

Tesis Doctoral

Plasticidad dependiente de experiencia en la codificación de olores

Marachlian, Emiliano

2015-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marachlian, Emiliano. (2015-03-30). Plasticidad dependiente de experiencia en la codificación de olores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Marachlian, Emiliano. "Plasticidad dependiente de experiencia en la codificación de olores". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología Biología Molecular y Celular

Plasticidad dependiente de experiencia en la codificación de olores

Lic. Emiliano Marachlian

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área Ciencias Biológicas

Director de tesis: Dr. Fernando Locatelli
Consejero de estudios: Dr. Alberto Kornbliht

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias,
IFIBYNE CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Fecha de defensa: 30 de marzo de 2015

Plasticidad dependiente de experiencia en la codificación de olores

Desde los estímulos sensoriales que los organismos vivos sensan hasta la percepción interna que estos se hacen del mundo que los rodea, ocurren una serie de transformaciones que le permiten al individuo extraer información relevante y filtrar aquella que no tenga valor predictivo.

El ejemplo del olfato es especialmente interesante pues los seres vivos deben ser capaces de decodificar del ambiente estímulos complejos y en continuo cambio. En ese contexto, la plasticidad cumple un papel fundamental dado que un estímulo puede ser percibido de maneras diferentes (dependiendo del estado motivacional y de la experiencia previa del individuo) permitiéndoles a los organismos adaptarse e ir ajustando la imagen interna de su entorno.

En el presente trabajo se estudió, mediante experimentos de comportamiento e imaging de calcio, la plasticidad dependiente de experiencia en el lóbulo antenal (AL), primera etapa de procesamiento olfativo de la abeja *Apis mellifera*. Se observó que la experiencia con un olor recompensado afecta la representación de las mezclas que contienen dicho olor. Luego de la experiencia las mezclas son representadas en el AL de manera que se parecen más al olor recompensado y menos al olor sin valor predictivo. El significado neuronal y funcional de estos cambios sería que, luego de la experiencia, la representación modificada adopta más elementos que permiten codificar y reconocer al estímulo relevante.

Además mediante simulaciones numéricas se propuso modelar las fuerzas sinápticas de las neuronas inhibitorias locales del AL para estudiar las propiedades de control de ganancia que estas infieren a la red. Describimos la dependencia que el control de ganancia tiene de las fuerzas sinápticas inhibitorias y del número de receptores que son reclutados por el estímulo. Mediante experimentos de imaging y farmacológicos describimos el aporte de las inhibiciones al control de ganancia en el lóbulo antenal de las abejas.

Los mecanismos de control de ganancia y de plasticidad dependiente de experiencia son discutidos en términos de su contribución a la transformación que la información sensorial sufre desde los receptores en la prefería hasta la representación interna que permite su percepción.

Palabras claves: Olfato - Imaging de Calcio - Plasticidad dependiente de experiencia - Control de ganancia - Abeja

Experience-dependent plasticity in odor's coding

Sensory stimuli are sensed at the periphery of the organisms and converted into its internal perception thanks to a series transformations that allows animals extract relevant information and filter out the one without predictive value.

The olfactory system is an interesting example since living beings have to be able to decode the complex and varying olfactory stimuli from the environment to extract and recognize informative stimuli. In this context, plasticity plays an important role, since the same stimulus might be perceived differently depending on the motivational state or the specific experience of the individual. The possibility to adapt their olfactory perception allows animals keep their internal representation of the environment always tuned.

In this work we combined behavior and calcium imaging experiments to study experience dependent plasticity in the antennal lobes, the first olfactory center in the brain of the honey bee *Apis mellifera*. We found that experience with a rewarded odor affects the representation of mixtures that contain that odor. After the experience the representation of the mixture is more similar to the representation of the rewarded component and less similar to the non-rewarded component. The meaning of the change is that the neural representation of the mixtures incorporates more elements that allow the recognition of the meaningful odor.

Furthermore, by means of numerical simulations, we modeled the synaptic strength of the inhibitory local neurons in the AL to study the gain control properties of the network. We described how gain control depends on the stimulus strength and the number of receptors that are recruited by the stimulus. Parts of the conclusions obtained from the model were further tested in calcium imaging experiments combined with pharmacology to block the local inhibitory network.

The mechanisms related with gain control and experience dependent plasticity are discussed in terms of their contribution to the transformation of the sensory information suffers from the receptors at the periphery to the internal representation that allows perception.

keywords: Smell - Calcium Imaging - plasticity - Gain Control - Bee

Índice

1. Tabla de abreviaciones	1
2. Introducción	3
2.1. Sistemas sensoriales	3
2.2. Los olores	4
2.3. Sistema olfativo de vertebrados e invertebrados: estructura y morfología . . .	8
2.3.1. Neuronas sensoriales y Epitelio	10
2.3.2. Lóbulo Antenal y Bulbo Olfatorio	12
2.3.3. Ordenes más altos de procesamiento olfatorio.	14
2.4. Rol de las neuronas locales inhibitorias en la codificación	17
2.4.1. La organización temporal	18
2.4.2. Control de ganancia	18
2.4.3. La organización espacial	21
2.5. Modelos: de la neurona al circuito (Hodgkin y Huxley).	22
2.6. Aprendizaje olfativo y plasticidad en el lóbulo antenal	26
2.7. Abejas y aprendizaje olfativo	28
2.8. Hipótesis y objetivos	29
2.8.1. Parte I	29
2.8.2. Parte II	30
3. Materiales y Métodos	33
3.1. Animales	33
3.2. Estímulos	35
3.3. Comportamiento	37
3.4. Protocolo de ensombrecimiento	39
3.5. Tinción de las neuronas de proyección	40
3.6. Imaging	43
3.7. Análisis de datos de imaging	44
3.8. Farmacología	46

3.9. Correlación vs distancia Euclidea	47
3.10. Análisis de componentes principales (PCA)	49
3.11. Predicción de la activación evocada por mezclas	50
3.12. Simulación numérica	51
4. Resultados	55
4.1. OLORES PUROS	56
4.1.1. Olores con saliencias equilibradas	56
4.1.2. Datos de imaging y series temporales	58
4.1.3. Distancia-correlación	62
4.1.4. Patrones y clustering	65
4.2. MEZCLAS	68
4.2.1. Variabilidad en la representación	68
4.2.2. Codificación de olores puros y mezclas	72
4.3. EL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO	81
4.3.1. Olores puros	81
4.3.2. La experiencia con un componente reduce la variabilidad	83
4.3.3. Efecto de la experiencia sobre la representación la mezcla	84
4.3.4. Comportamiento	93
4.4. CONTROL DE GANANCIA	97
4.4.1. Efecto del entrenamiento sobre la amplitud de las señales	98
4.4.2. Concentraciones	100
4.4.3. Experimentos	109
5. Discusión	115
6. Apéndice A	121

1. Tabla de abreviaciones

Abreviación	Significado
AL	Lóbulo Antenal
OB	Bulbo Olfatorio
M/T	Células mitrales y células en penacho
ORN	Neuronas Receptoras de Olores
LNI	Neuronas Locales Inhibitorias
PN	Neuronas de Proyección
ACE	Acetofenona
HEX	1-Hexanol
OCT	2-Octanona
Mix A-H	Mezcla ACE y HEX
Mix O-A	Mezcla OCT y ACE
Mix O-H	Mezcla OCT y HEX
A+	Entrenado a ACE
H+	Entrenado a HEX
N	Naive, grupo control
PTX	Picrotoxina
KC	Neuronas de Kenyon
CS+	Estímulo condicionado con refuerzo
CS-	Estímulo condicionado neutro

2. Introducción

2.1. Sistemas sensoriales

Los animales dependen de su capacidad de percibir el entorno y hacerse de una imagen interna de este para la supervivencia. Así por ejemplo, es importante que perciban la presencia un predador para poder evitar el peligro, ser capaces de detectar y rastrear alimento para mantener una adecuada nutrición, y en algunos casos reconocer feromonas sexuales para poder reproducirse. Los sistemas sensoriales son parte del sistema nervioso, fundamentales para que el animal adquiera información del ambiente. Existe una gran variedad de sistemas sensoriales que transducen información del ambiente en impulsos nerviosos que pueden ser leídos e interpretados por el cerebro. Todos ellos contienen células que transducen los estímulos externos en señales eléctricas y luego procesan la señal para ser leída en otras áreas del cerebro. Algunos ejemplos de estas células transductoras son los mecanorreceptores (que forman parte del oído o el tacto), los quimiorreceptores (presentes en el olfato o el gusto) y los electrorreceptores (como los fotorreceptores de la vista o los transductores de campo eléctrico o campo magnético con los que cuentan algunos animales).

Los sistemas sensoriales han evolucionado para extraer información útil del medio ambiente. Donde útil debe entenderse en el sentido de la ecología del animal y las necesidades de estos en el ambiente. Por lo tanto, lo útil necesariamente debe variar entre cada especie. Del mismo modo, la sensibilidad, velocidad, alcance sensorial y la capacidad de memorizar difieren entre especies. Dada esta variedad, se podría esperar una gran diversidad en la arquitectura de los circuitos neuronales que procesan la información sensorial. Sin embargo, debe haber similitudes sustanciales en estos sistemas dado que hay requisitos fundamentales que son comunes a todos. Por ejemplo todos requieren aumentar la relación señal/ruido, adaptarse a diferentes ambientes, extraer estímulos con valor predictivo e ignorar estímulos irrelevantes, darle forma a las señales de manera de permitir la formación de la memoria, regular el rango de estímulos en términos de su generalización como el mismo y evaluar la importancia de un estímulo según el estado de motivación del animal.

Dada la importancia vital de los sistemas sensoriales estos son disparadores de muchos

estudios. Además por su alto grado de conservación y la gran cantidad de propiedades en común (desde el punto de vista estructural y funcional) el estudio de un sistema sensorial en un animal nos aporta información no sólo sobre el modelo de estudio sino también sobre mecanismos sensoriales presentes en otras especies, incluso muy distante evolutivamente. En el presente trabajo estudiaremos la primera etapa de procesamiento del olfato utilizando a la abeja *Apis mellifera* como modelo de estudio.

2.2. Los olores

Los animales desarrollaron una amplia diversidad de transductores que les permite sentir el ambiente. Se conocen ejemplos de sistemas sensoriales con un alto grado de desarrollo y especificidad para muchas de las propiedades fisicoquímicas de la naturaleza (tales como campo eléctrico, campo magnético terrestre, sonido, luz, luz polarizada, identidad química, presión, humedad o temperatura). De modo que uno podría preguntarse acerca de toda la información del ambiente con la que cada organismo cuenta, su importancia y su integración. Pero si nos hacemos la pregunta inversa, ¿Cuál es la mínima información del ambiente necesaria para la supervivencia? No es descabellado pensar que cada animal debe ser capaz de reconocer al menos las sustancias que lo rodean. Es posible que por esto los sistemas sensoriales que consisten en la detección de moléculas del ambiente, la quimiorrecepción, hayan aparecido muy temprano y se encuentren altamente conservados a lo largo de las especies [Strausfeld y Hildebrand, 1999]. En consecuencia, hasta el más simple organismo unicelular es capaz de detectar gradientes de sustancias en el ambiente que lo rodea y desplazarse hacia regiones de concentraciones adecuadas a sus necesidades. La estrategia de detección de moléculas puede variar entre receptores específicos que responden exclusivamente a una determinada molécula (para moléculas con un gran valor predictivo) o arreglos de receptores que sienten propiedades más generales y que permiten al ser vivo reconocer las moléculas sensadas en base a la combinación de las características que estas reúnen.

El funcionamiento general del sistema olfativo, desde la detección de los odorantes por los receptores ubicados en la periferia hasta su codificación en el sistema nervioso central, es similar en todos los organismos. Las proteínas receptoras olfatorias se expresan en las

neuronas receptoras olfatorias (ORNs por las siglas en inglés: olfactory receptor neurons). Los receptores interactúan con moléculas odorantes en base a propiedades fisicoquímicas de las moléculas y ante la presencia de cierta molécula los transductores conducen a la apertura de canales de sodio y calcio que disparan la señal eléctrica en la célula receptora. No es conocido con exactitud qué propiedades de las moléculas son sensadas, pero si se sabe que en general los receptores no son odorante específico, es decir que cada receptor responde a más de un odorante y al mismo tiempo se sabe que cada odorante enciende más de un receptor [Hallem y Carlson, 2006].

El olor tal como se lo percibe es la representación interna de las propiedades fisicoquímicas sensadas por el organismo para una determinada molécula o grupo de moléculas. Así, en principio, dos moléculas diferentes juntas pueden tener el mismo olor que una única molécula de otro tipo y ser confundidas, si es que por ejemplo las dos moléculas juntas reúnen las mismas propiedades que una sola molécula del otro tipo.

Nótese que la relación entre los receptores y las moléculas que son sensadas no es unívoca, lo que permite al sistema detectar un mayor número de moléculas con un menor número de receptores. Si el sistema detecta un número finito de propiedades fisicoquímicas, la combinación de estas le permite clasificar un mayor número de moléculas. Al mismo tiempo dado que no conocemos cuáles son las propiedades que cada receptor sensa no contamos con una base que defina el espacio de estímulos ni en cuáles ni en cuántos parámetros dimensionarlo.

La capacidad para detectar y categorizar diferentes moléculas está limitada por la complejidad biológica de la percepción del olor. Debido a la función de la experiencia y otros factores, en muchos casos la relación entre la estructura sensada como olor, la representación neural y la percepción no es determinista. Además, la representación interna de una misma molécula odorante es diferente entre especies y por lo tanto también puede ocurrir que sustancias que no pueden ser detectadas u olidas por una especie sí lo sean por otras.

La identificación de parámetros que describen adecuadamente los olores resulta una herramienta fundamental para el estudio del olfato y el desarrollo de aplicaciones. Sin embargo, la estructura de los olores no puede aún ser descrita por una variable simple tal como longitud de onda para el sonido o la luz. Por lo tanto, es difícil comparar cuantitativamente dos estructuras odorantes. ¿Es la estructura de 2-Octanona más parecida a la de 1-Hexanol o a

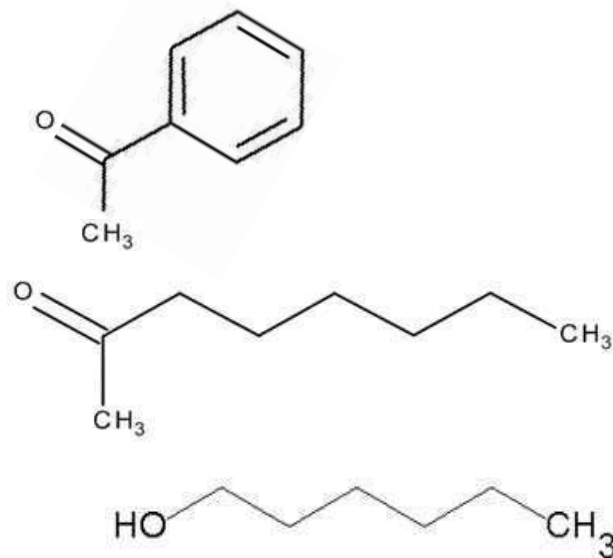


Figura 1: Estructura molecular de tres moléculas odorantes. Diagrama de la estructura molecular (de arriba abajo): Acetofenona, 2-Octanona y 1-Hexanol. Es difícil esbozar un criterio para decir cuáles serán más parecidas dado que todas ellas tienen cosas en común y cosas que las diferencian. Además tampoco sabemos cuáles de las posibles características de cada una son sensadas por distintos receptores.

la de Acetofenona? En la figura 1 pueden verse las estructuras de estas tres moléculas.

Los parámetros fisicoquímicos que determinan e identifican a un odorante pueden variar y son en principio un número indeterminado. Pueden usarse propiedades químicas tales como la longitud de cadena de carbono, el peso molecular y la polaridad. En algunos trabajos se presenta un espacio multidimensional fisicoquímico para describir la estructura de las moléculas. Por ejemplo Haddad y colaboradores [Haddad *et al.*, 2008] proponen 1.664 descriptores moleculares para más de 1.500 odorantes que se utilizan para construir un espacio de 1664 dimensiones, en el que cada dimensión representa una característica de la estructura molecular. De este modo un odorante puede ser asignado a una ubicación única en este espacio fisicoquímico de acuerdo a sus valores para cada uno de los 1664 descriptores. La relación entre su ubicación en el espacio fisicoquímico y el parecido que se percibe entre dos odorantes puede ser cuantificado aplicando alguna medida de parentesco entre los vectores que representan a cada uno de los odorantes en este espacio. Mediante una correlación entre la estructura fisicoquímica, tal como se la define en este espacio, y el espacio que describe su percepción por los seres humanos construido a partir de categorizaciones subjetivas en test cognitivos, se mostró que este espacio es útil para predecir la percepción de olores [Khan *et al.*, 2007].

Otro tipo de espacio olfativo es un espacio neuronal, que ilustra cómo se representa un odorante particular en el sistema olfativo. Un espacio neural puede ser construido a partir

de mediciones directas de las respuestas de olor de las neuronas del sistema o, a partir de las respuestas de los receptores de olor en un sistema de expresión, siempre que el sistema de expresión represente fielmente las actividades de receptores en sus neuronas de origen [Hallem *et al.*, 2004]. La construcción de un espacio de este tipo es más factible en los sistemas que son numéricamente más simples. En este espacio, dos moléculas serán parecidas si suscitan patrones de respuestas similares en todo el repertorio de receptores. Por ejemplo, mediante el análisis de respuesta de receptores olfativos de las larvas de *Drosophila*, junto con un análisis del comportamiento, se ofrece apoyo a la idea de que dos odorantes que están cerca en este espacio neuronal también lo están en términos de la calidad perceptual [Kreher *et al.*, 2008]. Es interesante que espacios neuronales distintos pueden ser construidos en base al nivel sucesivo de procesamiento neuronal y es probable que las distribuciones de los odorantes en cada espacio sucesivo difieran de la de sus predecesores. Es esperable que mientras el espacio de descriptores físicos tenga un alto grado de correlación con la representación en el espacio de actividad a nivel de los receptores, el espacio de representación perceptual o comportamental tenga un alto grado de correlación con el espacio de representación a niveles más altos del procesamiento [Locatelli y Relu, 2014].

A todo esto hay que añadir que los olores en la naturaleza son compuestos por muchas moléculas diferentes y que los animales se encuentran en entornos con muchos odorantes. Un número de moléculas odorantes provendrá de determinado objeto de interés y otras serán parte del contexto en el que ese objeto está presente. Sin embargo, toda la escena estará resumida a nivel de los receptores en una única representación sin capacidad de discernir entre cada una de las moléculas que componen dicha escena ¿Cómo hace un animal para extraer la información importante en esa complejidad? ¿Reconoce el animal las distintas partes del todo? Una solución a este problema es que los mecanismos de detección y codificación de olores permitan al animal detectar los olores relevantes con valor predictivo y filtrar aquellos olores que carecen de dicho valor.

Sin embargo, la relevancia de los olores no siempre es la misma. El significado en un olor puede cambiar de un momento a otro, incluso en animales de una misma especie puede ocurrir que para individuos que viven en un determinado lugar y momento sea muy importante un olor mientras que para individuos de otro lugar no lo sea. Por lo tanto, si existen, los

mecanismos responsables de filtrar información sensorial en base a su relevancia no pueden ser del todo fijos.

2.3. Sistema olfativo de vertebrados e invertebrados: estructura y morfología

Tanto los mamíferos como los insectos cuentan con múltiples órganos olfativos (figura 2). Los órganos difieren en su ubicación, en las proteínas receptoras que expresan y en los sitios a los que proyectan sus neuronas en el sistema nervioso central. Es esperable que estas diferencias anatómicas y moleculares impliquen diferencias funcionales, ya sea en los tipos de estímulos que los órganos codifican o en los comportamientos a los que conducen.

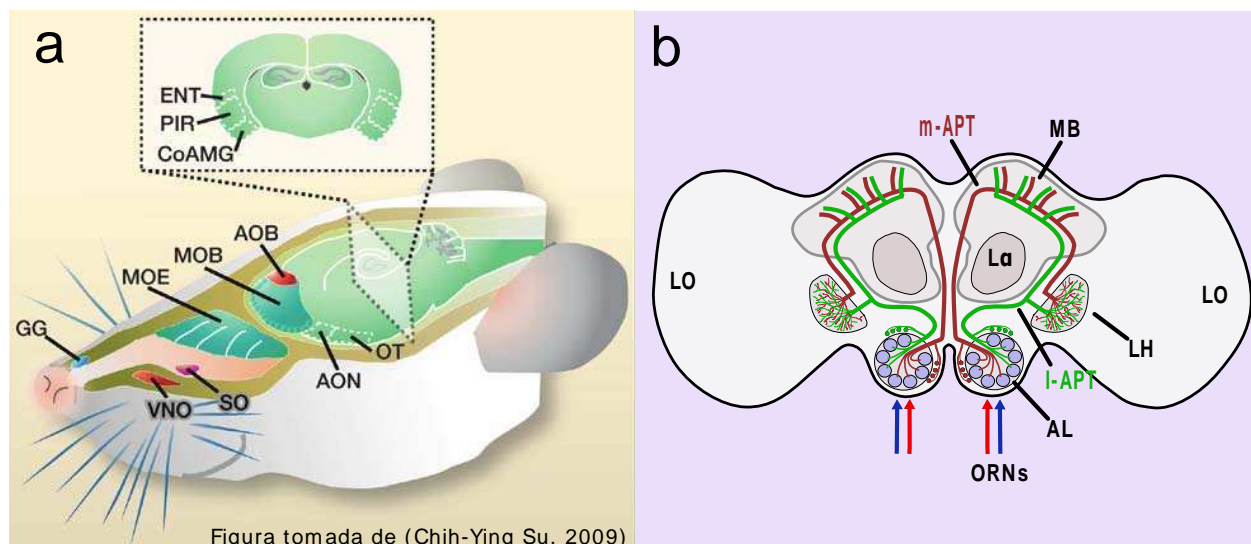


Figura 2: Sistema olfatorio de mamíferos e invertebrados. **a** Imagen sagital de una cabeza de roedores, que muestra cuatro órganos olfativos: el epitelio olfativo principal (MOE), el órgano vomeronasal (VNO), el ganglio Grueneberg (GG), y de órganos septal de Masera (SO). Neuronas olfativas receptoras (ORNs) en el MOE, GG, y SO proyectan al bulbo olfatorio principal (MOB), mientras que las neuronas del VNO proyectan al bulbo olfativo accesorio (AOB). Información olfativa se procesa adicionalmente en regiones superiores del cerebro, tales como el núcleo olfatorio anterior (AON), el tubérculo olfatorio (OT), la corteza entorrinal (ENT), corteza piriforme (PIR), y la amígdala cortical (CoAMG). Recuadro: corte coronal del cerebro. **b** Corte axial del cerebro de abeja. La información olfativa es primero transmitida al lóbulo antenal (AL), que contiene múltiples glomérulos. El procesamiento posterior tiene lugar en el lateral horn del protocerebro (LH) y en las células *Kenyon* en los *mushroom body*. (MB). l-APT y m-APT son los tractos de conectividad entre regiones. El lóbulo alfa (L α) se usa en muchos caso como referencia. LO: lóbulo óptico.

En los mamíferos, se encuentran identificados cuatro órganos olfatorios: El epitelio olfatorio principal que se encuentra en la cavidad nasal dorsal, y sus neuronas sensoriales envían proyecciones a los glomérulos en el bulbo olfatorio principal. El órgano vomeronasal que se

encuentra justo debajo de la cavidad nasal ventral y sus neuronas sensoriales también se proyectan hacia los glomérulos en el bulbo olfatorio. El órgano septal de Masera [Grosmaître *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2003, Kaluza *et al.*, 2004, Tian y Ma, 2004] y el ganglio de Gruenberg también contienen neuronas sensoriales que expresan receptores de olor [Fleischer *et al.*, 2007].

Mientras el epitelio olfatorio principal sensa olores generales los otros tres se especializan en feromonas y olores asociados a comportamientos innatos [Brechtbühl *et al.*, 2008]. Sin embargo, se han descubierto también feromonas que activan las neuronas en el sistema olfativo principal y que la actividad de este sistema es necesaria para varios comportamientos sexuales y sociales [Lin *et al.*, 2004, Luo *et al.*, 2003, Mandiyan *et al.*, 2005, Spehr *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2005]. Asimismo, se ha observado que algunos odorantes generales de los que no se sabe que actúen como feromonas activan el sistema olfativo accesorio y modulan el comportamiento en ausencia de un sistema olfativo principal funcional [Sam *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2005, Trinh y Storm, 2003].

En los insectos también se han reportado múltiples órganos para el olfato (figura 2b). La mosca *Drosophila* adulta cuenta con dos órganos olfativos, la antena y el palpo maxilar. Ambos contienen pelos sensoriales, o sensilias, que contiene las dendritas de hasta cuatro neuronas receptoras del olfato. Las neuronas sensoriales de los diferentes órganos proyectan a glomérulos en diferentes regiones del lóbulo antenal. Aunque estos órganos responden a conjuntos de odorantes solapados, el palpo maxilar se encuentra cerca del labellum que es el principal órgano del gusto en la cabeza y hay evidencia de que la entrada olfativa a través del palpo maxilar mejora los comportamientos mediados por el gusto [Shiraiwa, 2008]. Otros órganos olfativos de insectos incluyen las fosas labiales de las polillas, que responden a CO₂ y algunos odorantes [Bogner *et al.*, 1986].

En resumen, mamíferos e insectos reciben cada uno la entrada olfativa a través de múltiples órganos. Aunque hay un cierto grado de solapamiento en los tipos de estímulos a los que los órganos son sensibles, existe una creciente evidencia de que los diferentes órganos olfativos son funcionalmente distintos y que su cableado a diferentes regiones en el cerebro puede ser la base de las diferencias en la salida comportamental a la que conducen. Es sumamente relevante para nuestro trabajo que los órganos olfativos principales y sus cableados

hacia una primera etapa de procesamiento de mamíferos e invertebrados presentan un alto grado de analogía.

2.3.1. Neuronas sensoriales y Epitelio

Muchas familias de proteínas receptoras olfatorias han sido descubiertas en mamíferos e insectos, y sus roles y diferencias funcionales son objeto de intenso estudio. Los receptores de mamífero se encuentran clasificados en cinco clases (OR, TAAR, V1R, V2R y formyl) y se prevé que todos ellos contienen siete dominios transmembrana y que el mecanismo de transducción es a través de proteínas G. En insectos existen tres familias conocidas de receptores olfativos (OR, GR y RI). Se sabe que algunas de estas variedades son receptores de tipo metabotrópicos asociados a proteínas G mientras otras disparan su señalización a través de canales ionotrópicos [Silbering y Benton, 2010].

Respecto al número total de tipos de receptores y sus funciones sabemos que los genomas de mamíferos contienen entre 250 y 1200 genes para proteínas receptoras dependiendo de la especie [Niimura y Nei, 2007]. Una minoría de ORNs expresa receptores de aminas (TAAR), algunos de los cuales responden a volátiles que se encuentran en la orina y actúan en la detección de las señales sociales [Fleischer *et al.*, 2007, Liberles y Buck, 2006]. Hay aproximadamente 15 genes TAAR en el ratón y se han encontrado en todos los genomas de vertebrados examinados hasta ahora [Hashiguchi y Nishida, 2007]. En el órgano vomeronasal se expresan los receptores de la familia V1R (aproximadamente 200 genes en el ratón), y de la familia V2R (que son alrededor de 100) [Touhara y Vosshall, 2009]. En el ganglio de Grueneberg se expresan un gen V2R y algunos TAAR.

En el genoma de insectos, dependiendo de la especie, existen entre 60 y 340 miembros de la familia de los receptores olfativos OR [Touhara y Vosshall, 2009] y aproximadamente 60 receptores del tipo RI [Benton *et al.*, 2009]. También algunos miembros de la familia del receptor gustativo Gr se expresan en los órganos olfativos, donde se ha encontrado que algunos de ellos median la respuesta al CO₂ [Jones *et al.*, 2007, Suh *et al.*, 2004, Kwon *et al.*, 2007].

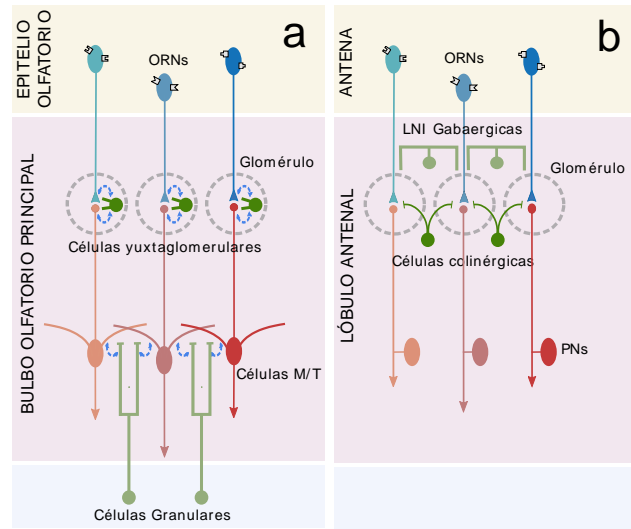
Se ha demostrado que la ausencia de receptores de olor causa una reducción en las respuestas comportamental para odorantes específicos [Dobritsa *et al.*, 2003, Jones *et al.*,

2007, Kreher *et al.*, 2008, Semmelhack y Wang, 2009, Kurtovic *et al.*, 2007]. Sin embargo, la supresión de un OR individual en *Drosophila* no necesariamente elimina la respuesta conductual producida por la detección del odorante [Keller y Vosshall, 2007, Elmore *et al.*, 2003]. Más aun, un estudio de la respuesta a acetato de etilo revela que la respuesta a altas concentraciones depende principalmente de un receptor, mientras que la respuesta a bajas concentraciones depende principalmente de otro [Kreher *et al.*, 2008]. Estos resultados son consistentes con considerar que la representación principal de un olor radica en las actividades diferenciales de la población de receptores de olor. Aunque esta representación se transforma en niveles sucesivos del circuito olfatorio, en última instancia, la percepción y discriminación de olores se funda en el perfil de la actividad de los receptores. La comprensión de la naturaleza de esta representación primaria proviene de un análisis sistemático de las respuestas de los repertorios de los receptores a extensos paneles de olores [Xia *et al.*, 2008, Saito *et al.*, 2009, Hallem y Carlson, 2006, Kreher *et al.*, 2008, Malnic *et al.*, 1999].

Tres principios básicos surgen de este análisis. En primer lugar, odorantes individuales activan subconjuntos de receptores. Esto apoya un modelo de codificación combinatoria, en la que la mayoría de los odorantes no están identificados por la activación de un receptor único, si no por el patrón de receptores que activa. En segundo lugar, los receptores individuales son activados por subconjuntos de sustancias odoríferas y varían en su especificidad a lo largo de un suave y continuo rango. Algunos receptores tienen una sintonía muy amplia respondiendo a muchos odorantes, mientras que otros tienen una sintonía muy fina y responden a muy pocos o a un único odorante. En tercer lugar, las concentraciones más altas de sustancias odoríferas provocan la actividad de un mayor número de receptores. Por lo tanto, el número de receptores activados es indicador tanto de la intensidad del odorante como de la identidad del mismo.

Además de la activación, los receptores muestran inhibición como otro modo de respuesta. Se ha documentado en vertebrados e invertebrados reducción de la actividad ORN basal inducida por el olor [Reisert y Restrepo, 2009]. Por medio del análisis de las respuestas de los receptores de *Drosophila* a olores se ha demostrado que un mismo olor puede activar algunos receptores e inhibir otros, mientras que un receptor individual puede ser activado por algunos olores y ser inhibido por otros. La existencia de dos modos de respuesta puede

Figura 3: Esquema del Bulbo Olfatorio (OB) y el Lóbulo Antenal (AL). **a** El OB es la primer área de procesamiento olfatorio en vertebrados. En él todas las ORNs del mismo tipo (que expresan el mismo receptor) hacen sinapsis con células M/T de un único glomérulo. En los glomérulos las neuronas locales llamadas células juxtglomerulares inhiben las neuronas dentro del glomérulo. Además células granulares inhiben lateralmente las células M/T en capas más profundas. **b** El AL presenta una organización muy similar a la del OB. Las neuronas sensoriales (ORNs) hacen sinapsis con las neuronas de proyección (PNs) en los glomérulos. En ellos, las neuronas locales (LNI) son responsables de inhibición lateral entre glomérulos. Existen también neuronas locales excitatorias (colinérgicas) que producen excitación entre glomérulos.



añadir un grado de libertad a la codificación de olores [de Brito Sanchez y Kaissling, 2005].

2.3.2. Lóbulo Antenal y Bulbo Olfatorio

La representación primaria de un odorante se distribuye a lo largo de un gran número de ORNs. Esta representación se transforma en la primer área de procesamiento de la información olfativa que se denomina bulbo olfatorio en los vertebrados (OB por sus siglas en inglés: olfactory bulb) y el lóbulo antenal en los insectos (AL por sus siglas en inglés: antenal lobe). La representación del olor a este nivel se distribuye como combinación de un número finito de celdas que recibe información de todos los receptores y transmiten información acerca de la presencia e identidad de los olores a otras regiones del cerebro. La estructura y el esquema de conectividad que caracterizan a esta área del cerebro es sorprendentemente similar desde mamíferos hasta insectos (ver figura 3).

En la mayoría de los animales examinados, todas las ORNs que expresan el mismo receptor convergen en uno o dos glomérulos [Maresh *et al.*, 2008, Wilson y Mainen, 2006]. La relación de convergencia es alta, del orden de 50 ORNs por glomérulo en *Drosophila* y de 5000 ORNs por glomérulo en el caso de roedores. En cada glomérulo, las terminales de los axones de ORNs hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas de salida, células mitrales y células en penacho o “tufted cells” en inglés (células M/T) en el caso de mamíferos y las neuronas de proyección en el caso insectos (PNs por sus siglas en inglés: projection neurons). Las células M/T y las PNs reciben entrada excitatoria directa de un solo tipo de ORN (que expresa solo un tipo de receptor de olor). La alta tasa de convergencia de ORNs a las

neuronas de proyección permiten la integración y amplificación de señales muy débiles que corresponden a bajas concentraciones del olor y también permiten el cálculo del promedio de las señales, lo que conduce a una mejor relación señal-ruido en las neuronas de proyección respecto de las neuronas sensoriales.

La actividad de las células M/T y las PNs también está regulada por interneuronas locales. En el bulbo olfatorio de los mamíferos, estas interneuronas se encuentran en dos capas: las interneuronas llamadas células yuxtglomerulares que se encuentran en la capa glomerular y las células granulares que se encuentran en una capa más profunda llamada la capa plexiforme externa (figura 3a). Las células yuxtglomerulares reciben excitación directa de las ORNs y forman sinapsis inhibitorias con los axones de las ORNs dentro del mismo glomérulo. Por su parte, las células granulares forman sinapsis inhibitorias con las células M/T de múltiples glomérulos y median de este modo la transferencia de información entre glomérulos [Shepherd *et al.*, 2007, Wilson y Mainen, 2006]. Por su parte, en el lóbulo antenal de los insectos encontramos interneuronas locales (LNIs por sus siglas en inglés: local neurons) que conectan los glomérulos y son principalmente inhibitorias (figura 3b) [Wilson y Mainen, 2006] aunque también se han encontrado una menor proporción de neuronas locales excitatorias colinérgicas en *Drosophila* y no se descartan en otros insectos [Shang *et al.*, 2007].

Los circuitos del bulbo olfatorio y del lóbulo antenal así como la transformación que realizan entre la información aferente y eferente son estudiados desde el punto de vista anatómico, electrofisiológicos y por medio de estudios de imaging [Laurent, 2002, Wilson y Mainen, 2006].

Una estrategia ideal para el análisis de las transformaciones que ocurren en esta primera etapa de procesamiento es comparar los perfiles de respuesta de las ORNs presinápticas con los de sus correspondientes postsinápticas, las células M/T en vertebrados y las neuronas de proyección en insectos. Este enfoque es conceptualmente simple pero técnicamente complicado. Por ello, los insectos resultan un sistema atractivo debido a su simplicidad en el número de neuronas, organización bien definida y accesibilidad para diversas técnicas. En un estudio basado en registros electrofisiológicos en *Drosophila* se observó que las neuronas de proyección que inervan un glomérulo en particular, el DM2, responden a una gama más

amplia de olores que sus respectivas ORNs presinápticas [Wilson *et al.*, 2004b]. Resultados similares fueron obtenidos para otros seis glomérulos, lo que sugiere que esta ampliación del rango de respuesta representa un principio general del procesamiento olfativo en el lóbulo antenal. Este fenómeno se explica en parte por la existencia de neuronas excitatorias laterales [Olsen *et al.*, 2007, Root *et al.*, 2007, Shang *et al.*, 2007]. Sin embargo, la ampliación de la sintonía en las neuronas de proyección respecto de sus pares presinápticas surge principalmente debido a la alta relación de convergencia entre las ORNs y las neuronas de proyección [Kazama y Wilson, 2008]. Una actividad presináptica débil de varias ORNs que convergen en una única neurona de proyección es suficiente para desencadenar respuestas sustanciales en su par postsináptico y esto es lo que produce la amplificación de la señal. Dado que este fenómeno favorece la representación de estímulos débiles se asume que una de las funciones de la transformación de la señal en el lóbulo antenal sería una amplificación no lineal que permite aumentar la sensibilidad del sistema para muy bajas concentraciones del estímulo [Bhandawat *et al.*, 2007]. Por el contrario, la actividad fuerte de las ORNs provoca una depleción de neurotransmisor que explica por qué fuertes actividades de las ORNs no se amplifican proporcionalmente en las neuronas de proyección. Llamativamente, este fenómeno no se observa en un glomérulo especializado para una feromona sexual en *Drosophila* [Schlieff y Wilson, 2007] lo cual es consistente con un función específica e inequívoca de los canales especializados en transferir información acerca de feromonas. La situación de alta probabilidad de liberación también se ha encontrado en el bulbo olfatorio de los mamíferos [Murphy *et al.*, 2004], lo que probablemente refleja el mismo principio en el procesamiento primario de la información olfatoria en especies evolutivamente alejadas. Estos efectos de amplificación y la aparente menor especificidad en las neuronas de proyección sugieren estudiar en qué medida estos mecanismos contribuyen a las diferencias entre lo que los receptores sensan y lo que el animal en definitiva percibe.

2.3.3. Ordenes más altos de procesamiento olfatorio.

En los vertebrados e insectos, las células de segundo orden (células M/T y PNs respectivamente) inervan múltiples regiones cerebrales. En estas regiones la información olfativa se integra con información de otras modalidades sensoriales, información de la experiencia y del

estado motivacional del animal para instruir el comportamiento guiado por el olfato y otras claves sensoriales [Huetteroth y Waddell, 2011, Krashes *et al.*, 2009]. En los mamíferos, las células M/T hacen sinapsis con neuronas piramidales en la corteza olfativa. La corteza olfativa contiene varias regiones distintas, incluyendo la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior y ciertas partes de la amígdala y la corteza entorrinal. A diferencia de otros sistemas sensoriales, las señales olfativas no se transmiten a través del tálamo antes de llegar a la corteza. Las neuronas corticales olfativas forman conexiones recíprocas con otras neuronas de la corteza olfativa, con neuronas de la corteza orbitofrontal, el tálamo y el hipotálamo, por lo que actúan como sitios de integración. La estimulación con olores evoca normalmente respuestas en sólo una pequeña fracción dispersa de las neuronas corticales que disparan además solo pocos potenciales de acción ante la presencia del olor [Illig y Haberly, 2003, Litaudon *et al.*, 2003, Poo e Isaacson, 2009]. Además, en contraste con sus pares presinápticos, cada neurona de la corteza piriforme responde a muy pocos olores [Litaudon *et al.*, 2003, Poo e Isaacson, 2009]. Por lo tanto, las neuronas corticales parecen estar más estrechamente sintonizadas que sus pares presinápticos y la codificación a diferencia de la etapa anterior no está basada en un esquema de codificación poblacional combinatorio sino en neuronas dedicadas a objetos perceptuales específicos y definidos. A diferencia de las células M/T, cuya actividad está impulsada por un solo tipo de receptor, las neuronas corticales reciben sinapsis de células M/T provenientes de distintos glomérulos y por lo tanto integran información de múltiples receptores distintos [Franks e Isaacson, 2006]. En este sentido, las neuronas piramidales actúan como detectores de coincidencia y sólo disparan potenciales de acción cuando un subconjunto particular de células M/T aferentes son activas de manera sincrónica. Se requiere que la actividad de varias células M/T presinápticas coincida para poder superar la inhibición tónica mediada por neuronas locales inhibitorias que mantienen baja y con alto umbral de disparo la actividad de las células corticales [Poo e Isaacson, 2009]. Dado que es poco probable que un olor active la combinación precisa de los receptores de olor necesaria para activar una neurona piramidal, muy pocas neuronas piramidales disparan ante la presencia de un olor y por lo tanto la codificación es dispersa y olor-específica. Se asume que esta forma de procesamiento aumenta la capacidad del sistema para discriminar odorantes estructuralmente parecidos. Esto último ocurriría gracias a que los requisitos es-

pecíficos de detección de coincidencia de las células piramidales permiten discriminar olores que activan ensambles solapados y apenas distintos de células M/T y aseguran a cada uno de ellos representaciones distintas en las regiones corticales.

En insectos, las neuronas de proyección (PNs) inervan dos áreas del protocerebro, el “*lateral horn*” y los “*mushroom bodies*”. En estos últimos las PNs hacen sinapsis con neuronas denominadas células de Kenyon (KCs). El esquema de codificación de olores en los mushroom bodies distribuido en las células de Kenyon es notablemente similar al de la corteza piriforme. Las células de Kenyon reciben aferencia de múltiples glomérulos a través de las PNs y están más estrechamente sintonizadas que las PNs. Entre las KCs la codificación de olores es dispersa y también depende de la detección de coincidencia ya que reciben una fuerte inhibición global que mantiene baja su actividad y altos los umbrales de activación [Jortner, 2012, Szyszka *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2007, Perez-Orive *et al.*, 2002, Tanaka *et al.*, 2004, Turner *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2004, Jortner *et al.*, 2007].

Una característica relevante tanto de neuronas de la corteza piriforme como de las células de Kenyon es el fenómeno denominado de supresión por mezcla: cuando se estimula con mezclas de olores muchas de las células que serían reclutadas por los olores puros no son activadas por una mezcla que los contiene [Stettler y Axel, 2009, Honegger *et al.*, 2011]. Este fenómeno revela que estas neuronas no solo actúan como detectores de coincidencia sino que son detectoras de ensambles específicos y exclusivos, dado que no responden cuando la suma de células a la que ellas responderían es un subconjunto incluido dentro de un patrón que contiene además otros elementos. Por otro lado, se observa también, que la mezcla activa neuronas que no son activadas por los componentes individuales. Las interacciones supresivas y las sinérgicas, como son los dos casos descritos, explican en parte el hecho de que las mezclas de olores sean percibidas en muchos casos como un objeto distinto al de la suma de sus componentes y plantea uno de los principales interrogantes que motivan esta tesis, que es cómo hacen los animales para detectar la presencia de un olor importante cuando este está presente en una mezcla.

2.4. Rol de las neuronas locales inhibitorias en la codificación

Hasta aquí hemos presentado la estructura general de los sucesivos niveles de procesamiento de la información olfativa. Hemos visto que la información transducida por las proteínas receptoras es transferida desde las neuronas sensoriales a las neuronas de segundo orden en el AL o en el OB donde el circuito muestra gran convergencia y una precisa organización espacial. Se ha demostrado que las etapas del AL y OB no son meras estaciones de relevo donde la información es fielmente transferida de las neuronas sensoriales a sus pares postsinápticas, sino que hay aquí un procesamiento de la señal por el cual la información acerca de olores emerge con una precisa organización espacio-temporal de la actividad de las neuronas eferentes que relevan la información a la siguiente estructura del cerebro.

Es sabido que la transformación de la señal en estructurados patrones espacio-temporales de la actividad está relacionada con la forma en la cual las neuronas corticales y de Kenyon integran y computan información del estímulo para reconstruir la identidad del olor y convertirlo en el objeto específico percibido. Por lo tanto, la estructura de los patrones de actividad que emergen debe contener información que codifique fielmente características representativas del olor, debe tener un control del nivel de actividad que no sature a las etapas subsiguientes y debe tener una organización temporal tal que cumpla con los requerimientos para la integración en neuronas de otras áreas del cerebro [Raman y Stopfer, 2008]. Es interesante que en términos generales esta etapa de adecuación de las señales se encuentra presente no solo en el olfato sino también en otras modalidades. Por lo tanto, el estudio comparado permite abordar problemas computacionales de integración mucho más generales.

El procesamiento local de la información en el OB y AL son el resultado de la acción de las neuronas inhibitorias locales, que regulan los rangos de actividad general, median interacciones entre los distintos canales de información (los glomérulos) y condicionan la actividad eferente a una organización temporal que sincroniza la actividad de las neuronas eferentes. A continuación se resumen las evidencias de la ocurrencia de estas adecuaciones de la señal en el bulbo olfatorio y el lóbulo antenal y el rol de las neuronas inhibitorias locales.

2.4.1. La organización temporal

Como se ha dicho anteriormente, las neuronas de la corteza olfativa en vertebrados y las células de Kenyon en insectos actúan como detectores de patrones específicos de activación de las neuronas que provienen de diferentes glomérulos. Se sabe además que si dos neuronas que hacen sinapsis con una tercera disparan simultáneamente sumarán sus actividades con más eficiencia que si lo hacen separadas. Por lo tanto, los ensambles de las células M/T o PNs que hacen sinapsis con una determinada neurona piramidal o célula de Kenyon deberán mostrar sincronía de sus disparos para poder sumar la excitación que supere la inhibición tónica y genere actividad en su par postsináptico. Consistente con ello, se ha observado que la estimulación con olor evoca oscilaciones en el potencial de campo en el OB y en el AL, lo que evidencia la sincronía de disparo de las neuronas de proyección [Laurent, 2002]. Además se comprobó que la interrupción de la sincronía afecta la capacidad en abejas para discriminar olores [Stopfer *et al.*, 1997]. Este resultado es consistente con la hipótesis de que la sincronía en los disparos de las PNs mejora la codificación y por lo tanto la agudeza olfativa. Un mecanismo por el que la actividad entre células M/T y PNs se sincroniza es explicado por la presencia de retornos y circuitos locales inhibitorios. En concordancia con esta idea se ha demostrado que la conexión entre neuronas por medio de inhibiciones en el lóbulo antenal es responsable de las oscilaciones medidas en el potencial de campo a la salida del lóbulo antenal [Galán *et al.*, 2006]. En consistencia con esto, en el trabajo de Stopfer y colaboradores al que se hace mención en el párrafo anterior, se ha comprobado que la actividad oscilatoria es suprimida por el antagonista del receptor de tipo GABA-A, Picrotoxina, la que a su vez afecta el reconocimiento y aumenta la generalización entre olores.

