e do terceiro disparo do modelo com 530 compartimentos (Figura 4.9 B). A forma e a duração dos disparos em ambos os modelos foi bastante semelhante (Figura 4.9 A e B).

Figura 4.9. Resposta das células granulares para uma injeção de corrente no soma com 0,125 nanoamperes de intensidade e duração de 275ms. A: Resposta do modelo simulado com 12 compartimentos. B: Resposta do modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos.

A curva de frequência de disparos da célula modelada com 12 compartimentos foi traçada (Figura 4.10 - círculos) em resposta a diferentes intensidades de estímulo de corrente aplicados ao soma. Esta curva foi comparada com a resposta, para o mesmo estímulo, da

célula modelada por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos e por Davison e colaboradores (2000) com 3 compartimentos (Figura 4.8 – triângulos).

Figura 4.10. Frequência de disparos de células granulares simuladas em função de diferentes valores de corrente injetada. Com os pontos marcados com círculos está a curva referente ao modelo simulado com 12 compartimentos. Com os pontos marcados com triângulos estão as curvas referentes aos modelos simulados por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos e por Davison e colaboradores (2000) com 3 compartimentos (elas são idênticas). A curva marcada com triângulos foi gerada a partir de dados retirados da figura 1 do trabalho de Davison e colaboradores (2001).

A curva de frequência de disparos da célula modelada com 12 compartimentos (Figura 4.8 - círculos) apresentou respostas mais próximas às dos modelos com 530 compartimentos e com 3 compartimentos (Figura 4.10 – triângulo) entre os estímulos de 0 e 0,1 nA, distanciando-se gradualmente dessas curvas entre os estímulos de 0,1 e 1 nA. Para o estímulo de 1 nA a frequência de disparos da célula modelada com 12 compartimentos (Figura 4.10 - círculos) foi 15 Hz menor que as frequências apresentadas pelos outros modelos (Figura 4.10 – triângulo).

4.4 Epitélio e Bulbo

Foram realizadas estimulações odoríferas, baseadas no trabalho experimental de Ma e Shepherd (2000), para validar as respostas do epitélio e do bulbo modelados a esses estímulos. As voltagens da membrana somática de cada célula do epitélio, da camada de células mitrais e granulares do bulbo foram registradas durante as simulações, levando em consideração a posição das células na rede neural. Desta forma, foi possível montar mapas contendo os padrões espaço-temporais de resposta das redes neurais para os diferentes estímulos odoríferos (Figuras 4.11 a 4.20).

Para uma simulação sem estimulação odorífera (Figura 4.11), o sistema olfativo modelado apresentou oscilações basais de baixa amplitude no epitélio (Figura 4.11 A) e nas camadas de células mitrais (Figura 4.11 B) e granulares do bulbo (Figura 4.11C).

Figura 4.11: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação sem a presença de odores. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor n-amyl acetato o sistema olfativo modelado apresentou padrões oscilatórios (Figura 4.12) com respostas de voltagem de até -20 mV (Figura 4.12 A) no epitélio modelado. A camada de células mitrais apresentou respostas de voltagem de até -40 mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.12 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.12C) apresentou respostas de voltagem de até -50 mV . É interessante notar que devido à ocorrência de um disparo na camada de células mitrais (posição $X=6$ e $Y=5$ na matriz da Figura 4.12B), ocorreu uma ativação das células vizinhas na camada granular, devido à existência das conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.12 C).

Figura 4.12: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor n-amyl acetato. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor acetophenona o epitélio olfativo modelado apresentou padrões oscilatórios em espiral (Figura 4.13 A) com o centro localizado em uma região formada por um cluster de células respondentes a este odor. As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.12 A), contendo ondas com cristas construtivas e destrutivas. A camada de células mitrais apresentou respostas de voltagem despolarizantes de até 0 mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.13 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.13C) apresentou respostas de voltagem de até -50 mV . É interessante notar que devido à ocorrência de um disparo na camada de células mitrais (posição $X=6$ e $Y=5$ na matriz da Figura 4.13B), ocorreu a ativação das células vizinhas da camada granular, devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.13 C).

Figura 4.13: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor acetophenona. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor cineole o epitélio olfativo modelado apresentou padrões oscilatórios em espiral (Figura 4.14 A) com o centro localizado em uma região contendo uma maior densidade de células respondentes a este odor. As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.14 A). A camada de células mitrais apresentou respostas de voltagem de até -40 mV, juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.14 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.14C) apresentou respostas de voltagem de até -50 mV. É possível notar uma maior quantidade de células granulares ativadas ao redor das regiões da camada de células mitrais onde os picos de voltagem foram mais altos, (posição $X=6$ e $Y=5$ na matriz da Figura 4.14B), devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.14C).

Figura 4.14: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor cineole. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor 3-heptanona o epitélio olfativo modelado apresentou oscilações de voltagem. (Figura 4.15 A). As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.15 A). A camada de células mitrais apresentou respostas de voltagem de até -0mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.15 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.15C) apresentou respostas de baixa voltagem, mas com valores de voltagem mais altos próximos as regiões da camada de células mitrais com picos de voltagem (posição $X=4$ e $Y=5$ na matriz da Figura 4.15B), devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.15C).