2.4.2. Control de ganancia

He mencionado que parte de la adecuación de la señal que se produce en la primera etapa de procesamiento olfativo es una amplificación de tipo no lineal, por la cual las señales pequeñas a nivel de las neuronas sensoriales logran evocar respuesta en las neuronas postsinápticas y por la cual señales intensas a nivel de las ORNs lograrían no saturar la capacidad de codificación de las neuronas de proyección [Zhu *et al.*, 2013]. Esta función tiene

enorme relevancia en contextos naturales en los cuales los animales pueden encontrarse con una enorme gama de concentraciones de olores. Para ello es necesaria una relación móvil entre la tasa de disparo de las ORNs y la de las neuronas de proyección tal que permita percibir señales pequeñas e impida la saturación de las PNs cuando las señales en las ORNs son altas [Kazama y Wilson, 2008].

El significado del control de ganancia queda más clara si miramos la figura 4 en la que se grafica esquemáticamente la magnitud de un parámetro de salida en función de la intensidad de un parámetro de la entrada. El rango de valores en el eje X representa el rango de actividad evocada a nivel de la entrada (por ejemplo la tasa de disparo de las neuronas sensoriales). Mientras que en el eje Y tenemos el rango de respuestas a la salida (por ejemplo la frecuencia de disparo en las neuronas de proyección o células M/T). Vemos en la línea negra que por ejemplo hay una región en la que la actividad en la entrada no es suficiente para evocar actividad en la salida. Luego a medida que la entrada aumenta también lo hace la salida con una dada pendiente hasta llegar a saturar la salida (punto en el que la entrada aun aumenta pero la salida no lo hace). Si por algún mecanismo el sistema logra pasar de la respuesta de la curva negra a la de la curva roja, lo que tendremos como resultado es que para el mismo rango de salida el sistema será capaz de codificar un rango mayor de entradas. Como se ve por el hecho de que las líneas punteadas verticales se desplazaron hacia la derecha.

En el caso de insectos se ha medido que las ORNs responden a olores en un rango de hasta ocho órdenes de magnitud [Hallem y Carlson, 2006], lo cual lleva también a interrogantes acerca de cómo una gama tan amplia de intensidades de estímulo puede ser codificada de manera eficiente en base a los rangos de frecuencia de disparo relativamente estrechos que poseen las ORNs y las PNs [Stopfer *et al.*, 2003]. Los mecanismos responsables del aumento de la señal en caso de estímulos débiles han sido descritos en párrafos anteriores y adjudicados a la alta probabilidad de liberación de las ORNs y a la alta relación de convergencia de ORN a PN. El mecanismo de control de ganancia que opera a alta intensidad de estímulos está, hasta donde se sabe, mediado por las interneuronas locales inhibitorias de tipo global, que reciben input directo de las neuronas sensoriales e inhiben proporcional e inespecíficamente a todos los glomérulos y además, por las interneuronas inhibitorias dedicadas que median inhibiciones específicas de un glomérulo a otro. Estas neuronas, en su gran mayoría GABAérgicas, actúan

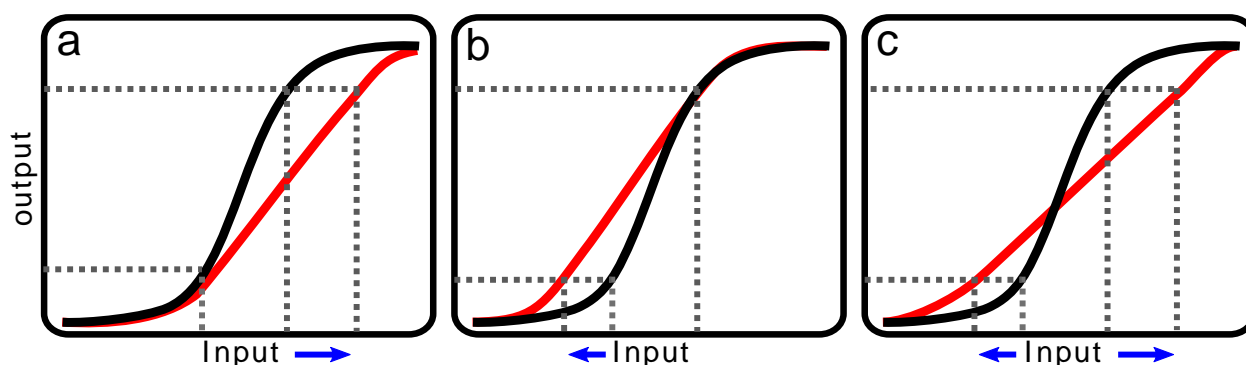


Figura 4: Esquema de control de ganancia. Se observan dos posibles curvas de salida en función de la entrada. Con líneas punteadas se marcan las regiones en las que cada curva presenta una respuesta distinta para la misma entrada. Notar que para valores fuera de las líneas punteadas la salida no cambia a pesar de que la entrada sí lo hace. De este modo la curva negra puede codificar en rango de entrada menor que el de la curva roja. Diremos entonces que en la curva roja hay mayor control de ganancia y esto le permitirá al sistema barrer mayores rangos de entrada pudiendo dar una respuesta dependiente del valor de la entrada. Se dice también que la curva roja tiene mayor rango dinámico que la curva negra. Existen muchas posibles estrategias para adecuar la relación entrada-salida. En la figura se esquematizan algunas opciones, con flechas azules se muestran los cambios en el rango dinámico de entrada entre una y otra curva. **a** La curva roja muestra un aumento en la región de respuesta debido a una disminución en la amplitud para valores altos en la entrada. **b** El aumento en el rango dinámico se produce como resultado de aumentar la actividad de salida en valores bajos de la entrada. **c** Se observa un aumento en el rango dinámico por la combinación de los efectos mostrados en **a** y **b**.

principalmente a través de receptores de tipo GABA-A, reciben input directo de las ORNs y hacen sinapsis con PNs y ORNs, por lo que a mayor entrada sensorial, mayor la fuerza de inhibitoria que controla al input excitatorio [Olsen y Wilson, 2008, Zhu *et al.*, 2013, Silbering y Galizia, 2007]. Lejos de poder establecer mapas precisos de interacciones laterales que permitan predecir procesamientos y competencias específicas entre glomérulos, lo que se sabe es que la distribución espacial de los sitios pre y postsinápticos de cada neurona inhibitoria es altamente heterogéneo y la fuerza inhibitoria de una neurona local puede variar de un glomérulo a otro [Root *et al.*, 2008, Girardin *et al.*, 2013]

El bulbo olfatorio de mamíferos también exhibe inhibición presináptica, mediada principalmente por conexiones intraglomerular [McGann *et al.*, 2005]. Las células yuxtglomerulares reciben input excitatorio directo desde las ORNs y forman sinapsis inhibitorias dentro del mismo glomérulo, proporcionando de este modo la inhibición por retroalimentación intraglomerular que extiende el rango dinámico del glomérulo. Sin embargo la fuerza de la inhibición parece independiente de la actividad de las ORNs [Pírez y Wachowiak, 2008], lo que sugiere un mecanismo diferente al de *Drosophila*.

2.4.3. La organización espacial

Las diferencias encontradas al comparar los patrones espaciales de activación glomerular a nivel de las terminales de las ORNs y a nivel de las dendritas de las PNs (entrada y salida del AL respectivamente) constituyen evidencia directa del procesamiento local y la labor de las neuronas locales [Silbering *et al.*, 2008, Sachse y Galizia, 2003]. Esas evidencias son diversas y han llevado a interpretaciones a veces encontradas tal como trabajos que reportan que la actividad de las neuronas de proyección es menos específica y de sintonía más amplia que sus pares presinápticas [Shang *et al.*, 2007, Bhandawat *et al.*, 2007] y los que han reportado que hay un afinamiento de la sintonía en la neuronas de proyección por fenómenos de inhibición lateral que reducen el ruido, mejoran el contraste y aumentan la separación entre patrones [Stopfer *et al.*, 1997, Sachse y Galizia, 2003]. La posibilidad de diferentes mecanismos adaptados a especies con requerimientos distintos y las diferencias por las metodologías utilizadas tales como electrofisiología o registro de actividad por imaging de calcio pueden explicar las discrepancias mencionadas.

La representación de mezclas de olores brinda evidencia más clara de la existencia de interacciones laterales entre glomérulos y de la transformación de la información en el lóbulo antenal. A menudo se observa que la representación de una mezcla de dos olores AB, no corresponde a la suma de los patrones de activación de los olores A y B por separado. Tomando el caso de la mezcla AB, se observa a menudo que un glomérulo X normalmente activado por el olor A, no muestra activación cuando se estimula con la mezcla AB. Este tipo de interacción se explica por la existencia de una inhibición lateral desde alguno o varios de los glomérulos activados por el componente B hacia el glomérulo X activado por el componente A [Joerges *et al.*, 1997, Deisig *et al.*, 2006]. También puede observarse casos en que la mezcla activa un glomérulo Y, que no es activado por ninguno de los dos componentes por separado, lo cual revela una interacción sinérgica entre ambos componentes [Silbering y Galizia, 2007]. El trabajo Silbering y Galizia (1997) demuestra, además, que las interacciones laterales excitatorias e inhibitorias evidentes con mezclas emergen principalmente desde las PNS y que en cambio los patrones de activación de las ORNs reflejan con mayor fidelidad a los componentes de la mezcla. El rol de las inhibiciones laterales queda comprobado por

el hecho de que al aplicar picrotoxina, antagonista de receptores GABA-A, se eliminan las supresiones por mezcla.

La existencia de interacciones laterales entre glomérulos ofrece una explicación neurobiológica a fenómenos observados en estudios de aprendizaje, tales como el ensombrecimiento [Deisig *et al.*, 2001, Smith, 1998]. El ensombrecimiento entre estímulos se observa cuando los animales son entrenados con un estímulo compuesto, luego testeados con uno de los componentes por separado, y se verifica que los animales aprenden menos de ese componente que si hubiesen sido entrenados con el componente solo. En base a lo explicado antes acerca de inhibiciones laterales entre glomérulos, el caso de ensombrecimiento podría entenderse como un fenómeno de inhibición lateral por el cual uno de los componentes de la mezcla inhibe la activación de un elemento que es necesario para la codificación y reconocimiento del otro componente y por eso no es aprendido durante el entrenamiento con la mezcla a pesar de haber estado el olor presente.

Una pregunta fundamental aun no respondida y que motiva también las hipótesis de esta tesis es como se establece y se regula la función de las inhibiciones laterales; que glomérulos inhiben a cuales, y cuan rígido o plástico cierto orden de jerarquías en el patrón de inhibiciones laterales. Trabajos apuntados a entender la lógica estructural, la conectividad y polaridad de las interneuronas locales inhibitorias muestran gran variabilidad y heterogeneidad [Girardin *et al.*, 2013] y dejan abierta la posibilidad de que en gran medida las inhibiciones y relaciones jerárquicas entre glomérulos sean definidas en base a la experiencia y requerimientos específicos.

2.5. Modelos: de la neurona al circuito (Hodgkin y Huxley).

La mayoría de las ideas presentadas hasta aquí son también sujeto de estudio de enfoques computacionales. El problema de cómo organizar una serie de características que identifican una entrada y permiten computar y determinar la identidad de la señal entrante es un problema que puede ser simulado y resuelto en modelos computacionales. De este modo, así como el estudio del problema biológico puede resolver problemas computacionales, los problemas de organización y codificación de información computacional, pueden ayudar a entender el

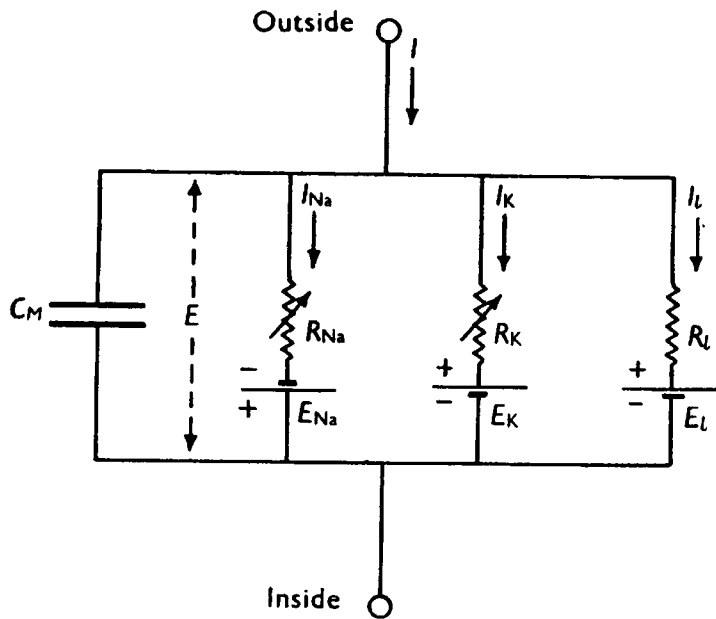


Figura 5: Esquema eléctrico análogo para el potencial de membrana. Se puede ver un esquema del circuito eléctrico de la membrana en el axón gigante del calamar propuesto por Hodgkin y Huxley en 1952. La membrana tiene una capacidad eléctrica (C_M), y tres resistencias con potenciales de reposos independientes. Cada una de las resistencias sintetizan el aporte de un portador de carga Na y K (I_{Na} , I_K) y una corriente de fuga (I_L). Cada una tiene asociados sus respectivos potenciales de equilibrio (V_{Na} , V_K y V_L).

procesamiento de información sensorial. De hecho si encontramos que un sistema biológico se basa en cierta información para determinar la identidad de un estímulo deberíamos ser capaces de reproducir ese procesamiento computacionalmente y así poder comprobar que la información es suficiente para realizar el algoritmo. En el presente trabajo se realizaron simulaciones computacionales para evaluar hipótesis de conectividad y funcionamiento del lóbulo antenal. La aproximación computacional constituye además en algunos casos, como en este, la única herramienta disponible para evaluar la factibilidad de algunas hipótesis ya que los experimentos no son aun técnicamente posibles.

Como lo que estudiaré son propiedades de una red de neuronas, primero se debe poder modelar y simular numéricamente la actividad eléctrica, la concentración intracelular de calcio y la actividad sináptica de una única neurona. Para eso utilizo el modelo biofísico que expresa el potencial de membrana de una neurona y su capacidad de disparar potenciales de acción de Hodgkin y Huxley [Hodgkin y Huxley, 1952]. Lo que ellos observaron realizando mediciones electrofisiológicas del axón gigante del calamar, es que el potencial de membrana se comportaba como el circuito RC de la figura 5.

Donde C_M es la capacidad eléctrica que tiene la membrana, las tres resistencias variables (R_{Na} , R_K y R_L) permiten pasar una corriente (I_{Na} , I_K y I_L) respectivamente. I_{Na} será una corriente de Na, I_K de K y I_L de fuga. Cada una de las resistencias sintetizan el aporte de un portador de carga y tienen asociado sus respectivos potenciales de reposo (V_{Na} , V_K y V_L).

Si escribimos las ecuaciones para este circuito tenemos la ecuacion 1.

$$C_M \cdot \frac{\partial V}{\partial t} = g_L \cdot (V - V_L) + g_{Na} \cdot (V - V_{Na}) + g_K \cdot (V - V_K) \quad (1)$$

Donde las conductancias g_i refieren a la permeabilidad que tiene la membrana a cada una de las moléculas cargadas y es el inverso de la resistencia ($g_i = 1/R_i$). Estas ecuaciones, si las conductancias son constantes, no tienen como dinámica posible el disparo de potenciales de acción. La dinámica es lineal y a lo sumo tendremos como resultado cargas y descargas exponenciales del capacitor. Eso sabían Hodgkin y Huxley cuando presentaron el modelo y a pesar de no conocer la existencia de los canales dependientes de voltaje se dieron cuenta que era necesario (para obtener dinámicas como las de los potenciales de acción) que estas conductancias tuvieran una dinámica no lineal propia. Por esto propusieron las ecuaciones (2), (3), (5) y (4) que predicen la necesidad de canales con aperturas y cierres poblacionales dependientes del potencial de membrana.

$$C_M \cdot \frac{\partial V}{\partial t} = g_L \cdot (V - V_L) + g_{Na}^- \cdot m^3 \cdot h \cdot (V - V_{Na}) + g_K^- \cdot n^4 \cdot (V - V_K) \quad (2)$$

Donde ahora el aporte de las corrientes de fuga sigue siendo lineal pero tanto Na como K tienen conductancias dependientes de potencias. g_{Na}^- y g_K^- indican conductancias constantes que son las llamadas conductancias a canal abierto (que pueden medirse mediante experimentos electrofisiológicos de “*pach clamp*”). Pero como se puede observar están multiplicados por funciones no lineales de unas nuevas variables n, h, y m. Estas variables dependen del potencial de membrana según las ecuaciones (3), (4) y (5). Que son normalmente interpretadas como estados de apertura o cierre de los canales correspondientes.

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \alpha_n \cdot (1 - n) + \beta_n \cdot n \quad (3)$$

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \alpha_m \cdot (1 - m) + \beta_m \cdot m \quad (4)$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} = \alpha_h \cdot (1 - h) + \beta_h \cdot h \quad (5)$$

Estas son ecuaciones de poblaciones bastante estándar. En este caso α_n , β_n , α_h , β_h , α_m y β_m son funciones que dependen del potencial. Para escribir estas funciones de manera

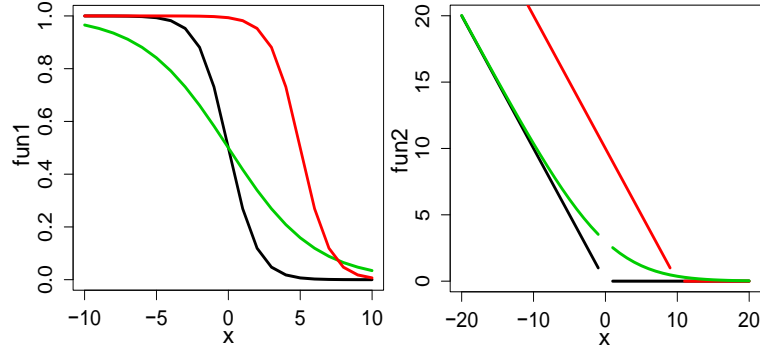


Figura 6: Funciones complementarias. En la figura se observan los gráficos de las funciones $fun1$ y $fun2$ que son necesarias para describir la dinámica de las conductancias del modelos de Hodgkin y Huxley [Hodgkin y Huxley, 1952]. En negro se encuentran las curvas $fun_1(x, 0, 1)$ (izquierda) y $fun_2(x, 0, 1)$ (derecha). Al aumentar el valor de y las funciones se desplazan, como ejemplificamos con $fun_1(x, 5, 1)$ y $fun_2(x, 10, 1)$ graficadas en rojo. Al aumentar el valor de z las funciones suaviza sus curvaturas. En verde vemos las curvas correspondientes a las funciones $fun_1(x, 0, 5)$ y $fun_2(x, 0, 5)$. Es necesario aclarar que fun_2 tiene problemas de definición en cero. En las simulaciones numéricas esto se resuelve interpolando la función por una recta en las zonas cercanas a la discontinuidad.

compacta y prolija es necesario introducir dos funciones (eq. 6 y eq. 7) que enunciamos y graficamos para que sea más simple visualizarlas. Además simplificarán la presentación de nuestras simulaciones.

$$fun_1(x, y, z) = \frac{1,0}{1,0 + e^{\frac{x-y}{z}}} \quad (6)$$

$$fun_2(x, y, z) = \frac{x - y}{e^{\frac{x-y}{z}} - 1} \quad (7)$$

Que al graficarlas tenemos la figura 6.

Con estas funciones Hodgkin y Huxley ajustaron las mediciones electrofisiológicas y postularon que las funciones α_n , β_n , α_h , β_h , α_m y β_m están descritas por las ecuaciones 8, 9, 10, 11, 12 y 13 respectivamente.

$$\alpha_n = 0,01 \cdot fun_2(V, -10, 10) \quad (8)$$

$$\beta_n = 0,125 \cdot e^{\frac{V}{80}} \quad (9)$$

$$\alpha_h = 0,07 \cdot e^{\frac{V}{20}} \quad (10)$$

$$\beta_h = fun_1(V, -30, 10) \quad (11)$$

$$\alpha_m = 0,1 \cdot fun_2(V, -25, 10) \quad (12)$$

$$\beta_m = 4 \cdot e^{\frac{V}{18}} \quad (13)$$

Estas ecuaciones pueden resolverse numéricamente y una posible respuesta a un estímulo de corriente entrante es el disparo de potenciales de acción. En el modelo original de Hodgkin y Huxley solo se consideraron las corrientes de Na y K pero en base a esta idea se puede modelar y simular cualquier neurona. Si conocemos los canales que expresa y contamos con caracterizaciones electrofisiológicas de éstas, cada nuevo canal o corriente puede ser incorporado en el modelo y recuperar así la dinámica de la neurona estudiada. Existen modelos y resultados que muestran que es posible simular las neuronas del lóbulo antenal y estudiar distintas estructuras de cómo estas se conectan [Bazhenov *et al.*, 2001]. Para ello, primero se determina una red de conectividad en la que se establecen todos los contactos de la red. Luego cuando se calcula el potencial de cada neurona se cuenta cuantas neuronas que hacen sinapsis con esta están activas y se inyecta una corriente proporcional que representa las corrientes sinápticas. Existen modelos de diferentes tipos de sinapsis y dinámica de diferentes tipos de neurotransmisores que pueden ser incorporados en las simulaciones.

2.6. Aprendizaje olfativo y plasticidad en el lóbulo antenal

Un estímulo olfativo puede provocar diferentes percepciones dependiendo de la experiencia previa. En roedores, ha sido observado que las representaciones neurales de olores en regiones superiores del cerebro, así como el bulbo olfatorio son dictadas no sólo por la estructura del odorante sino también por la experiencia [Wilson *et al.*, 2004a]. En los insectos, los mushroom bodies son sitios fundamentales para el aprendizaje olfativo y la formación de memoria y por ello se han llevado la mayor atención de estudios de los mecanismos de plasticidad relacionados con aprendizaje y memoria [Okada *et al.*, 2007, Cassenaer y Laurent, 2007, Strube-Bloss *et al.*, 2011, Keene y Waddell, 2007, Busto *et al.*, 2010]. Sin embargo, existe también evidencia acerca de cambios en el lóbulo antenal relacionados con aprendizaje y memoria olfativa [Sandoz *et al.*, 2003, Faber *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2004, Fernandez *et al.*, 2009, Locatelli *et al.*, 2013]. Por un lado se ha encontrado que los estímulos incondicionados utilizados en protocolos de condicionamiento olfativo evocan una robusta actividad en el AL donde esta información converge con los patrones de actividad evocados por los olores [M., 1993, Yu *et al.*, 2004]. Este hecho sugiere al AL como posible sitio detector de la coinciden-

cia y como substrato de modificaciones que contribuyan al aprendizaje olfativo asociativo. Además, las aminas biogénicas octopamina y la dopamina son liberadas en el lóbulo por neuronas que transmiten información sobre estímulos incondicionados apetitivos y aversivos respectivamente [M., 1993, Farooqui *et al.*, 2003, Schwaerzel *et al.*, 2003, Riemensperger *et al.*, 2005, Farooqui, 2007, Aso *et al.*, 2010, Sinakevitch *et al.*, 2011, Sinakevitch *et al.*, 2013] . La administración de octopamina en el AL simultánea a la estimulación con olor, modula la actividad evocada por este último y genera un aprendizaje apetitivo hacia el olor [Rein *et al.*, 2013, Hammer y Menzel, 1998]. A su vez, el bloqueo de los receptores de octopamina en el lóbulo antenal de *Drosophila* (DmOA1) y de abeja (AmOA1; [Farooqui *et al.*, 2003]) impide el aprendizaje olfativo.

El lóbulo antenal es también sitio importante para el aprendizaje de tipo no asociativo. En *Drosophila*, la habituación olfativa, lo cual es un aprendizaje evidente por la reducción de la respuesta olfativa causada por la exposición repetida a un olor, depende de mecanismos de plasticidad sináptica localizados en el AL [Das *et al.*, 2011, Sudhakaran *et al.*, 2012]. En dicho caso, se demostró que la activación prolongada con un olor conduce a un fortalecimiento de las sinapsis que inhiben las neuronas de proyección activadas por el olor expuesto [Sachse *et al.*, 2007].

Experimentos de imaging de calcio y electrofisiología han demostrado que el aprendizaje olfatorio modifica la representación del olor condicionado en el lóbulo antenal [Sandoz *et al.*, 2003, Arenas *et al.*, 2009, Daly *et al.*, 2004, Faber *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2004, Fernandez *et al.*, 2009]. Sin embargo, la interpretación de estos cambios es actualmente tema de debate ya que los cambios observados a nivel del lóbulo, indicarían que la experiencia modifica la representación primaria de los olores. Esta observación parece contradecirse con el concepto de un código olfatorio que asume una correspondencia de identidad entre un olor y el patrón de actividad neuronal evocado. En otras palabras, si el reconocimiento de un olor depende de una representación neuronal repetible y específica, ¿cómo hace un animal para reconocer el olor condicionado, si la representación del mismo cambia como resultado del aprendizaje? Este interrogante ha sido también motivación para parte de las hipótesis y experimentos que presento a continuación en esta tesis

2.7. Abejas y aprendizaje olfativo

El aprendizaje y la memoria son funciones esenciales del cerebro que ayudan a los animales a desenvolverse con aptitud en ambientes diversos y cambiantes. En este sentido, el aprendizaje olfativo juega un rol central en la vida de muchos animales ya que permite optimizar comportamientos relacionados con búsqueda de alimento y de pareja y evitar peligros. El sistema olfativo de los insectos ha sido y es un modelo canónico para el estudio de los mecanismos relacionados con aprendizaje olfativo debido a la existencia de comportamientos y aprendizajes olfativos estereotipados, fácil acceso a los circuitos involucrados para distintas técnicas y como ya fue dicho anteriormente resulta de interés por su analogía estructural y funcional con el sistema olfatorio de organismos superiores.

Las abejas se alimentan de diferentes tipos de flores cuya disponibilidad varía drásticamente dependiendo razones geográficas y estacionales. Sin embargo, en ese contexto variable, las abejas muestran adaptarse gracias a una gran habilidad para detectar y discriminar olores y a un variado repertorio de aprendizajes. Distintos paradigmas de aprendizaje olfativo han sido estudiados y descritos en abejas *Apis mellifera* [Hammer y Menzel, 1995, Menzel, 2001] que pueden ser combinados con mediciones de la representación de los olores en los lóbulos antenales [Peele *et al.*, 2006, Sandoz *et al.*, 2003, Faber *et al.*, 1999, Fernandez *et al.*, 2009, Locatelli *et al.*, 2013]. Además, es posible estudiar la similitud entre olores a nivel comportamental en grandes matrices de olores, y así obtener una métrica del espacio perceptual que puede ser correlacionada con la representación interna de los olores [Guerrieri *et al.*, 2005, Laska *et al.*, 1999]. En las abejas en particular hay 60.000 ORNs en las antenas. Sus axones proyectan a los lóbulos antenales, que se subdividen en aproximadamente 160 glomérulos identificados. La identificación de los glomérulos se basa en su forma y posición relativa en el AL y son fácilmente reconocibles de un individuo a otro [Flanagan y Mercer, 1989, Galizia *et al.*, 1999]. Los glomérulos están interconectados por unas 4.000 interneuronas locales, y de los glomérulos parten unas 800 neuronas de proyección que conducen información del olor a los centros cerebrales de orden superior. Mediante el uso de imaging de calcio es posible medir patrones de actividad glomerular evocados por los olores en aproximadamente 20 a 30 de los 160 glomérulos [Joerges *et al.*, 1997, Galizia *et al.*, 1997, Galizia

et al., 1998] . Los resultados de estos estudios muestran que cada olor provoca un mosaico de glomérulos activados, y que cada glomérulo puede tomar parte en el mosaico de varios olores. Como se dijo en la sección anterior los patrones de actividad cambian en base a la experiencia de cada individuo con los olores [Daly *et al.*, 2004, Arenas *et al.*, 2009, Sandoz *et al.*, 2003, Faber *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2004, Fernandez *et al.*, 2009, Sandoz *et al.*, 2003].

En este proyecto he trabajado para entender el significado y el origen de los cambios que ocurren en el AL como consecuencia de un aprendizaje olfatorio apetitivo bajo la hipótesis de que los cambios en el lóbulo antenal tienen como objeto facilitar la detección de olores relevantes y con valor predictivo. La capacidad para detectar y reconocer componentes con valor predictivo es necesidad fundamental de los animales ya que en la naturaleza los olores no se presentan como olores simples, sino que normalmente están presentes conformando mezclas con otros olores que pueden enmascarar la detección. Por ello, a diferencia de trabajos previos, realicé los trabajos basados en el uso de mezclas de olores y estudié la capacidad del sistema olfatorio para codificar y detectar un olor relevante embebido en una mezcla.

2.8. Hipótesis y objetivos

2.8.1. Parte I

En situaciones naturales los animales se encuentran en ambientes con muchos odorantes. Algunos de ellos provienen de objetos de interés (cosas de las que el animal obtiene provecho al detectar), mientras que otros que no son informativos pueden enmascarar la detección de los primeros. Como fue explicado en la introducción, el enmascaramiento puede ocurrir porque el sistema olfatorio funciona basado en la activación combinatoria de receptores generalistas que no identifican moléculas sino características de ella. Por lo tanto las neuronas que colectan e integran información de esas características no tienen forma de descifrar si determinado ensamble de neuronas activas proviene de un único tipo de moléculas, o de dos o más moléculas que reúnen las mismas características que la primera. En este esquema de codificación puede ocurrir que una mezcla sea percibida como un objeto distinto y los componentes no sean percibidos.

A lo largo de esta tesis he trabajado para entender sí la experiencia contribuye a resolver

el problema de cómo detectar los componentes que si son importantes sin ser confundidos por componentes que no son relevantes. Se ha observado previamente que la experiencia modifica la representación de los olores en el lóbulo antenal y en esta tesis he propuesto que las modificaciones están relacionadas con recalibrar los pesos y fuerzas de las inhibiciones laterales en el AL para priorizar la activación de ensambles de neuronas que aseguran la identificación de componentes relevantes y reducen la posibilidad de que, los que no lo son, los enmascaren. Este tipo de cambio facilitaría notablemente la detección e identificación de los objetos de interés en otras áreas del cerebro donde las decisiones comportamentales son tomadas en base al olor percibido.

Hipotesis I: Por lo tanto la primera hipótesis de esta tesis es que la experiencia con olores conduce a cambios en la representación de olores en el lóbulo antenal, tal que estos cambios favorecen la codificación de olores relevantes y reduce la representación de los que no lo son.

Objetivo I: Realizar mediciones de la actividad de las neuronas de proyección evocada por olores puros y mezclas. Estudiar la existencia y función de cambios en la codificación relacionados con la experiencia. Identificar posibles sujetos de la plasticidad.

2.8.2. Parte II

Los olores relevantes no se presentan en la naturaleza siempre a la misma concentración. De acuerdo a lo explicado en las secciones de la introducción sabemos que en la medida en que aumente la concentración de un olor aumentará la probabilidad de que receptores menos afines sean excitados y comiencen a participar del patrón de activación y vimos también que la incorporación de elementos en un ensamble de neuronas puede llevar a dejar de reconocer el olor para pasar a ser cualitativamente otro olor. Esta situación es poco deseable para un animal que precisa reconocer la identidad del olor en todo su rango. En la hipótesis y objetivos de la primera parte asigné a las neuronas inhibitorias un rol fundamental para ajustar el procesamiento de lóbulo antenal de manera que se optimice la codificación de los olores relevantes. En esta segunda parte estudié el rol de las neuronas inhibitorias entre los mecanismos de control de ganancia del lóbulo antenal que impiden la saturación de las señales y permiten la codificación de un olor a lo largo de un rango amplio de concentraciones.

Hipotesis II: Las neuronas inhibitorias contribuyen al control de ganancia y permiten el reconocimiento de olores independientemente de su intensidad.

Obetivo II: Realizar un modelo computacional del lóbulo antenal que permita estudiar el funcionamiento de la red y el rol de la neuronas inhibitorias ante estímulos de distintas intensidades. Medir la respuesta de las neuronas de proyección a distintas concentraciones de olor con y sin la actividad de las neuronas inhibitorias.

Las hipótesis I y II están estrechamente ligadas puesto que ambas estudian a las neuronas inhibitorias del lóbulo antenal como actores esenciales de las modificaciones que sufre la representación del estímulo olfativo desde las neuronas sensoriales a las neuronas proyección. En ambos casos la adecuación de las señales es en la dirección de permitir una codificación de los patrones de actividad en objetos perceptuales asociables a recuerdos y significados.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales

Los animales utilizados en todos los experimentos fueron abejas *Apis mellifera* recolectoras de polen que fueron capturadas en la entrada de dos colmenas regulares ubicadas en el predio de Ciudad Universitaria de la Universidad de Buenos Aires ($34^{\circ} 32' S; 58^{\circ} 6' W$). Es importante hacer énfasis en que las abejas se encontraban en entornos abiertos con la posibilidad de forrajear tanto en Ciudad Universitaria como en sus alrededores. De modo que la experiencia de los animales previa a los experimentos lejos de ser homogénea para todos los animales será variable, ya que cada uno contará con experiencias en entornos muy ricos en estímulos olfatorios sin ningún tipo de restricción. Para capturar a las abejas se bloqueaba el ingreso a la colmena, la piquera, y se esperaba que abejas forrajeras regresaran a la colmena. Esto nos aseguró que los animales elegidos tienen edades en un rango que van desde las tres hasta cinco semanas de vida. Al intentar entrar por la piquera bloqueada los animales eran capturados en tubos de vidrio con orificios para que circule el aire. Para detectar abejas forrajeras y diferenciarlas del resto de los animales en la piquera se seleccionan aquellos animales que portan polen en sus patas traseras, fácilmente reconocible a simple vista como puede verse en la foto de la figura 7. No se ponen más de 4 animales en cada tubo y se procura que los animales correspondan a la misma colmena para evitar stress en



Figura 7: Foto de entrada de la colmena. Se pueden ver abejas forrajeras con las patas traseras cargadas de polen.

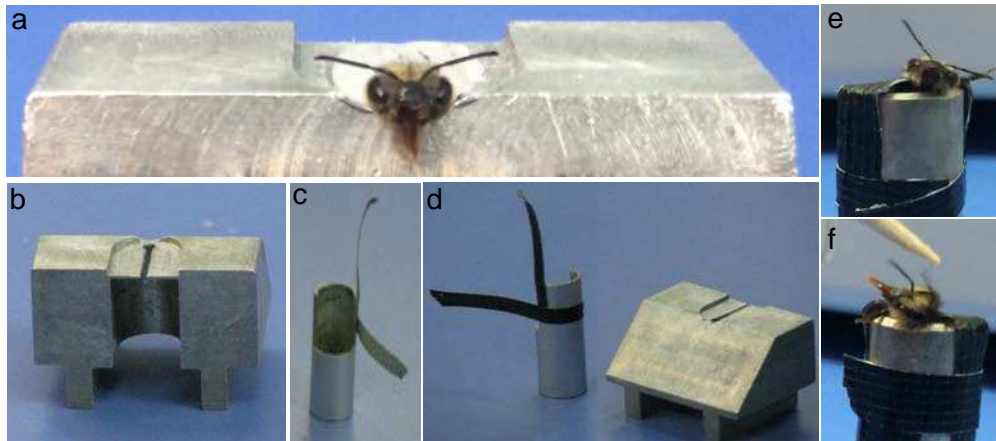


Figura 8: Cepas utilizadas durante los experimentos. **a** Puede verse una abeja colocada en el cepo para imaging. **b** El cepo utilizado para imaging visto desde atrás. Tiene una cavidad en la que entran el tórax y abdomen de la abeja. Además, una ranura que permite colocar a la abeja dejando a la cabeza queda expuesta en la parte superior y al cuerpo retenido en la cavidad inferior. Durante los experimentos de imaging se presionan el tórax y abdomen con una pieza de esponja para evitar movimientos y en la parte superior se construye con cera una cavidad estanca alrededor de la cabeza que servirá para mantener al cerebro expuesto sumergido en solución salina. **c** Imagen trasera del cepo utilizado en los experimentos de comportamiento. Se observa que el tubo está cortado de modo tal que puede ser colocada la abeja de manera vertical. Las cintas permiten trabar abdomen y tórax de la abeja. **d** Se pueden ver ambos cepos, uno al lado del otro, de frente. En **e** y **f** se ve a la abeja en el cepo utilizado para los experimentos de comportamiento. En **e** el animal tiene la probóscide retraída mientras en **f** se puede ver como el animal extiende la probóscide. En la parte superior se observa un escarbadientes mojado con solución azucarada. Al tocar las antenas con la solución el animal extiende la probóscide a modo de reflejo.

el interior de los tubos. Además se procuró que el tiempo total en los tubos no supere los 20 minutos para reducir la posibilidad de daños por stress o hipoxia.

Una vez en el laboratorio las abejas se anestesiaban colocando los tubos de vidrio en contacto con agua en equilibrio con hielo. Una vez que los animales estaban inmóviles se los manipulaba individualmente y se los sujetaba en cepos individuales [Galizia y Vetter, 2004]. Durante este trabajo se utilizaron dos tipos de cepos para las abejas (figura 8). Unos consisten en un tubo de aluminio (fig 8c, d, e y f) en el que los animales se colocan en forma vertical y son sujetos por medio de cinta adhesiva que las retiene desde el tórax y abdomen. Estos cepos fueron utilizados para los experimentos de comportamiento. Si bien permiten mantener a los animales inmovilizados y evitan la posibilidad de picaduras, los experimentos de imaging de calcio requieren mayor estabilidad y además es necesario tener espacio alrededor de la cabeza para poder realizar una cavidad en la cual sumergir el cerebro en solución salina para el microscopio de inmersión. Para ello se utilizó otro modelo de cepo de acrílico o aluminio como el que se ve en la figura 8 a, b y d. Cada animal es colocado en el cepo sujetando

su cabeza para que no puedan realizar movimientos y limitando el movimiento de abdomen para evitar posibles picaduras. Las antenas y la probóscide se dejan con total libertad de movimiento durante todo el experimento excepto en el momento de hacer imaging. Después de recuperar la temperatura, las abejas eran alimentadas con solución de sacarosa 1,0 M. En el laboratorio, las abejas son guardadas en una caja húmeda a temperatura ambiente (20-24 °C) en un ciclo luz:oscuridad 12:12 hs. Las sesiones de entrenamiento y testeo se llevaron a cabo 10 AM-04:00 PM comenzando todos los experimentos 1 día después de la captura. En la figura 8 e pueden verse a la abeja colocada en el cepo utilizado para experimentos de comportamiento. En figura 8 a se puede ver al animal en el cepo utilizado para imaging.

3.2. Estímulos

Los olores utilizados para todos los experimentos fueron 2-octanona, 1-hexanol y acetofenona (los tres de TCI América, Portland OR). Durante los diferentes experimentos se utilizaron dos dispositivos distintos de administración de los olores, uno para los experimentos de mezclas y otro para los experimentos de concentraciones, debido a que en cada caso debe ser controlada una variable distinta del estímulo (proporción en las mezclas y concentración absoluta respectivamente). En ambos dispositivos el mecanismo de apertura y cierre del olor es controlado por válvulas eléctricas que son manejadas por medio de la computadora (en el caso de los experimentos de imaging) o manualmente por botones asociados a controladores eléctricos que aseguran el tiempo de duración del estímulo (en los experimentos comportamentales). Para los experimentos con mezclas, 100 μ l de olor puro se cargan en viales de vidrio del tipo frasco-vacuna de 5 ml antes de los experimentos y se cierran de manera hermética con un septum de goma de manera de dejar que se establezca un equilibrio de vapor dentro del frasco. El espacio de vapor saturado dentro de los viales se usó como fuente para obtener la muestra del olor para la estimulación. Para ello, un determinado volumen de vapor de olor saturado fue transferido a una jeringa. Cuando se utilizaron los olores puros una jeringa de 1 ml se cargó primero con 0,5 ml de aire saturado con olor y se completó hasta 1 ml con 0,5 ml de aire limpio. Para obtener las mezclas binarias se levantó 0,5 ml aire de un vial de uno de los olores que componen la mezcla y 0,5 ml del vial

del otro olor. Por lo tanto ambos olores se mezclaron dentro de la jeringa antes de usarlo para la estimulación. Para evitar contaminaciones fueron utilizadas diferentes jeringas para 2-octanona, 1-hexanol, acetofenona y las respectivas mezclas binarias. Para aplicar el olor a la abeja, la jeringa correspondiente se inserta en un dispositivo controlado por computadora, llamado “pistola de olor”, que empuja el émbolo de la jeringa a una velocidad constante de 1 ml/seg. El contenido de la jeringa se inyecta en el centro de una corriente de aire limpio de flujo 9 ml/seg. El aire proviene de un filtro de carbón activado. La concentración de olor final entregado a la abeja da como resultado 1/20 de la muestra del gas saturado tomado de los viales (0.5 ml de olor + 0.5ml de aire limpio, inyectados en 9ml de aire limpio = 0.5 ml de olor /10ml). El inicio del estímulo se sincroniza con el registro de imaging de calcio usando el software de adquisición TillVision (Till-Photonics, Alemania). Durante los períodos sin olor el flujo de aire filtrado sigue ventilando las antenas. Un extractor de aire colocado 10 cm por detrás de la abeja evacua los olores de la arena experimental. El mismo procedimiento de estimulación se utiliza para las sesiones de entrenamiento y las de imaging de calcio. Para los experimentos de diferentes concentraciones del estímulo, fue construida y calibrada una pistola de olor con la capacidad de aplicar diez concentraciones diferentes de un mismo olor a lo largo de cuatro órdenes de magnitud. Para esto la pistola cuenta con diez canales independientes y en cada uno de ellos un vial de 5 ml con cantidades distintas de olor. Cada vial tiene un volumen final de 0.5 ml de una dilución de olor en aceite mineral. En la tabla 1 se muestra la dilución de olor en cada vial.

vial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[olor]	0	1/10000	1/3000	1/1000	1/300	1/100	1/30	1/10	1/3	1

Tabla 1: Se detallan la dilución de 2-octanona en cada vial. Para el frasco 1 la concentración de 2-octanona es 0, esto quiere decir que el frasco solo contiene 0.5 ml de aceite mineral. Mientras que el frasco 10 contiene 0,5 ml de olor puro.

El dispositivo consiste de un caudal central continuo de aire limpio de 8,3 ml/seg y otro de igual caudal que se divide en 10 canales iguales controlados por 10 válvulas eléctricas asociadas a los 10 viales con las diferentes concentraciones del olor. Si la válvula de un canal se abre, este canal inyecta el aire de su correspondiente vial arrastrando el vapor en el espacio superior del frasco hacia el caudal central. Lo que implica una dilución de 1/10 de

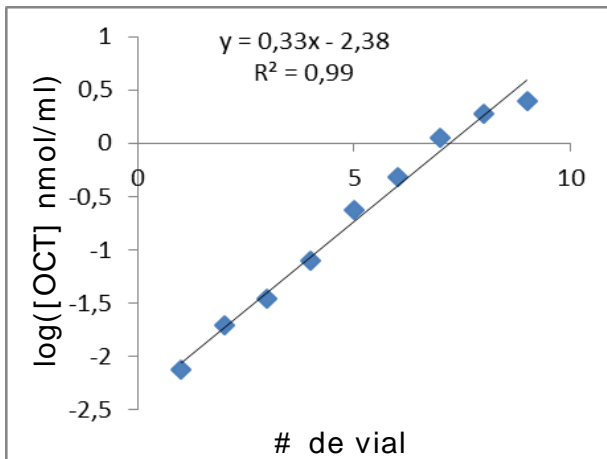


Figura 9: Curva de calibración del estímulo para los experimentos de codificación e intensidad. La figura muestra la relación entre el logaritmo de la concentración absoluta con la que se estimuló en función de la dilución en el frasco de origen. Notar que la relación es lineal ($R^2 = 0,99$). Si bien las diluciones barren 4 órdenes de magnitud la concentración real en el estímulo cubre solo 3 órdenes. Por ello la concentración real fue luego utilizada para el análisis de la respuesta.

la concentración inicial en cada frasco. Qué concentración efectiva de olor le está llegando al animal es clave para comparar los resultados experimentales con otros trabajos (sin embargo esto no siempre es bien controlado y presentado). Para poder cuantificar la cantidad absoluta de olor que efectivamente llega al animal la pistola de olores fue calibrada y testada usando el detector de llama de un cromatógrafo gaseoso (Agilent Technologies 7890 GC). Las cantidades absolutas de 2-octanona por unidad de volumen con la que se estimuló a las abejas para cada una de las diluciones se muestran en la figura 9.

La concentración real en cada estímulo fue utilizada armar la curva de respuesta en función de intensidad del estímulo (ver resultados). Vale resaltar que mientras en los frascos recorrimos una relación de concentraciones de 4 órdenes de magnitud en el olor final solo son 3 órdenes. Esto muestra la importancia de la calibración, ya que en muchos casos se publican la dilución en la fase líquida como la concentración real que llega al animal, sin embargo esta relaciones no son lineales.

3.3. Comportamiento

En el presente trabajo se buscó estudiar los cambios en la codificación y la percepción de olores causados por la experiencia. Para evaluar esto necesitamos un comportamiento del animal que nos reporte la experiencia del animal con el olor. Dado que no es posible saber de modo directo si el animal reconoce la identidad de un olor, para “preguntarselo” es necesario entrenar a los animales asociando alguna respuesta comportamental a la presencia del olor. Para esto se utilizó el protocolo de condicionamiento de extensión de la probóscide

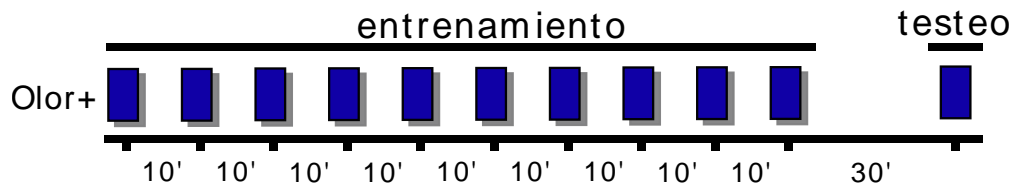


Figura 10: Esquema de entrenamiento. Los rectángulos azules representan la presencia del olor, mientras los rectángulos grises por detrás representan la recompensa. Abajo puede verse una línea temporal. En el testeo se presenta el olor sin recompensa.