Figura 4.15: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor 3-heptanona. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor octanol o epitélio olfativo modelado apresentou oscilações de voltagem. (Figura 4.16 A). As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.16 A). A camada de células mitrais apresentou de respostas de voltagem despolarizantes de até 20 mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.16 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.16C) apresentou respostas de baixa voltagem, mas com valores de voltagem mais altos próximos às regiões da camada de células mitrais com 3 picos de voltagem, devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.16C).

Figura 4.16: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor octanol. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor octanal o epitélio olfativo modelado apresentou oscilações de voltagem, além de padrões oscilatórios tipo alvo localizados com o centro em uma região contendo um cluster (indicado com uma seta preta da Figura 3.5) de células respondentes a este odor (Figura 4.17 A). As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.17 A). A camada de células mitrais apresentou de respostas de voltagem despolarizantes de até -30 mV, juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.17 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.17C) apresentou respostas de baixa voltagem, mas com valores de voltagem mais altos próximos as regiões da camada de células mitrais com picos de voltagem, devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.17C).

Figure 4.17: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor octanal. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor ácido octanóico o epitélio olfativo modelado apresentou oscilações de voltagem. (Figura 4.18 A). As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.18 A). A camada de células mitrais apresentou de respostas de voltagem despolarizantes de até -40 mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.18 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.18C) apresentou respostas de baixa voltagem, mas com valores de voltagem mais altos próximos as regiões da camada de células mitrais com picos de voltagem, devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.18C).

Figura 4.18. Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor ácido octanóico. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com o odor benzaldeído o epitélio olfativo modelado apresentou oscilações de voltagem. (Figura 4.19 A). As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.19 A). A camada de células mitrais apresentou respostas de voltagem de até -40 mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.19 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.19C) apresentou respostas de baixa voltagem, mas com valores de voltagem mais altos próximos as regiões da camada de células mitrais com picos de voltagem, devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.19C).

Figura 4.19: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM do odor benzaldeído. A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

Para uma simulação com 300 μM de estimulação com vários odores ao mesmo tempo (n-amyl acetato, acetophenona, cineole, 3-heptanona, octanol, octanal, ácido octanóico e benzaldeído), o epitélio olfativo modelado também apresentou oscilações de voltagem. (Figura 4.20 A). As respostas de voltagem no epitélio modelado foram de até -20 mV (Figura 4.20 A). A camada de células mitrais apresentou respostas de voltagem de até -40 mV , juntamente com oscilações de baixa amplitude (Figura 4.20 B). A camada de células granulares do bulbo (Figura 4.20C) apresentou respostas de baixa voltagem, mas com valores de voltagem mais altos próximos as regiões da camada de células mitrais com picos de voltagem, devido às conexões sinápticas dendro-dendríticas (Figura 4.20C).

Figura 4.20: Mapa do sistema olfativo montado a partir das voltagens da membrana somática de cada célula registradas no instante de 5 segundos de uma simulação com 300 μM de estimulação com vários odores ao mesmo tempo (n-amyl acetato, acetophenona, cineole, 3-heptanona, octanol, octanal, ácido octanóico e benzaldeído). A: Camada de células do epitélio. B: Camada de células mitrais do bulbo. C: Camada de células granulares do bulbo. Os eixos X e Y correspondem à superfície da camada neural. O eixo Y corresponde à intensidade da resposta das células em Volts e caracterizada por um código de cor.

V – DISCUSSÃO

A dificuldade de se encontrar dados experimentais para construção e validação dos modelos esteve presente durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Quando os dados experimentais eram encontrados, muitas vezes vinham de trabalhos baseados em metodologias diferentes e era difícil compatibilizá-los com a maneira como a simulação desta dissertação foi construída.

Outra dificuldade encontrada neste trabalho foi a limitação da capacidade de processamento do computador. Isso nos obrigou a simplificar vários aspectos do modelo, reduzindo o número de compartimentos que compõem as células e o número de células que compõem as estruturas simuladas.

Apesar de todas essas dificuldades, foi possível construir um modelo incorporando dados anatômicos e fisiológicos suficientes para que ele possa ser considerado biologicamente plausível.

5.1 Células Receptoras

As respostas das células receptoras modeladas nas diferentes simulações computacionais que reproduziram experimentos de controle de corrente (Figuras 4.1 e 4.2) e estimulação por odor (Figuras 4.3, 4.4 e 4.5), ficaram, em alguns pontos, diferentes das respostas experimentais encontradas na literatura. Porém, tanto nas situações simuladas como nas situações experimentais ocorreram aumentos nas frequências de disparos das células em resposta a aumentos na intensidade do estímulo de corrente.

A atividade espontânea da célula receptora simulada apresentou 12 disparos em 2,5 s (4,8 Hz) (Figura 4.1 A1), já a célula de camundongo (Ma et al, 1999) apresentou 17 disparos em 2,5 s (6,8 Hz) (Figura 4.1 A2). Apesar desta diferença, ambos os valores estão dentro da faixa de valores medidos para atividade espontânea das células receptoras de mamíferos (3 a 12 Hz) (Ma et al, 1999).

A frequência de resposta da célula receptora modelada para estímulos de corrente entre 0 e 14pA (Figura 4.2) ficou próxima às das respostas das células de camundongo e de rato (Ma et al, 1999) para o intervalo de estímulos entre 0 e 2 pA. Para os estímulos de correntes acima de 6,5 pA as frequências de resposta da célula simulada ficaram acima das

respostas das células de rato e camundongo. O fato de a célula modelada conseguir reproduzir adequadamente a resposta das células reais apenas dentro de uma faixa de estímulos reflete limitações na construção dos modelos biofísicos.