(PER por sus siglas en inglés) [Bitterman *et al.*, 1983, Takeda, 1961, Smith *et al.*, 1991]. Este consiste en asociar un olor con una recompensa apetitiva. Para ingerir néctar o miel las abejas extienden una pieza bucal llamada probóscide. Este comportamiento puede ser observado a simple vista y es un buen indicador de las intenciones del animal de ingerir un alimento. Mediante la estimulación con azúcar de las antenas se produce una respuesta refleja de extensión de la probóscide. De modo que el protocolo de condicionamiento consiste en presentar un olor asociado a solución de sacarosa. En las primeras presentaciones del olor, los animales no extienden la probóscide y es necesario tocar las antenas para lograr la extensión de la probóscide y así poder darles la recompensa. Con el transcurrir de los ensayos los animales que asocian el olor con la recompensa, comienzan a extender la probóscide ante la presencia del olor anticipándose a la llegada del azúcar. Esto es evidencia de que el animal reconoce el olor y aprendió su valor predictivo. Cuando este aprendizaje y su memoria son evaluadas, solo se presenta el olor y se cuantifica que porcentaje de todos los animales entrenados extienden la probóscide ante el olor.

La figura 10 muestra el esquema básico de entrenamiento de 10 ensayos y evaluación utilizada en esta tesis. Los rectángulos de color representan tiempo durante el cual se estimula al animal con un olor (cada color en los esquemas siguientes representa un olor diferente). Los rectángulos grises representan la recompensa. En la figura 10 podemos ver que los ensayos de condicionamiento se presentan a intervalos de 10 minutos y que la recompensa se entrega desfasada respecto del olor (30 min). Mientras se realizan los sucesivos ensayos se registra el porcentaje de abejas que extienden la probóscide anticipando la recompensa. De este modo se pueden obtener curvas de porcentaje de respuestas en función del número de ensayos como la que se ve en la figura 11 en la que se observa que más del 80 % de los animales responden al olor luego de 3 ensayos lo cual es un porcentaje adquisición de la respuesta condicionada

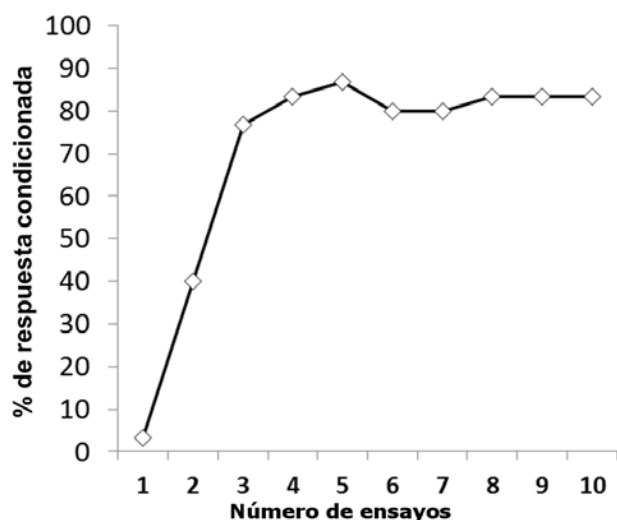


Figura 11: Porcentaje de respuesta de extensión de la probóscide. Se observa el porcentaje de animales que responden al olor a lo largo de los ensayos. El ejemplo de la figura corresponde a 26 animales entrenados con el olor 1-hexanol.

típico de estos experimentos. En las sesiones de evaluación no hay recompensa

3.4. Protocolo de ensombrecimiento

Para evaluar situaciones en las que un olor condicionado ensombrece la presencia de otro olor, se utilizó un protocolo de entrenamiento como el que se esquematiza en la figura 12. Primero se entrena a un olor durante el día de acuerdo al protocolo ya explicado. Un grupo de animales control recibe la misma cantidad de azúcar en ensayos que el primero pero sin aprender el valor de ningún olor (solo azúcar). El día 2 todos los animales son vueltos a entrenar con 6 ensayos pero esta vez utilizando una mezcla que contiene el olor aprendido el día anterior y un olor nuevo. Para el grupo control ambos olores son nuevos. Luego se evalúa en todos los animales cuanto han aprendido del olor nuevo.

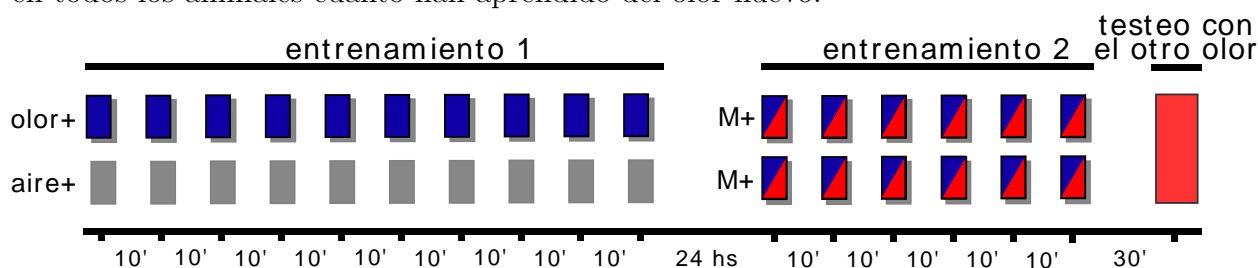


Figura 12: Esquema de experimento de ensombrecimiento. Los rectángulos azul y rojo representan la presencia de dos olores A y B respectivamente mientras los rectángulos grises representan la presencia de recompensa. Un grupo de animales es entrenado al olor A durante 10 ensayos mientras otro grupo control de animales recibe azúcar en ausencia de olor. Luego ambos grupos de animales son entrenados con la mezcla binaria Mix = A+B y finalmente evaluados con el olor B.

Con el objeto de tener una mayor sensibilidad para detectar diferencias ocasionadas por los distintos tratamientos en los distintos grupos de animales se realizó una cuantificación

de los tiempos de latencia y duración de la extensión de la probóscide durante el ensayo de evaluación. Para esto la evaluación de cada animal es filmada. En el plano de la cámara se podía observar al animal desde arriba. El encendido de un LED rojo, que los animales no veían, indicaba el momento en el que la pistola de olor libera el estímulo. De la grabación se cuantifica el tiempo que transcurre desde que se inicia el olor hasta que el animal extiende de probóscide (latencia) y durante cuánto tiempo la mantiene extendida (duración). El video se cuantifica pasando cuadro por cuadro, lo que permite definir el momento exacto de la extensión y de la retracción de la probóscide con un margen de error no mayor a 30 ms. Latencia y duración de la respuesta son buenos y más sensibles indicadores de la intensidad de la extensión y de la respuesta condicionada [Fernandez *et al.*, 2009, Smith, 1997]. Un animal que extiende muy rápido la probóscide revela un inequívoco reconocimiento del olor. Mientras que mantenerla extendida por mucho tiempo puede interpretarse como la certeza de que dicho olor trae asociado una recompensa disponiendo al animal a gastar energía en esperarla. Una gran latencia y corta duración son interpretadas como falta de certeza y de un aprendizaje débil respecto del valor predictivo del olor presentado.

3.5. Tinción de las neuronas de proyección

Para evidenciar y medir los patrones de actividad evocados por olores en las neuronas de proyección del lóbulo antenal es necesario aplicar algún marcador de actividad neuronal. En el presente trabajo se eligió trabajar con marcadores de calcio debido a su ya mostrada eficacia y factibilidad en el modelo de abejas. El marcador de actividad de calcio elegido se aplicó en el cerebro de las abejas con el objeto teñir neuronas de proyección el día anterior a los experimentos. Para esto, el primer paso es fijar la cabeza de la abeja al cepo en el que la abeja fue introducida con anterioridad (ver sección 3.1) con cera dental suave (Kerr Sybron Dental Specialties, EE.UU.). Luego se corta una ventana en la cápsula dorsal de la cabeza a la altura de las articulaciones de las antenas y hasta el ocelo ventral medial (figura 13). Se trasladan cuidadosamente las glándulas a un lado hasta que los lóbulos α ($L\alpha$) sean visibles dado que estos sirven de referencia espacial para la tinción. Las neuronas de proyección (PNs) se tiñen con el colorante sensor de calcio Fura-dextrano (sal de potasio, 10.000 MW;

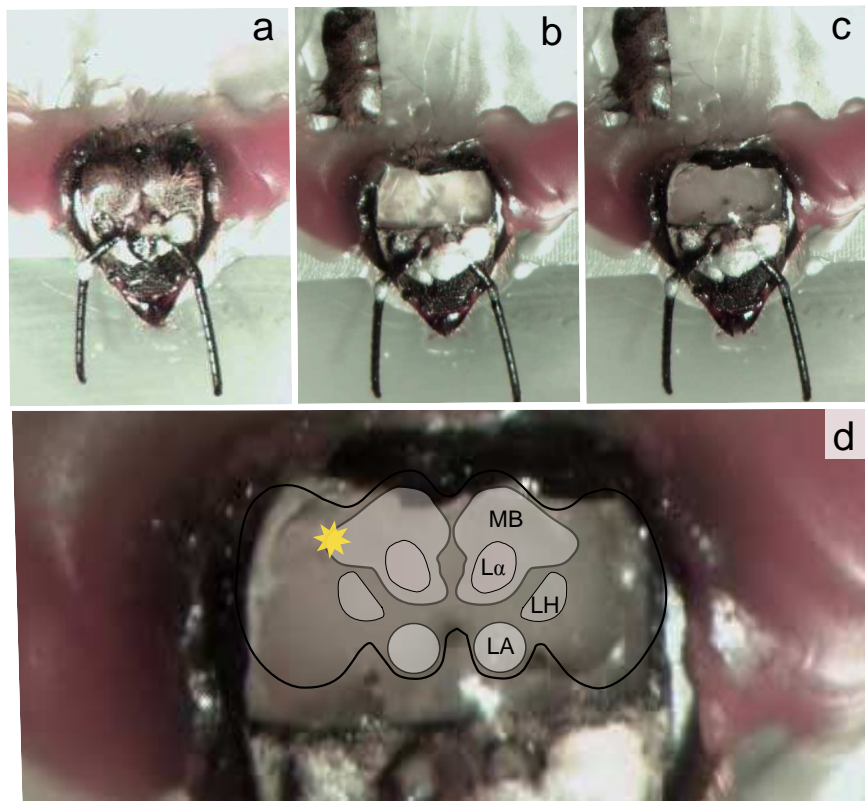


Figura 13: Tinción de las neuronas de proyección. Imagen desde arriba de la cabeza de la abeja. **a** El animal está fijo en el cepo. Sobre las antenas se ve el eicosano (Sigma-Aldrich) utilizado para fijar la posición de las antenas. **b** Se abre una ventana en la cutícula exponiendo el cerebro. Arriba a la izquierda puede verse el rectángulo de cutícula removido que se utiliza luego de la tinción para recubrir la ventana. **c** Se limpia la zona de glándulas y tráqueas exponiendo el Lóbulo α . **d** Ampliación de la ventana. Se esquematizan las regiones. LA: Lóbulo Antenal, MB: *Mushroom body*, La: Lóbulo α y LH: *Lateral horn*. El asterisco amarillo indica el lugar en donde se aplica el electrodo cargado con el colorante.

Invitrogen, Eugene, EE.UU.). Para hacerlo, hay que preparar previamente la punta de un microelectrodo de vidrio recubierto con colorante. Esto se hace primero diluyendo un cristal del colorante en una gota de agua destilada y levantando con la punta del electrodo cuando la gota es lo suficientemente viscosa como para que se forme una bolita de aproximadamente 50 μm de diámetro al levantarlo. Un electrodo cargado se inserta en cada lado del protocerebro (para teñir las PNs de ambos lóbulos antenales), dorsolateral de los lóbulos α donde los tractos protocerebro-antenal entran en los cálices laterales de los mushroom bodies [Kirschner *et al.*, 2006] (Figura 2 del a sección 2.3 Sistema olfativo de vertebrados e invertebrados). El colorante se disuelve en el tejido en unos 3 a 5 segundos. Suele ser conveniente romper un poco el tejido en dicha zona para permitir el ingreso del colorante. Una vez que se puso el colorante en ambos lados del cerebro se cierra la ventana usando la pieza de cutícula que había sido removida previamente y se sella con eicosano (Sigma-Aldrich) pegando la cutícula

y evitando posibles desprendimientos y sangrado. Veinte minutos después de la tinción, se alimentan las abejas con solución de sacarosa 1M *ad libitum* y se dejan reposar hasta el día siguiente. Durante este tiempo el colorante viaja de forma reversa hacia el lóbulo antenal que es donde podemos realizar las mediciones de actividad de calcio de las neuronas de proyección. Al día siguiente antes de los experimentos de imaging, se fijan las antenas apuntando hacia el frente utilizando eicosano (el eicosano tiene una temperatura de fusión que es inferior a las temperaturas que dañan el tejido y las antenas del animal). Se abre la cápsula de la cabeza y se enjuaga el cerebro con solución de Ringer (en mM: NaCl, 130; KCl, 6; MgCl₂, 4; CaCl₂, 5; sacarosa, 160; glucosa, 25, y HEPES, 10; pH 6,7, (500 mosmol), todos los productos químicos de Sigma-Aldrich). Se remueven las glándulas y la tráquea que cubren los lóbulos antenales. La incorporación del colorante fluorescente en los lóbulos antenales se pone en evidencia iluminando el cerebro con luz UV (380 nm). Sólo los animales que presentan una tinción homogénea de todos los glomérulos visualmente accesibles se utilizaron para los experimentos de imaging de calcio. Como parte de la preparación para el imaging de calcio es importante reducir el movimiento del animal. Se impiden los movimientos del cuerpo comprimiendo suavemente el abdomen y el tórax con una pieza de goma espuma que se coloca presionando el cuerpo contra el soporte en el que se encuentra a la abeja. Luego se realiza una segunda abertura en la cápsula de la cabeza entre las antenas y las mandíbulas, la estructura compacta de los músculos, el esófago y la quitina de soporte se levanta y se pone bajo una ligera tensión [Mauelshagen, 1993]. Esto reduce el movimiento del esófago que pasa justo en medio de los dos lóbulos antenales y que de no fijarse complica las mediciones generando un movimiento permanente. Por último, se cubre el cerebro con una capa de Kwik-sil (WPI). Este producto consiste en dos componentes transparentes de consistencia líquida viscosa que al mezclarse producen un producto transparente que se endurece y gelatiniza en pocos minutos. Para colocarlo primero se mezclan las componentes evitando la formación de burbujas y luego se deja caer suavemente sobre el cerebro. Luego se coloca un pedacito de cobre objetos sobre el producto colocado para asegurar una superficie plana lo que mejora la visión y se deja secar. De esta manera al gelatinizarse el kwik-sil, este mantiene humectado el cerebro y reduce movimientos mientras que por ser transparente no perjudica la visibilidad en los experimentos de imaging de calcio (aunque para lograr esto es muy importante mezclar

bien los dos componentes y no formar burbujas). Después de la preparación, se monta la abeja en el microscopio y se le permite recuperarse durante 20 minutos antes de comenzar con la sesión de imaging de calcio.

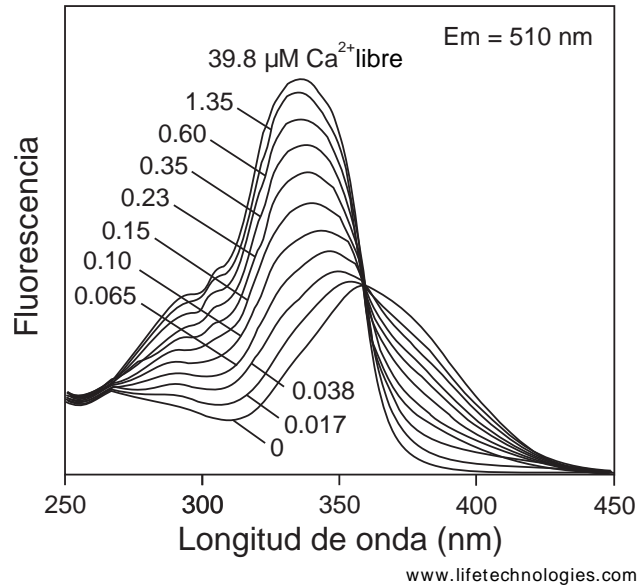
3.6. Imaging

El colorante utilizado, Fura-dextrano, es un marcador de calcio intracelular que gracias al dextrano viaja activamente distribuyéndose dentro de la célula. Fura tiene dos picos de absorción correspondientes a las longitudes de onda de 340 nm y 380 nm según si el colorante este asociado a calcio o no. Puede verse en la figura 14 que en ausencia de calcio el colorante posee un máximo de absorción en 380 nm, mientras que en presencia de Calcio el máximo de absorción se desplaza hacia luz de frecuencia 340nm. A medida que aumenta la concentración de calcio, aumenta la porción de moléculas de fura que emiten si son estimuladas a 340 y disminuye la porción de moléculas de fura que emiten si son estimuladas a 380nm. Una vez absorbido un fotón en cualquiera de esas longitudes de onda el colorante emite en una longitud de onda en torno a 510 nm fuera del rango de absorción.

De este modo iluminando selectivamente a 340 nm y a 380 nm, tenemos que mientras en el caso de 380 nm a medida que la concentración de calcio aumenta la fluorescencia disminuye, en el caso estimulado con 340 nm a medida que la concentración de calcio aumenta la fluorescencia también lo hace. Por lo tanto calculando la relación entre la fluorescencia emitida para cada longitud de onda como $R=F_{340}/F_{380}$ obtenemos un parámetro que nos da la variación de luminosidad independientemente de si hay variaciones en la eficiencia o cantidad de colorante y aumentando mucho la sensibilidad de la medición dado que esta relación da valores en un rango más grande que el de cada longitud de onda por separado.

El setup utilizado para realizar el imaging de calcio consta de una cámara EMCCD iXon (Andor, Belfast, Reino Unido) montada en un microscopio de fluorescencia en posición vertical (Olympus BX-50WI, Japón) equipado con un objetivo 20 x inmersión, NA 0,95 (Olympus) y un set de filtro de excitación y espejo: LP515 nm y 505DRLPXR (Till-Photonics, Grafelfing, Alemania). La luz de excitación fue proporcionada por un monocromador Polychrome V (Till-Photonics) que alterna entre 340 y 380 nm para la luz de excitación de

Figura 14: Curva de absorción de FURA. Se pueden ver las curvas de absorción de luz del fluoróforo FURA para las distintas concentraciones de Ca libre. FURA es diluido en distintas concentraciones de Ca, estimulado con luz de longitudes de onda entre los 250 nm y los 450 nm y se registra el valor de la fluorescencia de emisión en 510 nm. Se puede ver que en ausencia de Ca el pico de absorción se encuentra cercano a los 380 nm., mientras que en la máxima concentración de Ca medida (39.8 μ M) el pico de absorción se encuentra cercano a los 340 nm.



manera de obtener registros pseudosimultáneos de la fluorescencia emitida para ambas longitudes de onda de excitación. El desfase temporal entre ambos registros es de solo 4 ms. Los protocolos de adquisición se realizaron utilizando el software TillVision (Till-Photonics). La frecuencia de muestreo fue de 8 Hz (una medición cada 125 ms). La resolución espacial fue de 125 x 125 píxeles agrupadas en un chip de 1000 x 1000 píxeles. La intensidad de la lámpara de fluorescencia fue regulada en cada animal para obtener tiempos de exposición de 20 ms y 5 ms para 340 y 380 nm respectivamente. Cada sesión de imaging consistió en la repetición de 3 mediciones de cada olor utilizado. Solo aquellos animales en los que la respuesta fue repetible con una correlación superior a 0.7 entre sus repeticiones fueron considerados para el análisis de los patrones de actividad. Los olores fueron presentados en orden aleatorio y separados por intervalos de 1 min. Cada medición duró 10 segundos y el olor duró de 1 a 4 segundos según el experimento. Las tres mediciones de cada olor se promediaron para el análisis.

3.7. Análisis de datos de imaging

El análisis de imágenes tiene dos etapas principales, primero deben identificarse los glomérulos y calcular las curvas de actividad en cada glomérulo para todos los olores y luego los correspondientes cálculos para realizar un análisis de los datos en función de la pregunta. La identificación de glomérulos y cálculo de las curvas de actividad de cada glomérulo

se realizó utilizando un software escrito en IDL (EXELIS, Visual Information Solutions , EE.UU.) por Giovanni Galizia (Universidad de Konstanz, Alemania) mientras que todo el análisis de estas curvas de actividad fue realizado en R en programas escritos en el marco de mi doctorado. Cada medición consistió de dos secuencias de 80 imágenes de fluorescencia cada una, obtenidos por la alternancia de 340 nm y 380 nm de luz de excitación (F_{340}^i, F_{380}^i , donde i es el número de la imagen de 1 a 80). Para cada par de imágenes F^i , calculamos pixel a pixel la relación $R^i = 100 \frac{F_{340}^i}{F_{380}^i}$ y se resta el R_b de fondo, obtenido promediando el valor de los R^i un segundo antes de la aparición de olores. Por lo tanto $R_b = 1/8(R^{16} + R^{17} + \dots + R^{22} + R^{23})$. Los valores resultantes (ΔR en las figuras) representan el cambio de la fluorescencia respecto de la ventana de referencia y son proporcionales a los cambios en la concentración de calcio intracelular.

Los glomérulos se identificaron sobre la base de su morfología y posición usando atlas publicados del lóbulo antenal de la abeja *Apis mellifera* [Flanagan y Mercer, 1989, Galizia *et al.*, 1999] (Figura 15). Los glomérulos son visibles primero en las imágenes de fluorescencia con la luz de excitación de 380 nm después de teñir las PN con FURA (Figura 15). Además, se utilizó una herramienta escrita en IDL por Mathias Ditzen (Freie Universität Berlin, Alemania) que segmenta la imagen en función del grado de actividad correlacionada entre píxeles vecinos. Dado que los píxeles derivados del mismo glomérulo están altamente correlacionados, la correlación entre píxeles vecinos proporciona imágenes en las que los glomérulos son unidades discretas separadas por límites oscuros (Figura 15). La activación glomerular se calculó como el promedio de la actividad en una zona cuadrada de 7 x 7 píxeles que corresponden a 23 x 23 micrones y se ajusta al tamaño de los glomérulos.

El análisis de los patrones de activación inducida por el olor en este trabajo se basa en las señales de aquellos glomérulos que fue posible identificar en todos los animales (20 glomérulos para la parte I de plasticidad y codificación y 11 glomérulos para la parte II de experimentos de control de ganancia). Se realizaron análisis de las series temporales pero principalmente se estudiaron los patrones espaciales de actividad evocada por olores. En ese caso el detalle temporal de la actividad se colapsó promediando el ΔR entre los 250 ms y los 750 ms después del inicio de olor. Por lo tanto, los patrones de activación de olor utilizados para el análisis espacial son vectores con tantos elementos como glomérulos identificados (20

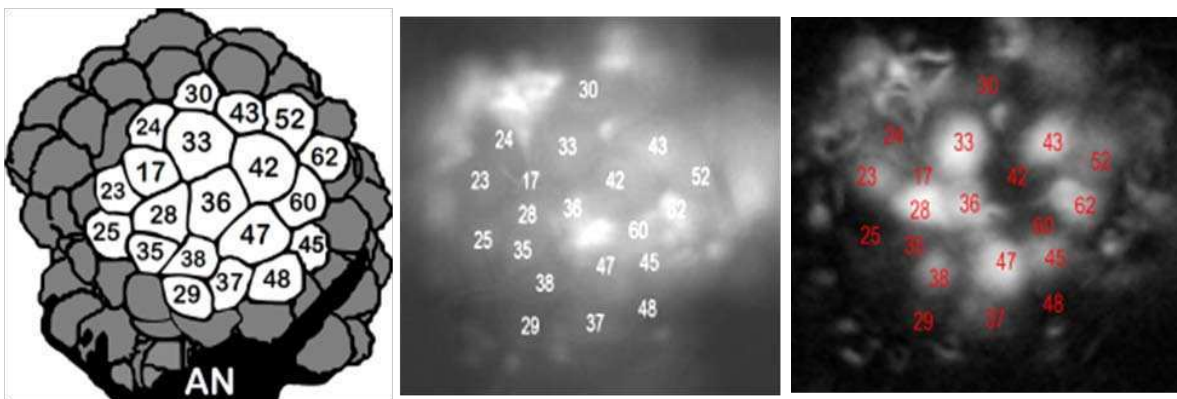


Figura 15: Lóbulo Antenal. Izquierda: atlas esquemático de los glomérulos que forman la estructura del AL de abeja. Se nombran con números aquellos glomérulos que pudieron ser identificados y medidos en todos los experimentos. Los números corresponden al nombre asignado a cada glomérulo en publicaciones anteriores [Galizia *et al.*, 1999]. Centro: foto de fluorescencia del AL teñido con FURA (excitación 380nm, emisión 510nm) . Derecha: imagen calculada en base al grado de correlación entre píxeles vecinos. Píxeles derivados del mismo glomérulo están altamente correlacionados y por tanto se los observa como regiones claras. Las zonas oscuras no indican falta de tinción, sino glomérulos que no mostraron actividad y por lo tanto sus píxeles no tuvieron actividad correlacionada.

u 11) y en el que cada elemento constituye la actividad glomerular promedio durante 500 ms. Esta ventana temporal fue elegida por coincidir con la ventana en la que se observa la respuesta comportamental del animal ante la presencia del olor y por lo tanto debería contener la información necesaria y suficiente para la toma de decisiones [Fernandez *et al.*, 2009, Ditzen *et al.*, 2003].

3.8. Farmacología

Durante este trabajo, parte del hilo conductor fue el papel que cumple la red de neuronas locales inhibitorias presente en el AL. Para evidenciar la actividad de estas neuronas inhibitorias es necesario comparar patrones de actividad en presencia o ausencia de las inhibiciones. El método utilizado para realizar esto fue por simplicidad y por falta de herramientas genéticas en abejas, la farmacología. Las interneuronas gabaérgicas inhiben a sus pares postsinápticas en el AL mayoritariamente a través de receptores de tipo GABA-A. Por ello utilicé picrotoxina que ya se conoce la dosis efectiva en abejas [Farkhooi *et al.*, 2013]. Para medir el efecto de la droga realicé series de mediciones completas con solución salina normal cubriendo el cerebro como siempre se hace en los experimentos de imaging. Luego reemplacé la salina normal por solución salina que contenía picrotoxina 10 μ M. La solución

con picrotoxina se recambió tres veces para disminuir posible dilución en el remanente de solución salina normal o hemolinfa. Se dejó al animal con picrotoxina durante veinte minutos y realicé otra serie de mediciones de imaging bajo el efecto de picrotoxina.

3.9. Correlación vs distancia Euclidea

Para cuantificar los cambios en la representación neuronal de olores es necesaria una herramienta cuantitativa que permita medir cuan parecidos o distintos son dos patrones de actividad evocados. Esta determinación no es trivial cuando los que se compara son patrones multidimensionales como los patrones espaciales de activación en el lóbulo antenal. Supongamos que tenemos un lóbulo antenal que tiene N glomérulos y por lo tanto se representa a la actividad de un olor en el lóbulo antenal como un vector de N elementos en el que cada elemento contiene el valor de actividad de un glomérulo en un momento dado. Para medir el parecido entre dos vectores X e Y existen muchas herramientas. Puede usarse la distancias entre vectores tal como la distancia Euclidea (ec. 14).

$$d(X, Y) = \sqrt{(X_1 - Y_1)^2 + (X_2 - Y_2)^2 + \dots + (X_N - Y_N)^2} \quad (14)$$

Esto suma las diferencias entre cada uno de los elementos de los vectores de modo que cada diferencia, aunque sea la misma en todos los glomérulos, aportan a que el cálculo nos dé un mayor valor de distancia. Si utilizamos este algoritmo los valores irán desde cero, en el caso en que ambos vectores son el mismo, a un valor positivo que puede ser tan grande como sumen las diferencias entre los N elementos. Existen como esta, otras muchas distancias con diferentes características que en lugar de medir el camino diagonal o más corto entre ambos vectores, consideran otras posibilidades de medir la distancia que no vamos a detallar por presentar similares características y no aportar a la discusión. Otra opción es usar la correlación o coeficiente de Paerson (ec. 15). Este consiste en utilizar como medida de la diferencia el coseno del ángulo entre ambos vectores centrados. Este coeficiente pone énfasis en la dirección de los vectores y no en el tamaño de estos vectores. Los valores que se obtienen van de -1, cuando ambos vectores están en la misma dirección en sentido contrario o anticorrelacionados, a 1, cuando tienen la misma dirección e igual sentido o correlacionados.

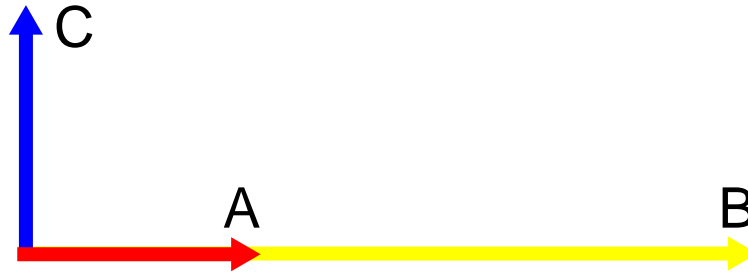


Figura 16: Ejemplo de medidas de parentesco entre vectores. Vemos los vectores $A=(1,0)$ en rojo, $B=(3,0)$ en amarillo y $C=(0,1)$ en azul. Existen muchas maneras de medir parentesco entre vectores y deseamos elegir uno de modo de tener una medida que nos sirva como predictor del comportamiento animal en el sentido de que dos vectores sean más parecidos si el animal los percibe más parecidos. En este ejemplo al utilizar la distancia euclídea, que prioriza los valores absolutos de los vectores, tendremos que A es más parecido a C que a B. Mientras que si utilizamos la correlación de Pearson en cambio tendremos que A y B son más parecidos entre sí que con C.

En el medio el valor 0 es cuando los dos vectores son perpendiculares o descorrelacionados.

$$c(X, Y) = \cos(a) \tag{15}$$

De modo que la discusión es si priorizar la dirección de los vectores (usando la correlación) o priorizar el tamaño de los vectores (usando la distancia). En un ejemplo sencillo en dos dimensiones, podemos ver los casos de la figura 16.

Vemos que tenemos tres vectores $A=(1,0)$, $B=(3,0)$ y $C=(0,1)$. Mientras que en base a la correlación A y B son más parecidos entre sí que cualquiera de ellos con C, si usamos la distancia, A y C son más parecidos entre sí que cualquiera de ellos con B.

Es importante destacar que cuando hablamos de parecido o distinto en este trabajo es desde el punto de vista de cómo el animal codifica y en definitiva percibe los olores. Para ello debemos preguntarnos qué información de los patrones es leída por las estructuras cerebrales río abajo y brinda a los animales la información que les permite tomar decisiones para realizar un comportamiento. También nos preguntamos si los animales son capaces de discriminar distintas concentraciones del mismo olor o de identificar en mezclas la presencia de más de un olor obteniendo la identidad de cada una de las componentes o si las mezclas son interpretadas como un nuevo olor. Por esta razón antes de definir un algoritmo que sea capaz de medir cuán parecidos son dos olores, debe responderse la pregunta ¿Cuán parecidos en qué sentido? En el presente trabajo si bien mostraremos en un comienzo resultados con ambos algoritmos nos inclinamos finalmente por el uso de la correlación entre dos patrones

como mejor predictor de lo que el animal percibe. El motivo es que la actividad en un glomérulo representa la activación de un receptor y la presencia de una propiedad particular del olor sentido. Qué propiedades son sentadas y en qué relación se encuentran dichas propiedades es lo que en definitiva dará la identidad del olor y no tanto el tamaño global en que el patrón se encienda. Por otro lado en el caso de usar distancia podría darse la situación en la que el mismo olor en dos concentraciones es más distinto (en el sentido de que la distancia es mayor) entre sí que con otro olor (ejemplo $(1,0,0)$ con $(0,0,1)$ y $(0,0,4)$). Esto no resulta natural puesto que es conocida la capacidad de los animales de generalizar la identidad de un olor a lo largo de un rango muy amplio de concentraciones. Por todo lo expuesto, en el presente trabajo se realizaron en un principio análisis utilizando ambas estrategias pero luego en base a los resultados que mejor predecían el comportamiento de los animales nos inclinamos por utilizar la correlación como medida de similitud o diferencia entre dos patrones.

3.10. Análisis de componentes principales (PCA)

Los patrones de actividad inducida por los olores son descritos en este trabajo por vectores de 20 u 11 elementos que corresponden al número de glomérulos identificados para todos los animales en ambos casos. Por lo tanto, cada dato, es decir, cada olor en cada instante de tiempo, se describe por un vector de 20 o 11 dimensiones que le asigna al olor un lugar en el espacio codificado por el AL. En algunas secciones de esta tesis, para simplificar y visualizar mejor el concepto multidimensional del espacio olfatorio, se realizaron análisis de componentes principales (PCA). Mediante este algoritmo se describe a los datos en base a un nuevo conjunto de menor cantidad de dimensiones que son combinación lineal de las dimensiones originales. Esto permite visualizar los diferentes patrones de actividad evocados por olores y mostrar la evolución de los patrones a través del tiempo en un espacio de menos dimensiones.

3.11. Predicción de la activación evocada por mezclas

Como vimos en la sección 2.3, el lóbulo antenal es la primera etapa de procesamiento de información olfativa. En él convergen las señales de las células receptoras y salen patrones espaciotemporales de actividad distribuidos en ensambles de neuronas de proyección que son leídas por las siguientes etapas de procesamiento. Si tuviéramos mediciones simultáneas de las formas del input y del output del lóbulo antenal en el mismo animal podríamos realizar modelos de la función de transferencia y del procesamiento local realizado. Dado que no contamos con mediciones de las neuronas sensoriales, pero sí con mediciones de mezclas binarias y de sus componentes por separado, parte del procesamiento local dado por interacciones laterales puede ser deducido si logramos comprender de qué manera los patrones evocados por los olores puros se combinan para generar el patrón de la mezcla. En el caso de que dicho procesamiento esté medianamente conservado entre individuos, deducir el algoritmo general mediante el cual los componentes se combinan para codificar la mezcla permitiría predecir la representación de la mezcla para cualquier otro individuo del cual se conozca la representación de los olores puros. La respuesta más simple, la que uno esperaría si no hubiera interacciones entre los patrones evocados por los componentes es que la respuesta a la mezcla sería la suma de las respuestas a los olores individuales. De este modo, si el olor A enciende el glomérulo i en un valor A_i y el olor B enciende el mismo glomérulo B_i , entonces la relación general es suponer que la actividad producida en el glomérulo i por mezcla binaria M estará dada por ec. 16

$$M_i = \alpha A_i + \beta B_i + \gamma \tag{16}$$

De acuerdo a este esquema de sumación, si la actividad de las mezclas viniera dada por la suma directa de las actividades evocadas por los olores puros deberíamos encontrar que en los ajustes los valores de α y β son uno mientras γ es cero. Al contar con datos de muchos animales, los valores α , β y γ de la ecuación 16 fueron calculados para obtener el plano que predice la actividad de la mezcla en función de los olores puros. Para realizar los ajustes se implementaron programas escritos en el entorno R durante el trabajo de doctorado.

3.12. Simulación numérica

Presentamos en la sección 2.5 el modelo de Hodgkin y Huxley que permite describir las señales eléctricas en las neuronas. En el presente trabajo mediante este modelo simulamos una red de neuronas que contiene 60 PNs y 100 LNIs conectadas en una estructura que emula la red del lóbulo antenal de abejas y que detallaremos en la sección de resultados correspondiente. En este punto buscamos presentar las ecuaciones y parámetros específicos utilizados para simular cada neurona y cada corriente. Para la simulación de cada neurona se consideraron las diferencias biofísicas entre PNs y LNIs. Lo primero que fue considerado fue que la dinámica en el soma y en los axones no es idéntica. Para esto se calculan los potenciales de cada uno que llamamos V_s y V_a respectivamente. Luego tendrán una constante de acoplamiento que denominaremos g_{AS} . Se consideraron las corrientes de Na (I_{Na}), Ca (I_{Ca}), K (I_K), de K dependiente de Ca (I_{KCa}), corrientes de fuga (I_L) (L por su sigla en inglés “leak”), corrientes sinápticas GABAérgicas (I_{sym}), corriente transitoria de K A (I_A), la posibilidad de algo de ruido en las corrientes (I_r) y una corriente de K rectificada (I_{Kd}). Además los inputs sensoriales son simulados como una corriente I en aquellas neuronas designadas a representar el patrón de activación del olor. Si ponemos todo esto en la ecuación 2 obtenemos la ecuación 17 para el soma y 18 para el axón.

$$C_S \cdot \frac{\partial V_s}{\partial t} = g_{sl} \cdot (V_s + 45) - g_{AS} \cdot (V_s - V_a) - I_{Ca} - I_A - I_{sym} + I_r + I \quad (17)$$

$$C_A \cdot \frac{\partial V_a}{\partial t} = g_{al} \cdot (V_a + 45) - g_{AS} \cdot (V_a - V_s) - I_{Na} - I_{Kd} - I_{KCa} \quad (18)$$

Los primeros dos términos a la derecha de la igualdad para las dos ecuaciones 17 y 18 son lineales. De modo que las conductancias g_{sl} , g_{al} y g_{AS} son constantes que tendremos que asignar tanto para las LNIs como para las PNs (todos los parámetros constantes se detallan por su nombre, símbolo y valor para cada tipo de neurona en la tabla 2). Mientras que el primero es debido a las corrientes de fuga el otro es un término de acoplamiento entre el axón y el soma. Este acoplamiento es el que hace que los potenciales dependan mutuamente uno del otro. El resto de las corrientes serán modeladas con conductancias no lineales y por lo tanto tendrán ecuaciones dinámicas propias como las que vimos en la sección 2.5. Presentemos todas juntas las ecuaciones de las corrientes y luego hacemos lo mismo con las

ecuaciones dinámicas para las variables que describen la dependencia con el potencial de los canales. Así las corrientes I_{Na} , I_{Kd} , I_{Ca} , I_{KCa} y I_A vienen dadas por las ec.(19), ec. (20), ec. (21), ec. (22) y ec. (23). Mientras que la corriente I_r que incluye la posibilidad de ruido es simplemente una función aleatoria sumada.

$$I_{Na} = g_{Na} \cdot n_{Na}^2 \cdot h_{Na} \cdot (V_a - 50) \quad (19)$$

$$I_{Kd} = g_{Kd} \cdot n_{Kd} \cdot (V_a + 60) \quad (20)$$

$$I_{Ca} = g_{Ca} \cdot n_{Ca}^3 \cdot V_s \cdot fun_1(2 \cdot V_s, 0, 24, 42002442) \quad (21)$$

$$I_{KCa} = g_{KCa} \cdot n_{KCa} \cdot (V_a + 60) \quad (22)$$

$$I_A = g_A \cdot n_A \cdot (V_s + 60) \quad (23)$$

Los valores de los parametros g_{Na} , g_{Kd} , g_{Ca} , g_{KCa} y g_A para las neuronas PNs y para las LNIs se encuentran todas resumidas en la tabla 2. Si ahora con la idea de HyH escribimos las ecuaciones que describen la dinámica de las variables n_{Na} , h_{Na} , n_{Kd} , n_{Ca} , n_{KCa} y n_A vienen dadas por las ec.(24), ec.(25), ec. (26), ec. (27), ec. (28) y ec. (29) respectivamente.

$$\frac{\partial n_{Na}}{\partial t} = 0,32 \cdot fun_2(V_t - V_a, -18, 4) \cdot (1 - n_{Na}) - 0,28 \cdot fun_2(-V_t + V_a, 40, 5) \cdot n_{Na} \quad (24)$$

$$\frac{\partial h_{Na}}{\partial t} = 0,128 \cdot e^{\frac{17+V_t-V_a}{18}} \cdot (1 - h_{Na}) - 4 \cdot h_{Na} \cdot fun_1(40 + V_s - V_a, 0, 5) \quad (25)$$

$$\frac{\partial n_{Kd}}{\partial t} = 0,016 \cdot fun_2(V_t - V_a, -20, 5) \cdot (1 - n_{Kd}) - 0,25 \cdot e^{\frac{20+V_t-V_a}{40}} \cdot n_{Kd} \quad (26)$$

$$\frac{\partial n_{Ca}}{\partial t} = 0,1 \cdot (fun_1(-V_s, 39, 1, 2) - n_{Ca}) \quad (27)$$

$$\frac{\partial n_{KCa}}{\partial t} = 3 \cdot fun_1(0,08, [Ca], 0,011) \cdot (1 - n_{KCa}) - 20 \cdot n_{KCa} \quad (28)$$

$$\frac{\partial n_A}{\partial t} = \frac{fun_1(-V_s, 0, 8) - n_A}{350 - 349 \cdot fun_1(V_s, -46, 4)} \quad (29)$$

Para calcular la ec. (28) necesitamos calcular las concentraciones de calcio [Ca]. Para esto en el presente modelo se usa la ec. (30)

$$\frac{\partial [Ca]}{\partial t} = 0,001 \cdot (-0,35 \cdot I_{Ca} - MU \cdot [Ca] + 0,04 \cdot MU^2) \quad (30)$$

Por último para calcular las corrientes sinápticas debemos saber qué neuronas inhibitorias hacen sinapsis con la neurona en la que estamos calculando el potencial. Llamemos

LNI_c a este subgrupo de todas las neuronas inhibitorias que hacen sinapsis con la neurona que está siendo calculada. De este modo debemos sumar sobre todas las LNI_c la corriente producida por el GABA que estas liberaron. Así en al ec. (31) se calcula la concentración de GABA que cada NLI libera.

$$\frac{\partial[GABA]}{\partial t} = kf_{GABA-A} \cdot (1 - [GABA]) \cdot fun_1(V_a, 30, -2) - kr_{GABA-A} \cdot [GABA] \quad (31)$$

De nuevo kf_{GABA-A} y kr_{GABA-A} son parámetros constantes que se encuentran tabulados en la tabla 2. Si tenemos el valor de la $[GABA]$ generada por todas las neuronas inhibitorias, podemos calcular la corriente sináptica que recibe cada neurona como la suma de todas las corrientes producidas por el GABA de las neuronas LNI_c en la neurona de interés ec. (32).

$$I_{syn} = \sum_{i=LNI_c} f_s \cdot (V_s + 90) \cdot [GABA]_i \quad (32)$$

f_s es un parámetro que regula la fuerza sináptica (notar que es multiplicativo respecto de la corriente que produce la sinapsis). En el presente trabajo este parámetro juega un papel central porque variaremos este parámetro para estudiar el papel que realizan las fuerzas sinápticas de las neuronas inhibitorias tanto en la codificación de mezclas como en el control de ganancia. En la tabla 2 se detalla el valor de todos los parámetros constantes utilizados para cada tipo de neurona y sus unidades.

Parámetro	símbolo	LNI	PN
capacidad del axón	C_A	10.0 pF	10.0 pF
capacidad del soma	C_S	10.0 pF	10.0 pF
conductancia de fuga del axón	g_{al}	0.16 nS	0.16 nS
conductancia de fuga del soma	g_{sl}	0.16 nS	0.16 nS
conductancia soma-axón	g_{AS}	10.0 nS	65.0 nS
conductancia de Na	g_{Na}	260.0 nS	260.0 nS
conductancia de K rectificada	g_{Kd}	80.0 nS	80.0 nS
conductancia de Ca	g_{Ca}	8.8 nS	8.8 nS
disipación dinámica de Ca	MU	1.5	1.6
conductancia K Ca	g_{KCa}	1.5 nS	0.5 nS
conductancia IA	g_A	200.0 nS	200.0 nS
constante de amplificación de GABA-A	kf_{GABA-A}	100.0 ms ⁻¹	-
constante de decaimiento GABA-A	kr_{GABA-A}	0.7 ms ⁻¹	-
umbral para el potencial de acción	V_t	-51.7	-52.1

Tabla 2: Resumen de los valores utilizados para todos los parámetros constantes del modelo. En la primer columna se presenta el rol del parámetro, en la segunda el símbolo utilizado y en la tercera y cuarta los valores y las unidades que toma para las LNIs y las PNs respectivamente.

4. Resultados

Hasta aquí he presentado los antecedentes, el contexto y las herramientas que utilizaré para responder las preguntas que, si bien ya fueron explicitadas, repasaré ahora antes de iniciar la inspección de los resultados. Es motivo principal de este estudio aportar conocimiento acerca de si la experiencia con un olor modifica su codificación y la forma en la que se lo percibe. La hipótesis es testada en el marco de mezclas de olores, la cual es la condición en la que los olores se presentan en la naturaleza. El estudio se centró en el procesamiento de la información olfativa en el lóbulo antenal que es la primera etapa de integración sensorial y de procesamiento del olfato en las abejas y nos preguntamos qué papel cumplen las neuronas locales inhibitorias en esta etapa. Testamos la hipótesis que propone que las neuronas inhibitorias locales confieren a la red propiedades de un filtro dinámico, haciendo que las señales olfativas compuestas por muchos estímulos se simplifiquen a la salida del lóbulo para resaltar la codificación de olores que tienen valor predictivo (sea este positivo o negativo) y reducir la de los olores que no lo tengan. El aspecto dinámico de dicho filtro se refiere a la propuesta de que el procesamiento en el lóbulo antenal no es rígido si no que depende de la experiencia y que dicha plasticidad estaría vinculada a reajustes de fuerzas inhibitorias. El estudio de la función y de la plasticidad de las neuronas locales inhibitorias no puede ser separado de lo que asumimos como otra de sus funciones centrales que es el control de ganancia de la señal y su rol en preservar la estabilidad del código olfatorio independiente de la intensidad de los estímulos. Por ello la segunda hipótesis testada es que las neuronas locales inhibitorias contribuyen también a la función de control de ganancia en el lóbulo antenal.

Como lo que se buscó es ver cómo se modifica la percepción de un olor y cuál es la relación con los cambios en su representación interna, la elección y caracterización de los olores que se utilicen no es indistinta. Dado que utilizamos olores que son componentes florales resulta de especial importancia conocer la saliencia que tienen los olores para el animal antes de cualquier entrenamiento para asegurarnos de trabajar con mezclas en las cuales la detectabilidad y saliencia de los componentes estén balanceadas. Podría ocurrir que el animal tenga especial preferencia con alguno de los olores (ya sea por experiencia previa o por que los animales tengan per se mayor sensibilidad a uno u otro olor). De modo que antes

de analizar experimentos con mezclas para responder preguntas específicas, debí primero realizar una elección de los olores componentes, de sus concentraciones y caracterizar las respuestas tanto comportamental como fisiológica.

4.1. OLORES PUROS

Los olores fueron elegidos de manera que varias características relacionadas con su percepción y saliencia sean equilibradas o, en caso de no ser posible, tener una buena caracterización de cuáles son las diferencias. Por un lado es importante que los olores que se utilizan tengan curvas de aprendizaje similares. Esto quiere decir; a) que requieran de condicionamiento para evocar una respuesta comportamental y que no se diferencien por evocar actividad espontánea; b) que requieran del mismo número de ensayos para mostrar una respuesta condicionada de igual porcentaje; c) que los valores de aprendizaje a los que llegan sean equivalentes.

Además se buscaron olores que tengan una representación equilibrada en el lóbulo antenal, es decir que enciendan el mismo o parecido número de glomérulos y que la actividad general sea del mismo orden en todos los olores. Algunos efectos podrían verse exacerbados o perderse en olores muy diferentes o en olores con cierto grado de similitud y por lo tanto intentamos contar con pares de olores que cumplan las dos condiciones (parejas de olores parecidos y parejas de olores distintos). Es también deseable que los componentes utilizados presenten grados similares de generalización y discriminación tanto a nivel de olores puros como respecto de las mezclas binarias que se generan para los experimentos. Por todo esto antes de abordar experimentos diseñados para contestar preguntas sobre plasticidad en la codificación, se realizó una caracterización de las respuestas a los olores puros que se utilizarían.

4.1.1. Olores con saliencias equilibradas

Por observaciones previas en el laboratorio sabemos que el compuesto 2-octanona es percibido muy distinto que acetofenona por las abejas. Por otro lado 1-hexanol es un olor que resulta similar a 2-octanona aunque distinguible mientras a su vez es claramente distinto de acetofenona. De hecho estas relaciones entre los tres olores también son percibidas por nuestro olfato. Uno puede hacer la experiencia de olerlos y coincidir con las abejas en cuáles

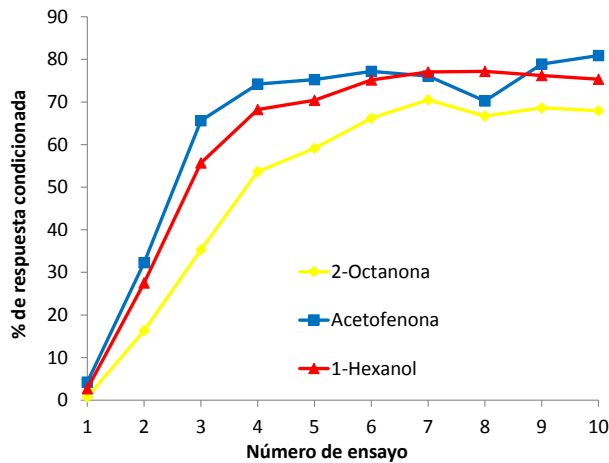


Figura 17: Curvas de condicionamiento. 2-octanona (amarillo) $n=142$, acetofenona (azul) $n=98$ y 1-hexanol (rojo) $n=155$. Las curvas muestran el porcentaje de animales que se anticipan a la recompensa conforme pasan los ensayos. No se observaron diferencias significativas de respuesta en el primer ensayo ($p=0.22$). La curva correspondiente a 2-octanona tiene una subida más lenta y el valor máximo al que llega es levemente inferior que los otros dos olores. Contrastes post ANOVA; Tukey acetofenona y 1-hexanol NS $p=0.73$, 1-hexanol y 2-octanona $p<0.01$, acetofenona y 2-octanona $p=0.01$.

son parecidos y cuáles son distintos. De este modo con estos tres olores tenemos un par de olores similares entre sí (2-octanona y 1-hexanol) y estos bien distintos a un tercer olor (acetofenona). Ahora bien, tenemos que ver si estos olores tienen saliencias similares para las abejas. Para esto, abejas capturadas en la piquera de la colmena fueron divididas en tres grupos y cada uno de ellos entrenado durante diez ensayos mediante el protocolo de condicionamiento de PER a uno de los tres olores. Se entrenaron 142 abejas a 2-octanona, 98 a acetofenona y 155 a 1-hexanol. Durante diez ensayos a cada animal se presentó el olor asociado a la recompensa de sacarosa 2M y se anotaron los eventos de extensión de probóscide en respuesta al olor. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos.

Como primera observación es interesante resaltar que los tres olores no muestran diferencias significativas de respuesta en la primera presentación de olor en el entrenamiento ($p=0.22$) y que además esta es lo suficientemente baja como para asegurar que ninguno de los tres olores genera respuesta en animales naïve. Luego, con el transcurso de los ensayos vemos que todos los olores son aprendidos y que bastan dos ensayos para ver respuesta condicionada (notar que el efecto del n -ésimo ensayo solo puede verse en el ensayo $n+1$). Téngase en cuenta que el estímulo condicionado (olor) y el estímulo incondicionado (azúcar) están desfasados en el tiempo de modo que durante el desfasaje se puede medir la respuesta condicionada evocada exclusivamente por el olor. También se observa que las tres curvas aumentan el porcentaje de respuesta condicionada hasta llegar a un plateau luego de lo cual el porcentaje de respuesta se mantiene bastante constante. Sin embargo, se puede observar que la velocidad en la que los olores son aprendidos no es equivalente para los tres olores.

En particular la curva correspondiente a 2-octanona no solo es más lenta sino que además el máximo valor al que llega es levemente inferior. Este resultado revela una diferencia entre la saliencia de los estímulos, ya que muestra que los animales aprenden con mayor facilidad un olor que otro. Teniendo en cuenta que en los experimentos que siguen nos interesa estudiar cómo la experiencia modifica la codificación de mezclas binarias que contienen estos olores la diferencia que vemos en las curvas de aprendizaje no es lo más deseable, no obstante presentaremos resultados de los tres olores y analizaremos las diferencias observadas entre los tres olores.

4.1.2. Datos de imaging y series temporales

Como he dicho uno de los objetivos principales es encontrar un correlato entre la experiencia y el procesamiento de los olores en el lóbulo antenal. Sin embargo, antes de estudiar posibles cambios inducidos por la experiencia es importante caracterizar la actividad que evocan los olores elegidos en animales control que no tienen experiencia previa con estos olores.

En cada experimento de imaging realizamos para cada animal tres mediciones de cada uno de los olores 1-hexanol, acetofenona y 2-octanona. En las mediciones obtenidas, el delta de fluorescencia ($\Delta F/F$) en una región dada es función de la cantidad de calcio intracelular en las neuronas de proyección de esa región e indicador de la actividad eléctrica de dichas neuronas, por lo tanto las imágenes y su cuantificación son analizadas como patrones espaciotemporales de actividad de neuronas de proyección. Así por ejemplo obtenemos imágenes como las que vemos en el panel de la izquierda de la figura 18. Como se observa en la figura cada olor evoca un patrón espaciotemporal de actividad distinto y repetible. En la primera fila se observa el patrón de activación evocado por 2-octanona, en la segunda es acetofenona y por último 1-hexanol. Los patrones de actividad se muestran en una escala de falso color que va desde negro (sin activación) a rojo (máxima activación). En las columnas se pueden ver las tres repeticiones de cada olor. Como puede observarse a simple vista el grado de repetibilidad de los patrones de actividad de cada olor es notable.

Como se observa, los patrones de actividad son notoriamente diferentes entre olores. Cada olor evoca actividad en una combinación distinta de glomérulos. En el mosaico de

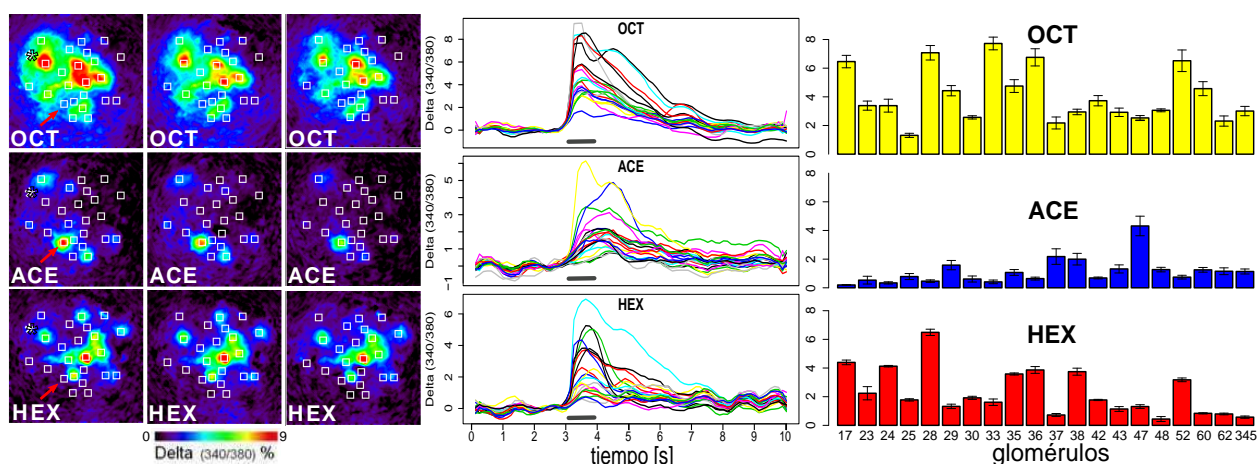


Figura 18: Izquierda: patrones de actividad evocada por los tres olores en el lóbulo antenal. La intensidad de la respuesta está expresada en la escala de falso color indicada debajo. Se muestran las tres repeticiones de cada olor. Centro: detalle de la actividad medida cuadro por cuadro para cada olor durante los 10 segundos de registro. Los trazos de diferentes colores indican el detalle de la actividad medida en cada uno de los glomérulos identificados con recuadros en el panel de la izquierda. La barra negra sobre la abscisa indica el tiempo de estimulación con el olor. Derecha: Luego de integrar el área bajo la curva desde 250 a 750 ms después del encendido el olor para cada uno de los glomérulos identificados.

actividad, cada región que se activa y desactiva colectivamente puede ser identificada como un glomérulo específico que es reconocible de un animal a otro. Podemos ver por ejemplo que el glomérulo señalado con una flecha roja se enciende con acetofenona y no lo hace con el resto de los olores mientras por ejemplo el glomérulo marcado con el asterisco blanco se enciende con 2-octanona y 1-hexanol pero no lo hace con acetofenona.

Es interesante ver si en los patrones evocados por los olores elegidos vale alguna de nuestras predicciones. Dijimos que acetofenona era perceptualmente bien distinto de 2-octanona y 1-hexanol y que estos últimos eran a su vez parecidos entre sí. ¿Podemos ver esto en los patrones de activación obtenidos? En una primera inspección vemos que hay un número de glomérulos compartidos entre 1-hexanol y 2-octanona mientras que algunos glomérulos relevantes en el patrón de acetofenona no se encienden significativamente en los otros dos olores. Podemos ver también que 2-octanona recluta más glomérulos que los otros y podría decirse que el patrón de 1-hexanol se encuentra contenido dentro de patrón de 2-octanona en el sentido que los glomérulos importantes de 2-octanona contienen a los de 1-hexanol. Si calculamos el promedio de la actividad para un área igual en todos los glomérulos (remarcadas en las fotos de actividad con cuadrados blancos) obtenemos curvas de actividad en función del tiempo para cada uno de los glomérulos como las que se ven en el panel central de la

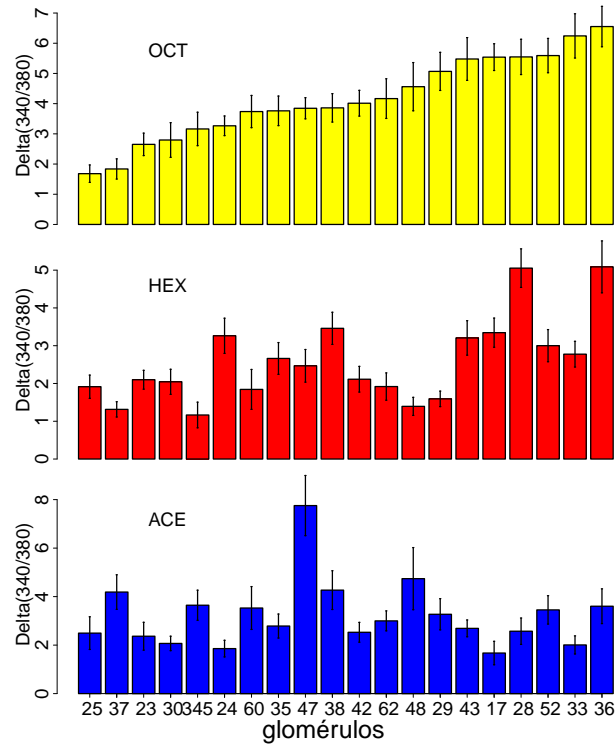


Figura 19: Patrones ordenados. Se observan los patrones evocados por cada olor ordenado por actividad creciente de 2-octanona. Se puede ver que mientras 1-hexanol se ordena parcialmente acetofenona no lo hace. Por ejemplo el glomérulo 47 que es el más activo para acetofenona está lejos del último lugar en 2-octanona. De este modo podemos observar que el patrón de actividad de 2-octanona y 1-hexanol comparten entre ellos más glomérulos que con acetofenona.

figura 18. Si identificamos por ejemplo 20 glomérulos, tendremos 20 de estos trazos para cada olor que midamos. Así por ejemplo podemos ver que no todos los glomérulos llegan al mismo tiempo al máximo de actividad y que la dinámica no es la misma en todos. Para simplificar el análisis lo que haremos es quedarnos con la información de la representación espacial en el lóbulo. Para ello colapsamos la información temporal calculando el área bajo la curva de cada glomérulo entre los 250 y 750 milisegundos después de encender el olor. La elección de este tiempo se debe a que es en ese intervalo en el que ocurre la máxima evolución del patrón de activación y coincide además con el tiempo en el que los animales toman las decisiones que se evidencian en el comportamiento (se verá en resultados siguientes). Al reducir la dimensión temporal obtenemos para cada estímulo un vector, que tiene tantos elementos como glomérulos reconocidos, en donde cada valor representa la actividad promedio de cada glomérulo en torno al momento de máxima expresión del patrón de activación.

Los gráficos de barras del panel de la derecha de la figura 18 representan la actividad espacial (calculada como el área bajo la curva) promedio de las tres repeticiones y las barras de error corresponden al error estándar de las tres repeticiones. Con los datos presentados de esta manera podemos ver si se cumplen las predicciones respecto de la relación entre el parecido perceptual y el parecido de los patrones de actividad.

Como primera aproximación de esto se calculó la actividad correspondiente a un animal promediando los patrones de activación de todos los animales para cada olor. Si para cada olor reordenamos los glomérulos de izquierda a derecha utilizando el orden creciente de la actividad en respuesta a 2-octanona podemos ver que la actividad de 1-hexanol también se ordena parcialmente de menor a mayor, mientras que la de acetofenona no lo hace (figura 19). Esto indica que los glomérulos relevantes y la relación entre ellos para 1-hexanol y 2-octanona es bastante conservada. Mientras que por ejemplo, para acetofenona el glomérulo 47 es el más activo no es así para los otros dos olores. Vemos también a primera vista que 2-octanona activa más glomérulos que los otros dos olores.

Otra manera de visualizar las diferencias entre tres representaciones es mediante un análisis de componentes principales (PCA). En este análisis las dimensiones originales en las que se representa a los olores son combinadas linealmente para generar una nueva base de dimensiones que maximiza la distribución de los datos en un número menor de dimensiones. El primer componente principal (PC1) es en el que los datos muestran la mayor varianza y por lo tanto es la dimensión que más distingue entre datos.

Los sucesivos componentes que entrega el análisis explican cada vez menos la dispersión de los datos. De esta manera es posible reducir el número de dimensiones y graficar solo aquellas dimensiones que explican la distribución de los datos. Realizamos un PCA utilizando todo el detalle temporal de los patrones de actividad para los tres olores para un animal promedio (resultado de promediar la actividad de 11 animales naïve, para cada olor y cada cuadro de las mediciones). En la figura 20 se presentan las trayectorias de los olores en las tres primeras

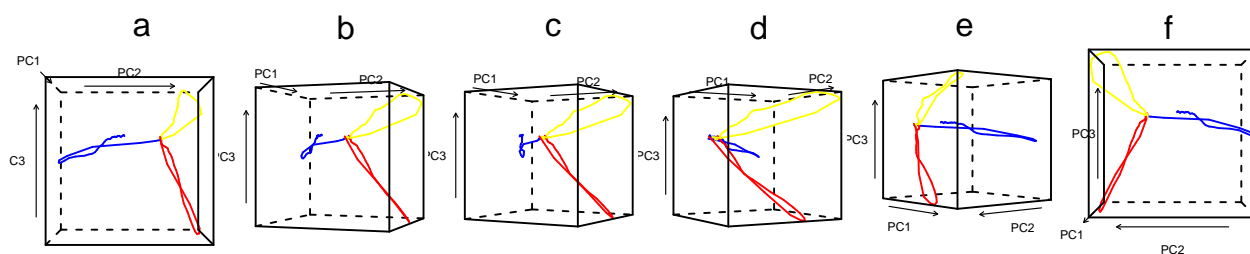
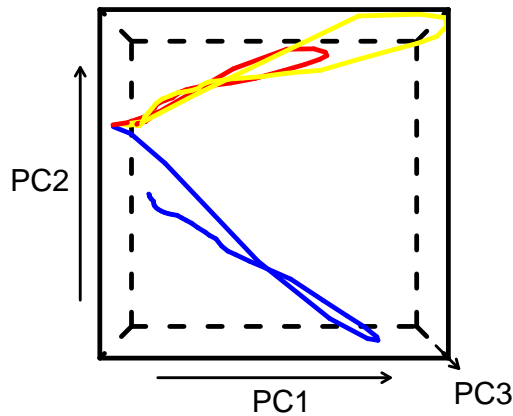


Figura 20: Análisis de componentes principales. En la figura se observan las curvas temporales de los tres olores 2-octanona (en amarillo), 1-hexanol (en rojo) y acetofenona (en azul) en un análisis de PCA. Cada olor comienza en actividades bajas cercanas a cero y terminan en actividades similares. Desde **a** hasta **f** se ve una rotación de la figura en la que se puede ver que los tres olores son perpendiculares en este espacio. Mostrando que las representaciones son distintas. los primeros tres PC representan el 98,18 % de la varianza de los datos. El porcentaje de varianza para las componentes principales son 84,65 % para PC1, 10,55 % para PC2 y 3 % PC3.

Figura 21: Proyección de la actividad de los tres olores 2-octanona (amarillo), 1-hexanol (rojo) y acetofenona (azul) solo en las 2 primeras componentes del PCA. Las primeras componentes principales distinguen acetofenona de 2-octanona y 1-hexanol pero que estos últimos no son distinguibles.



componentes principales del PCA. Se ve en amarillo la actividad de 2-octanona, en azul la de acetofenona y en rojo la de 1-hexanol. Los trazos corresponden a la evolución temporal de los patrones de activación. Así por ejemplo si miramos la actividad de acetofenona en la figura 20a, se puede observar que al encender el olor la actividad arranca en un valor cercano al cero y común a todos los olores, luego aumenta llegando a un máximo de separación de los patrones alrededor de los 500 ms y luego vuelve a un valor cercano al de arranque cuando se apaga el estímulo.

Desde la figura 20a a la figura 20f se muestra una rotación del espacio obtenido con el PCA. Podemos ver que los tres olores son representados en dimensiones diferentes y casi ortogonales. Esto quiere decir que la codificación de cada uno de los olores en principio es diferente y que con las tres primeras componentes alcanza para separarlos. Si nos quedamos solo con las 2 primeras componentes y volvemos a graficar los tres olores obtenemos la figura 21. Vemos que en base a estas a las primeras 2 componentes, 2-octanona y 1-hexanol no se diferencian y ambos son perpendiculares a acetofenona. Esto indica que las variables que más diferencian los olores lo hace separando acetofenona de los otros dos olores y esto implica que, considerando sus respectivos patrones, es más fácil distinguir acetofenona consistentemente con los que proponíamos.

4.1.3. Distancia-correlación

Como se discutió en la sección de materiales y métodos existen distintas maneras de medir similitud entre dos vectores y no es claro qué algoritmos utiliza el sistema nervioso para reconocer y distinguir cada patrón de activación. En esta sección mostraré algunas

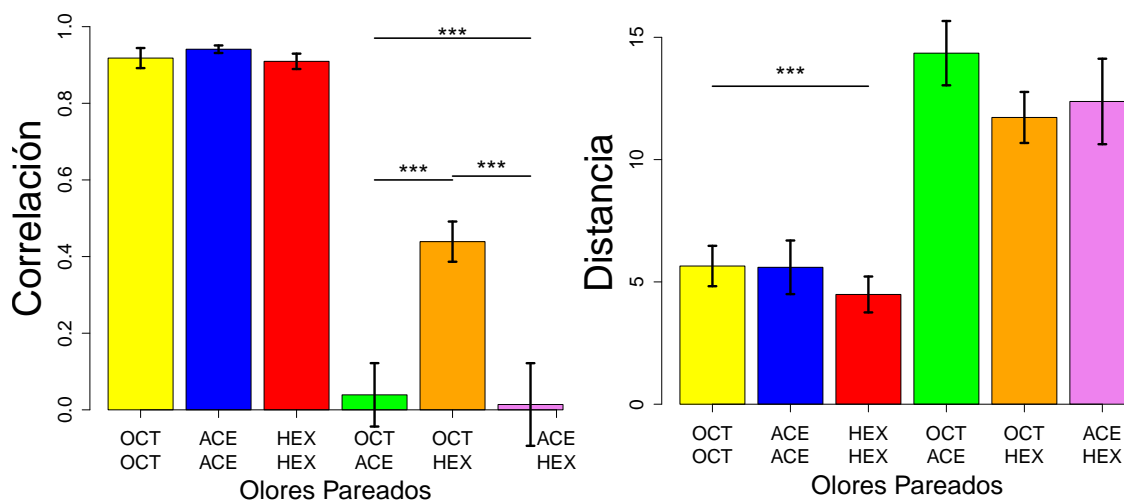


Figura 22: Correlación y distancia entre repeticiones de los olores. Se presentan los valores correspondientes a promedios de correlación y distancia intra animal. En amarillo los valores de parrear las repeticiones de 2-octanona, en azul las de acetofenona y en rojo las de 1-hexanol. Las tres barras restantes corresponden a parejas cruzadas entre los correspondientes olores puros. En verde se ve el resultado de parrear los patrones de 2-octanona y acetofenona en naranja entre 2-octanona y 1-hexanol y en violeta entre acetofenona y 1-hexanol. A la izquierda se ven los valores calculados con la correlación. ANOVA $F_{5,54}=52.38$ $p<0.001$, *** $p<0.001$ (contraste post hoc Tukey). A la derecha valores de distancia. ANOVA; $F_{5,54}=13.12$ $p<0.001$, *** $p<0.001$ (contraste post hoc Tukey).

alternativas para ver en qué medida los patrones de actividad mostrados en la sección anterior pueden ser utilizados para predecir la cualidad perceptiva de un olor.

Si calculamos las correlaciones entre todas las repeticiones de los olores dentro de cada animal obtenemos que el promedio de la correlación entre repeticiones del mismo olor es de 0.90 ± 0.01 mientras que en las correlaciones entre patrones de distintos olores son significativamente menores como se ve en la figura 22.

Esto muestra que dentro de cada animal los patrones para cada olor son estables y que la representación de cada olor es diferente. Queda también en evidencia que 2-octanona y 1-hexanol muestran mayor grado de correlación entre sí que cualquiera de las otras dos parejas de olores. Si realizamos este análisis utilizando la distancia Euclídea lo que obtenemos se ve en la figura 22.

En base a la distancia vemos que entre las repeticiones del mismo olor son mucho menores que con los otros olores. Esto indica que en ambos casos (correlación y distancia) es posible distinguir entre repeticiones del mismo olor respecto de patrones evocados por otro olor.

Ahora calculamos para cada animal los patrones promedio de las tres repeticiones de cada olor y con esto analizamos cuan conservada o repetible es la representación de los olores de

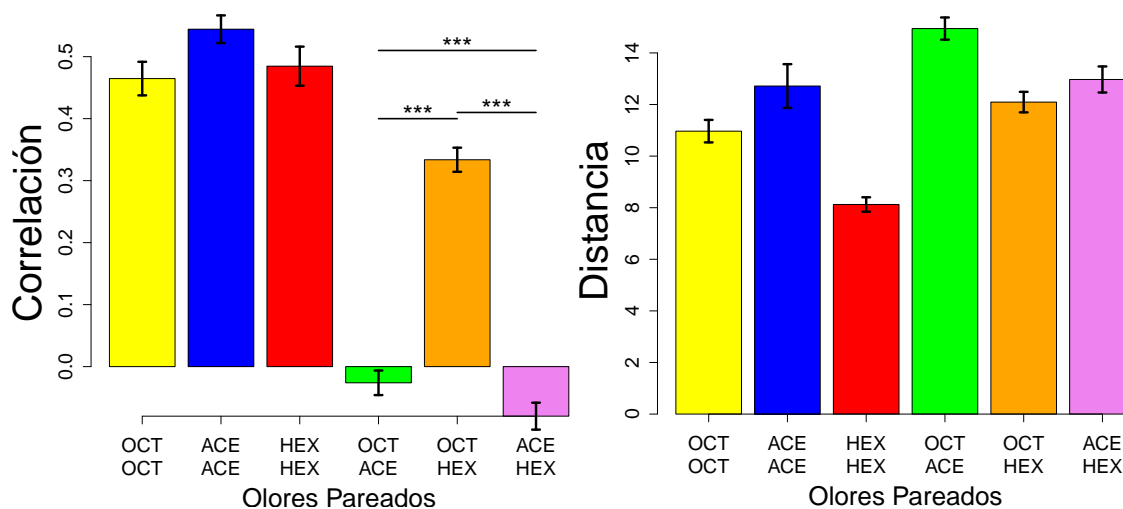


Figura 23: Correlación y distancia Euclidea entre la representación de olores en los distintos animales. En la figura de la izquierda se observan los resultados obtenidos para la correlación mientras que a la derecha los obtenidos con la distancia. En ambos casos las primeras tres barras vemos el promedio de los valores obtenidos entre patrones de activación interna de los olores puros (amarillo es 2-octanona, azul acetofenona y en rojo 1-hexanol). Las tres barras restantes corresponden a los valores obtenidos de cruces binarios entre los olores puros (en verde 2-octanona y acetofenona, en naranja 2-octanona y 1-hexanol y en violeta acetofenona y 1-hexanol). para la correlación ANOVA $F_{5,522} = 138,2$ $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ (Tukey contraste post hoc). Para la distancia NS.

un animal a otro. Para ello calculamos la correlación y la distancia entre patrones evocados por el mismo olor y entre patrones evocados por distintos olores y vemos que la correlación entre patrones del mismo olor es significativamente más alta que entre olores diferentes. Una tendencia similar pero no tan clara se observa en el análisis de las distancias (figura 23)

Si observamos el promedio de la correlación entre patrones evocados por distintos olores (ace-hex, oct-ace y oct-hex) de la figura 23 vemos que mientras la correlación entre 1-hexanol o 2-octanona con acetofenona es cero, la correlación entre 1-hexanol y 2-octanona es alta (barra naranja). De modo que los resultados a nivel de los patrones coinciden con la cercanía o distancia perceptual de los olores y que además contamos con una triada de olores que contiene dos olores parecidos entre sí (2-octanona y 1-hexanol) y uno bien distinto de ambos (acetofenona). Por otro lado comienza a notarse que la distancia Euclidea no resulta tan buen predictor cuando la comparación involucra mediciones de distintos animales. Esto se evidencia en el hecho de que el promedio de distancias entre patrones del mismo olor (amarillo, azul o rojo en la figura 23b) no es tan distinto de las distancias promedio entre patrones de olores que ya hemos visto son bien distintos (verde y violeta en la figura 23b).

Hasta aquí hemos mostrado que los patrones olfativos evocados por estos tres olores mo-

nomoleculares son estables dentro de cada animal y que también están relativamente conservados de un animal a otro. Esto último puede observarse más claramente con la correlación que con la distancia.

4.1.4. Patrones y clustering

Nos preguntamos si los patrones de actividad medidos son representativos de los olores y si tienen la suficiente información como para dado una medición nueva saber cuál es el olor que la produjo. Para ello, una buena herramienta es la formación de clusters. Dada una serie de mediciones utilizamos la correlación (o la distancia) entre todas ellas para agrupar los elementos tal que se juntan primero los más correlacionados entre sí (o menos distantes), después se agrega el elemento que correlacione más (o diste menos) con los dos primeros y así se agregan elementos hasta tener a todos ellos relacionados en base a la correlación o a la distancia. Una vez agrupadas las mediciones vemos si efectivamente los grupos formados son consistentes con la identidad de los olores. Cuando encaramos esta estrategia para las repeticiones de los olores en cada animal vemos en todos los animales resultados como el que se muestra en la figura 24.

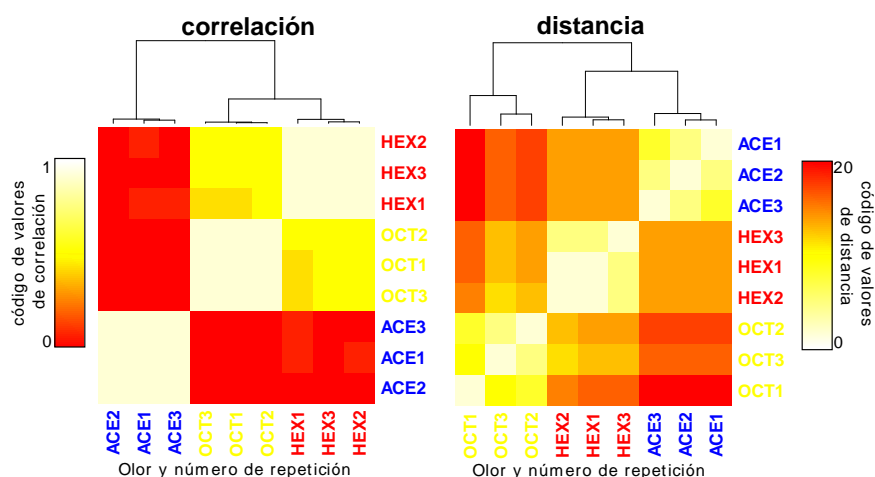


Figura 24: Clusters de las representaciones internas de un animal. Se muestran los resultados de aplicar el método de clustering a las representaciones internas de los tres olores y sus correspondientes repeticiones medidas en un animal. En el gráfico de la izquierda se utilizó la correlación como medida de parentesco y en el de la derecha la distancia euclídea. Los colores representan los valores obtenidos. Así en blanco se muestran valores que indican mayor parentesco o cercanía (correlación alta o distancia baja) y en rojo los de menor parentesco o cercanía (baja correlación o distancias grandes). En los ejes se pueden ver los nombres de los olores y la repetición a la que corresponden ordenados por el algoritmo de clustering. Arriba un dendograma de árbol muestra los agrupamientos surgidos del algoritmo. El largo de las ramas representa la proximidad entre dos mediciones.

En estos gráficos de clúster el eje X y el eje Y tienen las tres mediciones de olores puros hechas en un animal y en colores vemos los valores de correlación o de distancia entre las mediciones y olores indicados en los ejes. Al costado de ambos ejes se muestra un diagrama de árbol que indica los grupos obtenidos para ambas estrategias de clustering. En la representación de los clusters de la figura 25, cuando se observan bloques de colores bien distinguibles es porque obtuvimos grupos bien definidos mientras que si los colores se encuentran muy mezclados indica que los grupos armados son débiles. En el ejemplo de la figura vemos que tanto la correlación como la distancia definen grupos de mediciones de acuerdo a la identidad de los olores. Sin embargo, utilizando la correlación vemos que acetofenona es muy distinto de 2-octanona y 1-hexanol y que existe un valor umbral para el cual 1-hexanol y 2-octanona pueden ser considerados un solo grupo. Cuando miramos el cálculo hecho en base a distancia son 1-hexanol y acetofenona los que se encuentran en un mismo grupo. Esto es debido a que el algoritmo en base a distancia prioriza la fuerza o tamaño de los valores generales de actividad y por lo tanto 2-octanona está más lejos de los otros dos olores. La correlación en cambio prioriza los patrones y las formas y por eso no importa tanto la intensidad del patrón de 2-octanona, sino que este comparte muchos glomérulos con 1-hexanol. Estos resultados indican que la información contenida en los patrones medidos es suficiente para diferenciar los olores que los produjeron. Sin embargo vimos que usar correlación o distancia nos da agrupamientos distintos. Si aplicamos esta misma estrategia para los patrones promedio de las repeticiones en cada animal y repetimos el análisis de clusters utilizando mediciones de todos los animales podemos también determinar en que medida los patrones medidos en un animal nos permiten identificar patrones de actividad en otro animal. Estos resultados están en la figura 25.

A simple vista vemos que mientras la correlación clusteriza correctamente las mediciones en base a los olores, el algoritmo en base a la distancia no lo hace. Nuevamente en los clusters formados por correlación, 2-octanona y 1-hexanol comparten un grupo claramente distinto del grupo de acetofenona. En el caso de la correlación, algunas de las mediciones de 2-octanona y de 1-hexanol se mezclan pero ninguna medición de acetofenona se ubica entre las mediciones de 2-octanona y 1-hexanol. Si bien esperamos que los patrones observados en las neuronas de proyección incorporen cierto grado de procesamiento y plasticidad, es

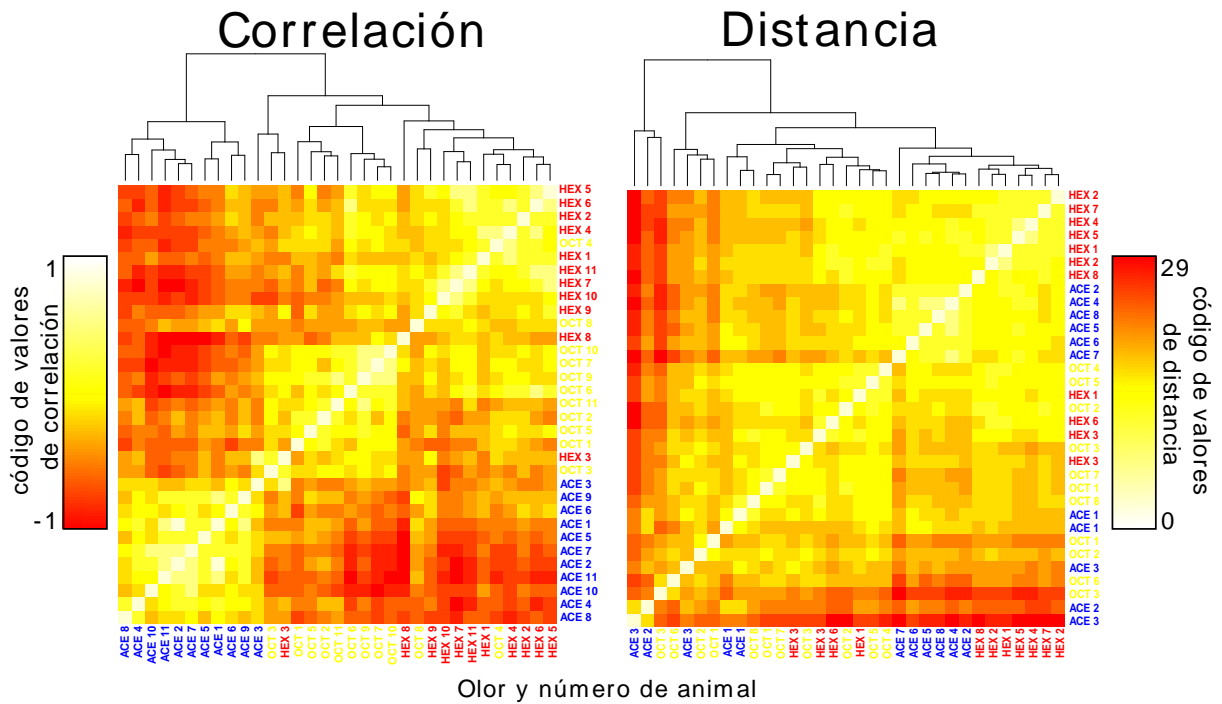


Figura 25: Clusters de la representación interna entre animales. Se muestran los resultados de aplicar el método de clustering a las representaciones internas de los tres olores medidas en 11 animales. En el gráfico de la izquierda se utilizó la correlación como medida de parentesco y en el de la derecha la distancia euclídea. Los colores representan los valores obtenidos. Así en blanco se muestran valores que indican mayor parentesco o cercanía (correlación alta o distancia baja) y en rojo los de menor parentesco o cercanía (baja correlación o distancias grandes). En los ejes se pueden ver los nombres de los olores y el número de animal al que corresponden ordenados por el algoritmo de clustering. Arriba un dendrograma de árbol muestra los agrupamientos surgidos del algoritmo. El largo de las ramas representa la proximidad entre dos mediciones.

esperable que un olor determinado encienda los mismos receptores en todos los animales y que esto se refleje con cierto grado de estabilidad de los patrones entre animales. Sin embargo, vemos que al utilizar la distancia, además de ser muy débiles, los agrupamientos no respetan la identidad de los olores. Estos resultados indican que la correlación resulta mejor criterio que la distancia para medir similitud entre olores en base a los patrones de actividad evocados en el AL y además, que los patrones medidos contienen información suficiente para reconocer al olor incluso de un animal a otro. Los resultados hasta aquí mostrados prueban que en base a los patrones de activación de las PNs, la acetofenona es fuertemente distinguible de 2-octanona y de 1-hexanol mientras que estos últimos dos son más parecidos entre sí y posiblemente confundibles en algunos casos. Esta interpretación coincide con las cualidades percibidas de estos tres olores ya que un alto grado de generalización comportamental ha sido reportado entre 1-hexanol y 2-octanona y en cambio estos dos son bien distinguibles

de acetofenona [Guerrieri *et al.*, 2005]. Por último debo resaltar que es importante para los experimentos que siguen más adelante, que 1-hexanol y acetofenona a pesar de ser codificados por patrones bien distintos y decorrelacionados, ambos son aprendidos con dinámicas idénticas en el condicionamiento olfativo de PER y muestran tener saliencias semejantes.

4.2. MEZCLAS

4.2.1. Variabilidad en la representación

Hasta acá hemos visto que si bien existe cierto grado de variabilidad en la representación de los olores puros, este no impide distinguir a que olor corresponde un patrón de actividad independientemente del animal. Pero ¿Qué ocurre con la representación de las mezclas donde el número de receptores involucrados aumenta y por lo tanto las interacciones laterales también los hacen? Si hacemos el mismo análisis de la sección anterior ahora incluyendo las mediciones de patrones evocados por las mezclas binarias observamos que la correlación entre los patrones evocados por mezclas en distintos animales es menor que los valores de correlación evocados por los olores puros (figura 26).

La menor correlación se debe a que las mezclas tienen una representación más variable entre animales que los olores puros. Una explicación posible es que las mezclas reclutan más glomérulos y por lo tanto tienen más candidatos para exponer variabilidad. Sin embargo, ya hemos visto antes que 2-octanona recluta más glomérulos que 1-hexanol y acetofenona y eso no conlleva a un efecto significativo de mayor variabilidad en ese olor respecto de los otros olores puros. Nuestra hipótesis respecto de la mayor variabilidad es que la incorporación de componentes en la mezcla aumenta la complejidad y el número de las posibles interacciones laterales y que estas últimas son especialmente sensibles a incorporar variabilidad. Por ejemplo, un factor a generar variabilidad en la mezcla es que lo que varíe de animal a animal sea la participación relativa de los olores puros en la representación de la mezcla. Puede ser que la representación de los olores puros sea estable, pero como consecuencia de interacciones competitivas su contribución sea reducida en el caso de una mezcla. En otras palabras, la representación de la mezcla sumaría la variabilidad intrínseca de la representación de los olores puros y la variabilidad de cómo esos dos componentes interactúen. Para

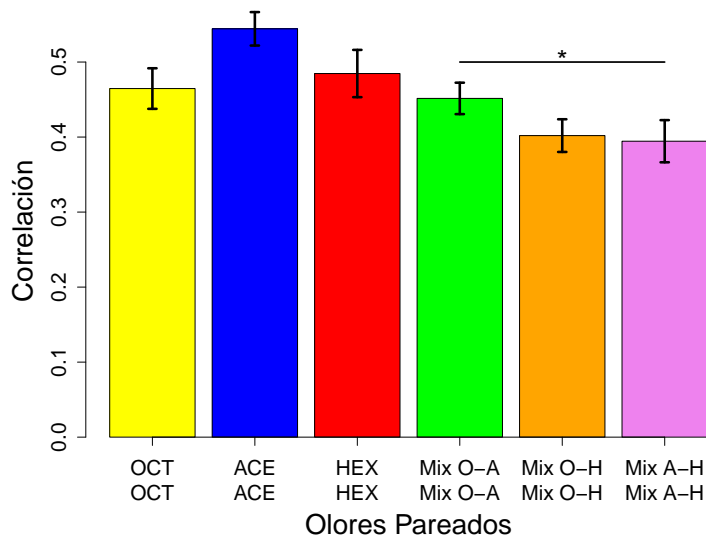
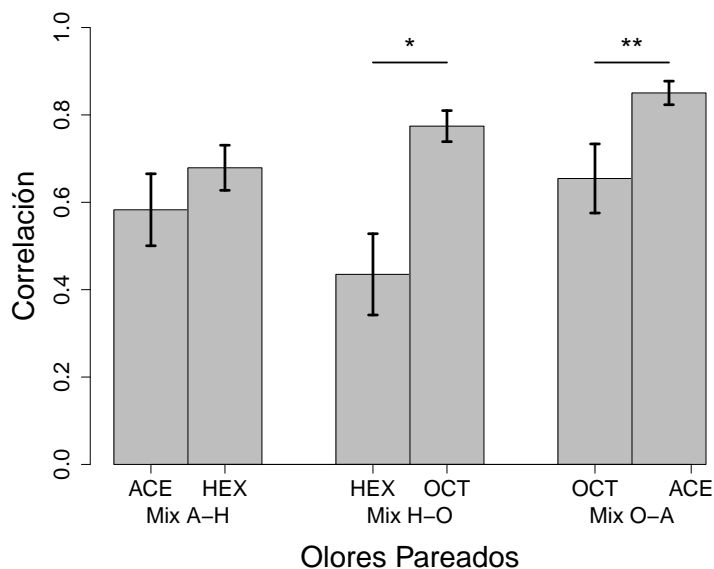


Figura 26: Correlación de los patrones de actividad de los olores puros y las mezclas binarias. Promedio y error estándar de las correlaciones entre los patrones de activación en el AL de los 11 animales. Los primeros tres (amarillo, azul y rojo) corresponden a los olores puros (2-octanona, acetofenona y 1-hexanol respectivamente) y los últimos tres (verde, naranja y violeta) a las mezclas binarias (OCT-ACE, OCT-HEX y ACE-HEX respectivamente). Se comparan mezclas vs puros * $p < 0.001$ (t.test).

evaluar dicha posibilidad realizamos un análisis para describir en cada animal cuan parecidas son la representaciones de las mezclas con la de los olores componentes. Para ello calculamos la correlación entre el patrón de cada uno de los componentes con el patrón de la mezcla. De este modo el patrón de la mezcla queda descrito por su correlación con el patrón de los componentes. Esto fue realizado para cada mezcla binaria, Mix A-H, Mix O-H y Mix O-A con sus respectivos olores componentes. Es importante resaltar que *a priori* no existe ningún motivo para poder predecir que uno u otro componente va a estar más representado que el otro, o que ambos estarán equirepresentados, ya que no conocemos cuál es el signo y magnitud de las interacciones entre elementos activados por un componente y por el otro. Este análisis fue inicialmente realizado en abejas forrajeras sin entrenamiento alguno con los olores mencionados. Los resultados se muestran en la figura 27 y representan el promedio y error estándar de 11 animales para cada una de las 6 correlaciones calculadas (3 mezclas \times 2 componentes cada una).

Podemos ver que la mezcla acetofenona-hexanol (que llamamos Mix A-H) es equilibrada en el sentido de que los valores promedio de correlación de cada uno de los componentes con la mezcla no presentan diferencias significativas entre sí. En cambio, las dos mezclas que contienen 2-octanona (Mix O-H y Mix O-A) no tienen una representación balanceada de los componentes ya que en promedio la mezcla esta mas correlacionada con 2-octanona que con el otro olor. Hasta aquí hemos visto el valor medio y el error estándar para los 6 tipos de correlación, sin embargo esto no evidencia la variabilidad entre animales de la que

Figura 27: Correlación entre mezclas y olores puros. Se muestran promedio y SE de la correlación entre las representaciones de los olores puros y las mezclas que lo contienen. De izquierda a derecha: la correlación entre la mezcla ACE-HEX y las componentes con ACE, luego con HEX; la mezcla OCT-ACE con ACE y luego con OCT; por último la mezcla OCT-HEX con HEX y luego con OCT). * $p=0.0101$, ** $p=0.004738$ (t.test pareado)



hablamos en los párrafos anteriores. Para ver cómo se distribuye en cada animal el peso de los componentes en la mezcla que los contiene, reorganizamos los datos de correlación de cada animal en los tres gráficos de la figura 28. Cada gráfico corresponde a una mezcla y en cada uno de ellos los ejes indican el valor de correlación entre el patrón de la mezcla y el de los componentes. Así por ejemplo para la mezcla Mix A-H pondremos en el eje x el valor de correlación entre la mezcla y acetofenona, y en el eje y la correlación entre la mezcla y 1-hexanol. Cada punto en el gráfico corresponde a la representación de la mezcla medida en un animal distinto. Como se observa en el caso particular de la mezcla Mix A-H la variabilidad en cuanto a la fuerza con la cual se representan los componentes en la mezcla cubre prácticamente todo el rango posible de la correlación desde 0 hasta 1 para ambos componentes.