Os comportamentos das curvas simuladas de resposta das concentrações intracelulares de cálcio para as concentrações de odores de 30 e 300 μM (Figura 4.3 quadrado e xis, respectivamente) assemelham-se às curvas experimentais (Figura 4.4B) obtidas através da medida da fluorescência do cálcio nos cílios da célula de salamandra (Figura 4.4A) (Leinders-Zufall et al, 1997), apresentando um aumento gradual na concentração de cálcio até alcançar um valor de pico, seguido posteriormente por um decrescimento na concentração. A duração total da resposta do cálcio ao estímulo demora por volta de 15 a 20 s em ambos os casos. Porém, os valores de concentração intracelulares simulados não correspondem necessariamente aos valores da célula real, já que os experimentos com medida da fluorescência do cálcio (Figura 4.4A) (Leinders-Zufall et al, 1997) não medem precisamente os valores destas concentrações.

Os valores máximos das frequências de disparos em função das concentrações de odores nas curvas experimentais (Figura 4.5, quadrado: 86Hz, triângulo: 160Hz, asterisco: 90Hz e cruz: 260Hz) foram mais altos que os valores obtidos para a célula simulada (Figura 4.5, círculo: 30Hz), apesar de os valores obtidos para as células reais serem bastante diversificados, inclusive vindo de animais pertencentes ao mesmo táxon (Figura 4.5, triângulo e quadrado). Essa diferença entre a resposta da célula modelada e das células experimentais pode ser devida a alguma limitação nos tipos de canais iônicos simulados no soma, ou devida aos valores de concentração de cálcio utilizados para os cílios.

É interessante notar que, apesar de que as repostas de frequência da célula simulada para diferentes estímulos de corrente injetada terem sido mais altas que as respostas experimentais; a resposta de frequência para diferentes concentrações de odores foi mais baixa que as respostas experimentais.

Essas diferenças encontradas entre as respostas do modelo e os dados experimentais poderiam ser explicadas devido ao fato do modelo referir-se à célula de um vertebrado genérico, já que os cílios foram inspirados em dados obtidos de salamandras e sapos⁸, os dados do canal de cloreto foram obtidos de ratos (Hallani et al, 1998; Reuter et al, 1998) e sapos (Larson et al, 1997) e os canais do soma foram obtidos de camundongos (Maue e

Dionne, 1987) e ratos ((Trombley e Westbrook, 1991; Schild e Restrepo, 1998). Além disso, cada trabalho experimental possui suas próprias limitações e metodologia, o que pode ter acrescentado imprecisões no modelo construído.

Os autores dos dados experimentais sobre o camundongo utilizados (Reisert e Matthews, 2001) destacam o pouco conhecimento que se tem sobre as propriedades de disparos das células do epitélio em experimentos com odores. Nosso modelo computacional das células receptoras pode ser utilizado como uma ferramenta no auxílio da compreensão dessas propriedades.

5.2 Células Mitrais

A resposta do modelo com 7 compartimentos (Figura 4.7 A) a um estímulo de corrente no soma, com 0,5 nA de intensidade e 200ms de duração, apresentou disparos com forma e duração semelhantes às do modelo com 286 compartimentos (Figura 4.7 B). Porém, diferenças foram observadas nos tempos de ocorrência dos disparos no modelo com 7 compartimentos (Figura 4.7 A) e com 286 compartimentos (Figura 4.7 B). Essas diferenças podem estar relacionadas com a grande diferença no número de compartimentos existente entre os dois modelos.

A curva de frequência de disparos em resposta a diferentes intensidades de estímulo de corrente aplicados ao soma da célula modelada com 7 compartimentos (Figura 4.8 - círculos) apresentou respostas próximas às das curvas das células modeladas por Bhalla e Bower (1993) com 286 compartimentos (Figura 4.8 - triângulos) e por Davison e colaboradores (2000) com 4 compartimentos (Figura 4.8 – quadrado) para a faixa de estímulos entre 0,2 e 0,8 nA, distanciando-se dessas curvas para a faixa de estímulos entre 1 e 1,6 nA. Para o estímulo de 1,6 nA a frequência de disparos da célula modelada com 7 compartimentos (Figura 4.8 - círculos) foi 50 Hz maior que as frequências apresentadas pelos outros modelos (Figura 4.8 – quadrado e triângulo). A diferença na resposta da célula simulada com 7 compartimentos ocorrida entre os estímulos de 1 e 1,6 nA pode ser explicado através do início da ocorrência de disparos duplicados para esta faixa de estímulos. Davison e colaboradores (2000) encontraram este tipo de problema com seu modelo de 4 compartimentos, mas eles eliminaram os disparos duplicados, argumentando que disparos

⁸ As salamandras e sapos possuem as maiores células receptoras olfativas do reino animal (Schild e Restrepo, 1998), facilitando as medidas experimentais.

deste tipo ocorreriam apenas nos dendritos e não no soma e que o modelo de Bhalla e Bower (1993) estaria superexcitado.