En los casos de las mezclas que contienen 2-octanona (Mix O-A y Mix O-H) los animales se distribuyen como un grupo algo más compacto y con mayor representación de 2-octanona. Se ve de los gráficos que la correlación entre la mezcla y 2-octanona nunca cae por debajo de 0,5 mientras la correlación entre la mezcla y los otros olores si esta en varios casos por debajo de 0,4. Las diferencias en cuanto a la variabilidad de la presencia de 2-octanona y la de los otros olores puede estar relacionada en parte con la intensidad de los patrones de actividad evocados por los olores puros. En secciones anteriores verificamos que 2-octanona evoca en la mayoría de los animales un patrón de mayor intensidad y que involucra mayor número de glomérulos. Por lo tanto, es esperable que su contribución al patrón complejo de

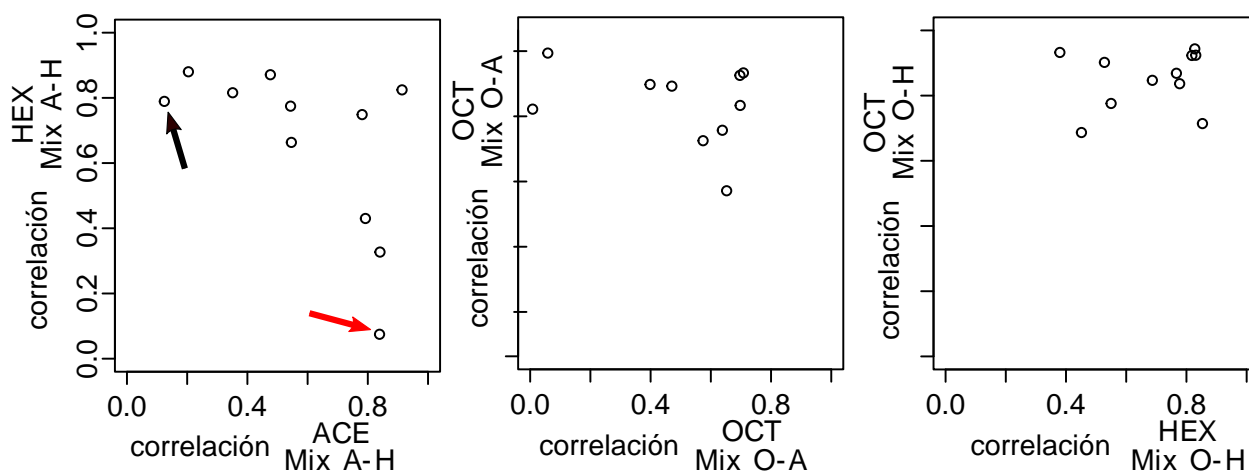


Figura 28: Variedad en la representación de las mezclas entre animales naïve. Se grafica cada uno de los 11 animales naïve. En cada recuadro se muestra una de las tres mezclas (ACE-HEX, OCT-ACE, OCT-HEX). En el eje x se coloca el valor de la correlación entre la mezcla correspondiente y una de las componentes y en el eje y el valor de la correlación de la mezcla con la otra componente. Así si por ejemplo el animal tiene una mezcla AB muy parecida a A y distinta de B el punto se situara cerca del eje que corresponde a la correlación de AB con A y lejos del eje correspondiente a la correlación AB con B.

la mezcla ensombrezca al otro olor que evoca un patrón de menor intensidad y menor número de glomérulos. Por ello, cuando 2-octanona está presente en la mezcla, la representación de esta última está volcada hacia 2-octanona. El caso de la mezcla de 1-hexanol y acetofenona, resulta ideal en términos de lo buscado para nuestros experimentos, ya que es un caso en el cual los dos olores componentes están representados por patrones de igual intensidad y número de glomérulos, las curvas de aprendizaje son semejante para ambos olores (figura 17) y en base a lo observado este el último análisis, la representación de la mezcla es susceptible a sufrir desviaciones hacia un lado o hacia el otro. Sin embargo, es probable también que esta variabilidad como punto de partida de los experimentos pueda dificultar la identificación de cambios específicos generados por un entrenamiento. En el caso de las mezclas con 2-octanona, el sesgo en la representación de las mezclas que contienen este olor, sumado al menor aprendizaje que se ha observado hacia 2-octanona (figura 17) plantea a su vez una relación asimétrica con la de los otros olores respecto de la posibilidad de encontrar que un entrenamiento con 2-octanona desplace la representación de la mezcla aún más hacia 2-octanona.

Por todas estas razones, para los experimentos de aprendizaje que siguen se optó por entrenar a los animales con 1-hexanol y con acetofenona, ya que estos olores mostraron mejores y similares tasas de aprendizaje y se espera que puedan mostrar más sensiblemente

corrimientos respecto de su representación en el patrón de la mezcla.

4.2.2. Codificación de olores puros y mezclas

Un objetivo central de esta tesis es comprender cuál es la información acerca de los componentes en la representación interna de la mezcla y si la calidad de esa información es modificada por la experiencia. Como aproximación a la primera de esas dos preguntas me propuse primero comprender si la representación de la mezcla confiere a esta una identidad nueva y distinta a las de los componentes o si es codificada como combinación de los componentes. Realicé entonces un análisis de componentes principales tal como fue hecho antes para los olores puros donde había comprobado que la trayectoria de cada uno de los olores puros se representa en una dimensión perpendicular a la de los otros dos olores. En principio podría ocurrir lo mismo con las mezclas y esto sería sugerencia de que existen elementos suficientes en su representación como para que sean codificadas y reconocidas como elementos distintos. De ser así en un análisis de componentes principales las trayectorias de las mezclas deberían estar codificadas en dimensiones diferentes y ortogonales a las de sus componentes. Para ello, los tres olores puros y las tres mezclas binarias fueron analizados en un único PCA cuyos resultados se muestran la figura 29. Para posibilitar la visualización se graficaron de a tres trayectorias por vez tal que cada gráfico muestra solo dos olores puros y la mezcla que contiene a esos dos olores. Es importante destacar que el PCA fue hecho con los seis olores a la vez y que como se ve en el primer panel de la figura las trayectorias de los tres olores puros siguen siendo perpendiculares entre sí.

Las figura 29b, c y d, muestran las trayectorias de las mezclas Mix O-H, Mix A-H y Mix O-A respectivamente. A lo largo de cada panel se presenta el mismo resultado del PCA girando el plano de enfoque para dar noción del espacio en el que se proyectan las trayectorias de las mezclas respecto de los componentes. Siguiendo la rotación se puede identificar que todas las mezclas se representan en el plano que contiene a las componentes. Esto muestra que las mezclas están siendo representadas básicamente como una combinación lineal de los olores puros.

Con los resultados del PCA en mente me propuse estudiar entonces si el patrón de la mezcla podía ser predicho en un animal en el cual conociera los patrones evocados por

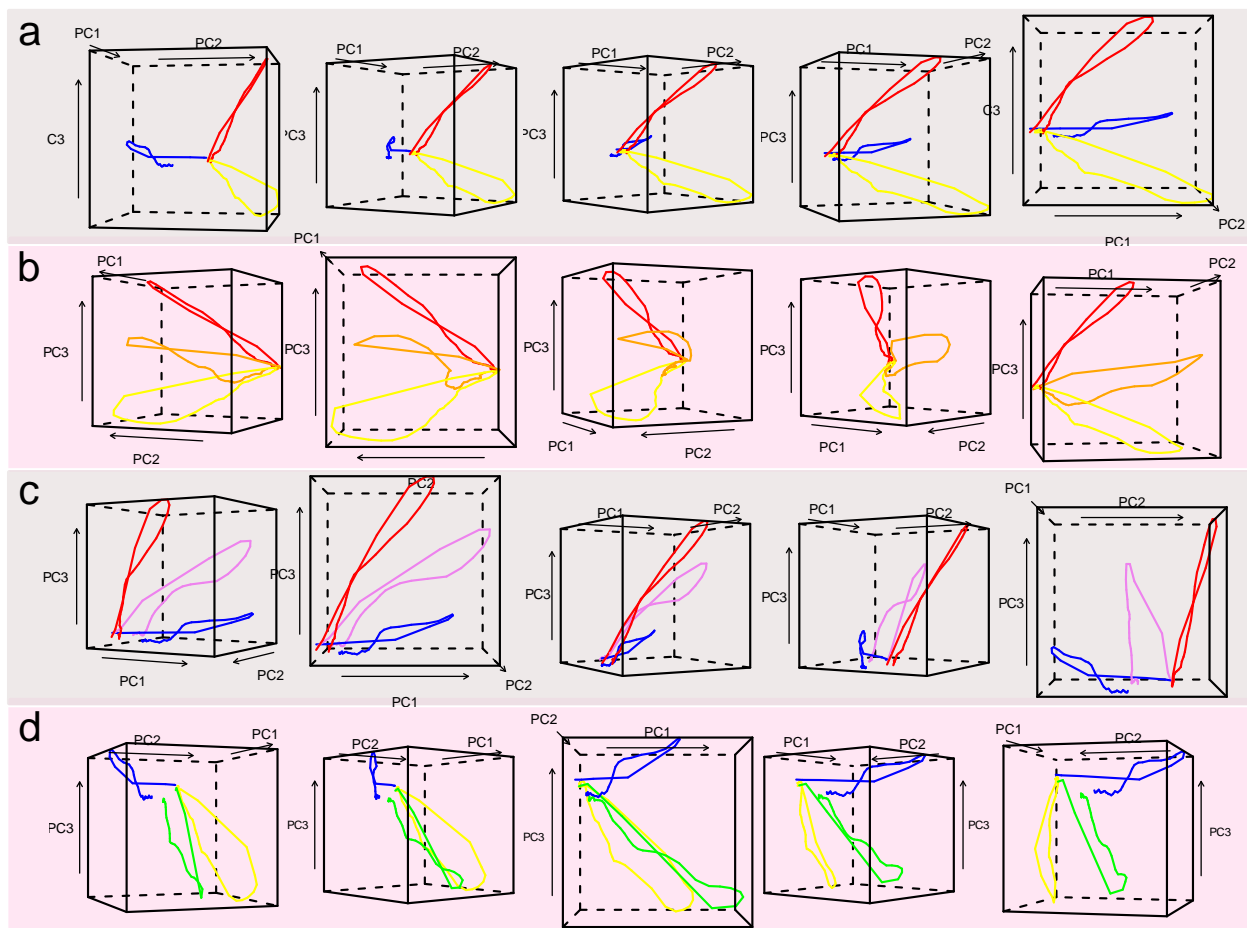


Figura 29: PCA: Las mezclas se encuentran en el plano que contiene a los olores. Se graficó en representación tridimensional el resultado del análisis de componentes principales realizado sobre los datos de los seis olores (OCT, ACE, HEX y las mezclas binarias OCT-ACE, OCT-HEX y ACE-HEX) se utiliza la actividad de 5 s desde el iniciado el olor (que dura 1 s). De izquierda a derecha se ve una rotación del mismo gráfico. **a** los olores puros ACE (azul), OCT (amarillo) y HEX (rojo). En la rotación se puede ver que los tres olores están en direcciones perpendiculares. Abajo se muestran las curvas de cada mezcla y los olores puros que las componen. En la rotación permite ver que en los tres casos los tres olores están en el mismo plano lo que indica que la mezcla se represente en las dimensiones definidas por los olores componentes. **b** Los olores puros OCT (amarillo), HEX (rojo) y la mezcla OCT-HEX (naranja). **c** Los olores puros ACE (azul), HEX (rojo) y la mezcla ACE-HEX (violeta). **d** Los olores puros OCT (amarillo), ACE (azul) y la mezcla binaria OCT-ACE (verde). Las tres PC suman el 98,33 % de la varianza donde PC1 el representa 91,54 %, PC2 el 5,19 % y PC3 el 1,59 %.

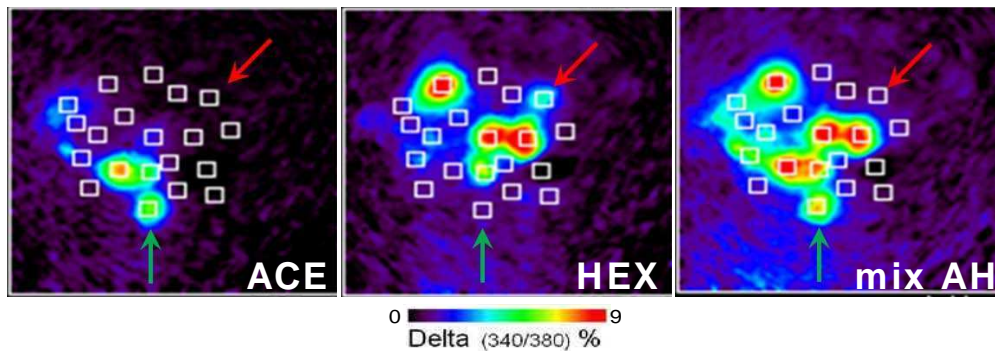


Figura 30: La representación de la mezcla no es la suma de las representaciones de los olores puros. Las figuras corresponden a patrones de activación en el lóbulo antenal evocados por ACE, HEX y la mezcla ACE-HEX. Los valores de actividad se muestran en falso color (rojo máxima activación y negro sin activación). Las fotos corresponden a los 500ms después de encendido el olor. Los cuadrados blancos están centrados en glomérulos identificados cuya actividad fue cuantificada. La flecha roja señala un glomérulo que se enciende en HEX y no lo hace en la mezcla mostrando un caso de inhibición por mezcla. La flecha verde muestra un glomérulo que se enciende en ACE, no lo hace en HEX y la actividad en la mezcla es mayor a la de ACE mostrando un efecto de sinergismo por mezcla.

los olores puros. En principio, si ignoramos la acción de las neuronas inhibitorias y de las posibles interacciones en el lóbulo antenal, es esperable que si acetofenona recluta un número de receptores con cierta intensidad y 1-hexanol hace lo suyo con otro grupo de receptores, entonces la mezcla reclute la suma de ambos. Ello es esperable, puesto que en la mezcla hay un número total de moléculas de odorante que es igual a la suma de moléculas en los componentes. Sin embargo, dado que la respuesta de los receptores no tiene por qué ser lineal a la concentración del odorante y dados los fenómenos de interacción lateral en el lóbulo antenal, la respuesta a nivel de los patrones de activación de las PNs nunca es igual a la suma directa de las respuestas a los componentes. Por ejemplo en el animal de la figura 30 hay señalados dos glomérulos que ejemplifican claramente este fenómeno. El glomérulo marcado con una flecha roja se activa con acetofenona, no lo hace con 1-hexanol y si valiera la sumación directa debería estar encendido en la mezcla. Sin embargo, como se ve, este glomérulo no se activa por la mezcla. Como ejemplo de lo contrario se muestra al glomérulo indicado con una flecha verde que se enciende con acetofenona y no lo hace con 1-hexanol y con la mezcla se enciende más de lo que sería la propia de las actividades evocadas por los olores puros. Como vemos en este ejemplo tenemos glomérulos que muestran actividades por debajo de la actividad producida por una de las componentes y otros glomérulos que se encienden por encima de lo esperable.

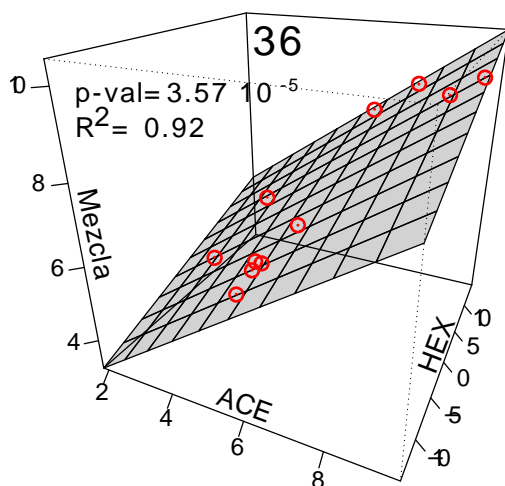


Figura 31: . La actividad evocada por la mezcla puede predecirse como combinación lineal de las actividades evocadas por los olores componentes. Se observa el ajuste lineal en tres dimensiones de los datos de actividad para el glomérulo 36 en la mezcla ACE-HEX. La actividad medida en cada animal es representada por un punto en un espacio tridimensional en el que un eje es la actividad evocada en por ACE el otro eje es la actividad evocada por HEX y el tercero es la actividad evocada por la mezcla ACE-HEX. Se observan 11 puntos (correspondientes a los 11 animales naïve medidos) y el ajuste lineal de los datos. $R^2=0,92$ y $p=3,57 \cdot 10^{-5}$.

Se llama inhibición por mezcla a los casos de glomérulos que presentan menos actividad que la mayor de las actividades evocadas por los dos componentes. Esto solo puede ser explicado como resultado de una inhibición producida por la presencia del otro olor. Por otro lado, se los llama sinergismos por mezcla cuando la actividad evocada por la mezcla es mayor a la suma de las actividades evocadas por los componentes, y solo puede ser entendido por la pérdida de una inhibición por la presencia del otro olor o por algún mecanismo excitatorio adicional al input directo de los receptores, también dado por el otro olor. Como se explicó en materiales y métodos la forma más general de relacionar matemáticamente la actividad producida por los dos olores puros con la actividad producida por la mezcla es a través de la ecuación lineal (ecuación 16, pagina 50). Dado que contamos con mediciones tanto de las respuestas evocadas por los olores puros como por la mezcla podemos realizar un ajuste de las características de la ecuación 16.

En la figura 31 podemos ver el ejemplo del glomérulo 36. En un gráfico 3D vemos los 11 animales como puntos en los que ponemos en un eje el valor de actividad del glomérulo 36 para acetofenona, en el otro eje el valor de actividad para 1-hexanol y en el eje vertical el valor de actividad evocada por la mezcla. En una grilla gris puede verse el plano que resulta de ajustar dicha función lineal. Como puede observarse el ajuste es bueno y todos los puntos caen muy cerca del plano ajustado. Este resultado del ajuste no es obvio y en cambio resulta sorprendente que los parámetros alfa, beta y gama logren comprimir la complejidad de las interacciones entre glomérulos. Es esperable que los parámetros alfa, beta y gama cambien para distintos olores o distintas concentraciones de los mismos que pongan en juego otras

interacciones. En definitiva, vemos que es posible realizar una ajuste lineal que permite la predicción del valor de actividad evocada por la mezcla en este glomérulo.

Si vemos los ajustes para todos los glomérulos en la figura 32 vemos que el ejemplo mostrado es representativo de lo que ocurre en los demás glomérulos. De este modo hemos calculado 20 sets de parámetros (α, β, γ) donde cada grupo de estos valores son obtenidos por el ajuste de los datos de cada glomérulo. Como medida de que los ajustes son realmente buenos reportamos el promedio de $\langle R^2 \rangle$ es $0,84 \pm 0,02$ y el de $\langle p \rangle$ $(2,7 \pm 1,1) 10^{-3}$. En la figura 32 se reporta el valor para cada ajuste. Si hacemos el mismo ajuste para las otras dos mezclas binarias obtenemos los ajustes de las figuras 33 y 34. Vemos que al igual que con Mix A-H tanto para Mix O-A como para Mix O-H los ajustes son buenos con un promedio de $\langle R^2 \rangle$ $(0,72 \pm 0,04)$ y $\langle p \rangle$ $(0,024 \pm 0,010)$ para Mix O-A y $\langle R^2 \rangle$ $(0,86 \pm 0,02)$ y $\langle p \rangle$ $(1,2 \pm 0,4) 10^{-3}$ para Mix O-H .

Mix A-H

$$\langle p\text{-val} \rangle = (2,7 \pm 1,1) 10^{-3}$$

$$p\text{-val}^{\min} = 5,88 10^{-6}$$

$$p\text{-val}^{\max} = 2,05 10^{-2}$$

$$\langle R^2 \rangle = (0,84 \pm 0,02)$$

$$R^2_{\min} = 0,62$$

$$R^2_{\max} = 0,95$$

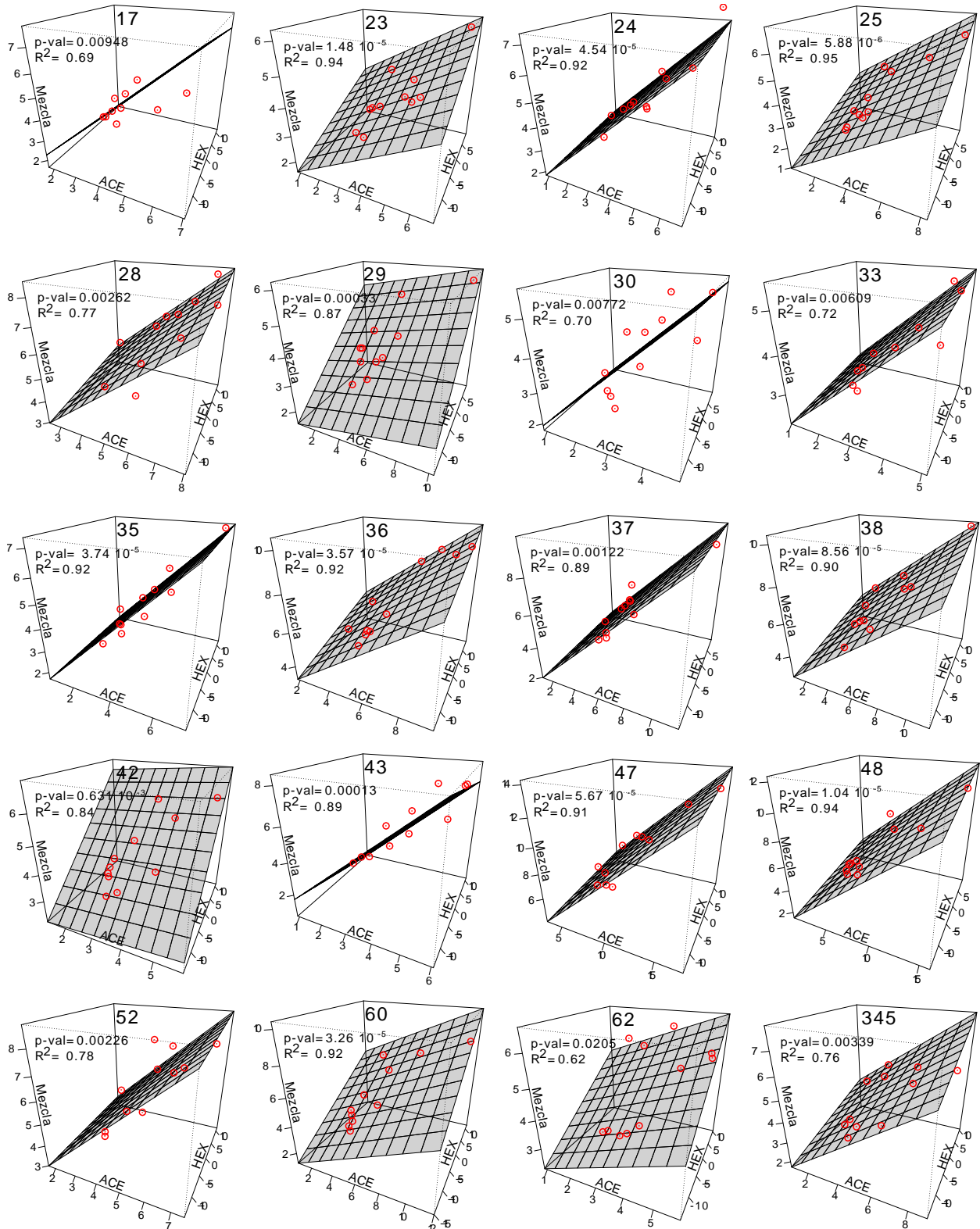


Figura 32: Ajuste lineal de los datos de actividad en la mezcla Mix A-H para los 20 glomérulos medidos e identificados. Para cada glomérulos se grafican la actividad de cada animal representada por un punto en el espacio tridimensional en el que un eje es la actividad evocada por ACE el otro eje es la actividad evocada por HEX y el tercero es la actividad evocada por la mezcla ACE-HEX. Se muestran 11 puntos correspondientes a 11 animales naïve utilizados para ajustar los planos: R^2 y p de los planos fueron en promedio: $\langle R^2 \rangle = 0,86 \pm 0,02$ y $p_{i,46} 10^{-3}$.

Mix O-A

$\langle p\text{-val} \rangle = (0,024 \pm 0,010)$
 $p\text{-val}^{\min} = 2,29 \cdot 10^{-7}$
 $p\text{-val}^{\max} = 2,56 \cdot 10^{-1}$

$\langle R^2 \rangle = (0,72 \pm 0,04)$
 $R^2_{\min} = 0,29$
 $R^2_{\max} = 0,98$

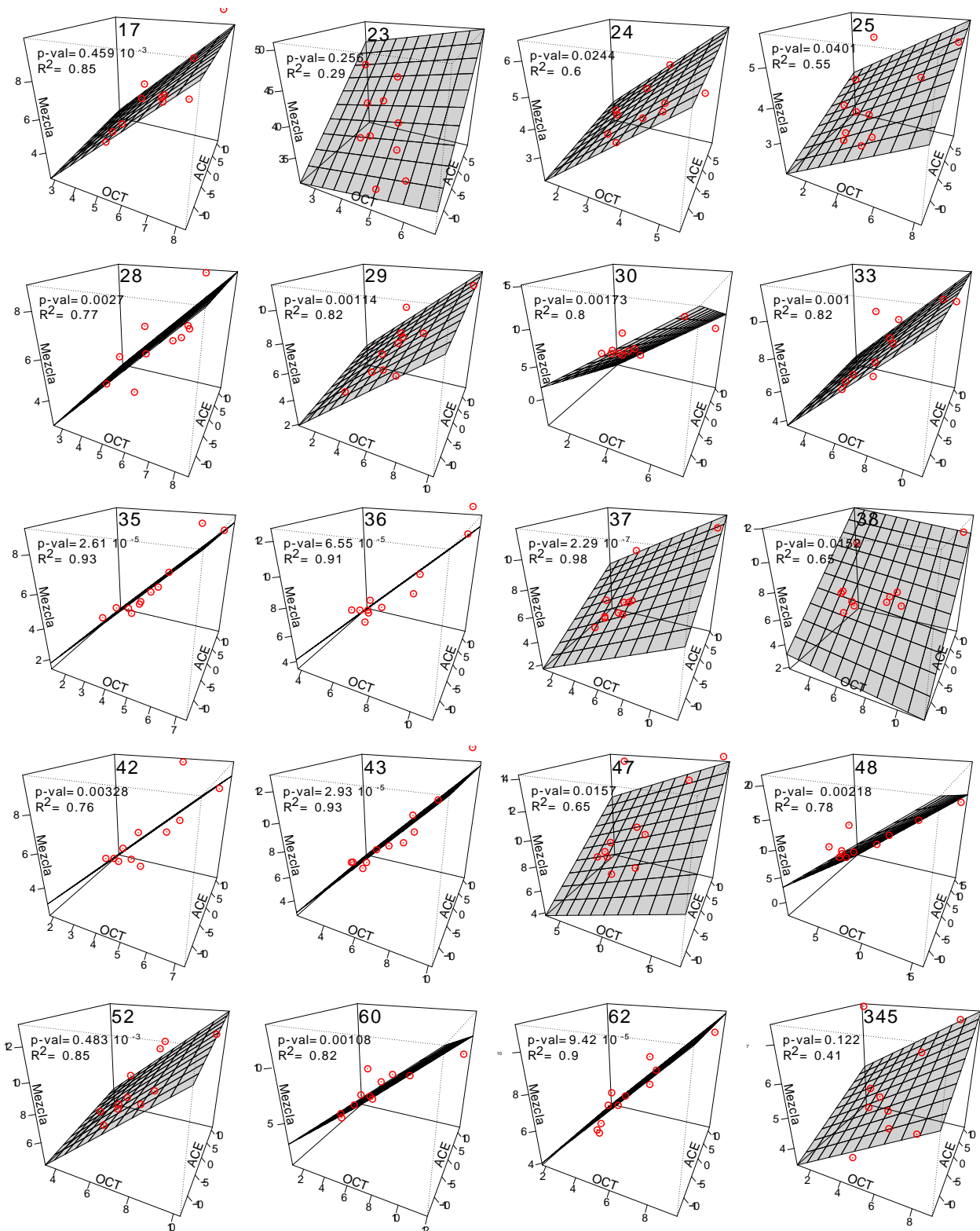


Figura 33: Ajuste lineal de los datos de actividad en la mezcla Mix A-O para los 20 glomérulos medidos e identificados. Para cada glomérulos se grafican la actividad de cada animal representada por un punto en el espacio tridimensional en el que un eje es la actividad evocada por ACE el otro eje es la actividad evocada por OCT y el tercero es la actividad evocada por la mezcla ACE-OCT. Se muestran 11 puntos correspondientes a 11 animales naïve utilizados para ajustar los planos: R^2 y p de los planos fueron en promedio: $\langle R^2 \rangle = 0,72 \pm 0,04$ y $p \approx 2,56 \cdot 10^{-1}$.

Mix O-H

$$\langle p\text{-val} \rangle = (1,2 \pm 0,4) 10^{-3}$$

$$p\text{-val}_{\min} = 3,31 10^{-6}$$

$$p\text{-val}_{\max} = 6,46 10^{-3}$$

$$\langle R^2 \rangle = (0,86 \pm 0,02)$$

$$R^2_{\min} = 0,72$$

$$R^2_{\max} = 0,96$$

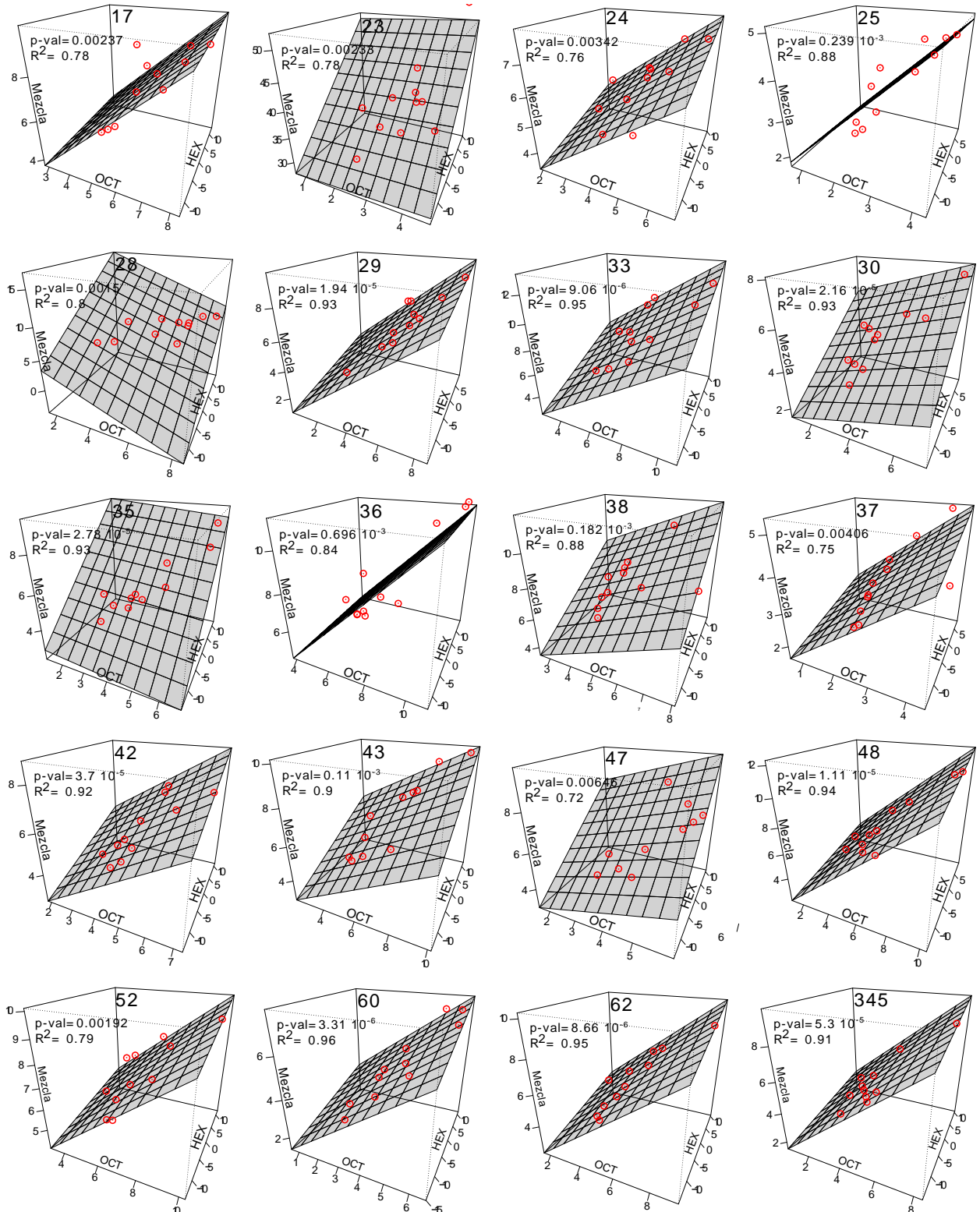


Figura 34: Ajuste lineal de los datos de actividad en la mezcla OCT-HEX para los 20 glomerulos medidos e identificados. Para cada glomerulos se grafican la actividad de cada animal representada por un punto en el espacio tridimensional en el que un eje es la actividad evocada por OCT, el otro eje es la actividad evocada por HEX y el tercero es la actividad evocada por la mezcla Mix O-H. Se muestran 11 puntos correspondientes a 11 animales naïve utilizados para ajustar los planos: R^2 y p de los planos fueron en promedio: $\langle R^2 \rangle = 0,84 \pm 0,02$ y $p_i 2,05 10^{-2}$.

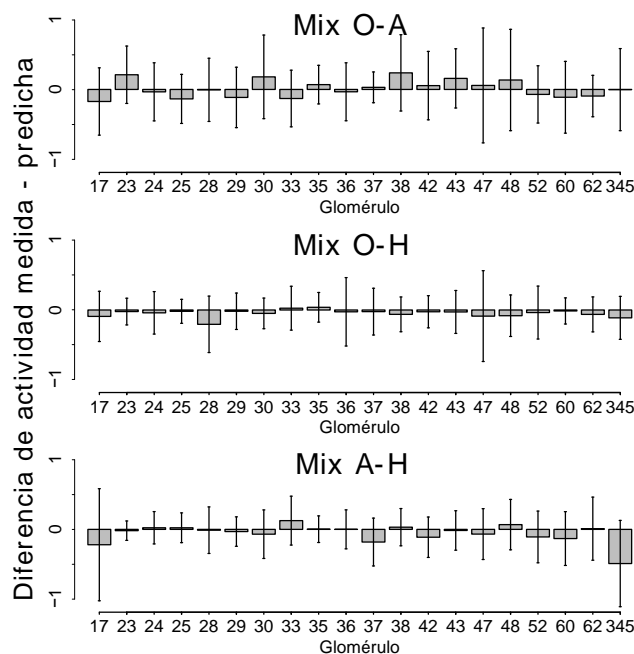


Figura 35: Diferencias entre actividad evocada y la actividad esperada para las mezcla en cada glomérulo para los animales naïve (N=11). Se muestra el promedio y error estándar de la diferencia entre el valor de actividad medida y la actividad esperada. Cada barra corresponde a un glomérulo. Ningún valor difiere de cero ($p > 0.45$ T.test pareado: medido vs esperado).

En base a la estrategia de los planos calculé la representación esperada de la mezcla para cada animal. Para ello calculé el valor de actividad esperado para cada glomérulo ante la mezcla utilizando planos que fueron ajustados a partir de los datos de todos los animales excepto los del animal cuya respuesta a la mezcla deseaba calcular. En otras palabras, el cálculo de la actividad predicha para la mezcla en un determinado glomérulo y un determinado animal fue hecho basado en la actividad evocada por los olores puros en ese mismo animal, pero utilizando parámetros alfa, beta y gama que eran calculados en base a datos de todos los animales menos ese mismo. Sería falso decir que el valor calculado para la mezcla es una predicción si los parámetros alfa, beta y gama que permiten predecirlo fueron calculados considerando las posición real de la mezcla en el mismo animal. Por ello, para cada animal y cada glomérulo se realizaron ajustes independientes dejando siempre fuera del ajuste del plano los datos del animal que era objeto de la predicción. Luego se calculó para cada uno de los 20 glomérulos la diferencia entre el valor de actividad predicha y el valor real de actividad evocada por la mezcla. Esta diferencia da medida del error de la predicción. En la figura 35 vemos el valor promedio y error estándar de las diferencias para los 20 glomérulos en 11 animales naïve y para la tres mezclas medidas. Como podemos ver los errores cometidos son indistinguibles de cero, lo que indica que se puede hacer una buena predicción del patrón de la mezcla en base a los algoritmos obtenidos.

4.3. EL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO

4.3.1. Olores puros

Antes de pasar a analizar la representación de las mezclas, debemos ver qué ocurre al entrenar los animales con los olores puros. Como hemos explicado en materiales y métodos tenemos tres grupos de animales un grupo control o naïve (que es el que hemos analizada hasta aquí), y los correspondientes grupos entrenados a cada uno de los olores, Acetofenona y 1-hexanol, a los que hemos presentando diez repeticiones del olor recompensado asociado a una gota de $0.4 \mu\text{l}$ de solución de sacarosa 2M. Todos los animales fueron capturados en el día cero, colocados en los cepos y alimentados. El entrenamiento se realizó en el día uno entre las 9 hs y las 14 hs. Seis horas después se tiñeron las neuronas de proyección y los animales fueron alimentados. El día dos entre las 9 hs y 14 hs se realizaron los experimentos de imaging. Lo que esperamos en los animales entrenados es que el olor recompensado se separe más del resto de los olores como consecuencia de que los patrones de activación sean más fácilmente distinguibles. Si repetimos el análisis de clustering con los animales entrenados, en este caso mostraremos solo los datos de correlación porque ya hemos mostrado que reproducen más fielmente los resultados comportamentales siendo capaz de identificar los olores por separado, lo que obtenemos se encuentra en la figura 36.

En los gráficos de clustering como el de la figura 36 la formación de regiones de alto contraste de los colores indican grupos en los cuales las mediciones se encuentran fuertemente asociadas entre sí y altamente alejadas del resto. En base a ello se observa que en los animales entrenados se exageran las diferencias entre olores distintos. En el gráfico 36 el color rojo indica baja correlación entre los patrones de actividad y el blanco indica alta correlación. Como es de esperar, vemos que en los tres tratamientos hay agrupamientos correctos por olor. Sin embargo en el caso de animales naïve, se puede estimar por la dispersión de los colores, que los grupos de olores no están tan fuertemente diferenciados entre sí como es en el caso de los animales entrenados. En los animales entrenados se observa que los olores se diferencian más, dando en las correlaciones cruzadas valores más bajos que en las correlaciones dentro del mismo olor.

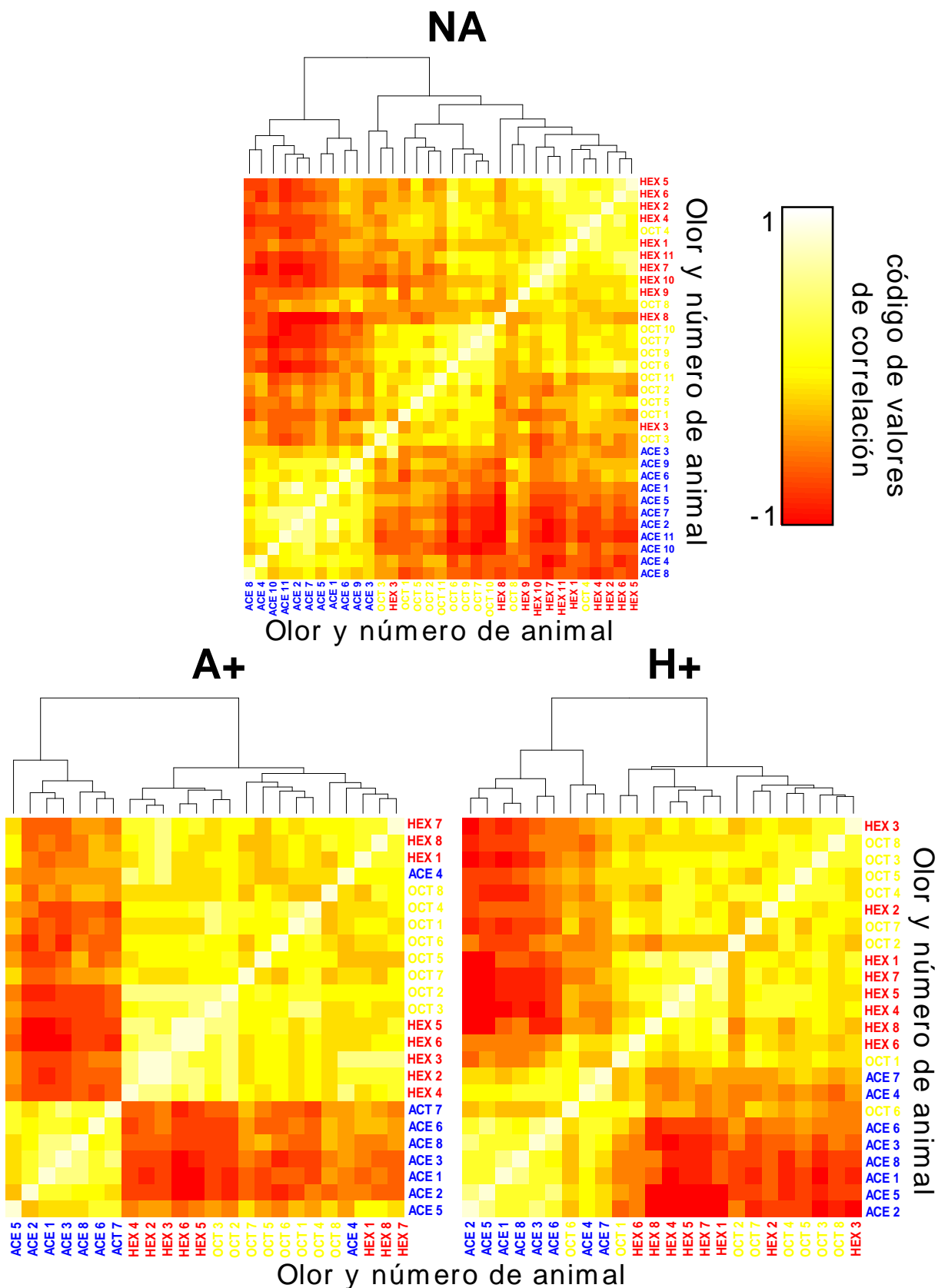


Figura 36: La experiencia con los olores afecta los clusters. Se realizó un análisis de clusters con todos los olores puros de todos los animales para el grupo naïve y los grupos entrenados A+ y H+. Los colores representan valores de correlación obtenidos. Blanco: alta correlación; Rojo: baja correlación. En los ejes se indican los olores y el número del animal al que corresponden. El orden es en base algoritmo de clustering. Arriba del grafico un dendrograma de árbol muestra los agrupamientos surgidos del algoritmo. El largo de las ramas representa la proximidad entre dos mediciones.

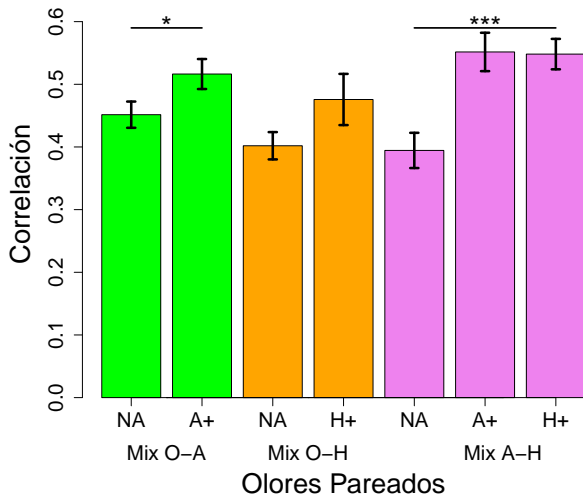


Figura 37: La experiencia aumenta la correlación entre patrones de actividad de distintos animales. Se muestran el promedio y error estándar de la correlación entre patrones de actividad de distintos animales bajo el mismo tratamiento. Los colores representan las mezclas (Mix O-A de verde, Mix O-H de naranja y Mix A-H de violeta). El tratamiento, Naïve, A+ o H+ al pie de cada barra. Se observa un incremento en la correlación para los grupos entrenados respecto del grupo naïve. * $p=0.045$ (t.teste pareado) ANOVA $F_{2,108} = 10,34$ $p < 0.001$, Tukey post hoc *** $p < 0,001$

4.3.2. La experiencia con un componente reduce la variabilidad

Cuando expuse acerca de la variabilidad en la representación de las mezclas en animales naïve presenté el valor medio y error estándar de la correlación entre las representaciones que las mezclas toman en distintos animales y vimos que eran significativamente menor que la correlación entre representaciones de los olores puros (figura 26). Si ahora miramos estos datos en animales entrenados observamos que las mezclas en los animales que tienen experiencia apetitiva con alguno de los componentes presentan un aumento significativo de la correlación, lo que implica una menor variabilidad entre las representaciones tomada por las mezclas en los animales entrenados (figura 37). Esto sugiere que parte de esa variabilidad observada en animales naïve podría venir dada la experiencia previa de los animales y que la experiencia extra que tuvieron los animales entrenados tuvo un efecto homogeneizador sobre los patrones de la mezcla.

En resumen, para olores puros y para mezclas vimos que el entrenamiento modifica la representación de los olores y aparentemente lo hace en un sentido dependiente del entrenamiento ya que las modificaciones tienden homogeneizar las diferencias entre individuos.

En las próximas secciones estudiaré si el cambio de las representaciones es en sentido que favorece la representación y detección de uno de los componentes y si este es el componente recompensado o el componente acompañante.

4.3.3. Efecto de la experiencia sobre la representación la mezcla

Sobre la actividad de cada glomérulo en el patrón de la mezcla

Por razones técnicas y de viabilidad de los animales resulta imposible realizar mediciones en un animal antes y después del entrenamiento lo cual resultaría ideal para encontrar y describir modificaciones. Por otro lado, considerando la variabilidad que encontré en los animales naïve en términos de la representación de los componentes en el patrón de la mezcla (figura 35) resulta poco conducente hacer comparaciones directas de la actividad entre animales con distintos tratamientos, dado que muy probablemente la variabilidad interindividual sea mayor a las diferencias provocadas por las experiencias que podamos brindar a los animales en el laboratorio.

La solución a este problema vino dada por la posibilidad de poder predecir la actividad evocada por la mezcla conociendo los patrones evocados por los olores puros en el mismo animal. Para ello, en las secciones anteriores obtuve un algoritmo que permite predecir con certeza como se combinan los patrones evocados por los olores puros para dar el patrón de actividad evocado por la mezcla en animales naïve. Por esto, la estrategia de análisis llevada a cabo para encontrar efectos del entrenamiento en la representación de la mezcla, fue proyectar para cada animal, como sería la representación de la mezcla si ese fuera una animal naïve, y comparar esa representación esperada con la representación medida. Para proyectar la representación esperada de la mezcla de manera individualizada en cada animal se utilizaron los patrones de actividad evocados por los olores puros en ese mismo animal y los planos calculados a partir de animales naïve que permiten la predicción de la actividad de cada glomérulo. Cabe recordar que los algoritmos de predicción permitieron anticipar con certeza el patrón de la mezcla en los animales naïve y por lo tanto interpretamos que si estos algoritmos fallaran en la predicción del patrón de la mezcla en animales entrenados, significa que los olores puros se combinan en ellos siguiendo reglas distintas que en los naïve.

Una vez calculada la actividad esperada para cada glomérulo en cada animal y cada mezcla, comparamos esta con la actividad medida. La figura 35 muestra el promedio y error estándar de las diferencias entre la actividad medida y la esperada.

En la figura 38 se observa una notable mayor cantidad de errores de predicción en los

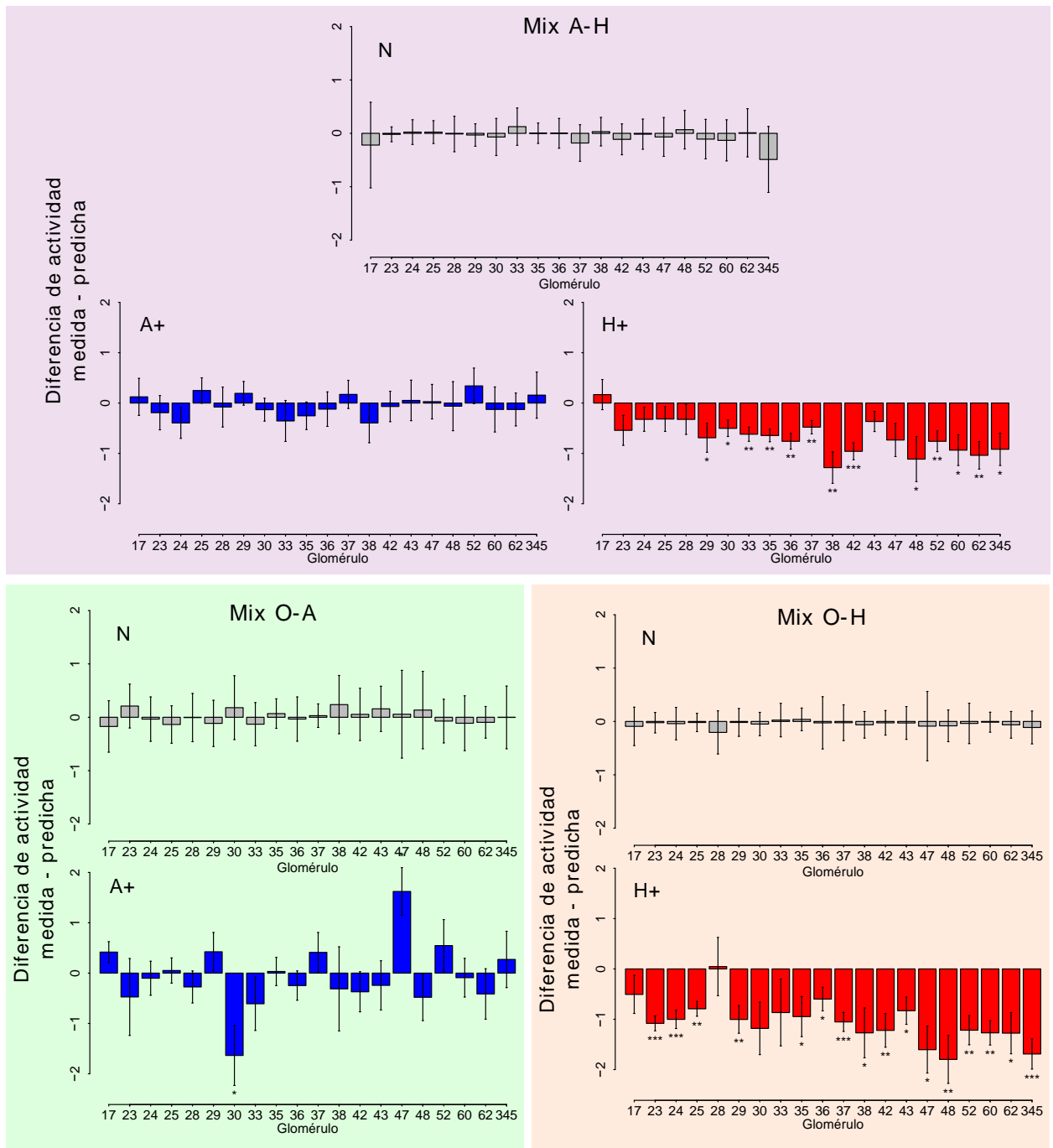


Figura 38: Error cometido por las predicciones. Diferencia entre la actividad medida y la predicha por el algoritmos de ajuste por planos en animales naïve. En cada mezcla se cuantifica el error cometido por la predicción en cada glomérulo. El recuadro de arriba corresponde a la mezcla Mix A-H. Las predicciones en animales naïve no cometen errores, mientras en los animales entrenados las diferencias son mayores con diferencias significativas en algunos glomérulos para los animales H+. Abajo a la izquierda la mezcla Mix O-A en los animales naïve y A+. De nuevo el algoritmo comete erro en los animales entrenados. Abajo a la derecha error para la mezcla Mix O-H. Los animales H+ tienen diferencias significativas entre la predicción y los valores medidos. t.test pareado medido vs esperado * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

de animales entrenados y es aún más pronunciado en el caso del entrenamiento a 1-hexanol. La diferencia expresada en los gráficos está calculada como actividad medida menos actividad predicha, por lo tanto los valores negativos indican glomérulos donde la actividad real fue menor a la esperada y pueden ser tomados como inhibiciones ya que esos glomérulos mostraron menos actividad en la mezcla que la esperada en base a la evocada por los olores puros. Contrariamente, los pocos casos de diferencias positivas, fueron glomérulos en los que la actividad fue mayor a la esperada y corresponderían a casos de sobreactivación. Estos resultados indicarían entonces que en los animales entrenados hay efectivamente un cambio respecto de los naïve con respecto a cómo los olores puros se combinan e interactúan para generar la representación final de la mezcla.

Sobre la codificación de los componentes en el patrón de la mezcla

Para analizar si los cambios en la representación de la mezcla favorecen la representación de alguno de los componentes realicé el siguiente análisis. El orden de los glomérulos tal como está en la figura 38 desde el número 17 al 345, no responde a ningún orden particular más que a estar ordenados de mayor a menor según el nombre/número con que se los reconoce de un animal a otro.

Ese nombre o identificación es relevante para agrupar datos de distintos animales y poder calcular promedios o ajustar los planos utilizados en las predicciones. Sin embargo ese orden de menor a mayor no tiene relación alguna con el perfil de respuesta de los glomérulos. En el siguiente análisis los glomérulos fueron reordenados esta vez si en base a su perfil de respuesta (en otras palabras: a que olores responden y a que olores no responden). Para hacer este orden, por ejemplo en caso de la mezcla Mix A-H, se tomó la respuesta de cada glomérulo a acetofenona y se le restó la respuesta de ese mismo glomérulo a 1-hexanol. Esto asignó al glomérulo un índice tal que si el valor es negativo, el glomérulo responde más a 1-hexanol que a acetofenona, y si el valor es positivo significa que ese glomérulo responde más a acetofenona que a 1-hexanol. En base al índice los glomérulos fueron reordenados de menor a mayor tal como se los muestra en los gráficos de barras de la figura 39. En este ordenamiento los glomérulos que responden de manera muy específica a 1-hexanol se ubican en el extremo izquierdo y los glomérulos que responden específicamente a acetofenona se

ubican en el extremo derecho. En la zona central del gradiente quedan ubicados glomérulos que tienen muy poca respuesta a cualquiera de los dos olores o glomérulos con igual a ambos olores. Como se muestra en la figura 39, lo mismo se repitió para todas las mezclas y todos los tratamientos. Una vez ordenados los glomérulos en base al perfil de respuesta, volvieron a ser consideradas las diferencias entre actividad medida y actividad esperada para la mezcla en cada glomérulo, en cada mezcla y para cada tratamiento. Los resultados de este análisis están detallados en la figura 39. Los gráficos de barras indican el índice en base al cual fue ordenado cada uno de los 20 glomérulos medidos e identificados. Ahora el número del glomérulo no es importante ya que están ordenados en base a su respuesta como lo indican las barras con gradientes de colores, desde los glomérulos que responde a un olor exclusivamente hasta los que responden al otro olor exclusivamente. Los respectivos gráficos de puntos a la derecha de cada uno muestran el error de predicción repitiendo el mismo orden de glomérulos. Lo que resulta informativo de todo este análisis es ver si el sentido y tamaño de los errores de predicción dependen del perfil de respuesta de los glomérulos y para ello se midió la correlación entre la posición del glomérulo y el error de predicción. La figura 39 muestra en el panel de la derecha los resultados de este análisis para los animales naïve y en el panel de la izquierda se muestran los animales entrenado a 1-hexanol y acetofenona. El orden de los glomérulos de izquierda a derecha está dispuesto de manera tal que sobre la izquierda en todos los casos están los glomérulos que responden al olor condicionado que fue el olor condicionado en ese caso y sobre la derecha el olor acompañante. Para facilitar la comparación, el mismo orden esta repetido en cada caso en los animales naïve, ya que en este caso no se puede hacer la diferencia entro olor condicionado y olor acompañante.

Podemos ver que en los animales naïve no hay errores de predicción en ningún caso y por tanto no hay dependencia alguna del perfil de respuesta de los glomérulos. Por el contrario, para los animales entrenados (tanto para A+ como para H+) se observa en todos los casos una tendencia de pendiente negativa lo que indica que el patrón de actividad de la mezcla muestra menos actividad que la esperada, especialmente en los glomérulos que codifican al olor acompañante (no condicionado). En particular para los animales A+ observamos una tendencia de correlación negativa ($p=0.12$) aunque no significativa para la mezcla AH mientras en para la mezcla Mix O-A la correlación si es significativa ($p=0,03$). En los animales

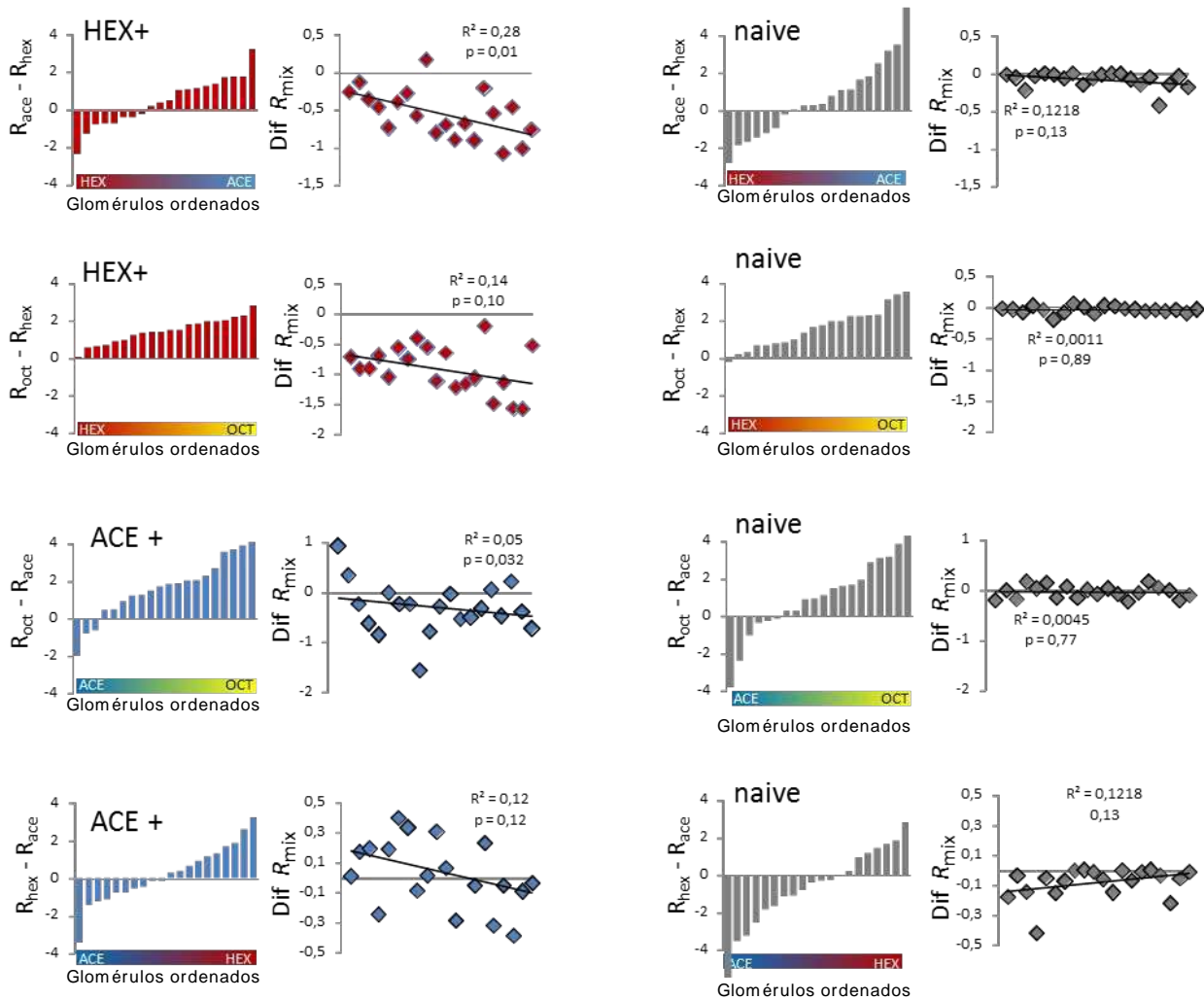


Figura 39: El algoritmo de predicción subestima, en los animales entrenados, la actividad del olor sin valor predictivo. En cada renglón, el par de gráficos de la izquierda debe ser comparado con el par de gráficos de la derecha. Panel izquierdo: grupos entrenados hex+ (rojo), ace+ (azul). Panel derecho: grupo control no entrenado (gris). Para los gráficos de animales entrenados los glomérulos fueron ordenados de izq. a der. en base al resultado de la actividad evocada por el olor condicionado menos la del olor no condicionado de la mezcla que corresponda. El mismo criterio pero en base a la identidad real del olor fue copiado para ordenar los glomérulos en los gráficos de los animales naïve de la derecha ya que en este caso no hay olor condicionado y no condicionado. Los gráficos de barras muestran los resultados del valor utilizado para ordenar de esta manera los glomérulos. Solo se muestra el análisis de las mezclas en las cuales hubo un olor condicionado. Arriba: para H+ se grafican las mezclas Mix A-H y Mix O-H que contienen el olor condicionado HEX. Abajo: A+, se muestran las mezclas Mix O-A y Mix A-H que contienen al olor condicionado ACE. Los gráficos de dispersión muestran los errores de predicción de la mezcla para cada glomérulo ordenando los glomérulos en base al orden obtenido de los gráficos de barras. Esto permitió calcular si existe una correlación entre el error de predicción y el perfil de respuesta del glomérulo. Encada gráfico de dispersión se superpone la línea de tendencia con los correspondientes valores de R^2 y p . Aclaración: el primer y cuarto gráfico de los animales naïve corresponde a los mismos datos, solo que el orden de glomérulos está invertido para facilitar la comparación directa con los gráficos de entrenados que tienen a la izquierda.

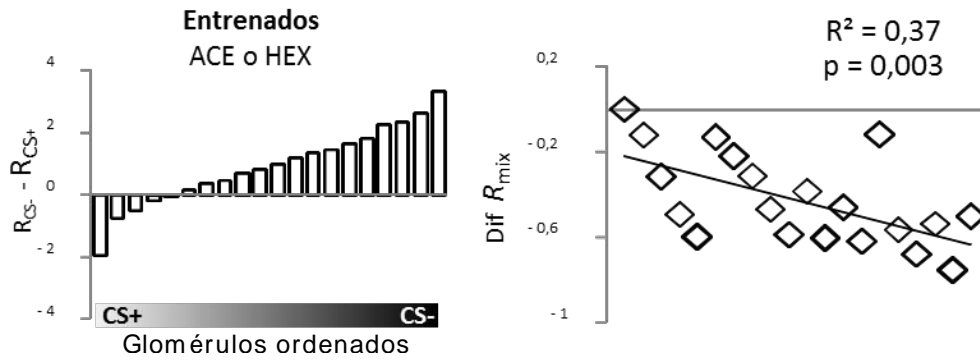


Figura 40: Errores de predicción de la mezcla en función del perfil de respuesta de los glomérulos. Se reagruparon todos los entrenamientos y todos los olores en base a categorizar los olores como CS+ o como CS- dependiendo de su función en la mezcla y sin importar su identidad real. El gráfico de barras muestra los valores obtenidos para ordenar los glomérulos en base al resultado de la respuesta a CS- menos la respuesta al CS+. En el gráfico de la derecha cada punto representa el promedio del error de predicción para los glomérulos en cada una de las 20 posiciones de ranking de la izquierda. Superpuesto al gráfico se muestra el ajuste lineal entre el error de predicción y la posición del glomérulo en el ranking. Vemos que la pendiente es negativa con $p=0,003$ mostrando que en la mezcla están subactivados los glomérulos que codifican el olor no condicionado y sin valor predictivo.

del grupo H+ se observa una correlación significativa ($p=0,017$) negativa para la mezcla Mix A-H y una tendencia ($p=0,1$) para la mezcla Mix O-H. Si bien en los casos mencionados la correlación es significativa y en otro es solo tendencias, la observación general es que en todos los grupos entrenados, los glomérulos que codifican al olor acompañante están menos activos en el patrón de la mezcla que lo esperado y en algunos casos los glomérulos que codifican al olor condicionado están más activos en la mezcla que lo esperado. Estas situaciones no se observan en los animales naïve.

Por último, si juntamos ahora todos los datos de animales entrenados y reorganizamos los glomérulos en base a su perfil de respuesta por el olor condicionado (CS+) y el olor no condicionado (CS-) sin importar cual fuera la identidad real del olor, (en otras palabras promediando los gráficos de entrenados de la figura 39) obtenemos el resultado que se muestra en la figura 40.

Sobre la información en el patrón de la mezcla

Hemos visto hasta ahora que el entrenamiento reduce la variabilidad del patrón de la mezcla entre animales (figura 37), que modifica la activación evocada por la mezcla a nivel de los glomérulos (figura 38) y que esencialmente reduce la actividad de glomérulos que codifican

el olor no condicionado (figura 39). Sin embargo aún no he comprobado que todos estos cambios conlleven a una modificación en el peso relativo de alguno de los componentes en la representación de la mezcla. Para evaluar esta posibilidad, retomé el análisis de correlación entre los patrones de actividad evocados por los olores puros y por la mezcla (figura 28) y comparé entre la correlación calculada a partir de los patrones reales de la mezcla con la correlación calculada a partir de los patrones obtenidos en base a los algoritmos de predicción utilizados más arriba (Figuras 32, 33, 34). Esto fue en primer lugar evaluado para los animales naïve en todas las mezclas y no hubo un caso en el cual la correlación entre alguno de los componentes y la mezcla difiera significativamente entre ser esta calculada en base al patrón real o en base al patrón esperado. Esto era en sí bastante esperable ya que como se vio en los pasos anteriores de este análisis la actividad esperada y la real evocadas por la mezcla no difieren en ningún glomérulo para los animales naïve (Figura 35).

La figura 41 muestra el caso de los animales entrenados a acetofenona y a 1-hexanol. Los gráficos de la izquierda expresan la ubicación relativa de la mezcla en base a su correlación con los patrones evocados por los olores puros. En cada uno de los gráficos dos puntos corresponden a un animal. El punto blanco de contorno negro representa la ubicación de la mezcla en base a las correlaciones esperadas con cada uno de los componentes, mientras el punto negro corresponde a la posición de la mezcla en base a las correlaciones obtenidas a partir de los patrones medidos. Los puntos que corresponden a un mismo animal están unidos por una flecha. Es decir, a modo muy esquemático los gráficos muestran el desplazamiento de la representación de la mezcla desde su ubicación esperada hasta su ubicación medida. Para cualquiera sea la mezcla y el tratamiento los ejes están dispuesto de manera tal que la correlación entre la mezcla y el olor condicionado se indican en el eje vertical y la correlación con el olor no condicionado se expresa sobre el eje horizontal. El conjunto de flechas ubicado inmediatamente a la derecha de cada gráfico reproduce el desplazamiento de la representación de la mezcla en cada animal desde su representación esperada si fuera un animal naïve hasta su representación después del entrenamiento. Todos los vectores están centrados en su origen para facilitar la visualización del efecto. La flecha negra representa el desplazamiento promedio. Por la posición de los ejes, los desplazamientos hacia arriba simbolizan un aumento en la correlación de la mezcla con el componente condicionado y los desplazamientos hacia

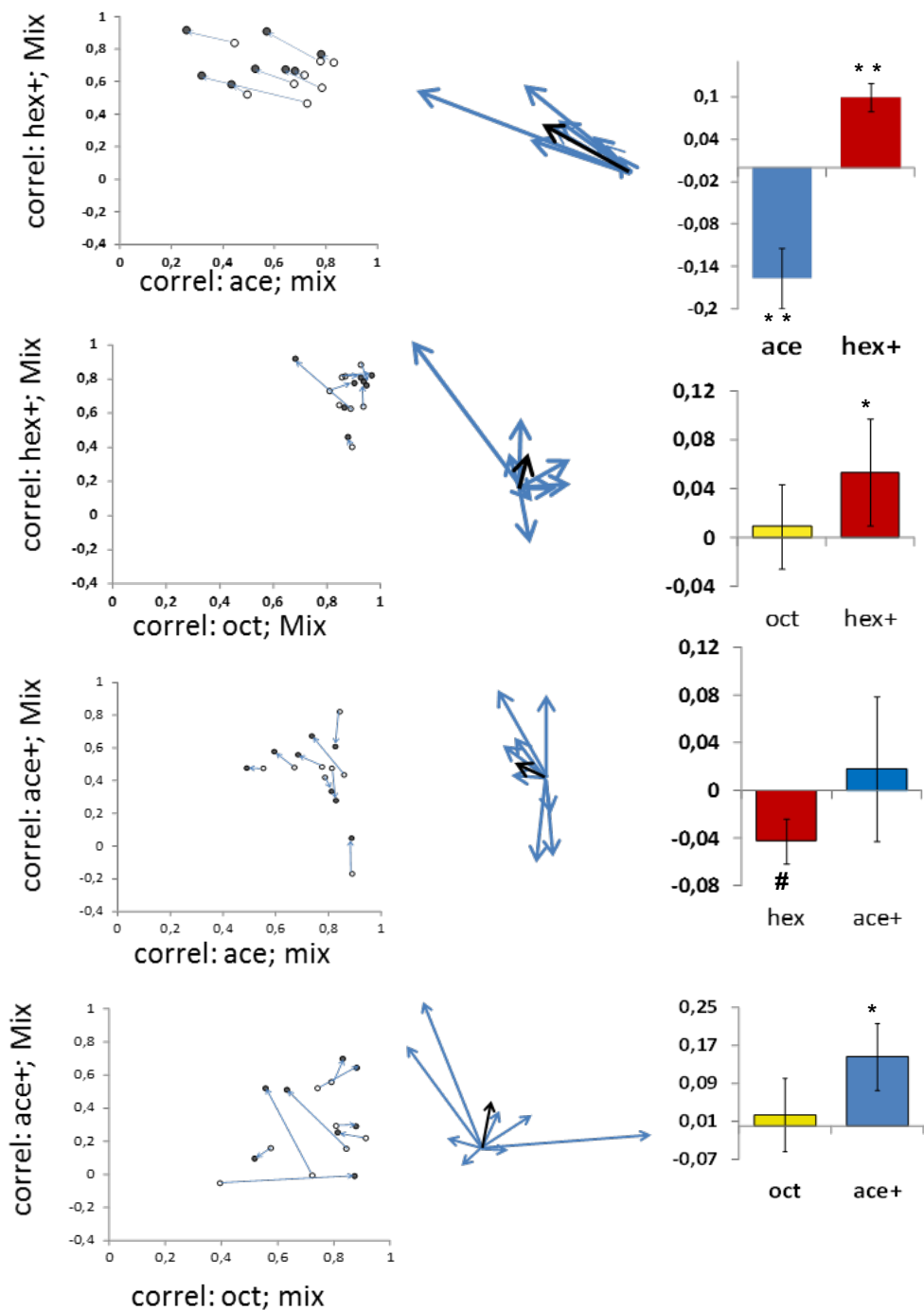


Figura 41: Se desglosa cada una de las mezclas relevante para cada tratamiento. Primero arriba los animales H+. Luego abajo los animales A+. En los gráficos de la izquierda el eje x es la correlación entre la mezcla y el CS- y el eje y la correlación con el CS+. Cada punto negro relleno son los valores para un animal entrenado. Los círculos vacíos son los valores esperados. Las flechas unen el valor esperado con el medido y muestran la dirección de desplazamiento. Si una flecha apunta en la dirección de uno de los ejes quiere decir que la representación de la mezcla de ese animal se parece más al olor de ese eje que lo esperado. En los gráficos de la columna del medio se organizan todas las flechas y se calcula una dirección promedio (flecha negra). Los gráficos de barra muestran media y erro de las diferencias para cada olor. T.test pareado correlación olor puro con mezcla medido vs esperado # $p=0.062$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

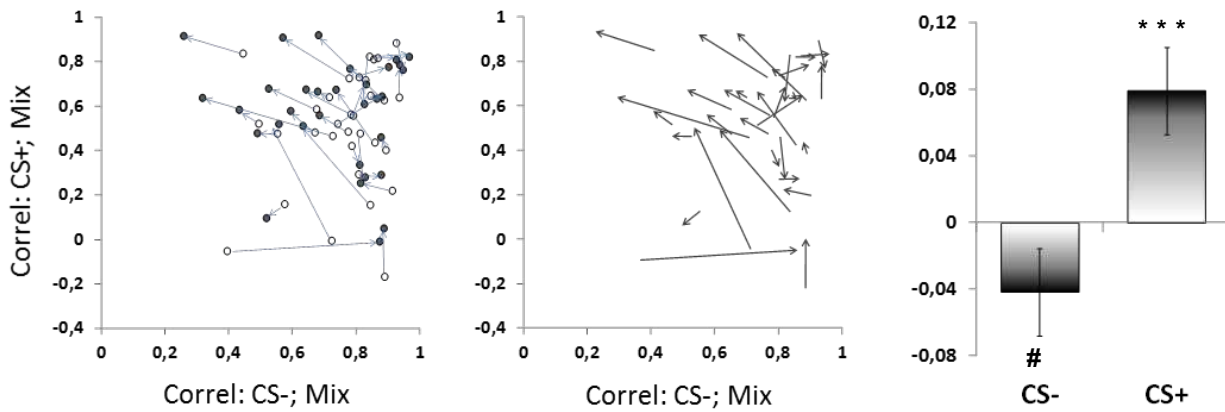


Figura 42: Ubicación de la representación de la mezcla esperada y la mezcla medida en relación a su correlación con el olor condicionado (CS+) y el olor no condicionado (CS-) en todos los animales entrenados. En el gráfico de la izquierda se muestran con puntos negros las correlaciones para las mezclas medidas y en círculos vacíos para las mezclas esperadas. Las flechas unen la mezcla esperada con la mezcla medida en cada animal y muestran el sentido del desplazamiento. En el centro se muestran solo las flechas donde es más evidente que en su gran mayoría las mezcla se desplaza en sentido de abajo a la derecha hacia arriba a la izquierda consistente con desplazarse hacia el olor condicionado (CS+) y alejándose del olor no condicionado (CS-). A la derecha la cuantificación de efecto expresado como el promedio y error estándar de la diferencia entre la correlación esperada y la correlación medida entre la mezcla y los olores CS- y el CS+. La diferencia fue calculada como la medida menos la esperada, por lo tanto valores negativos significan una correlación menor a la esperada y valores positivos significan una correlación mayor a la esperada. T.test parado medido vs esperado # $p=0.05$, *** $p<0.001$

la derecha representan aumento en la correlación con el componente no condicionado. La cuantificación formal del desplazamiento en la representación de la mezcla que favorece la codificación de uno de los olores puros, esta expresada en los gráficos de barra del panel de la derecha, los cuales muestran el promedio y error estándar de la diferencia entre la correlación real y la correlación esperada de a mezcla con los olores condicionado y no condicionado que son parte de la mezcla. Los gráficos muestran las tendencias y las significancias que en casi todos los casos son consistentes con un desplazamiento de la mezcla hacia la representación de olor condicionado y alejándose del olor no condicionado.

Dado que en las cuatro casos estudiados, los resultados mostraban la misma dirección de cambio, reagrupé y promedié todos los datos en base a dos categorías únicas: correlación entre la mezcla y el olor condicionado (cor: CS+, Mix) o la correlación entre la mezcla y el olor no condicionado (cor: CS-, Mix). Los resultados se muestran en la figura 42

4.3.4. Comportamiento

Por un lado hemos encontrado que el condicionamiento con acetofenona modifica la representación de las mezclas que la contienen y por la dirección del cambio de la representación, interpretamos que acetofenona debería ser más claramente percibida en esas mezclas después del entrenamiento que antes del mismo. De manera similar, el entrenamiento con 1-hexanol desplaza la representación de las mezclas que lo contienen en una dirección en la que 1-hexanol debería ser más claramente percibido después del entrenamiento que antes del mismo. Si es cierto que estos cambios en la representación de las mezclas modifican la percepción de estas, entonces esto debería poder ser evidenciado en el comportamiento del animal. Sin embargo un paradigma de comportamiento que evidencie esto no es trivial, ya que la única forma de saber que el animal está percibiendo uno de estos olores es entrenándolo a responder a ellos. La pregunta difícil es como hacemos entonces para medir cuanto percibe un animal un olor sin tener que entrenarlo, para poder después compararlo con un animal que si estuvo entrenado. En los próximos experimentos intentaré acercarme con alguna respuesta a estos interrogantes.

Reconocimiento del olor recompensado en la mezcla

En el análisis de la representación de 1-hexanol y acetofenona vimos que su actividad recluta aproximadamente el mismo número de glomérulos en el mismo rango de actividad. Vimos además que los patrones son muy diferentes y que efectivamente la correlación entre ambos patrones es nula. En experimentos de aprendizaje vimos que ambos olores tienen curvas de aprendizaje semejantes. A continuación realizamos un experimento de condicionamiento similar al anteriormente presentado pero en este caso evaluamos a los animales no solo con el olor condicionado, sino también con el olor no condicionado y con la mezcla que contenía a los dos. Los resultados del experimento se muestran en la figura 43.

Como muestra la figura, los animales entrenados a 1-hexanol muestran valores superiores al 80 % de aprendizaje al olor condicionado y como era esperable no responden a acetofenona. Los animales entrenados a acetofenona muestran también un alto valor de respuesta al olor condicionado pero no responden a 1-hexanol. Es interesante que ambos grupos de animales

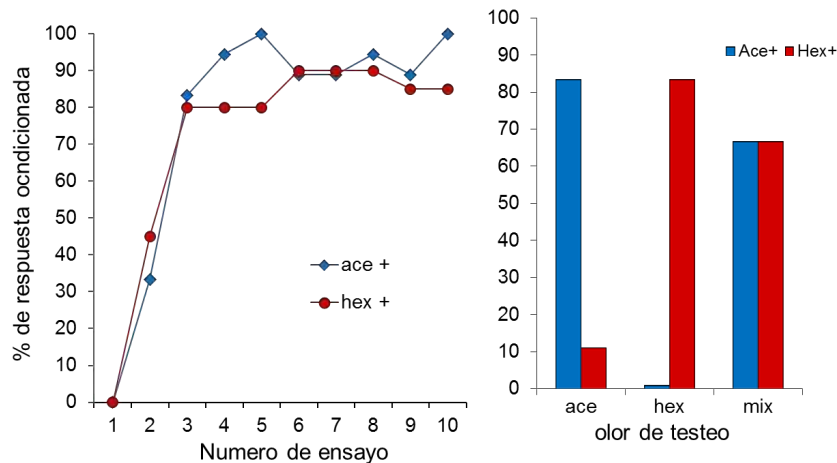


Figura 43: Los animales no confunden acetofenona con 1-hexanol y reconocen por igual su presencia en la mezcla. En la figura de la izquierda se muestran las curvas de aprendizaje de los animales en los dos tratamientos. El eje x es el número de ensayos y el eje y corresponde al porcentaje de respuesta de extensión de probóscide que evoca el olor. La curva en azul corresponde a los animales A+ (18 animales) y la roja a los animales H+ (20 animales). El grafico de barra muestra el porcentaje de respuesta evocado durante el testeo. Los colores describen el tratamiento (rojo para los H+ y azul para los A+). Las primeras dos barras son el porcentaje de respuesta a ACE, las siguientes a HEX y las últimas dos a la mezcla. Notar que mientras los animales muestran respuestas altas para el olor al que fueron entrenados no responden al olor con el que no tuvieron experiencia. Además muestran una respuesta alta a la mezcla (con la que no tuvieron experiencia) mostrando que reconocen la presencia del olor recompensado. Además el porcentaje de respuesta a la mezcla es el mismo en ambos grupos.

tienen idéntico grado de generalización hacia la mezcla y que el nivel de respuesta a la mezcla esta apenas por debajo de la respuesta al olor recompensado. Estos resultados dejan claramente ver que en ambos casos los animales fueron capaces de percibir el componente recompensado en el patrón de actividad evocado por la mezcla. La pregunta ahora es saber si el componente recompensado fue reconocido gracias a que el entrenamiento previo indujo una modificación en la representación de la mezcla que lo contiene de manera que hizo posible reconocer el componente en la mezcla.

Experimentos de ensombrecimiento

Como expliqué antes, el diseño de un experimento que nos conteste si un animal percibe un olor, sin tener que entrenarlo a ese olor, no existe. Está claro que si puede hacerse con olores que no precisen entrenamiento porque tienen un valor innato que evoca una respuesta, pero ese no es el caso que nos interesa ya que ahí no hay plasticidad o aprendizaje involucrado. Por lo tanto, tratamos de acercarnos a la pregunta por el otro lado, y en lugar de contestar si el componente entrenado es mejor percibido, intentamos contestar si el componente que

acompaña al olor entrenado es peor percibido. Esta posibilidad se desprende también de los resultados obtenidos hasta ahora en los que vimos que la experiencia recompensada con un olor modifica la representación de la mezcla que lo contiene en la dirección que la mezcla se parece más al componente recompensado y menos al componente nuevo o no recompensado. Para hacer este experimento optamos por la situación en la cual los experimentos de imaging arrojaron resultados más claros. Ese fue el caso del entrenamiento a 1-hexanol y la mezcla ace-hex. El protocolo del experimento fue el explicado en Materiales y Métodos (figura 12). Dos grupos de animales fueron tratados durante el día 1 de manera simultánea pero sometidos a distintos tratamientos. Uno de ellos fue entrenado con 1-hexanol asociado a la recompensa de solución azucarada 2M durante 10 ensayos (tal como se hizo para los experimentos anteriores) y el otro grupo (denominado control) recibió la misma solución azucarada pero sin ser asociada a ningún olor. 24 hs después, se entrenó a los dos grupos, esta vez utilizando para ambos la mezcla binaria Mix A-H (acetofenona + 1-hexanol) como estímulo condicionado, durante 6 ensayos. Finalmente se evaluó a todos los animales con acetofenona. Para tener una mayor sensibilidad en la medición de la respuesta a acetofenona se midió la latencia (tiempo que tarda el animal en extender la probóscide desde que se presenta el olor condicionado) y la duración de la extensión de la probóscide. Hay que notar que en este experimento los dos grupos tienen la misma experiencia con acetofenona de modo que si algo cambia en la respuesta a acetofenona, esto solo puede ser debido a la experiencia del primer día, en la cual el grupo entrenado aprendió el valor de 1-hexanol. Diferencias en la respuesta a acetofenona revelarían diferencias en cuanto a la percepción de la mezcla durante el segundo día de entrenamiento.

En la figura 44 podemos ver las curvas de aprendizaje para los dos grupos el primer y segundo día de entrenamiento y la cuantificación de la latencia y la duración de la extensión de probóscide en la evaluación con acetofenona. En los animales entrenados a 1-hexanol en el primer día de entrenamiento la curva de aprendizaje llegó rápidamente a porcentajes mayores al 80 % y esto se mantuvo estable durante el resto de los ensayos. Por supuesto el grupo control que solo recibió la solución azucarada sin asociarla a ningún olor no mostró aprendizaje. En el segundo día el grupo control comienza con un bajo porcentaje de respuesta y en pocos ensayos (tres) tiene una respuesta superior al 80 % que se sostiene en el resto de los

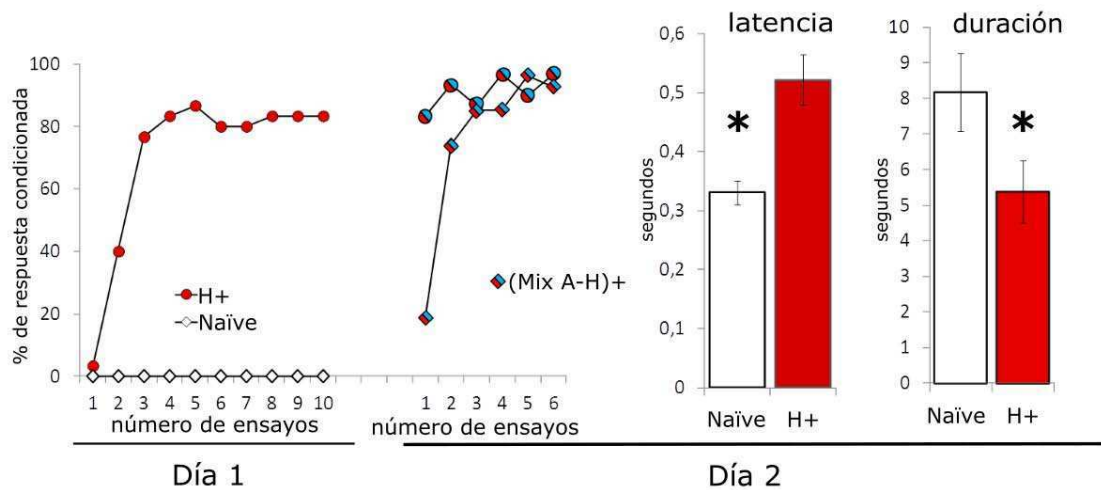


Figura 44: Resultados de los experimentos de ensombrecimiento. A la izquierda el resultado del primer día de entrenamiento. En círculos el grupo entrenado el color rojo indica que el entrenamiento es a 1-hexanol. En cuadrados el grupo control el blanco indica que no recibió olor. El eje x es el número de ensayo mientras el eje y es el porcentaje de respuesta de extensión de probóscide. En la figura del medio se observan los porcentajes de respuesta para los dos grupos (H+ y control) al ser entrenados con la mezcla indicada por el color rojo y azul en los puntos. Se ve que mientras el grupo H+ empieza con respuesta alta el grupo control no. Con el correr de los ensayos el porcentaje de respuesta a la mezcla es la misma. En la figura de la izquierda se cuantifican los resultados del testeo. Los gráficos de barra muestran el promedio y error de la latencia y duración de la respuesta de extensión de probóscide. Las barras rojas corresponden al grupo entrenado y las blancas al grupo control. La latencia del grupo H+ es significativamente más alta mientras que la duración es significativamente menor. Indicando que la experiencia con el olor 1-hexanol el primer día de entrenamiento ensombreció la presencia del olor acetofenona en el segundo día de entrenamiento. T.test Latencia $p=0.0002$, Duración $p=0.049$.

ensayos. La respuesta del grupo entrenado a 1-hexanol es alta durante todos los ensayos del día 2. Esto se debe a que el animal reconoce la presencia de 1-hexanol en la mezcla y evoca la respuesta aprendida como se vio en el resultado de la figura 43. Luego de los seis ensayos con la mezcla, ambos grupos llegan al mismo porcentaje de respuesta. En el ensayo de evaluación con acetofenona no vimos diferencias en el porcentaje de respuesta de los grupos que en ambos casos fue cercano al 100%. Sin embargo, el detalle de la respuesta condicionada respecto de la latencia y la duración sí mostró efectos entre grupos. Los animales del grupo control mostraron menor latencia (una respuesta más rápida) y mayor duración en la respuesta condicionada lo cual es interpretado como mayor certeza de que acetofenona predice la recompensa. Las diferencias solo pueden ser explicadas por diferencias generadas en el primer entrenamiento ya que el resto del protocolo y la experiencia con acetofenona fueron iguales para ambos grupos. Entonces, lo que ocurrió es que el entrenamiento del primer día con 1-hexanol afectó la percepción de acetofenona en la mezcla durante el segundo día

del entrenamiento. Eso explica la performance más baja hacia acetofenona en el grupo que había sido entrenado a 1-hexanol. Bajo esta interpretación este resultado es consistente con los cambios observados en las mezclas en términos de su representación en el lóbulo antenal

4.4. CONTROL DE GANANCIA

Un candidato natural a ser responsable de las modificación ocasionadas por el entrenamiento son las fuerzas sinápticas de las neuronas inhibitorias que intervienen en las inhibiciones laterales. Parece una solución razonable proponer que las neuronas inhibitorias que reciben input de los glomérulos activos durante el entrenamiento aumenten la inhibición de sus pares postsinápticos. Si además consideramos el número y la incidencia de conexiones inhibitorias en todo el lóbulo antenal es esperable que al final de un entrenamiento encontremos como resultado del aumento de la inhibición una caída general de la actividad en el lóbulo antenal que no sea solo evidente en aquellos glomérulos que compiten con los glomérulos del olor recompensado. Estas dos hipótesis son testeables en un modelo computacional que simule la red y el funcionamiento del lóbulo antenal. Para eso establecimos una colaboración con el grupo del Dr. Bazhenov de la Universidad de California que ya han desarrollado modelos computacionales que emulan los patrones espacio-temporales de actividad de las neuronas de proyección [Bazhenov *et al.*, 2001, Assisi *et al.*, 2012]. Mediante simulaciones numéricas del lóbulo antenal encontramos que un incremento de la actividad de las neuronas inhibitorias de que son reclutadas por un olor conlleva a resultados similares a los experimentales respecto de la representación de ese olor en el patrón de una mezcla. El modelo permitió evaluar separadamente el efecto de potenciar sinapsis inhibitorias que inciden sobre neuronas de proyección (sinapsis LNI-PN) y el de sinapsis inhibitorias que inciden sobre otras neuronas locales inhibitorias (sinapsis LNI-LNI). Cuando la potenciación afecta solo a las sinapsis LNI-PN entonces se vio una pronunciada inhibición general de la actividad en el lóbulo antenal, mientras que cuando afecta solo a las LNI-LNI no hubo efecto significativo sobre el funcionamiento de la red. Cuando la potenciación afecto a los dos tipos de conexiones entonces se observó una disminución controlada de la actividad evocada, que en términos biológicos y del funcionamiento del lóbulo antenal parece ser aplicable. Esto es

interesante porque la plasticidad en ambos tipos de sinapsis se compensaría y permitiría una regulación más fina del control general de la actividad y la plasticidad. El modelo permitió entonces postular soluciones que, *in silico*, parecen factibles y deben ser ahora probadas experimentalmente. La regulación dinámica de las fuerzas inhibitorias en respuesta a la actividad específica que se demande de la red parece ofrecer al lóbulo antenal los elementos para que este funcione como el filtro dinámico que postulamos. Si este fuese el mecanismo real, el modelo prevé que la experiencia con olores incrementa las fuerzas sinápticas de la red inhibitoria y por lo tanto un resultado asociado debería ser la disminución general de la actividad. Es interesante pensar que el efecto sobre la actividad general sea otra función de la red inhibitoria del lóbulo antenal relacionada con el control general de la ganancia.

4.4.1. Efecto del entrenamiento sobre la amplitud de las señales

Los filtros físicos suelen tener un efecto sobre en la ganancia de las señales que debe ser estudiado para caracterizarlos correctamente. El modelo computacional que explica el cambio en la codificación de la mezcla prevé de hecho una caída en la tasa de disparo general de las neuronas de proyección. Esa caída es consistente con el planteo de que la forma en la que se modifica la actividad del AL es aumentando las inhibiciones. Esta caída sistemática y aparentemente inespecífica de la ganancia parece en principio antiintuitiva, ya que aparentemente llevaría a la insensibilidad del sistema olfatorio como resultado de la experiencia. Sin embargo el modelo también prevé que la caída es asintótica. Las razones de que la caída se detenga es que a medida que la fuerza de las sinapsis LNI-PN aumenta, también los hacen las sinapsis de tipo LNI-LNI. Es decir que el mecanismo postulado regula su propia acción sin llevar a la red a una situación absurda. A partir de los datos experimentales podemos ahora verificar si los animales entrenados muestran la reducción en la ganancia tal como predice el modelo. Para llevar adelante este análisis estudiamos los niveles generales de respuesta en cada animal. Para ello hicimos un análisis donde consideramos el efecto por glomérulo y el efecto por tratamiento, para evaluar si el entrenamiento reduce la actividad de manera general o glomérulo específica (ver figura apéndice A). La interacción no dió efecto significativo lo que implica que la reducción por tratamiento fue general y no específica de algunos glomérulos. Para visualizar el efecto por tratamiento promediamos en cada medición la ac-

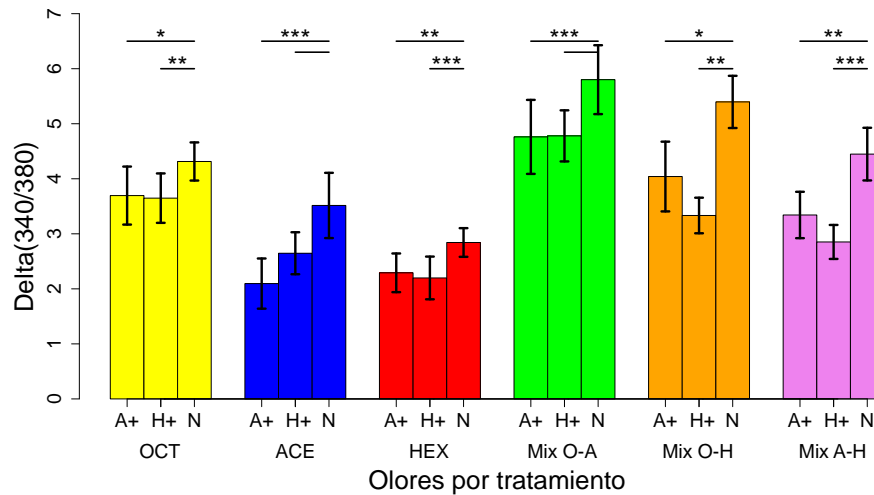


Figura 45: El entrenamiento reduce la actividad general del AL. Se muestra valor promedio y error estándar de la intensidad general de la respuesta por cada tratamiento y para olor. Los colores identifican el olor testeado. Amarillo: OCT, azul: ACE, rojo: HEX, verde: Mix O-A, naranja: Mix O-H y violeta: Mix A-H. Al pie de cada barra se indica olor y tratamiento. Para todos los olores la actividad evocada es significativamente menor en los animales entrenados respecto de los animales Naïve. ANOVA dos factores glomérulos y tratamiento (figura complementaria en Apéndice A), tratamiento $p < 0.001$. Tukey post hoc $***p < 0.001$, $*p < 0.05$

tividad evocada en todos los glomérulos y tomamos el valor obtenido como representativo de la intensidad general de la respuesta. En la figura 45 se muestran los valores promedio de actividad general y error estándar de los valores de intensidad general de la respuesta para cada olor en animales bajo los tres tratamientos: Naïve, A+ y H+. La estadística indicada en el gráfico corresponde a los resultados obtenidos en el ANOVA (ver epígrafe y apéndice A).