Apesar de o modelo com 7 compartimentos construído neste trabalho não utilizar recursos para abolir os disparos duplicados, ele apresentou a vantagem de preservar 4 compartimentos dendríticos secundários, possibilitando um maior realismo na simulação das sinapses dendrodendríticas com as células granulares, diferentemente do modelo com 4 compartimentos de Davison e colaboradores (1999), que preservou apenas um dendrito secundário.

5.3 Células Granulares

A resposta do modelo com 12 compartimentos (Figura 4.9 A) a um estímulo de corrente no soma, com 0,125 nA de intensidade e 2270 ms de duração, apresentou disparos com forma e duração semelhantes às do modelo com 530 compartimentos (Figura 4.9 B). Porém, foram observadas diferenças no número de disparos e nos tempos de ocorrência dos disparos entre o modelo com 12 compartimentos (Ocorreram 2 disparos: Figura 4.9 A) e o modelo com 530 compartimentos (Ocorreram 3 disparos: Figura 4.9 B). No entanto, é importante ressaltar que Bhalla e Bower (1993) modelaram 3 classes diferentes de células granulares, sendo que as respostas das células granulares de outras classes chegaram a apresentar 2 disparos nessa mesma condição de estimulação (Figura 9 do artigo de Bhalla e Bower, 1993).

A curva de frequência de disparos em resposta a diferentes intensidades de estímulo de corrente aplicados ao soma da célula modelada com 12 compartimentos (Figura 4.10 - círculos) apresentou respostas mais próximas às das curvas dos modelos de Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos e de Davison e colaboradores (2000) com 3 compartimentos (Figura 4.8 – triângulos) na faixa de estímulos entre 0 e 0,1 nA, distanciando-se gradualmente dessas curvas para a faixa de estímulos entre 0,1 e 1 nA. Para o estímulo de 1 nA, a frequência de disparos da célula modelada com 12 compartimentos (Figura 4.10 - círculos) foi 15 Hz menor que as frequências apresentadas pelos outros modelos (Figura 4.10 – triângulo).

Apesar da existência das diferenças entre as curvas de resposta do modelo com 12 compartimentos e dos modelos com 530 e 3 compartimentos, o modelo com 12

compartimentos apresentou a vantagem de preservar 4 espinhos, possuindo complexas dinâmicas de cálcio e de canais iônicos, possibilitando um grande realismo na simulação das sinapses dendrodendríticas. O modelo de Davison e colaboradores (2000) não possui espinhos e o modelo simulado por Bhalla e Bower (1993) com 530 compartimentos contém apenas espinhos passivos, sem os canais iônicos ativos e a dinâmica de cálcio existente no modelo simulado com 12 compartimentos.

Os próprios Davison e colaboradores (2000), na discussão de seu trabalho, levantam a necessidade de se simular células granulares simplificadas contendo espinhos, para uso em modelos de redes neurais, mas sem se referir a uma possível simulação da dinâmica bioquímica de cálcio envolvida nas sinapses dendrodendríticas.

5.4 Epitélio e Bulbo

As simulações realizadas com estimulações odoríferas na camada receptora, baseadas no trabalho experimental de Ma e Shepherd (2000), mostraram que o modelo é capaz de produzir vários padrões de oscilações.

Para a simulação sem estimulação odorífera (Figura 4.11), o sistema olfativo modelado apresentou oscilações de baixa amplitude, possivelmente relacionadas com as taxas basais de disparos das células que compõem o sistema.

Para as simulações com concentrações de 300 μM de diferentes odores, foi possível verificar a propagação de ondas de voltagem (Figuras 4.11 a 4.20).

A existência dessas ondas provavelmente está relacionada com a presença das junções comunicantes que foram simuladas entre as células do epitélio, entre as células da camada granular do bulbo e entre os espinhos das células granulares e os dendritos das células mitraes do bulbo. A propagação dessas ondas pode estar levando a informação gerada pelas células que respondem a determinados odores para as outras células da rede neural, possivelmente amplificando e aumentando a sensibilidade da camada receptora a esses odores.

Foi possível observar que as regiões do epitélio onde existiam maiores densidades de células (clusters) que respondiam aos odores parecem funcionar como as fontes de ondas que se propagam para as demais regiões, como aconteceu com as células que respondem ao odor acetophenona (Figuras 4.13 A), cineole (4.14 A) e octanal (Figura 4.17 A). Nestes casos, foram observadas ondas do tipo espiral (Figura 4.13 A e 4.14 A) e alvo (4.17 A). É

importante ressaltar que o trabalho de Ma e Shepherd (2000), através da marcação do cálcio que entrava através da protuberância dendrítica das células, foi o primeiro a demonstrar a existência de clusters de células receptoras e da existência de grandes densidades de células espalhadas no epitélio que respondem a odores.

O modelo de sistema olfativo construído pode ser visto como uma animação do conjunto de células descritas por Ma e Shepherd (2000), simulando a variação das voltagens de todas elas, o que ainda não foi possível de se observar experimentalmente. Através disso nosso modelo mostrou uma possível explicação para o papel dos clusters de células no sistema olfativo.

Na resposta do epitélio simulado ao odor octanal (Figura 4.17-A; Seta preta na Figura 3.5), foi possível observar as ondas alvo chocando-se e aniquilando-se com outras ondas existentes em outras regiões do epitélio. Possivelmente este processo pode estar funcionando como uma maneira de não permitir que a informação contida nas ondas geradas em uma região do epitélio apague a informação gerada em outras áreas, o que prejudicaria a recepção dos odores diminuindo a quantidade de informação recebida.

No caso em que o epitélio foi estimulado com vários odores ao mesmo tempo (Figura 4.20), excitando um grande número de células, podem ser vistas muitas ondas se aniquilando. Isso sugere que este processo de aniquilação também pode estar funcionando como um mecanismo de adaptação que previne a ativação simultânea de um número excessivo de células no epitélio, evitando que todo o sistema caia no período refratário absoluto e pare de responder aos odores.

Nas simulações com os diferentes odores foi possível verificar a existência de uma maior excitabilidade das células granulares próximas as regiões com picos de voltagem na camada de células mitrais do bulbo (Figuras 4.12 a 4.20). Isso demonstra, de uma maneira visual, a atividade das sinapses dendrodendríticas do bulbo e pode ser utilizada como uma ferramenta na compreensão da função destas sinapses no processamento da informação olfativa.

Técnicas menos invasivas de observação na variação na voltagem das células do sistema olfativo, através da utilização de corantes dependentes da voltagem, vêm sendo muito utilizadas em substituição às técnicas anteriores de medição de EOGS com a utilização de múltiplos eletrodos. Inclusive, alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade dessas técnicas de imagem não invasivas de reproduzir eficientemente o que é medido através do EOG (Cinelli e Kauer, 1992, Kauer e White, 2001). A formação de mapas característicos para

diferentes odores vem sendo observada experimentalmente tanto no epitélio (Kent et al, 1995) como no bulbo olfativo (Cineli et al, 1995a, Cineli e Kauer, 1995b, Cineli et al 1995c), através da utilização dos corantes sensíveis a voltagem e do uso de múltiplos eletrodos.

O modelo computacional construído neste trabalho pode servir como uma ferramenta no auxílio da compreensão do funcionamento do sistema olfativo.

VI - CONCLUSÃO

O modelo construído possui as seguintes novidades em relação aos modelos existentes na literatura:

- Simulação das vias bioquímicas das células receptoras relacionadas com a recepção e a transdução da informação olfativa;
- Adição de espinhos e dinâmica de cálcio nas células granulares do bulbo;
- Representação anatomicamente realista da posição dos receptores no epitélio olfativo e dos glomérulos no bulbo;
- Simulação de glomérulos formados por várias células mitrais;
- Inserção de junções comunicantes no epitélio e no bulbo olfativo.

O modelo construído com essas novidades foi capaz de reproduzir satisfatoriamente características importantes do sistema olfativo de vertebrados, incluindo a recepção de diferentes concentrações e tipos de odores no epitélio olfativo e a propagação dessa informação para o bulbo. O sistema olfativo simulado gerou padrões de resposta característicos para diferentes tipos de estímulos odoríferos aplicados à camada receptora.

Esses resultados estimulam a continuidade do trabalho, com novas e mais profundas investigações do modelo construído. A simulação das vias bioquímicas das células receptoras permite testar hipóteses sobre diferentes modelos propostos para tais vias, assim como a ação de drogas sobre elas. A adição de espinhos, com dinâmica de cálcio nas células granulares do bulbo, permite testar a ação de substâncias moduladoras que agem nesse sistema, como acetilcolina e noradrenalina, assim como diferentes hipóteses que tentam explicar os mecanismos bioquímicos presentes nas sinapses dendrodendríticas. A representação anatomicamente realista da posição dos receptores no epitélio e dos glomérulos no bulbo olfativo permite testar hipóteses sobre a atividade elétrica dessas células para diferentes estímulos odoríferos, o que nem sempre é possível experimentalmente. A simulação de glomérulos formados por várias células mitrais juntamente com a inserção de junções comunicantes permite estudar a origem e o papel das oscilações observadas no sistema olfativo de vertebrados.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKAI, E.; HASSELMO, M.E. Modulation of the Input/Output Function of Rat Piriform Cortex Pyramidal Cells. *Journal of Neurophysiology*, v.72, p. 644-658, 1994.
- BARKAI, E.; BERGMAN, R.E.; HORWITZ, G.; HASSELMO, M.E. Modulation of Associative Memory Function in a Biophysical Simulation of Rat Piriform Cortex. *Journal of Neurophysiology*, v. 72, p. 659-677, 1994.
- BEEMAN, D. Lectures on Computational Neuroscience. Disponível em: <<http://www.genesis-sim.org/GENESIS/cnsweb/cnslecs.html>>. Acesso em: 23 fev. 2002.
- BELLUSCIO, L.; KATZ, L.C. Symmetry, Stereotypy, and Topography of Odorant Representations in Mouse Olfactory Bulbs. *Journal of Neuroscience*, v.21, p.2113-2122, 2001.
- BHALLA, U. The Network Within: Signaling Pathways. In: *The Book of GENESIS: Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural SIMulation System*, 2.ed., Santa Clara: TELOS, 1998, cap.10, p.169-190.
- BHALLA, U.S.; BOWER, J.M. Exploring Parameter Space in Detailed Single Neuron Models: Simulation of the Mitral and Granule Cells of the Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology*, v.69, p.1948-1964, 1993.
- BHALLA, U.; IYENGAR, R. Emergent properties of network of biological signaling pathways. *Science*, v. 283, p.381-387, 1999.
- BHALLA, U.; IYENGAR, R. Robustness of the bistable behavior of a biological signaling feedback loop. *Chaos*, v. 11, p.221-226, 2001.
- BOWER, J. M.; BEEMAN, D. *The Book of GENESIS: Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural SIMulation System*, 2.ed., Santa Clara: TELOS, 1998.
- BREER, H.; BOEKHOFF, I.; TAREILUS, E. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature*, v.345, p. 65-68, 1990.
- BRENNAN, P.A.; KEVERNE, E.B. Neural Mechanisms of Mammalian Olfactory Learning. *Progress in Neurobiology*, v.51, p.457-481, 1997.
- BUCK, L.B.; FIRESTEIN, S.; MARGOLSKIE, R.F. Olfactory and Taste in Vertebrates: Molecular and Organizational Strategies Underlying Chemosensory Perception. In: *Basic*

- Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 5.ed., Nova Iorque: Raven Press, 1994, cap. 8, p.156-177.
- CHEN, T.; YAU, K. Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory neurons. *Nature*, v.368, p.545:548, 1994.
- CINELLI, A.R; KAUER, J.S. Voltage-Sensitive Dyes and Functional Activity in the Olfactory Pathway. *Annual Review Neuroscience*, v.15, p.3211-351, 1992.
- CINELLI, A.R; HAMILTON, K.A.; KAUER, J.S. Salamander olfactory bulbo neural activity observed by video-rate voltage-sensitive dye imaging. III. Spatio-temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J. Neurophysiology*, v.73, p.2053-2071, 1995 a.
- CINELLI, A.R; HAMILTON, K.A.; KAUER, J.S. Salamander olfactory bulbo neural activity observed by video-rate voltage-sensitive dye imaging. II. Spatio-temporal properties of responses evoked by electrical stimulation. *J. Neurophysiology*, v.73, p.2033-2052, 1995 b.
- CINELLI, A.R; HAMILTON, K.A.; KAUER, J.S. Salamander olfactory bulbo neural activity observed by video-rate voltage-sensitive dye imaging. I. Characterization of the recording system. *J. Neurophysiology*, v.73, p.2017-2032, 1995 c.
- CLÁUDIO, D. M., MARINS, J. M. Resolução Numérica de Equações Diferenciais Ordinárias. In: *Cálculo numérico computacional: teoria e prática*, 2.ed., São Paulo: Editora Atlas S. A ., 1994, cap.8, p.351-395.
- DAVISON, A.P.; FENG, J.; BROWN, D. Structure of lateral inhibition in an olfactory bulb model. *Lectures Notes in Computer Science*, v.1606, p.189-196, 1999.
- DAVISON, A.P.; FENG, J.; BROWN, D.A. A reduced compartmental model of the mitral cell for use in network models of the olfactory bulb. *Brain Research Bulletin*, v.51, n.5, p.393-399, 2000.
- DAVISON, A.P.; FENG, J.; BROWN, D. Spike synchronization in a biophysically-detailed model of the olfactory bulb. *Neurocomputing*, v.38-40, p.515-521, 2001.
- DE SCHUTTER, E.; SMOLEN, P. Calcium Dynamics in Large Neuronal Models, In *Methods in Neural Modeling: From Ions to Networks*, 2.ed., Cambridge: MIT Press, 1998, cap.6, p. 211-250.
- DESMAISONS, D.; VICENT, J.; LIEDO, P. Control of Action Potential Timing by Intrinsic Subthreshold Oscillations on Olfactory Bulb Output Neurons. *Journal of Neuroscience*. v.19, p.10727-10737, 1999.

- DORRIES, K.M.; KAUER, J.S. Relationships Between Odor-Elicited Oscillations in the Salamander Olfactory Epithelium and Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology*, v.83, p.754-765, 2000.
- DUCHAMP-VIRET, P.; CHAPUT, M.A.; DUCHAMP, A. Odor Response Properties of Rat Olfactory Receptor Neurons. *Science*, v.284, p.2171-2174, 1999.
- DUCHAMP-VIRET, P.; DUCHAMP, A.; CHAPUT, M.A. Peripheral Odor Coding in the Rat and Frog: Quality and Intensity Specification. *J. Neuroscience*, v.20, p.2383-2390, 2000.
- FREEMAN, W. J. The Physiology of Perception. *Scientific American*, v.264, p.78-85, 1991.
- GENESIS(GENERAL NEURAL SIMULATION SYSTEM) Web site. Coordenação de David Beeman, 1994-2002. Disponível em: <<http://www.genesis-sim.org/GENESIS/>>. Acesso em: 23 fev. 2002.
- GOLD, G. H. Controversial Issues in Vertebrate Olfactory Transduction. *Annual Review of Physiology*, v.61, p.857-871, 1999.
- HALLANI, M.; LYNCH, J.W.; BARRY, P.H. Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *Journal of Membrane Biology*, v.161, p.163-171, 1998.
- HASSELMO, M.E.; ANDERSON, B.P.; BOWER, J.M. Cholinergic Modulation of Cortical Associative Memory Function. *Journal of Neurophysiology*, v.67, p.1230-1246, 1992.
- HASSELMO, M.J.; BOWER, J.B. Afferent and Association Fiber Differences in Short-Term Potentiation in Piriform (Olfactory) Cortex of the Rat. *Journal of Neurophysiology*, v.64, p.179-190, 1990.
- HASSELMO, M.J.; BOWER, J.B. Cholinergic Suppression Specific to Intrinsic not Afferent Fiber Synapses in Rat Piriform (Olfactory) Cortex. *Journal of Neurophysiology*, v.67, p.1222-1229, 1992.
- HODGKIN, A.L.; HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and its applications to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology (Lond.)*, v.117, p.500-544, 1952.
- ISAACSON, J.S. Mechanisms governing dendritic γ -aminobutyric acid (GABA) release in the rat olfactory bulb. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v.98, p.337-342, 2001.