En consistencia con lo esperado en base al modelo, los animales entrenados muestran efectivamente menor actividad para todos los olores. En todos los casos, olores puros y mezclas, la intensidad general de la respuesta en los animales H+ o A+ fue significativamente más baja que la del grupo Naïve. Este resultado apoya el mecanismo de plasticidad sugerido por el modelo entorno al aumento de las inhibiciones y plantea la necesidad de estudiar el efecto de la reducción de la ganancia sobre el funcionamiento de lóbulo antenal. Es importante destacar que la reducción en la actividad general no impidió observar el aumento en la saliencia del olor recompensado en la mezcla y por lo tanto es probable que ambos efectos estén relacionados.

4.4.2. Concentraciones

Como ya he mencionado, cada olor recluta varios glomérulos y cada glomérulo es reclutado por varios olores. Esto implica un alto grado de solapamiento en el reclutamiento de las neuronas inhibitorias por distintos olores y concentraciones. En base a los resultados de las secciones anteriores esperaríamos entonces que el incremento de la fuerza de las inhibiciones por la experiencia afecte propiedades generales del lóbulo antenal y no solo la codificación del olor recompensado. De hecho, hemos medido que la actividad general de lóbulo antenal bajó en los animales entrenados en consistencia con lo que el modelo predecía, reduciendo la ganancia de señal de todos los olores independientemente de cual haya sido el olor entrenado. Por ello, nos propusimos estudiar a las neuronas locales inhibitorias como participantes del mecanismo de control de ganancia del lóbulo antenal. Abordamos el problema primero desde el análisis computacional y luego mediante experimentos de imaging.

Estructura de la red, input-output

En una primera aproximación al problema quisimos describir cómo la fuerza de las neuronas inhibitorias afecta la relación de amplitud entre la entrada y la salida del lóbulo antenal. Para ello generamos una red computacional que respete el diseño en glomérulos de lóbulo antenal y se aproxime a datos estructurales realista en cuanto a probabilidad de conectividad y proporción de componentes excitatorio e inhibitorios. Como se presentó en materiales y métodos cada neurona se simula mediante el modelo de Hodgkin y Huxley considerando las corrientes informadas en detalle en dicha sección. Lo que se modificó en este caso fue la estructura. Se consideraron sesenta neuronas de proyección y cien neuronas inhibitorias locales organizadas en veinte glomérulos. Cada glomérulo tiene tres neuronas de proyección y cinco neuronas inhibitorias locales. La conectividad de las neuronas inhibitorias fue asignada mediante una función random en base a probabilidades realistas de conectividad. Si una neurona inhibe un glomérulo lo hará a todas las neuronas de ese glomérulo, salvo ella misma y a las neuronas de proyección de su mismo glomérulo. La fuerza de la sinapsis será la misma para todas las neuronas inhibitorias y otra para las neuronas de proyección. En la figura 46 se puede ver un esquema que muestra un ejemplo de la red de conexiones que se

utilizó para simular el lóbulo antenal. En el eje x tenemos las cien neuronas inhibitorias que son presinápticas a las conexiones que estamos esquematizando (nótese que las neuronas de proyección no son presinápticas en este modelo del lóbulo antenal). En el eje y se encuentran todas las neuronas postsinápticas (notar que las neuronas de proyección son postsinápticas mientras las inhibitorias locales pueden ser postsinápticas y presinápticas dado que pueden inhibir y ser inhibidas). Los rectángulos punteados esquematizan los glomérulos. En colores rojo y negro se muestran las distintas conexiones dentro de cada glomérulo donde el color negro representa las sinapsis LNI-PN con una determinada fuerza sináptica y el color rojo representa las sinapsis LNI-PN con una fuerza sináptica mayor que las LNI-LNI. A la izquierda se muestra una ampliación de los glomérulos 2 y 3. Se puede ver el detalle y la denominación de cada neurona. Por ejemplo la neurona LNI82 inhibe su propio glomérulo (el 3) y como vemos solo inhibe a las neuronas inhibitorias. Mientras por ejemplo la neurona LNI102 inhibe al glomérulo 2 y lo hace con todas las neuronas inhibitorias y de proyección (con fuerzas inhibitorias distintas). Si bien no se conoce el detalle de cuantas neuronas exactamente hay en cada glomérulo y con qué fuerza, cuáles y cuántos glomérulos se conectan las neuronas inhibitorias la estructura que probamos cumple con todas las características generales conocidas [Sinakevitch *et al.*, 2013, Abel *et al.*, 2001, Girardin *et al.*, 2013]. Los estímulos sensoriales serán simulados mediante corrientes inyectadas en las neuronas de los glomérulos seleccionados. Así por ejemplo si un olor que queremos simular recluta seis glomérulos, las PNs y LNIs de esos seis glomérulos recibirán un pulso cuadrado, que dura el tiempo que quiera simularse la presencia del estímulo, de una corriente cuyo valor representa la concentración con la que quiera simularse el estímulo. Las simulaciones permiten calcular como salida de la red variables que nos resulten interesantes, tales como el potencial de cada neurona que nos interese (ya sean de proyección o inhibitorias) y podemos también ver el calcio intracelular de las mismas para hacer a los resultados comparables a los experimentos de imaging. La figura 47 muestra un ejemplo de la salida obtenida para

algunas neuronas de proyección. En el ejemplo de la izquierda tenemos el potencial de membrana de cuatro neuronas de proyección y en el panel de la derecha el calcio para las mismas neuronas. Todas las neuronas tienen una tasa de disparo diferente de cero antes del estímulo que corresponde a cierto valor basal de actividad espontanea. Cuando se enciende el

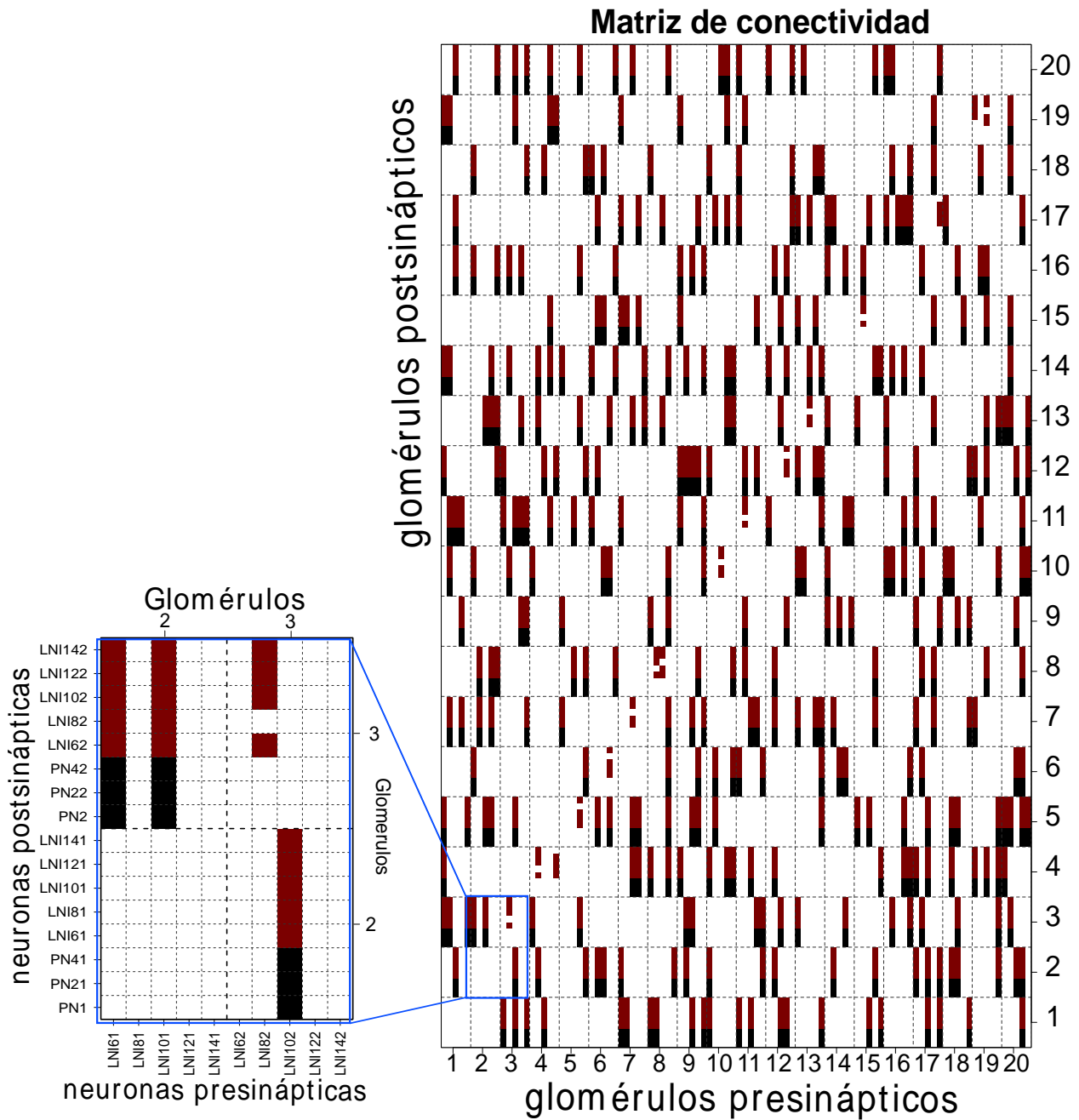


Figura 46: Mapa de conectividad para la red de neuronas que simulan el lóbulo antenal de abeja. En el cuadro de la derecha cada rectángulo punteado representa un glomérulo. En el eje x se encuentran todas las neuronas presinápticas. Por lo tanto solo pueden ser todas las LNI. En el eje y se enumeran las neuronas postsinápticas. De modo que pueden ser tanto las LNIs como las PNs. En la aplicación de los glomérulos 2 y 3 de la izquierda cada cuadradito representa un contacto. Si el cuadradito es blanco significa que la neurona de la columna no hace contacto (no inhibe) la neurona de la fila. Si el cuadradito es rojo la neurona presináptica inhibe la neurona postsináptica con un dado valor de contacto (f_s) y si el cuadrado es negro lo hace con un valor de f_s mayor. Se ve en el caso de la LNI 101 perteneciente al glomrulo 2 que si una neurona hace sinapsis con un glomérulo inhibe todas las neuronas de este glomérulo y tiene un valor de f_s que es mayor para las PNs que para las LNIs. En el ejemplo de la neurona LNI 82 perteneciente al glomérulo 3 vemos que si una neurona hace sinapsis con el glomérulo al que pertenece solo inhibe a las otras neuronas inhibitorias, evitando hacer contacto con las PNs y con sigo misma.

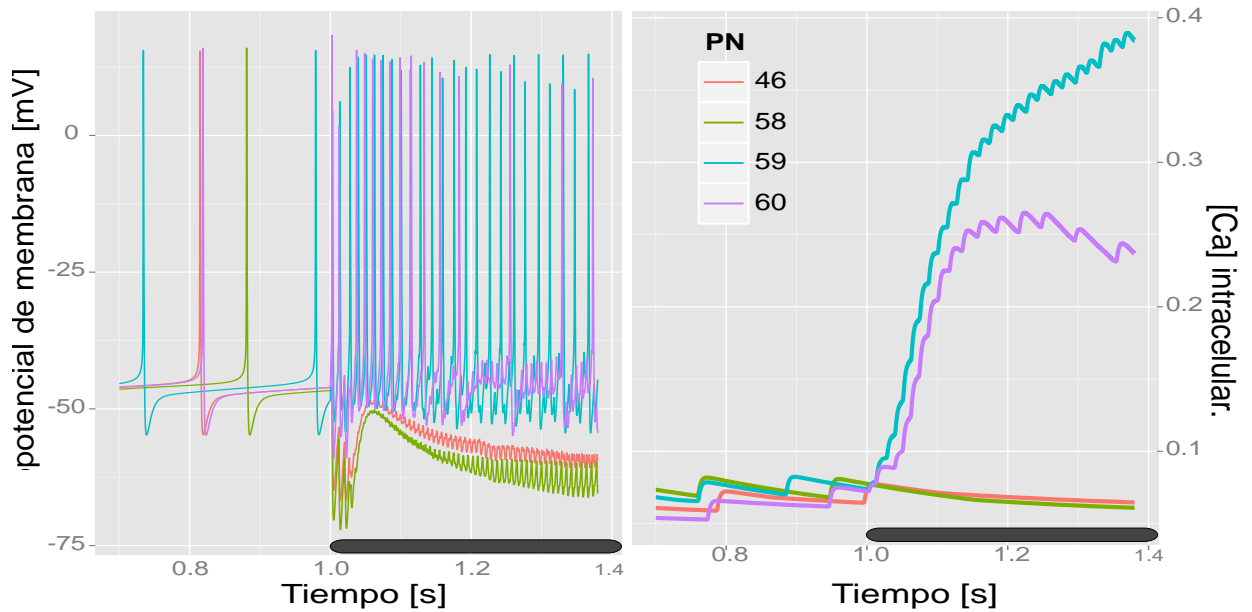
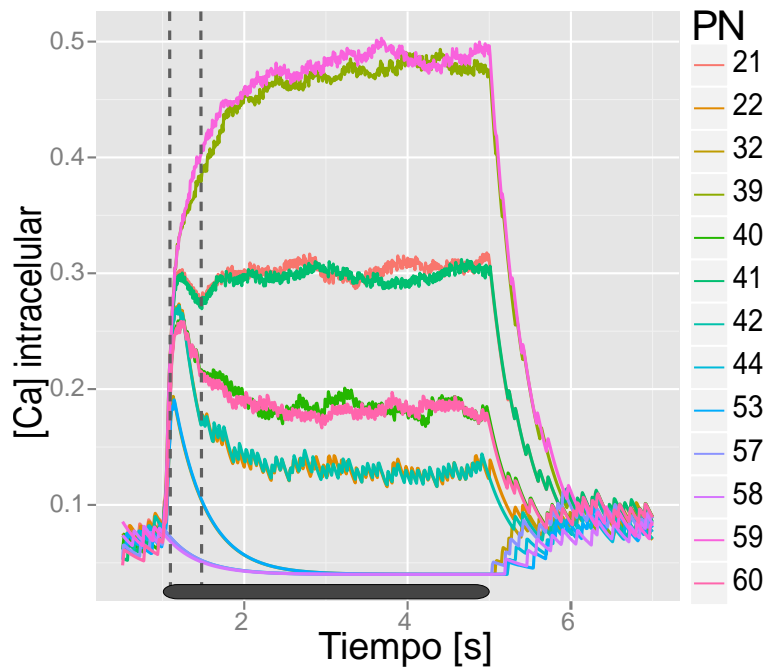


Figura 47: Ejemplos de la salida obtenida para las simulaciones. En la figura de la izquierda se muestra el potencial de membrana para cuatro neuronas de la simulación del lóbulo antenal. El eje x es el tiempo en segundos y el eje y el potencial en mV. Una barra negra marca el tiempo en el que la red es estimulada. Se ve que mientras algunas neuronas se silencian mostrando menor actividad que la basal (46 y 58 en rojo y verde respectivamente) otras neuronas aumentan su frecuencia de disparo (59 y 60 celeste y violeta). Además se puede ver que la neurona celeste tiene mayor tasa de disparo que la violeta. En la figura de la izquierda se muestran el calcio intra celular para la situación de la figura de la izquierda. Se ve que asociado al aumento en la frecuencia de disparo hay un aumento en el calcio interno. En particular el calcio en la neurona celeste (de mayor frecuencia de disparo) es mayor que el calcio en la neurona violeta.

estímulo (marcado con una barra negra sobre el eje x) se inyecta la corriente en las neuronas de los glomérulos reclutados, algunas neuronas aumentan su frecuencia mientras otras reducen su actividad espontánea. Mientras las neuronas 46 y 58 (rosa y verde respectivamente) se apagan las neuronas 59 y 60 (celeste y violeta) suben su tasa de disparo. Podemos ver también que la frecuencia de disparo correlaciona con su respuesta en calcio. Una observación importante es que en las simulaciones todas las neuronas reclutadas reciben un estímulo cuadrado del mismo valor. Sin embargo, en la figura 59 vemos que dos neuronas (59 y 60) que reciben la misma corriente entrante muestran dinámicas distintas. Lo que estamos viendo es que la red de neuronas inhibitorias locales provocan una variedad de posibles respuestas para el mismo estímulo entrante. En la figura 48 tenemos un ejemplo completo de la respuesta de calcio de todas las diferentes neuronas.

Lo primero destacable es que la dinámica de calcio obtenida no es muy diferente de la observada en los experimentos de imaging de calcio que mostramos en la figura 48. La dinámica individual de las neuronas no sigue estrictamente el pulso cuadrado que se les

Figura 48: Respuesta y dinámica del calcio en el modelo. Vemos una curva de calcio para 13 neuronas de una red que fue estimulada durante 4 segundos (barras negras en el eje x) con un patrón determinado de activación. Se observa que la respuesta de calcio es bastante realista y parecida a la observada en los experimentos de imaging de calcio. Además las curvas de las diferentes neuronas muestran dinámicas distintas. Las líneas punteadas marcan la región en la que se calcula el área bajo la curva para reducir la parte temporal del patrón y quedarnos con la información espacial al igual que en los experimentos. Como en ellos el tiempo corresponde al tiempo entre los 250 y 750 ms luego de iniciado el estímulo.



inyecta y como hemos dicho, las diferentes neuronas activadas muestran diferentes niveles de respuesta. Más aún tenemos neuronas que aun recibiendo input no llegan a activarse del todo y neuronas que responden con diferentes valores y dinámicas temporales. Esta variedad se asemeja mucho a la observada en los experimentos y significa un resultado interesante, dado que esto implica que no es necesaria una señal compleja ni es necesaria una estricta jerarquización de los glomérulos a nivel de los receptores para que la actividad evocada a nivel de las neuronas de proyección la tenga. Dicho de otro modo, este resultado numérico muestra que una red de neuronas inhibitorias como la que hay en el lóbulo antenal es capaz de modificar las jerarquías del patrón entrante como resultado de sus diferentes conectividades entre neuronas inhibitorias. Esto es especialmente relevante en nuestro trabajo puesto que es lo que postulamos que estaría ocurriendo en la representación de mezclas después del entrenamiento. El mismo patrón entrante será distinto según este se active en un lóbulo antenal con diferentes experiencias. Para simplificar las figuras y el análisis, calculamos el área bajo la curva marcada con líneas punteadas en la figura 48 sumando la actividad de todas las neuronas del mismo glomérulo y generamos un patrón de activación como el presentado en los experimentos. Si hacemos lo mismo con la señal entrante y los comparamos vemos en la figura 49 que mientras la señal entrante consiste en 6 barras del mismo tamaño, lo que tenemos en las neuronas de proyección es un patrón complejo. Donde por ejemplo dos de los

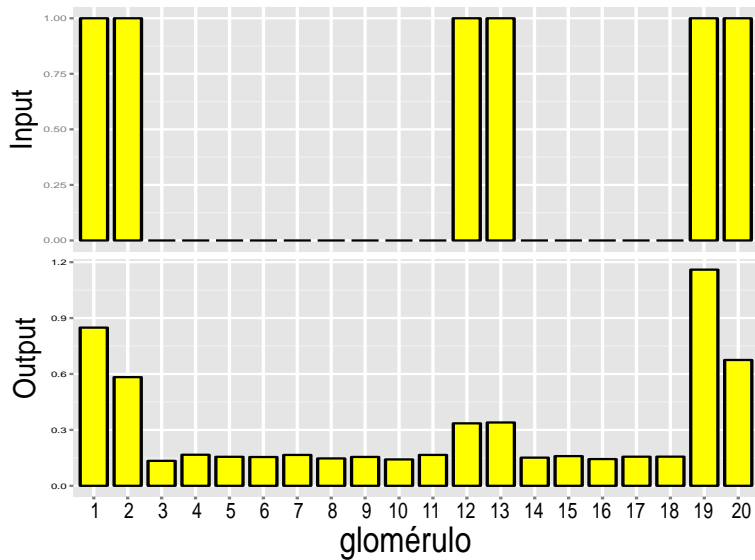


Figura 49: Comparación entre el patrón de activación de entrada y salida en el modelo de lóbulo antenal. En el eje x se indican todos los glomérulos de la red del lóbulo antenal. En el eje y se muestra el valor de integrar bajo la curva las señales de entrada (arriba) y salida (abajo). Vemos que mientras en la entrada el patrón está compuesto por ceros y unos. En la salida existe un rango de actividades. Incluso glomérulos que reciben actividad a la entrada (G12) muestran a la salida actividades bajas no muy distintas de la actividad basal de neuronas que no reciben entrada (G11).

glomérulos que recibieron estimulación (glomérulos 12 y 13) no tienen niveles de activación muy distinta de la de glomérulos que no recibieron input (ver cualquiera de sus vecinos por ejemplo 11 y 14).

Implicancia de la cantidad de glomérulos activados

En el modelo simulamos las diferentes intensidades del estímulo como un incremento en la corriente entrante. Es decir que cambiar la concentración del olor será equivalente a inyectar en las mismas neuronas pulsos cuadrados de diferente valor de corriente (mayor concentración implicará mayor corriente). Se estudió la respuesta a la salida del lóbulo antenal como función de la corriente entrante (o intensidad del estímulo). Esta relación, en principio, puede variar dependiendo de varios parámetros. En la figura 50 se presentan los resultados de estudiar el cambio que produce en la relación entrada-salida el porcentaje de glomérulos reclutados por el estímulo en la entrada.

En la figura 50 de la izquierda se muestra la curva obtenida para entradas que reclutan distinto porcentaje de glomérulos (del 20 % al 95 % graficados con distintos colores).

Si, por ejemplo, vemos en la figura 50 (gráfico de la izquierda) la curva correspondiente al caso para el cual el estímulo recluta cuatro glomérulos (curva roja correspondiente al 20 % de glomérulos reclutados), tenemos que a medida que el estímulo crece la respuesta (medida en calcio intracelular) aumenta. Sin embargo vemos que la salida del lóbulo antenal no sigue linealmente la entrada. Por el contrario vemos una región en la que la salida es bastante

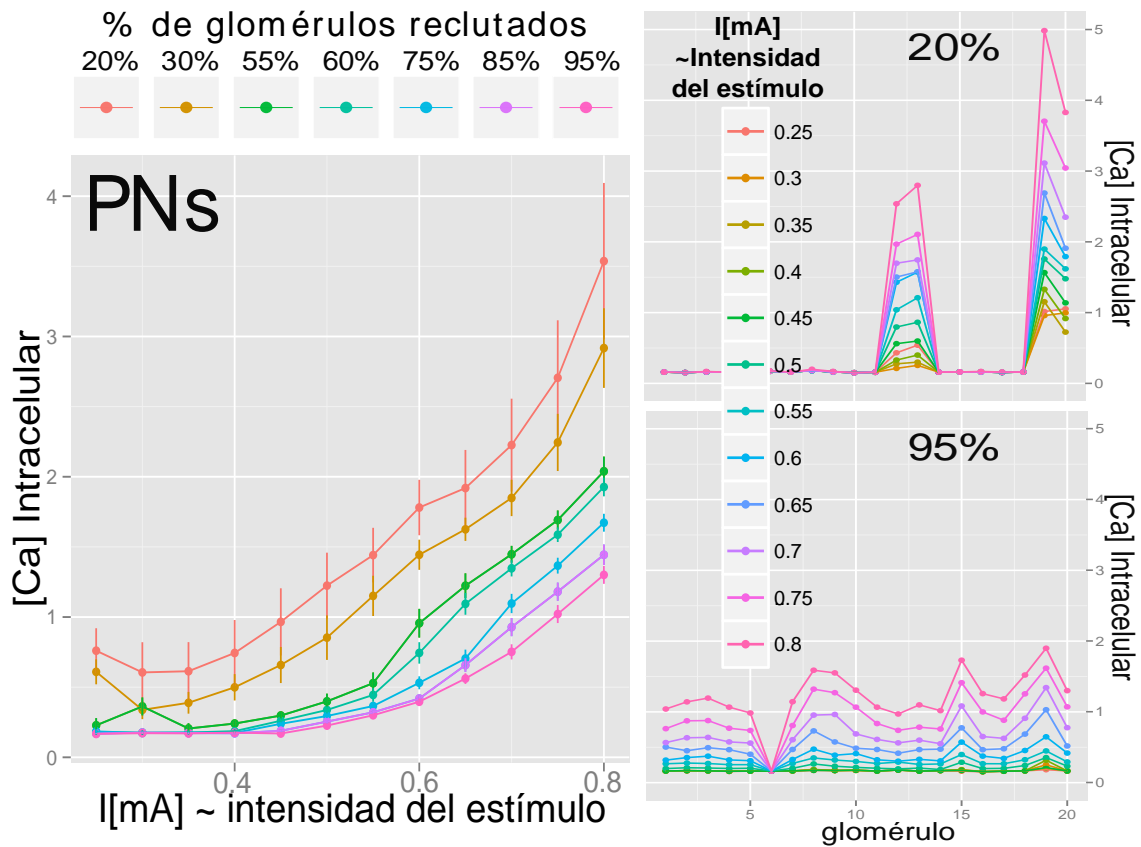


Figura 50: Comportamiento de la red para distinto porcentaje de glomérulos activados. En la figura de la izquierda se muestra la respuesta de las PNs en función del valor de corriente inyectada (eje x). Los colores identifican las curvas para diferentes porcentajes de glomérulos reclutados (del 20% en rojo al 95% en rosa). El eje y es la concentración de calcio intra celular. Vemos que a medida que aumenta la corriente entrante aumenta el calcio en las neuronas. Además a medida que aumenta el número de glomérulos reclutados se observa que la pendiente es menor. En la figura de la derecha vemos dos ejemplos de activación de patrón glomerular para distintos estímulos y porcentaje de reclutamiento. Tanto para el ejemplo de 20% de glomrulos reclutados (arriba) como el de 95% de glomerulos reclutados (abajo) se observa un incremento en la actividad a medida que aumenta la corriente. Sin embargo en el caso de abajo el aumento en cada glomérulo es mucho menor (menos de la mitad) que el del ejemplo de arriba.

estable (aproximadamente hasta los 0,5 mA para la curva roja) y luego una región en la que la respuesta aumenta significativamente. Si miramos con más detalle el principio de la curva, la salida disminuye cuando la entrada crece. Lo que vemos es un resultado importante puesto que esto representa la comprobación de que una red inhibitoria como la que estamos estudiando puede ser capaz de modificar la relación de amplitudes entre la entrada y la salida (incluso invirtiéndola) y por tanto tiene propiedades de control de ganancia.

Este es el tipo de curvas que buscamos comparar. Dijimos en la introducción que el termino control de ganancia se refiere a cómo la pendiente de esta curva puede modificarse. Diremos que aumentó el control de ganancia si la pendiente disminuye y que el control de ganancia es total si la salida es absolutamente chata respecto de la entrada (figura 4).

Como vimos en los experimentos, distintos olores reclutan un número diferente de glomérulos. En particular vimos que 2-octanona reclutaba más que 1-hexanol o acetofenona. De modo que no tiene sentido elegir un número particular de glomérulos reclutados para el estudio ya que los mecanismos de control de ganancia deberían funcionar para los distintos olores.

En la figura 50 de la izquierda se puede ver que a medida que aumenta el porcentaje de glomérulos reclutados disminuye la pendiente de la curva, aumenta la región en la que la respuesta es estable y por lo tanto aumenta el control de ganancia. Es importante destacar que la región en el que las curvas mantienen el nivel de salida a pesar de aumentos en la entrada tiene valores de concentración de calcio distintos de cero y por lo tanto la red de neuronas inhibitorias locales no está apagando la salida sino manteniéndola constante e independiente del valor de entrada.

En la figura 50 de la derecha se muestran en dos ejemplos (20 % y 95 % de reclutamiento) los patrones de activación para valores crecientes de corriente inyectada. En el eje x se encuentran los 20 glomérulos y en el eje y los valores de concentración de calcio intracelular en los glomérulos. Cada color representa un valor diferente de corriente inyectada. En ambos ejemplos la respuesta de los glomérulos que son estimulados aumenta con la magnitud del estímulo. Pero, llamativamente, en el ejemplo de menor porcentaje de glomérulos reclutados el rango en el que varían es muy superior. Mientras que con el 20 % de glomérulos reclutados (figura 50 arriba a la derecha) los valores de respuesta varían desde 0 a 5 en el ejemplo de 95 % de reclutamiento (figura 50 abajo a la derecha) la respuesta de salida varía de 0 a 2.

Evidentemente el sistema que estudiamos presenta mayor control de ganancia cuando los estímulos reclutan mayor porcentaje de glomérulos. Esto puede ser explicado si enfatizamos el hecho de que reclutar más glomérulos implica también reclutar más neuronas inhibitorias. Así los olores con más glomérulos serán al mismo tiempo los olores con patrones con mas inhibición y por tanto más regulados.

Efecto de la reducción de las fuerzas inhibitorias en el modelo

Cuando introdujimos el modelo dijimos que las corrientes sinápticas se calculaban como la suma de las corrientes producidas por el GABA de todas las LNIs que hacen sinapsis pesadas por un parámetro f_s que indica la fuerza de la sinapsis. Estudiemos ahora cómo se modifican las curvas de respuesta entrada-salida como función de la fuerza de las sinapsis inhibitorias regulada por el parámetro f_s .

La relación entre las sinapsis LNI-PN y la sinapsis LNI-LNI se eligió para obtener curvas temporales de calcio intracelular consistentes con los experimentos. Para los valores utilizados la red tiene una relación de ocho, es decir que la sinapsis LNI-LNI es ocho veces más chica que la LNI-PN. Una vez fijada la relación el parámetro f_s aumenta o disminuye las fuerzas sinápticas de todas las neuronas inhibitorias homogéneamente. En la figura 51 vemos las curvas obtenidas para variaciones de este parámetro desde 0.25 a 0.8.

Vemos que a medida que aumenta f_s disminuye la pendiente de la relación entrada-salida y por lo tanto aumenta el control de ganancia. Para inhibiciones altas se observa que la salida es estable en un gran rango de corrientes entrantes. Si se siguen aumentando las fuerzas inhibitorias se ve un mayor rango en el que la respuesta es de igual valor pero se encuentran salidas con dinámicas poco compatibles con los resultados experimentales. Por otro lado vemos que cuando las fuerzas sinápticas de las neuronas inhibitorias locales son bajas no hay control de ganancia. Perdiendo incluso la región en la que la concentración de Ca intracelular disminuye con el incremento de corriente y la salida crece monótonamente a medida que crece la entrada. Los resultados resumidos en figura 51 muestran que la propiedad de control de ganancia en nuestro modelo es controlada por las fuerzas sinápticas de la red inhibitoria. De esta manera mostramos que en una red de neuronas que cumple con la estructura que se conoce del lóbulo antenal presenta la propiedad de control de ganancia que puede ser

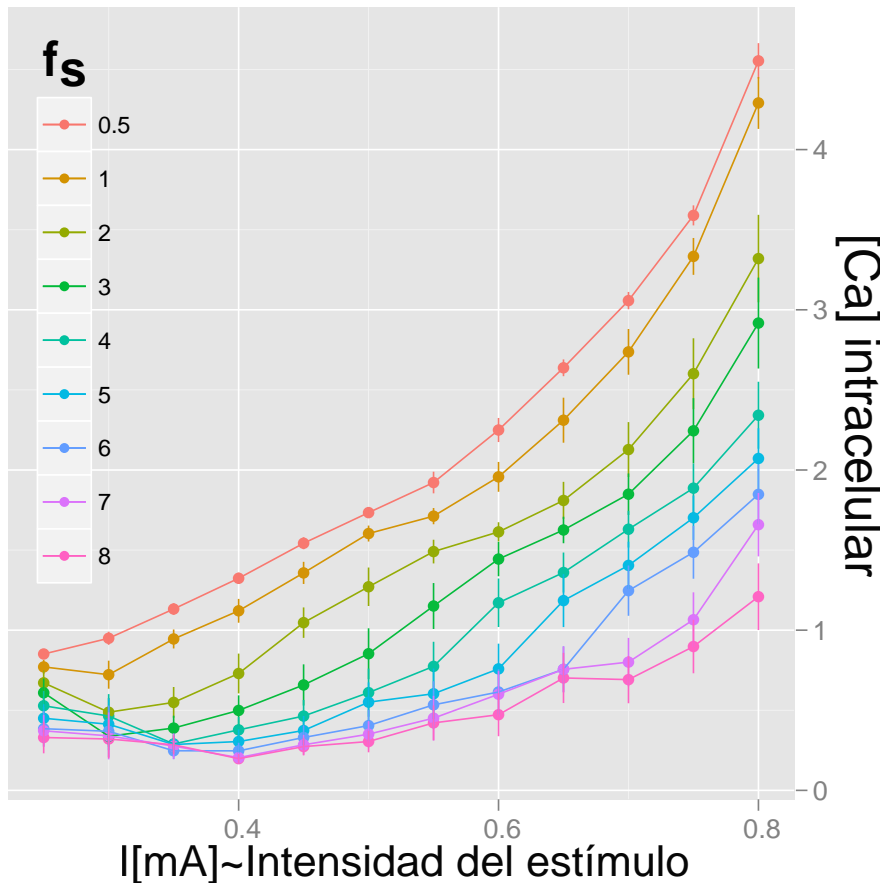


Figura 51: Control de ganancia en el modelo. Se estudia la propiedad de control de ganancia de la red como función del parámetro f_s que define la fuerza sináptica de las neuronas inhibitorias. El eje x es el valor de corriente inyectada en mA mientras el eje y es el promedio de la actividad medida en concentración de calcio intracelular para las neuronas. Con colores se grafican las distintas curvas para diferentes valores de f_s . Se ve que a medida que se incrementa la fuerza sináptica el sistema tiene mayor propiedad de control de ganancia.

regulada por medio del valor de las fuerzas sinápticas inhibitorias.

4.4.3. Experimentos

Respuesta vs Intensidad de Estímulo

Por medio de simulaciones numéricas mostré que una red con una estructura tal como la del lóbulo antenal presenta propiedades de control de ganancia reguladas por la fuerza de las sinapsis inhibitorias. Ahora debo probar si esta propiedad efectivamente existe en el lóbulo antenal de abejas. Para ello realicé experimentos en Imaging de Calcio en los que presenté a los animales 2-octanona en concentraciones crecientes y medí los patrones de actividad evocados por cada concentración en las neuronas de proyección. Se midieron diez concentraciones comenzando desde 0 hasta 2.5 nmol/ml y 8 concentraciones intermedias equidistantes en una escala logarítmica. Como las predicciones numéricas indican que el efecto de control de ganancia debería ser mayor en olores con mayor número de glomérulos reclutados realicé los experimentos con 2-octanona que vimos según los análisis anteriores es el olor en el que se recluta más glomérulos. En la figura 52 se muestran las mediciones

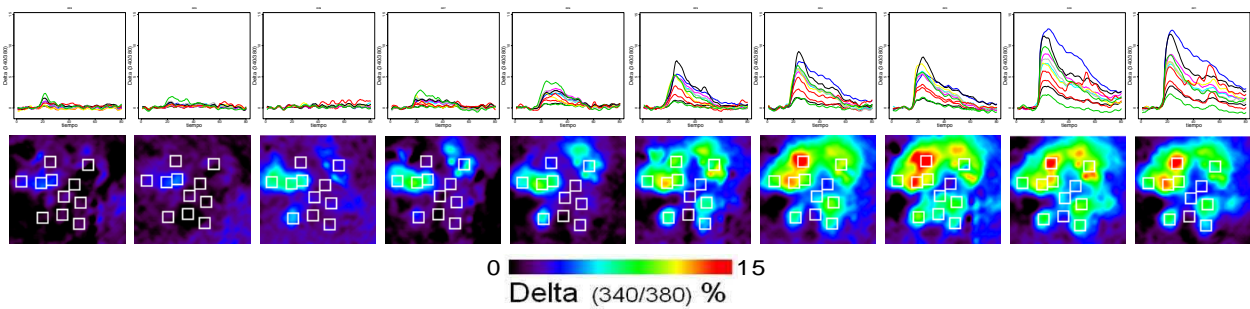


Figura 52: Experimentos de imaging de calcio para concentraciones crecientes de 2-octanona. Se muestra un ejemplo de un experimento. Abajo se ve una secuencia de 10 fotos en falso color correspondientes a la actividad medida con indicadores de calcio para concentraciones de 2-octanona que van desde cero hasta 100%. Los cuadrados blancos marcan las regiones de los 11 glomérulos identificados en los que se cuantifica la actividad. Arriba se ven los trazos para los 11 glomérulos.

en un animal ejemplo. De izquierda a derecha se muestran en falso color las respuestas para concentraciones crecientes de 2-octanona. Las imágenes de la figura corresponden a un instante 500 ms después de encendido el olor. Arriba de cada imagen los gráficos muestran el curso temporal de activación en los 11 glomérulos identificados en todos los animales que están indicados sobre cada imagen de actividad.

La mera observación de los patrones de actividad deja ver a simple vista que si, cierto control de ganancia existe, este no es absoluto. Claramente se puede observar que conforme aumenta la concentración del olor, aumenta también la respuesta en el lóbulo antenal. Sin embargo, esperar que el control de ganancia sea absoluto, es decir que el nivel de actividad evocada sea constante e independiente de la intensidad del estímulo no sería realista ni deseable, ya que para el animal es importante tener elementos que le permitan reconocer la intensidad del estímulo [Gaudry *et al.*, 2012]. Por lo tanto, es posible que sí exista cierto grado de control de ganancia, que permita a la representación del olor moverse entre los rangos de actividad observados sin saturar en caso de concentraciones muy altas. En caso de haber un mecanismo de control de ganancia para el cual las inhibiciones son importantes, este podría ser evidenciado si logramos apagar las inhibiciones. Por todo ello, realizamos un experimento en dos etapas. En la primera de ellas se midió la respuesta en función de la concentración a lo largo de todo el rango de concentraciones, desde 0 a la máxima concentración. Luego se repitió la medición completa pero habiendo aplicado primero picrotoxina $10 \mu\text{M}$ para inhibir receptores de tipo GABA-A [Farkhooi *et al.*, 2013]. En un grupo de animales control, se replicó exactamente la misma secuencia de dos ciclos de mediciones

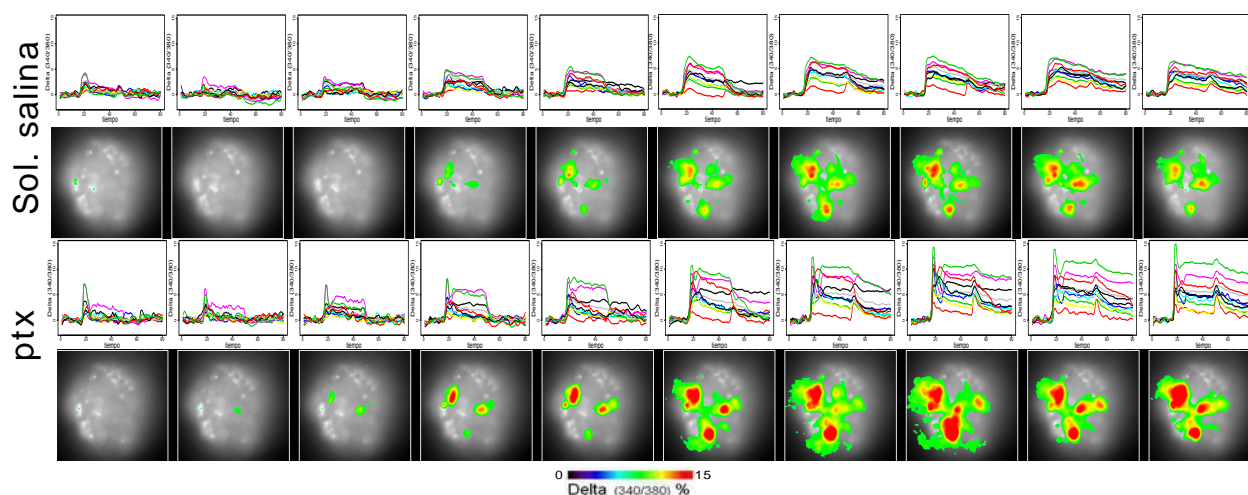


Figura 53: Rol de las inhibiciones en la relación respuesta/intensidad del estímulo. Efecto del bloqueante del receptor GABA-A, picrotoxina. Ejemplo de un animal con una 1ª serie de mediciones con solución salina y 2ª serie de mediciones con picrotoxina 10 μ M. Las imágenes muestran patrones de activación como respuesta de calcio superpuestos a la imagen de fluorescencia del lóbulo antenal. Las curvas asociadas representa el perfil temporal de activación de cada glomérulo identificado

pero no se aplicó picrotoxina. En ese grupo los dos ciclos de mediciones fueron hechos en las mismas condiciones con el cerebro inmerso en solución fisiológica normal. La figura 53 muestra los resultados del primer y el segundo ciclo de mediciones para un animal al cual se aplicó picrotoxina antes de la segunda serie de mediciones.

La figura muestra los patrones de actividad evocada en un instante 500 ms después de encendido el olor. Los gráficos inmediatamente encima de cada imagen muestran los trazos temporales de actividad para cada glomérulo identificado. En cada medición se integró el área bajo la curva de cada glomérulo entre los 250 ms y 750 ms después de encendido el olor y luego promediamos la actividad de todos los glomérulos para obtener una medida representativa de la intensidad general del patrón, tal como fue hecho para las mediciones en las que medimos un descenso en la actividad general después del entrenamiento. Los resultados de este análisis mostrados en la figura 54 y son similares a los obtenidos para las simulaciones numéricas.

Para un rango de concentraciones bajas, se observa que la intensidad general de la respuesta tiene cierta independencia de la concentración del olor mientras que para un rango más alto de concentraciones la intensidad de respuesta varía con la concentración del olor. La pendiente de la curva de intensidad de respuesta en función de concentración es mayor para las mediciones con picrotoxina respecto de sol. salina y vemos además que en los animales

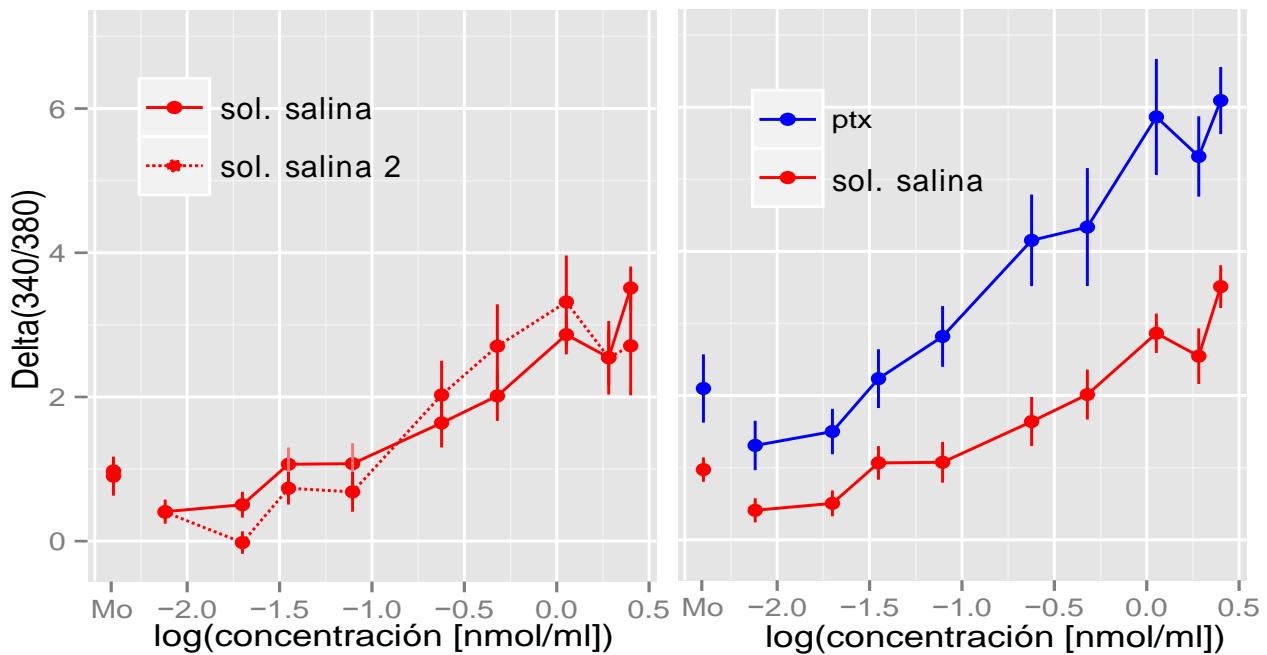


Figura 54: Control de ganancia y efecto de la ptx. Curvas de actividad en función de concentración del estímulo. A la izquierda se ve el grupo control. Animales a los que se les mide la rampa creciente de 2-octanona en dos oportunidades ambas con salina. Vemos que no hay diferencias entre la primera y la segunda repetición. A la derecha en los animales se mide una vez con salina y luego se repite con ptx. Se ve que hay un aumento en la pendiente de respuesta y por tanto una disminución del control de ganancia. El valor Mo corresponde a la actividad evocada por aceite mineral que sirve de control de actividad basal.

control no hay diferencias entre las repeticiones con salina. Lo que nos asegura que el aumento con picrotoxina no se deben a algún aspecto temporal dependiente del 1er y 2do ciclo de mediciones. Este resultado muestra la necesidad de la inhibición vía receptores GABA-A para el control de ganancia y la extensión del rango dinámico de codificación de los olores.

Es importante destacar que a pesar del cambio en la intensidad de respuesta provocado por picrotoxina se sigue observando una región en la que la actividad disminuye cuando la concentración del olor aumenta de modo que sigue habiendo efectos de control de ganancia. De existir otro mecanismo este podría ser por medio de GABA-B. Se sabe que hay receptores de tipo GABA-B en el lóbulo antenal de insectos y estos podrían intervenir en el rango de concentración que no es afectado por picrotoxina.

Actividad espontanea

Los segundos previos a la estimulación con olor en cada registro fueron utilizados para estudiar el efecto de picrotoxina sobre la actividad espontanea. En la figura 55 pueden verse ejemplos de actividad espontanea en presencia de solución salina o en presencia de

microtoxina. En ambos casos se observaron oscilaciones entorno al nivel basal de calcio que eran de mayor amplitud en el caso de microtoxina. Para cuantificar estas diferencias medimos el valor medio de la actividad para todas las mediciones con sol. salina vs microtoxina y se compararon las dispersiones. En la figura 55 se puede ver que hay diferencias en los valores de dispersión. Esto muestra que la microtoxina aumenta los niveles de disparos espontáneos y que las redes inhibitorias ejercen una inhibición tónica sobre la red del lóbulo antenal.

Número de glomérulos reclutados

Desde la sección de imaging donde se analizó la representación de las mezclas, hasta las simulaciones donde se compararon los patrones de entrada con los de salida del lóbulo antenal, quedó ejemplificado el fenómeno de supresión por el cual algunos glomérulos que reciben estimulación desde las neuronas receptoras no muestran actividad a nivel de las neuronas de proyección. Esta diferenciación es importante ya que en los experimentos de imaging se midió actividad solo a nivel de neuronas de proyección y puede ocurrir que muchas de estas reciben el input sensorial pero no se activan porque integran a su vez input de neuronas inhibitorias. Este fenómeno debería evidenciarse en el caso de concentraciones crecientes del olor, ya que a medida que se reclutan más neuronas sensoriales serán reclutadas más neuronas inhibitorias y por lo tanto el número total de glomérulos que respondan al olor debería permanecer regulado. Los resultados de esta sección solo parcialmente apoyan esta predicción. Para cuantificar esto y evaluar el rol de las inhibiciones se conto el número de glomérulos activos en función de la concentración crecientes de 2-octanona con y sin microtoxina. Se consideró como activo a los glomérulos con una actividad tres veces mayor que el desvío estándar de la actividad basal. Los resultados se muestran en la figura 56.

Lo primero que vemos es que el número de glomérulos aumenta con la concentración variando desde 10% a 70% de glomérulos. Vemos además que la microtoxina desplazó solo levemente hacia la izquierda la curva de glomérulos reclutados en función del estímulo lo que indica que en el caso sin inhibiciones un mayor número de glomérulos se enciende a bajas concentraciones del olor. Sin embargo a altas concentraciones el número de glomérulos reclutados es el mismo con o sin microtoxina.

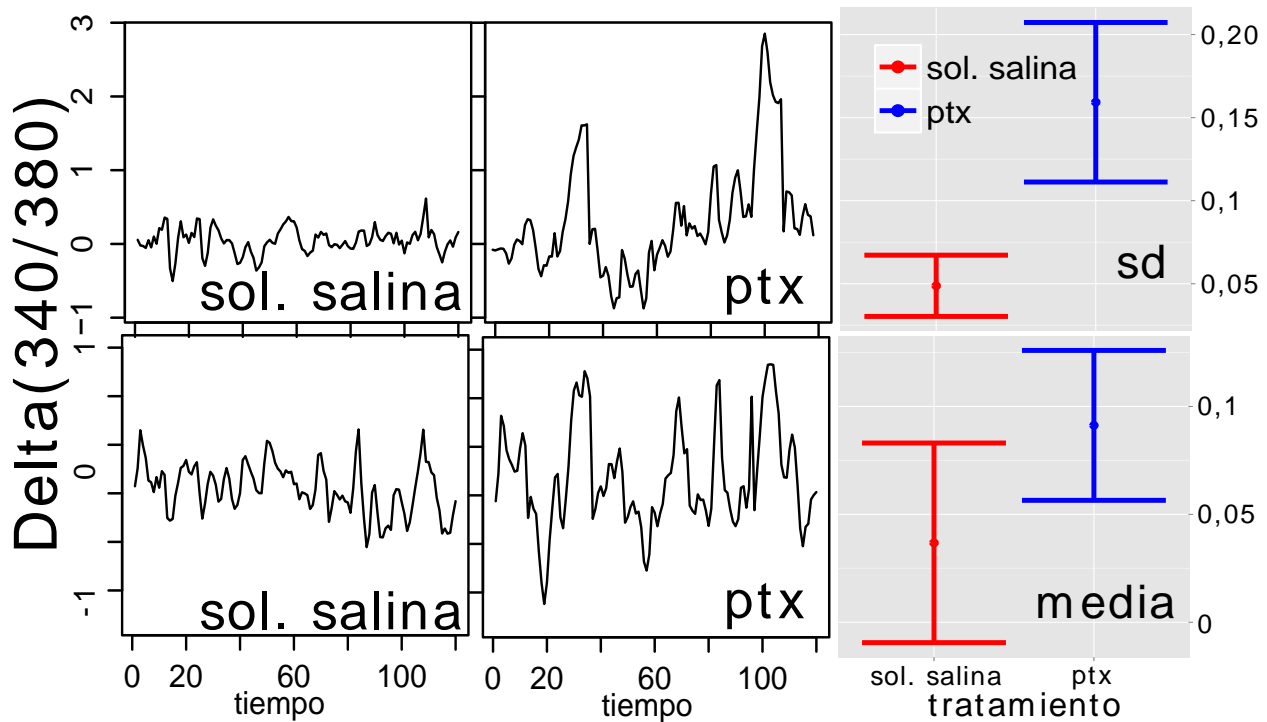


Figura 55: Cuantificación de la respuesta espontánea. Los trazos de la izquierda corresponden a dos ejemplos de actividad espontánea. En el mismo animal antes y la exposición al olor se cuantifica las curvas de calcio antes y después de la aplicación de ptx. Se ve en los ejemplos que las curvas temporales con ptx tienen mayor actividad. A la derecha se muestran los valores de la media (abajo) de la actividad y la dispersión (arriba) en la respuesta espontánea con salina (rojo) y con ptx (azul). Se observa que si bien el valor medio no cambia con ptx hay un aumento en la actividad basal del animal.

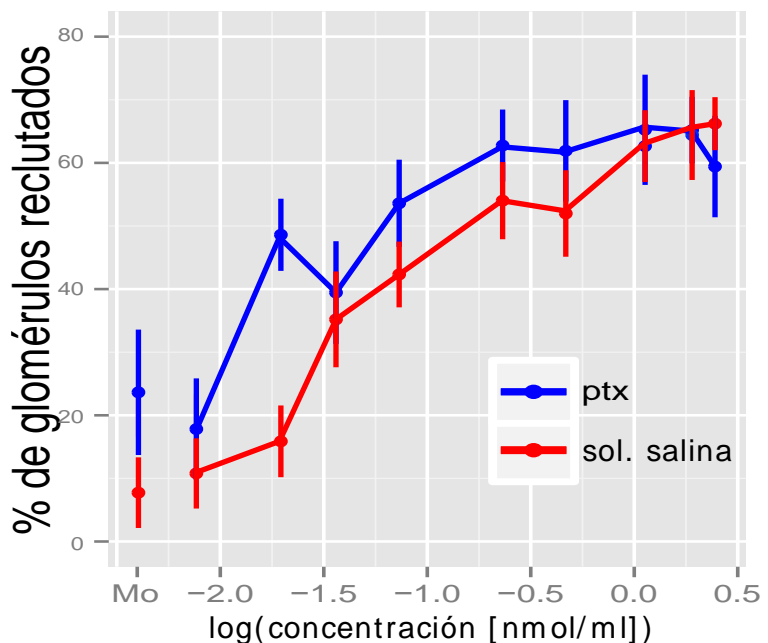


Figura 56: Porcentaje de glomérulos activos para cada concentración. Se cuantifica el porcentaje de glomérulos activos como aquellos que tienen actividades 3 veces mayor que la dispersión de la actividad basal. En la figura se ve el promedio y error para las distintas concentraciones. En rojo con salina y en azul con ptx. Se observa un aumento en el porcentaje de glomérulos con la concentración peor no se ven diferencias entre salina y ptx.

5. Discusión

A lo largo del trabajo dividimos los resultados en cuatro secciones que nos permiten organizar los pasos dados. Hagamos un repaso de estos y las conclusiones obtenidas discutiéndolas y poniéndolas en contexto.

OLORES PUROS

Vimos que los olores mono moleculares, que llamamos puros, tienen una representación en el lóbulo antenal formada por la actividad de un conjunto de glomérulos dando así una representación combinatoria de los olores. De manera que por ejemplo dos olores distintos pueden compartir parte de la actividad [Xia *et al.*, 2008, Saito *et al.*, 2009, Hallem y Carlson, 2006]. Discutimos diferentes algoritmos que podrían utilizarse como medida de parentesco entre olores [Locatelli y Relu, 2014] y mostramos que la correlación Paerson, que hace hincapié en el código relativo (y no tanto en la intensidad [Deisig *et al.*, 2001]), es capaz de clasificar los distintos olores dentro de un animal. Consistentemente con las respuestas comportamentales que indican que los animales son capaces de distinguir los olores. Más aun mostramos que, dado que la correlación es capaz de clasificar los patrones de activación de los olores para todos los animales juntos, el código espacial evocado por cada olor puro es bastante conservado a través de los animales.

MEZCLAS

Sin embargo vimos que la representación de la mezcla presenta mayor variabilidad que la de sus componentes. Es interesante discutir en este punto porque, en principio, si consideramos que la codificación de olores es de manera combinatoria [Malnic *et al.*, 1999, Kreher *et al.*, 2008] el animal no tendría forma de saber si el olor que percibe es “puro” o “mezcla”. ¿Qué es entonces lo que produce mayor variabilidad? Sabemos que si A recluta un grupo de ORNs y B recluta otro subconjunto de ORNs, la mezcla AB reclutará todas las ORNs (las que son de A, las que son de B y las compartidas). Entonces el número de glomérulos reclutados por la mezcla a nivel de los receptores es mayor y por tanto es mayor el número de interacciones posibles. El número de interacciones crece mucho más rápido que el número de glomérulos. Dado que los contactos posibles para N glomérulos son $N(N-1)/2$ (sólo con-

siderando contactos de a dos glomérulos) el incremento de posibles contactos es al menos cuadrático con la cantidad de glomérulos reclutados. De este modo dado que, como mostramos en este trabajo, las interacciones son sujeto de plasticidad es posible que al reclutar más glomérulos sea mayor la variabilidad entre animales. Vimos que la representación de las mezclas en las PNs no es la suma de las actividades evocadas por los olores puros y vimos también que se observan efectos de inhibición y sinergia en algunos glomérulos. Es interesante que dichos efectos no se ven conservados en los mismos glomérulos a través de los animales. No obstante esta variabilidad, vimos que las mezclas pueden predecirse como una combinación lineal de las componentes. Pero es importante destacar que dicha combinación lineal es distinta para cada glomérulo pudiendo incluir información de cómo cada glomérulo integra la información de la mezcla. Cuando miramos el análisis de componentes principales vimos que las mezclas están en el plano que contiene a los olores puros. Lo cual supone que no existe una dimensión específica para la mezcla y por tanto que toda la representación puede integrarse como una única combinación de las componentes. Sin embargo este análisis lo hicimos para un animal promedio. Dado que lo que observamos es que tanto los efectos sinérgicos como inhibitorios pueden ser diferentes en cada animal no es raro encontrar que en el promedio se pierdan las variaciones que cada animal tenga. Es posible que por esto el ajuste por glomérulo nos permitió notar y evaluar las diferencias en los cambios individuales cuando estos fueron en la dirección de codificación.

EL EFECTO DEL ENTRENAMIENTO

Que las mezclas sean representadas como combinación lineal de los componentes puede resultar en un problema perceptual si lo que es importante es la detección de una de las componentes. Las células de Kenyon en los niveles más altos de procesamiento identifican a los olores por un patrón de codificación específica. Para identificar un olor no solo tienen que tener actividad los elementos que codifiquen ese olor, sino que no tienen que activarse otros (es decir el patrón es tanto de PNs activas como PNs en reposo). La codificación de un olor relevante podría entonces verse interrumpida por la presencia de otros olores. El mecanismo que mostramos en este trabajo podría ser de vital importancia en este sentido. Vimos del análisis de los patrones de activación para los olores puros y las mezclas que en los animales

con experiencia apetitiva con uno de los olores la representación de la mezcla se parece más al componente recompensado y menos a aquel que no tiene valor predictivo. De este modo luego de la experiencia cuando el animal huele la mezcla, la información que llega a las células de Kenyon les permitiría detectar el olor recompensado con mayor eficiencia en detrimento de la capacidad de identificar o percibir los olores que acompañan en la mezcla. Esto explica los resultados obtenidos en experimentos comportamentales de ensombrecimiento [Guerrieri *et al.*, 2005, Smith, 1998].

Mostramos además que los cambios en la codificación de mezclas ocurren a partir de un detrimento en el peso de glomérulos del CS- respecto de lo esperado, mientras que los glomérulos CS+ aumentan su peso relativo. Esto no quiere decir que los glomérulos tengan más actividad que antes del entrenamiento. Lo que encontramos es que dada un valor de actividad para un olor puro la actividad de sus glomérulos activos esta sobre representada en la mezcla respecto de la misma relación en un animal control. Dicho de otra manera, la relación lineal con la que un animal naive computa la actividad de un dado glomérulo cambia con la experiencia.

Es posible que la experiencia también este afectando la codificación de los olores puros. De ser así, los cambios fueron incluidos en el análisis presentado (mediante el algoritmo que utiliza los valores evocados por las componentes para predecir las mezclas) y podemos estar tranquilos de que los resultados presentados tienen en cuenta su papel en el problema de codificación de mezclas. Estudiar los cambios en los olores puros independientemente de la representación de estos en las mezclas resulta más difícil debido a que no tenemos controles internos antes y después del entrenamiento. Sin embargo mediante el análisis de clustering vimos que en los animales entrenados el contraste entre grupos es mayor y el algoritmo diferencia mejor los olores puros. Sería interesante estudiar si el entrenamiento con mezclas mejora la capacidad de clasificar y agrupar las representaciones de estas y de hacerlo estudiar la estrategia. Analizando si en ese caso las mezclas ganan una dimensión propia.

Existen propuestos modelos de cómo ocurre la plasticidad en el lóbulo antenal [Rath *et al.*, 2011, Locatelli *et al.*, 2013]. Resultados obtenidos en colaboración con el grupo de Maxim Bazhenov de la UC Riverside muestran numéricamente que la plasticidad en las fuerzas sinápticas inhibitorias del lóbulo antenal podrían explicar los resultados encontrados. Estos

resultados numéricos predicen además una caída en la actividad general [Chen *et al.*, 2015]. En el presente trabajo mostramos resultados experimentales que prueban que la experiencia con un olor reduce la actividad general evocada por los olores comprobando la predicción del modelo. Sin embargo no probamos que este sea el mecanismo por el cual sea efectiva la plasticidad en el lóbulo antenal y la consecuente modificación en la representación. En trabajos futuros nos proponemos, mediante experimentos farmacológicos realizar mediciones indirectas de actividad inhibitoria local y cuantificar si hay cambios apreciables en esta debido a la experiencia.

CONTROL DE GANANCIA

Los animales además de reconocer olores presentes en mezclas deben ser capaces de generalizar la identidad de un olor en muchas concentraciones. Estos problemas son muchas veces presentados como antagónicos [Stopfer *et al.*, 2003] probablemente debido a que mientras aumentar el control de ganancia puede implicar una reducción en la actividad, a priori, es esperable que aumentar la saliencia tenga el efecto contrario. Sin embargo como vimos en los resultados anteriores proponemos que los cambios en el lóbulo antenal podrían ocurrir a través de aumento en actividad inhibitoria implicando una reducción en la actividad general. Estudiamos mediante simulaciones numéricas la posibilidad de que la red de neuronas del lóbulo antenal presente propiedades de control de ganancia y vimos que el incremento de las fuerzas inhibitorias reduce la pendiente de la relación entre la entrada y la salida. Mostrando que es posible regular la ganancia mediante la fuerza de las sinapsis inhibitorias de las neuronas GABAérgicas del lóbulo antenal. Además vimos que esta propiedad depende también del número de glomérulos reclutados por el olor. Así olores que reclutan más glomérulos muestran mayor efecto de control de ganancia mientras olores que reclutan pocos glomérulos muestran rangos de respuesta mayores. Este resultado es sumamente interesante. Como dijimos, las células d Kenyon son detectores de coincidencia y se encuentran calibradas para responder a combinaciones muy específicas actuando solo en el caso que las neuronas adecuadas se activen superando un umbral. Entonces resulta funcional que aquellos olores que reclutan pocos glomérulos y probablemente requieran más actividad en las PNs muestren menor control en la ganancia. Puesto que serán menos para superar el umbral.

Por otro lado en muchas ocasiones olores con mucha relevancia biológica como feromonas tienen representaciones con glomérulos y receptores muy específicos. En estos casos por su relevancia esperamos que evoquen actividades suficientemente altas para ser reconocido e inhibir la presencia de otros olores. En los experimentos de concentraciones vemos que la respuesta del lóbulo antenal muestra control de ganancia en concentraciones bajas.

Los experimentos con picrotoxina muestran que si bien el control de ganancia en concentraciones bajas no desaparece la pendiente de la relación entrada-salida para concentraciones altas e intermedias aumenta al bloquear los canales de cloro. Esto muestra que existe control de ganancia regulado por GABA como muestran las simulaciones. La persistencia del control de ganancia para bajas concentraciones en los experimentos con picrotoxina puede tener varias explicaciones. La más sencilla es que la droga aplicada no esté bloqueando el 100% de los canales de cloro y que por tanto aun exista el efecto de neuronas inhibitorias. Otra opción posible es que exista más de un mecanismo. Estos podrían ser mediante receptores GABA-B mediante la amplificación no lineal presentada en la introducción. En el trabajo de [Zhu *et al.*, 2013] se presentan dos mecanismos diferenciados en el pez zebra, uno para bajas concentraciones y otro para altas. De hecho como mostramos en la introducción es esperable que mientras para bajas concentraciones el control de ganancia se dé como consecuencia de un aumento en la actividad, en altas concentraciones sea regulada bajando la actividad. Entonces es posible algún mecanismo (podría ser la amplificación no lineal) este aumentando la respuesta para bajas concentraciones y que al mismo tiempo este siendo regulada por las inhibiciones.

Vemos que los problemas de la adecuación de las señales sensoriales están muy interrelacionados. Interesantemente encontramos y presentamos un mecanismo compatible tanto con la codificación de olores presente en mezclas como con la integración a través de las concentraciones que, además, logramos emular numéricamente. Según lo visto, la experiencia podría estar modificando las fuerzas sinápticas de las neuronas inhibitorias explicando el aumento de la saliencia de los olores recompensados y la reducción de los olores sin valor predictivo en las mezclas. Al mismo tiempo las neuronas inhibitorias regulan el control de ganancia y por tanto el olor aprendido no solo tendría mayor saliencia si no que sería generalizable a través de un rango más amplio de concentraciones. Así la plasticidad actuaría tanto sobre

la competencia entre olores como en la generalización de la identidad del olor aprendido.

La relevancia que el olfato tiene para la supervivencia de las especies y para nuestra propia percepción del entorno es fuertemente reconocida. Sin embargo es, de los sistemas sensoriales, probablemente uno de los menos comprendidos. Esto es probablemente por la falta de comprensión de la física involucrada en los estímulos y la complejidad del análisis de experimentos en los que no se sabe que propiedades de las moléculas sensan los seres vivos. Los resultados presentados aportan conocimiento sobre el proceso que transforma y adecua la información sensorial olfativa desde los estímulos a la percepción. Estudiando los mecanismos de plasticidad y adecuación de señales. Pero además espero haber podido hacer un aporte a mostrar el valor del trabajo inter disciplinario en constante interacción entre las preguntas, los modelos y los experimentos.

6. Apéndice A

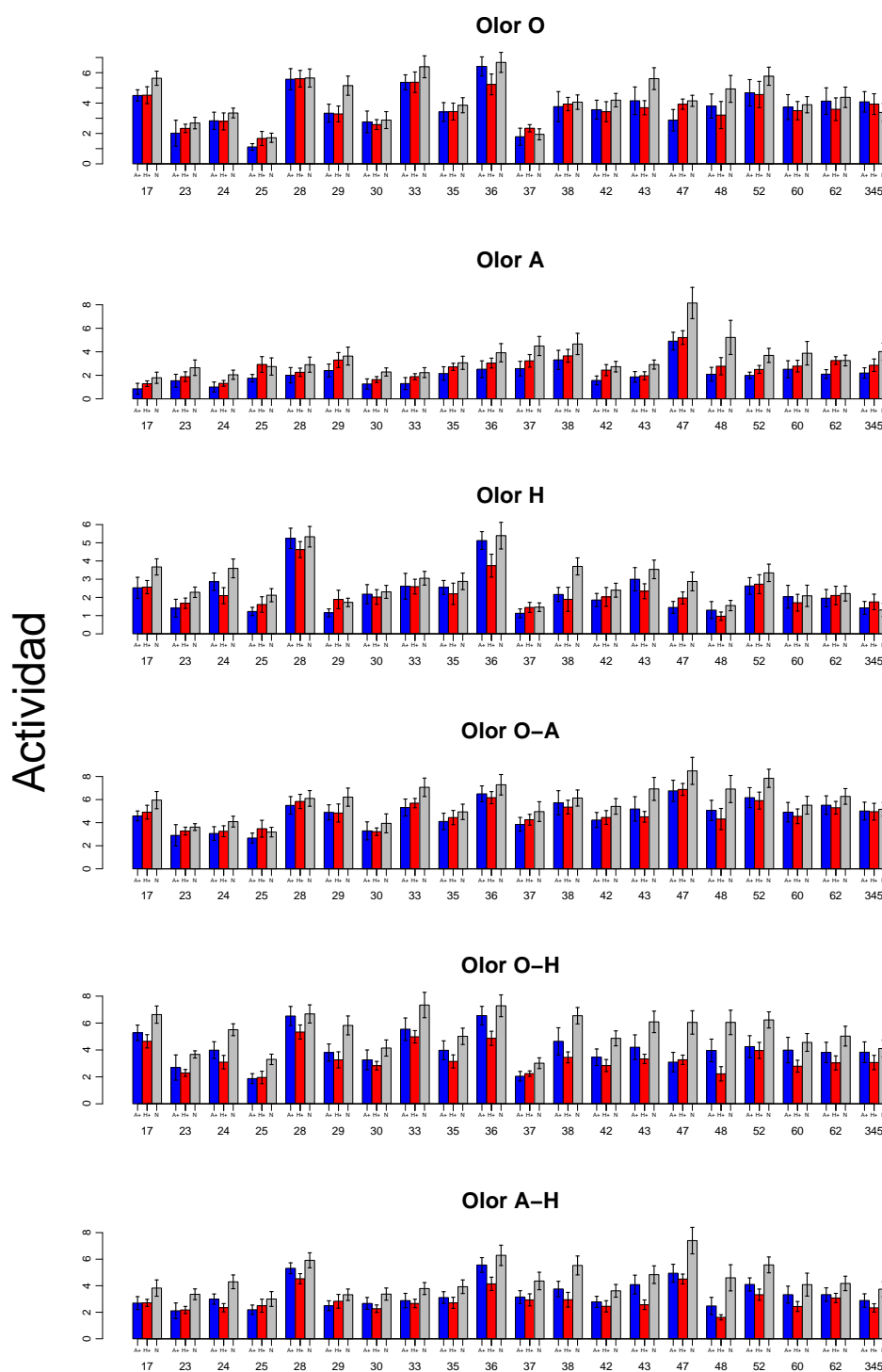


Figura 57: Actividad evocada para todos los olores. Se muestran los promedios y error estándar de la actividad evocada por todos los olores para todos los glomérulos de los tres tratamientos. De arriba hacia abajo se muestran los diferentes olores el eje x es el nombre de los glomérulos y el eje y el valor de actividad medido por imaging de calcio. Los tres tratamientos se identifican por los colores. En color gris se muestran los valores para los animales naïve, en rojo los animales entrenados a 1-hexanol y en azul a acetofenona. Se observa que para todos los caso (independiente de olor, tratamiento o glomérulos) la actividad de los grupos entrenados es menor o igual que la del grupo naïve.

Referencias

- Abel, R., Rybak, J., y Menzel, R. (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *apis mellifera*. *Journal of Comparative Neurology*, 437(3):363–383.
- Arenas, A., Giurfa, M., Farina, W., y Sandoz, J. (2009). Early olfactory experience modifies neural activity in the antennal lobe of a social insect at the adult stage. *European Journal of Neuroscience*, 30(8):1498–1508.
- Aso, Y., Siwanowicz, I., Bräcker, L., Ito, K., Kitamoto, T., y Tanimoto, H. (2010). Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Current Biology*, 20(16):1445–1451.
- Assisi, C., Stopfer, M., y Bazhenov, M. (2012). Excitatory local interneurons enhance tuning of sensory information. *PLoS computational biology*, 8(7):e1002563.
- Bazhenov, M., Stopfer, M., Rabinovich, M., Huerta, R., Abarbanel, H. D., Sejnowski, T. J., y Laurent, G. (2001). Model of transient oscillatory synchronization in the locust antennal lobe. *Neuron*, 30(2):553–567.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., y Vosshall, L. B. (2009). Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *drosophila*. *Cell*, 136(1):149–162.
- Bhandawat, V., Olsen, S. R., Gouwens, N. W., Schlieff, M. L., y Wilson, R. I. (2007). Sensory processing in the *drosophila* antennal lobe increases reliability and separability of ensemble odor representations. *Nature neuroscience*, 10(11):1474–1482.
- Bitterman, M., Menzel, R., Fietz, A., y Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2):107.
- Bogner, F., Boppré, M., Ernst, K.-D., y Boeckh, J. (1986). CO₂ sensitive receptors on labial palps of *rhodogastria* moths (Lepidoptera: Arctiidae): physiology, fine structure and central projection. *Journal of Comparative Physiology A*, 158(6):741–749.

- Brechbühl, J., Klaey, M., y Broillet, M.-C. (2008). Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science*, 321(5892):1092–1095.
- Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I., y Davis, R. L. (2010). Olfactory learning in drosophila. *Physiology*, 25(6):338–346.
- Cassenaer, S. y Laurent, G. (2007). Hebbian stdp in mushroom bodies facilitates the synchronous flow of olfactory information in locusts. *Nature*, 448(7154):709–713.
- Chen, J.-Y., Marachlian, E., Assisi, C., Huerta, R., Smith, B. H., Locatelli, F., y Bazhenov, M. (2015). Learning modifies odor mixture processing to improve detection of relevant components. *The Journal of Neuroscience*, 35(1):179–197.
- Daly, K. C., Christensen, T. A., Lei, H., Smith, B. H., y Hildebrand, J. G. (2004). Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28):10476–10481.
- Das, Sudeshna and Sadanandappa, Madhumala K and Dervan, Adrian and Larkin, Aoife and Lee, John Anthony and Sudhakaran, Indulekha P and Priya, Rashi and Heidari, Raheleh and Holohan, Eimear E and Pimentel, Angel and others (2011). Plasticity of local gabaergic interneurons drives olfactory habituation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36):E646–E654.
- de Brito Sanchez, M. G. y Kaissling, K.-E. (2005). Inhibitory and excitatory effects of iodobenzene on the antennal benzoic acid receptor cells of the female silk moth bombyx mori l. *Chemical senses*, 30(5):435–442.
- Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H., y Sandoz, J.-C. (2006). Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. *European Journal of neuroscience*, 24(4):1161–1174.
- Deisig, N., Lachnit, H., Giurfa, M., y Hellstern, F. (2001). Configural olfactory learning in honeybees: negative and positive patterning discrimination. *Learning & Memory*, 8(2):70–78.

- Ditzen, M., Evers, J.-F., y Galizia, C. G. (2003). Odor similarity does not influence the time needed for odor processing. *Chemical Senses*, 28(9):781–789.
- Dobritsa, A. A., van Naters, W. v. d. G., Warr, C. G., Steinbrecht, R. A., y Carlson, J. R. (2003). Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the drosophila antenna. *Neuron*, 37(5):827–841.
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J. R., y Smith, D. P. (2003). Targeted mutation of a drosophila odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *The Journal of neuroscience*, 23(30):9906–9912.
- Faber, T., Joerges, J., y Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature neuroscience*, 2(1):74–78.
- Farkhooi, F., Froese, A., Muller, E., Menzel, R., y Nawrot, M. P. (2013). Cellular adaptation facilitates sparse and reliable coding in sensory pathways. *PLoS computational biology*, 9(10):e1003251.
- Farooqui, T. (2007). Octopamine-mediated neuronal plasticity in honeybees: implications for olfactory dysfunction in humans. *The Neuroscientist*, 13(4):304–322.
- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H., y Smith, B. H. (2003). Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *The journal of Neuroscience*, 23(12):5370–5380.
- Fernandez, P. C., Locatelli, F. F., Person-Rennell, N., Deleo, G., y Smith, B. H. (2009). Associative conditioning tunes transient dynamics of early olfactory processing. *The Journal of neuroscience*, 29(33):10191–10202.
- Flanagan, D. y Mercer, A. R. (1989). An atlas and 3-d reconstruction of the antennal lobes in the worker honey bee, *apis mellifera* l.(hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 18(2):145–159.
- Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., y Breer, H. (2007). Expression of trace amine-associated receptors in the grueneberg ganglion. *Chemical senses*, 32(6):623–631.

- Franks, K. M. e Isaacson, J. S. (2006). Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex: implications for olfactory coding. *Neuron*, 49(3):357–363.
- Galán, R. F., Fourcaud-Trocmé, N., Ermentrout, G. B., y Urban, N. N. (2006). Correlation-induced synchronization of oscillations in olfactory bulb neurons. *The Journal of neuroscience*, 26(14):3646–3655.
- Galizia, C. G., Joerges, J., Küttner, A., Faber, T., y Menzel, R. (1997). A semi-in-vivo preparation for optical recording of the insect brain. *Journal of neuroscience methods*, 76(1):61–69.
- Galizia, C. G., McIlwrath, S. L., y Menzel, R. (1999). A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell and tissue research*, 295(3):383–394.
- Galizia, C. G., Nägler, K., Hölldobler, B., y Menzel, R. (1998). Odour coding is bilaterally symmetrical in the antennal lobes of honeybees (*apis mellifera*). *European Journal of Neuroscience*, 10(9):2964–2974.
- Galizia, C. G. y Vetter, R. S. (2004). Optical methods for analyzing odor-evoked activity in the insect brain.
- Gaudry, Q., Nagel, K. I., y Wilson, R. I. (2012). Smelling on the fly: sensory cues and strategies for olfactory navigation in drosophila. *Current opinion in neurobiology*, 22(2):216–222.
- Girardin, C. C., Kreissl, S., y Galizia, C. G. (2013). Inhibitory connections in the honeybee antennal lobe are spatially patchy. *Journal of neurophysiology*, 109(2):332–343.
- Grosmaître, X., Santarelli, L. C., Tan, J., Luo, M., y Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nature neuroscience*, 10(3):348–354.
- Guerrieri, F., Lachnit, H., Gerber, B., y Giurfa, M. (2005). Olfactory blocking and odorant similarity in the honeybee. *Learning & Memory*, 12(2):86–95.

- Haddad, R., Khan, R., Takahashi, Y. K., Mori, K., Harel, D., y Sobel, N. (2008). A metric for odorant comparison. *Nature methods*, 5(5):425–429.
- Hallem, E. A. y Carlson, J. R. (2006). Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, 125(1):143–160.
- Hallem, E. A., Ho, M. G., y Carlson, J. R. (2004). The molecular basis of odor coding in the drosophila antenna. *Cell*, 117(7):965–979.
- Hammer, M. y Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *The Journal of Neuroscience*, 15(3):1617–1630.
- Hammer, M. y Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning & Memory*, 5(1):146–156.
- Hashiguchi, Y. y Nishida, M. (2007). Evolution of trace amine-associated receptor (taar) gene family in vertebrates: Lineage-specific expansions and degradations of a second class of vertebrate chemosensory receptors expressed in the olfactory epithelium. *Molecular biology and evolution*, 24(9):2099–2107.
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500–544.
- Honegger, K. S., Campbell, R. A., y Turner, G. C. (2011). Cellular-resolution population imaging reveals robust sparse coding in the drosophila mushroom body. *The Journal of Neuroscience*, 31(33):11772–11785.
- Huetteroth, W. y Waddell, S. (2011). Hungry flies tune to vinegar. *Cell*, 145(1):17–18.
- Illig, K. R. y Haberly, L. B. (2003). Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 457(4):361–373.
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G., y Menzel, R. (1997). Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain.

- Jones, W. D., Cayirlioglu, P., Kadow, I. G., y Vosshall, L. B. (2007). Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in drosophila. *Nature*, 445(7123):86–90.
- Jortner, R. A. (2012). Network architecture underlying maximal separation of neuronal representations. *Frontiers in neuroengineering*, 5.
- Jortner, R. A., Farivar, S. S., y Laurent, G. (2007). A simple connectivity scheme for sparse coding in an olfactory system. *The Journal of neuroscience*, 27(7):1659–1669.
- Kaluza, J. F., Gussing, F., Bohm, S., Breer, H., y Strotmann, J. (2004). Olfactory receptors in the mouse septal organ. *Journal of neuroscience research*, 76(4):442–452.
- Kazama, H. y Wilson, R. I. (2008). Homeostatic matching and nonlinear amplification at identified central synapses. *Neuron*, 58(3):401–413.
- Keene, A. C. y Waddell, S. (2007). Drosophila olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(5):341–354.
- Keller, A. y Vosshall, L. B. (2007). Influence of odorant receptor repertoire on odor perception in humans and fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13):5614–5619.
- Khan, R. M., Luk, C.-H., Flinker, A., Aggarwal, A., Lapid, H., Haddad, R., y Sobel, N. (2007). Predicting odor pleasantness from odorant structure: pleasantness as a reflection of the physical world. *The Journal of Neuroscience*, 27(37):10015–10023.
- Kirschner, S., Kleineidam, C. J., Zube, C., Rybak, J., Grünewald, B., y Rössler, W. (2006). Dual olfactory pathway in the honeybee, *apis mellifera*. *Journal of comparative neurology*, 499(6):933–952.
- Krashes, M. J., DasGupta, S., Vreede, A., White, B., Armstrong, J. D., y Waddell, S. (2009). A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in drosophila. *Cell*, 139(2):416–427.

- Kreher, S. A., Mathew, D., Kim, J., y Carlson, J. R. (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron*, 59(1):110–124.
- Kurtovic, A., Widmer, A., y Dickson, B. J. (2007). A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a drosophila sex pheromone. *Nature*, 446(7135):542–546.
- Kwon, J. Y., Dahanukar, A., Weiss, L. A., y Carlson, J. R. (2007). The molecular basis of co2 reception in drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9):3574–3578.
- Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M., y Menzel, R. (1999). Olfactory discrimination ability and odor structure–activity relationships in honeybees. *Chemical senses*, 24(4):429–438.
- Laurent, G. (2002). Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nature reviews neuroscience*, 3(11):884–895.
- Liberles, S. D. y Buck, L. B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442(7103):645–650.
- Lin, H.-H., Lai, J. S.-Y., Chin, A.-L., Chen, Y.-C., y Chiang, A.-S. (2007). A map of olfactory representation in the drosophila mushroom body. *Cell*, 128(6):1205–1217.
- Lin, W., Arellano, J., Slotnick, B., y Restrepo, D. (2004). Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit a2 stimulate the main olfactory system. *The Journal of neuroscience*, 24(14):3703–3710.
- Litaudon, P., Amat, C., Bertrand, B., Vigouroux, M., y Buonviso, N. (2003). Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *European Journal of Neuroscience*, 17(11):2457–2461.
- Locatelli, F. F., Fernandez, P. C., Villareal, F., Muezzinoglu, K., Huerta, R., Galizia, C. G., y Smith, B. H. (2013). Nonassociative plasticity alters competitive interactions among mixture components in early olfactory processing. *European Journal of Neuroscience*, 37(1):63–79.

- Locatelli, F. F. y Rela, L. (2014). Mosaic activity patterns and their relation to perceptual similarity: open discussions on the molecular basis and circuitry of odor recognition. *Journal of neurochemistry*, 131(5):546–553.
- Luo, M., Fee, M. S., y Katz, L. C. (2003). Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science*, 299(5610):1196–1201.
- M., H. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 366:59.
- Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C. L., Baker, H., Greer, C. A., y Shepherd, G. M. (2003). Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *The Journal of neuroscience*, 23(1):317–324.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., y Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5):713–723.
- Mandiyan, V. S., Coats, J. K., y Shah, N. M. (2005). Deficits in sexual and aggressive behaviors in *cnga2* mutant mice. *Nature neuroscience*, 8(12):1660–1662.
- Maresh, A., Gil, D. R., Whitman, M. C., y Greer, C. A. (2008). Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb—implications for odor processing. *PloS one*, 3(7):e2640.
- Mauelshagen, J. (1993). Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *Journal of neurophysiology*, 69:609–609.
- McGann, J. P., Pérez, N., Gainey, M. A., Muratore, C., Elias, A. S., y Wachowiak, M. (2005). Odorant representations are modulated by intra-but not interglomerular presynaptic inhibition of olfactory sensory neurons. *Neuron*, 48(6):1039–1053.
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learning & Memory*, 8(2):53–62.

- Murphy, G. J., Glickfeld, L. L., Balsen, Z., e Isaacson, J. S. (2004). Sensory neuron signaling to the brain: properties of transmitter release from olfactory nerve terminals. *The Journal of neuroscience*, 24(12):3023–3030.
- Niimura, Y. y Nei, M. (2007). Extensive gains and losses of olfactory receptor genes in mammalian evolution. *PloS one*, 2(8):e708.
- Okada, R., Rybak, J., Manz, G., y Menzel, R. (2007). Learning-related plasticity in pe1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *The Journal of neuroscience*, 27(43):11736–11747.
- Olsen, S. R., Bhandawat, V., y Wilson, R. I. (2007). Excitatory interactions between olfactory processing channels in the drosophila antennal lobe. *Neuron*, 54(1):89–103.
- Olsen, S. R. y Wilson, R. I. (2008). Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit. *Nature*, 452(7190):956–960.
- Peele, P., Ditzen, M., Menzel, R., y Galizia, C. G. (2006). Appetitive odor learning does not change olfactory coding in a subpopulation of honeybee antennal lobe neurons. *Journal of Comparative Physiology A*, 192(10):1083–1103.
- Perez-Orive, J., Mazor, O., Turner, G. C., Cassenaer, S., Wilson, R. I., y Laurent, G. (2002). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science*, 297(5580):359–365.
- Pérez, N. y Wachowiak, M. (2008). In vivo modulation of sensory input to the olfactory bulb by tonic and activity-dependent presynaptic inhibition of receptor neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(25):6360–6371.
- Poo, C. e Isaacson, J. S. (2009). Odor representations in olfactory cortex: “sparse” coding, global inhibition, and oscillations. *Neuron*, 62(6):850–861.
- Raman, B. y Stopfer, M. (2008). Olfactory coding: non-linear amplification separates smells. *Current Biology*, 18(1):R29–R32.

- Rath, L., Giovanni Galizia, C., y Szyszka, P. (2011). Multiple memory traces after associative learning in the honey bee antennal lobe. *European Journal of Neuroscience*, 34(2):352–360.
- Rein, J., Mustard, J. A., Strauch, M., Smith, B. H., y Galizia, C. G. (2013). Octopamine modulates activity of neural networks in the honey bee antennal lobe. *Journal of Comparative Physiology A*, 199:947–962.
- Reisert, J. y Restrepo, D. (2009). Molecular tuning of odorant receptors and its implication for odor signal processing. *Chemical senses*, p. bjp028.
- Riemensperger, T., Völler, T., Stock, P., Buchner, E., y Fiala, A. (2005). Punishment prediction by dopaminergic neurons in drosophila. *Current biology*, 15(21):1953–1960.
- Root, C. M., Masuyama, K., Green, D. S., Enell, L. E., Nässel, D. R., Lee, C.-H., y Wang, J. W. (2008). A presynaptic gain control mechanism fine-tunes olfactory behavior. *Neuron*, 59(2):311–321.
- Root, C. M., Semmelhack, J. L., Wong, A. M., Flores, J., y Wang, J. W. (2007). Propagation of olfactory information in drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28):11826–11831.
- Sachse, S. y Galizia, C. G. (2003). The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *European journal of neuroscience*, 18(8):2119–2132.
- Sachse, S., Rueckert, E., Keller, A., Okada, R., Tanaka, N. K., Ito, K., y Vosshall, L. B. (2007). Activity-dependent plasticity in an olfactory circuit. *Neuron*, 56(5):838–850.
- Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., y Mainland, J. D. (2009). Odor coding by a mammalian receptor repertoire. *Science signaling*, 2(60):ra9.
- Sam, M., Vora, S., Malnic, B., Ma, W., Novotny, M. V., y Buck, L. B. (2001). Neuropharmacology: Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature*, 412(6843):142–142.

- Sandoz, J., Galizia, C. G., y Menzel, R. (2003). Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience*, 120(4):1137–1148.
- Schlief, M. L. y Wilson, R. I. (2007). Olfactory processing and behavior downstream from highly selective receptor neurons. *Nature neuroscience*, 10(5):623–630.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., y Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in drosophila. *The Journal of neuroscience*, 23(33):10495–10502.
- Semmelhack, J. L. y Wang, J. W. (2009). Select drosophila glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature*, 459(7244):218–223.
- Shang, Y., Claridge-Chang, A., Sjulson, L., Pypaert, M., y Miesenböck, G. (2007). Excitatory local circuits and their implications for olfactory processing in the fly antennal lobe. *Cell*, 128(3):601–612.
- Shepherd, G. M., Chen, W. R., Willhite, D., Migliore, M., y Greer, C. A. (2007). The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain research reviews*, 55(2):373–382.
- Shiraiwa, T. (2008). Multimodal chemosensory integration through the maxillary palp in drosophila. *PloS one*, 3(5):e2191.
- Silbering, A. F. y Benton, R. (2010). Ionotropic and metabotropic mechanisms in chemoreception: 'chance or design'? *EMBO reports*, 11(3):173–179.
- Silbering, A. F. y Galizia, C. G. (2007). Processing of odor mixtures in the drosophila antennal lobe reveals both global inhibition and glomerulus-specific interactions. *The Journal of Neuroscience*, 27(44):11966–11977.
- Silbering, A. F., Okada, R., Ito, K., y Galizia, C. G. (2008). Olfactory information processing in the drosophila antennal lobe: anything goes? *The Journal of neuroscience*, 28(49):13075–13087.

- Sinakevitch, I., Mustard, J. A., y Smith, B. H. (2011). Distribution of the octopamine receptor *amoal* in the honey bee brain. *PLoS one*, 6(1):e14536.
- Sinakevitch, I. T., Smith, A. N., Locatelli, F., Huerta, R., Bazhenov, M., y Smith, B. H. (2013). *Apis mellifera* octopamine receptor 1 (*amoal*) expression in antennal lobe networks of the honey bee (*apis mellifera*) and fruit fly (*drosophila melanogaster*). *Frontiers in systems neuroscience*, 7.
- Smith, B. H. (1997). An analysis of blocking in odorant mixtures: an increase but not a decrease in intensity of reinforcement produces unblocking. *Behavioral neuroscience*, 111(1):57.
- Smith, B. H. (1998). Analysis of interaction in binary odorant mixtures. *Physiology & behavior*, 65(3):397–407.
- Smith, B. H., Abramson, C. I., y Tobin, T. R. (1991). Conditional withholding of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*) during discriminative punishment. *J Comp Psychol*, 105(4):345–356.
- Spehr, M., Kelliher, K. R., Li, X.-H., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., y Zufall, F. (2006). Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *The Journal of neuroscience*, 26(7):1961–1970.
- Stettler, D. D. y Axel, R. (2009). Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron*, 63(6):854–864.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B. H., y Laurent, G. (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, 390(6655):70–74.
- Stopfer, M., Jayaraman, V., y Laurent, G. (2003). Intensity versus identity coding in an olfactory system. *Neuron*, 39(6):991–1004.
- Strausfeld, N. J. y Hildebrand, J. G. (1999). Olfactory systems: common design, uncommon origins? *Current opinion in neurobiology*, 9(5):634–639.

- Strube-Bloss, M. F., Nawrot, M. P., y Menzel, R. (2011). Mushroom body output neurons encode odor–reward associations. *The Journal of neuroscience*, 31(8):3129–3140.
- Sudhakaran, I. P., Holohan, E. E., Osman, S., Rodrigues, V., Vijayraghavan, K., y Ramaswami, M. (2012). Plasticity of recurrent inhibition in the drosophila antennal lobe. *The Journal of Neuroscience*, 32(21):7225–7231.
- Suh, G. S., Wong, A. M., Hergarden, A. C., Wang, J. W., Simon, A. F., Benzer, S., Axel, R., y Anderson, D. J. (2004). A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in drosophila. *Nature*, 431(7010):854–859.
- Szyszka, P., Galkin, A., y Menzel, R. (2008). Associative and non-associative plasticity in kenyon cells of the honeybee mushroom body. *Frontiers in systems neuroscience*, 2.
- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3):168–179.
- Tanaka, N. K., Awasaki, T., Shimada, T., e Ito, K. (2004). Integration of chemosensory pathways in the drosophila second-order olfactory centers. *Current biology*, 14(6):449–457.
- Tian, H. y Ma, M. (2004). Molecular organization of the olfactory septal organ. *The Journal of neuroscience*, 24(38):8383–8390.
- Touhara, K. y Vosshall, L. B. (2009). Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annual Review of Physiology*, 71:307–332.
- Trinh, K. y Storm, D. R. (2003). Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature neuroscience*, 6(5):519–525.
- Turner, G. C., Bazhenov, M., y Laurent, G. (2008). Olfactory representations by drosophila mushroom body neurons. *Journal of neurophysiology*, 99(2):734–746.
- Wang, Y., Guo, H.-F., Pologruto, T. A., Hannan, F., Hakker, I., Svoboda, K., y Zhong, Y. (2004). Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of drosophila revealed by green fluorescent protein-based ca²⁺ imaging. *The Journal of neuroscience*, 24(29):6507–6514.

- Wang, Z., Sindreu, C. B., Li, V., Nudelman, A., Chan, G. C.-K., y Storm, D. R. (2006). Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium. *The Journal of neuroscience*, 26(28):7375–7379.
- Wilson, D., Best, A., y Sullivan, R. (2004a). Plasticity in the olfactory system: lessons for the neurobiology of memory. *The Neuroscientist*, 10(6):513–524.
- Wilson, R. I. y Mainen, Z. F. (2006). Early events in olfactory processing. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29:163–201.
- Wilson, R. I., Turner, G. C., y Laurent, G. (2004b). Transformation of olfactory representations in the drosophila antennal lobe. *Science*, 303(5656):366–370.
- Xia, Y., Wang, G., Buscariollo, D., Pitts, R. J., Wenger, H., y Zwiebel, L. J. (2008). The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in anopheles gambiae larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17):6433–6438.
- Xu, F., Schaefer, M., Kida, I., Schafer, J., Liu, N., Rothman, D. L., Hyder, F., Restrepo, D., y Shepherd, G. M. (2005). Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *Journal of Comparative Neurology*, 489(4):491–500.
- Yu, D., Ponomarev, A., y Davis, R. L. (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning: memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron*, 42(3):437–449.
- Zhu, P., Frank, T., y Friedrich, R. W. (2013). Equalization of odor representations by a network of electrically coupled inhibitory interneurons. *Nature neuroscience*, 16(11):1678–1686.