- KASHIWADANI, H.; SASAKI, Y.F.; UCHIDA, N.; MORI, K. Synchronized Oscillatory Discharges of Mitral/Tuft Cells With Different Molecular Receptive Ranges in the Rabbit Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology*, v.82, p.1786-1792, 1999.
- KEENER, J.; SNEYD, J. *Mathematical Physiology*, New York, Springer, 1998.
- KAUER, J.S.; WHITE, J. Imaging and Coding in the Olfactory System. *Annual Review Neuroscience*, v.24, p.963-979, 2001.
- KENT, P.F., YOUNGENTOB, S.L., SHEEHY, P.S. Odorant-Specific Spatial Patterns in Mucosal Activity Predict Perceptual Differences Among Odorants. *Journal Neurophysiology*, v.74, p.1777-1781, 1995.
- KOCH, C.; SEGEV, I. *Methods in Neural Modeling: From Ions to Networks*, 2.ed., Cambridge: MIT Press, 1998.
- KOCH, C. *Biophysics of Computation: Information Processing in Single Neurons*. New York, Oxford University Press, 1999.
- KURAHASHI, T. AND YAU, K. Tale of an unusual chloride current. *Current Biology*, v.4, p.256-258, 1994.
- LARSSON, H.P., KLEENE, S.J., LECAR, H. Noise Analyses of Ion Channels in Non-Space-Clamped Cables: Estimates of Channel Parameters in Olfactory Cilia. *Biophysical Journal*, v.72, p.1193-1203, 1997.
- LEINDERS-ZUFALL, T.; GREER, C.A.; SHEPHERD, G.M.; ZUFALL, F. Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *Journal of Neuroscience*, v.18, p.5630-5639, 1998.
- LEINDERS-ZUFALL, T., RAND, M.N., SHEPHERD, G.M., GREER, C.A.; ZUFALL, F. Calcium Entry through Cyclic Nucleotide-Gated Channels in Individual Cilia of Olfactory Receptor Cells: Spatiotemporal Dynamics. *Journal of Neuroscience*, v.17, n.11, p.4136-4148, 1997.
- LEINSTER, C., HASSELMO, M. Modulation of inhibition in a model of olfactory bulb reduces overlap in the neural representation of olfactory stimuli. *Behavioural Brain Research*, v.84, p.117-127, 1997.
- LYNCH, J.W.; BARRY, P.H. Action potentials initiated by single channels opening in a small neuron (rat olfactory receptor), *Biophysical Journal*, v.55, p.775-768, 1989.
- MA, M.; SHEPHERD, G.M. Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v.97, n.23, p.12869-12874, 2000.

- MA, M.; WEI, R.; SHEPHERD, G.M. Electrophysiological characterization of rat and mouse olfactory receptor neurons from an intact epithelial preparation. *Journal of Neuroscience Methods*, v.92, p.31-47, 1999.
- MAINEN, Z.F.; SEJNOWSKI, T.J. Modeling Active Dendritic Processes in Pyramidal Neurons, In: *Methods in Neural Modeling: From Ions to Networks*, 2.ed., Cambridge:MIT Press, 1998, cap.5, p.171-209.
- MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L.B. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, v.96, p.713-723, 1999.
- MAUE, R.A.; DIONNE, V.E. Patch-Clamp Studies of Isolated Mouse Olfactory Receptor Neurons. *Journal of General Physiology*, v.90, p.95-125, 1987.
- MEISTER, M.; BONHOEFFER, T. Tuning and Topography in an Odor Map on the Rat Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, v.21, p.1351-1360, 2001.
- MENINI, A. Calcium signaling and regulation in olfactory neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, v.9, p.419-426, 1999.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L. *Biochem. Z.*, v.49, p.333, 1913.
- MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R. Gating kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayer: evidence for two voltage-dependent Ca^{2+} binding reactions. *Journal General Physiology*, v.82, p.511-542, 1983.
- MORRI, K.; NAGAO, H.; SASAKI, Y.F. Computation of molecular information in mammalian olfactory systems. *Network: Computation in Neural System*, v.9, p.R79-R102, 1998.
- MORRISON, E.E.; CONSTANZO, R.M. Morphology of the Human Olfactory Epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, v.297, p.1-13, 1990.
- NUNEZ, P.L. *Electric Fields of the Brain: The Neurophysics of EEG*, Oxford, Oxford University Press, 1981.
- PROTOPAPAS, A.; BOWER, J.M. Dynamics of Cerebral Cortical Networks. In: *The Book of GENESIS: Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural SIMulation System*, 2.ed., Santa Clara: TELOS, 1998, cap.9, p.150-168.
- RALL, W. *The theoretical foundation of dendritic function: selected papers of Wilfrid Rall with commentaries*. Cambridge: The MIT Press, 1995.
- RÁMON Y CAJAL, S. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. 7.ed. Madrid: Moya, 1899 e 1904, 2 vols. em 3.

- REUTER, D.; ZIEROLD, K.; SCHRÖDER, W.H.; FRINGS, S. A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons *in situ*. *The Journal of Neuroscience*, v.18, p.6623-6630, 1998.
- REISERT, J.; MATTHEWS, H.R. Na^+ -dependent Ca^{2+} Extrusion Governs Response Recovery in Frog Olfactory Receptor Cells. *Journal of General Physiology*, v.112, p.529-535, 1998.
- REISERT, J.; MATTHEWS, H.R. Response properties of isolated mouse olfactory receptor cells. *Journal of Physiology*, v.530.1, p.113-122, 2001.
- REYHER, C. K.H.; LÜBKE, J.; LARSEN, W. J.; HENDRIX, G.M.; SHIPLEY, M.T.; BAUMGARTEN, H.G. Olfactory Bulb Granule Cell Aggregates: Morphological Evidence for Interperikaryal Electrotonic Coupling via Gap Junctions. *Journal of Neuroscience*, v.11, p.1485-1495, 1991.
- ROMERO, S.M.B. *Fundamentos de Neurofisiologia Comparada*. Ribeirão Preto: Holos, 2000.
- SCHOPPA, N.E.; KINZEL, J.M.; SASHARA, Y.; SEGERSON, T. P.; WESTBROOK, G.L. Dendrodendritic Inhibition in the Olfactory Bulb is Driven by NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience*, v.18, p.6790-6802, 1998.
- SHEN, G.Y.; CHEN, W.R.; MIDTGAARD, J.; SHEPHERD, G.M.; HINES, M.L. Computational Analysis of Action Potential Initiation in Mitral Cell Soma and Dendrites Based on Dual Patch Recordings. *Journal of Neurophysiology*, v.82, p.3006-3020, 1999.
- SHEN, G.Y.; MIDTGAARD, J.; SHEPHERD, G.M. Forward and Backward Propagation of Dendritic Impulses and Their Synaptic Control in Mitral cells. *Science*, v.278, p.463-467, 1997.
- SCHILD, D.; RESTREPO, D. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiology Review*, v.78, p.429-466, 1998.
- TRAUB, R.D.; SCHMITZ, D.; JEFFERYS, J.G.R.; DRAGUHN, A. High-Frequency Population Oscillations Are Predicted to Occur in Hippocampal Pyramidal Neuronal Networks Inteconnected by Axoaxonal Gap Junctions. *Journal of Neuroscience*, v.92, p.407-426, 1999.
- TRAUB, R.D., WONG, R.K., MILES, R. AND MICHELSON, H. A model of a CA3 hippocampal pyramidal neuron incorporating voltage-clamp data on intrinsic conductances. *Journal of Neurophysiology*, v.66, p.635-650, 1991.

- TROMBLEY, P.Q., WESTBROOK, G.L. Voltage-Gated Currents in Identified Rat Olfactory Receptor Cells. *Journal of Neuroscience*, v.11, n.2, p.435-444, 1991.
- VANDERWOLF, C.H.; ZIBROWSKI, E.M. Pyriform cortex β -waves: odor-specific sensitization following repeated olfactory stimulation. *Brain Research*, v.892, p.301-308, 2001.
- YAMADA, W.M.; KOCK, K.; ADAMS, P.R. Multiple Channels and Calcium Dynamics. In: *Methods in Neural Modeling: From Ions to Networks*, 2.ed. Cambridge: MIT Press, 1998, p. 137-170.
- YOKOI, M.; MORI, K.; NAKANISHI, S. Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v.92, p.3371-3375, 1995.
- WEI, J.; WAYMAN, G.; STORM, D.R. Phosphorylation and Inhibition of Type III Adenylyl Cyclase by Calmodulin-dependent Protein Kinase II in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.39, p.24231-24235, 1996.
- WHITE, J.; HAMILTON, K.A.; NEFF, S.R.; KAUER, J.S. Emergent Properties of Odor Information Coding in a Representational Model of the Salamander Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, v.12, n.5, p.1772-1780, 1992.
- WILSON, M.A. CIT Thesis.1990. Tese de Phd, California Institute of Technology, Pasadena.
- WILSON, M.; BOWER, J. Cortical Oscillations and Temporal Interactions in a Computer Simulation of Piriform Cortex. *Journal of Neurophysiology*, v.67, n.4, p.881-995, 1992.
- WOOLF, T.B.; SHEPHERD, G.M.; GREER, C.A. Local Information Processing in Dendritic Trees: Subsets of Spines in Granule Cells of the Mammalian Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, v.11, p.1837-1854, 1991.
- ZADOR, A.; KOCH, C.; BROWN, T.H. Biophysical model of a Hebbian synapse. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, v.87, p.6718-6722, 1990.
- ZHANG, C.; FINGER, E.; RESTREPO, D. Mature Olfactory Receptor Neurons Express Connexin 43. *Journal of Comparative Neurology*, v.426, p.1-12, 2000.
- ZUFALL, F.; LEINDERS-ZUFALL, T. The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chemical Senses*, v.25, p.473-481, 2000.
- ZUFALL, F.; LEINDERS-ZUFALL, T., GREER, G.A. Amplification of odor-Induced Ca^{2+} Transients by Store-Operated Ca^{2+} Release and Its Role in Olfactory Signal Transduction. *J. Neurophysiology*, v.83, p.501-512, 2000