

Estrógeno Cerebral como Modulador Rápido da Função Auditiva

Ryan F. Kovaleski, Liisa A. Tremere e Raphael Pinaud

Sabe-se que os hormônios esteroides sexuais influenciam uma série de funções e comportamentos, inclusive reprodução, agressividade, humor e aprendizado (Fillit *et al.*, 1986; McEwen, 2002; Ostlund *et al.*, 2003; Craft *et al.*, 2004; McCarthy, 2008). Embora muitos destes comportamentos sejam influenciados pelos hormônios produzidos nas gônadas, sabe-se que os esteroides produzidos no cérebro podem ter influência significativa sobre a função cerebral e, conseqüentemente, sobre o comportamento. Um exemplo marcante de como os esteroides cerebrais (neuroesteroides) podem influenciar o sistema nervoso central é uma recém-descoberta atuação do hormônio feminino clássico, estrógeno (17β -estradiol, E_2), no processamento de informações sensoriais, especialmente a função auditiva. Esta revisão vai enfatizar especificamente o trabalho conduzido recentemente por nosso grupo de pesquisa e apresentado, em São Paulo, no VII Simpósio Internacional de Otorrinopediatria da IAPO, além de trabalhos selecionados de outros grupos. Coletivamente, estas descobertas recentes definiram como e em que extensão o E_2 produzido por neurônios auditivos centrais influencia a funcionalidade dos circuitos cerebrais que suportam a função auditiva, e como afeta os comportamentos com base na audição. Para uma descrição mais completa e discussão sobre o papel de E_2 sobre o processamento auditivo central, consulte (Maney e Pinaud, 2011; Pinaud e Tremere, 2012).

A hipótese de que o E_2 poderia modular a audição evoluiu continuamente ao longo dos últimos 30 anos. Uma das primeiras indicações da importância de E_2 no processamento sensorial advém das mudanças observadas nos limiares de audição durante o ciclo menstrual (Davis e Ahroon, 1982; Walpurger *et al.*, 2004). Além disso, pacientes com síndrome de Turner, que apresentam deficiência de estrogênios e o declínio nos níveis de E_2 que ocorrem naturalmente com o envelhecimento já foram fortemente relacionados com déficits na função auditiva (Gungor *et al.*, 2000; Hederstierna *et al.*, 2009). A conexão entre os níveis plasmáticos de E_2 e o desempenho auditivo está bem estabelecida tanto em seres humanos quanto em diversos modelos animais, tais como roedores, macacos, aves canoras, sapos e peixes (Maney e Pinaud, 2011; Pinaud e Tremere, 2012).

Apesar da clara conexão entre níveis *circulantes* de E_2 e função auditiva, só recentemente foi esclarecido que a ação do E_2 *cerebral*, é diferente do hormônio gonadal. A seguir resumimos as principais observações, que transformaram a visão de E_2 anteriormente considerado um hormônio plasmático envolvido no controle do ganho periférico do processamento auditivo passando a ter caracterizada sua ação de neuromodulador produzido localmente, e responsável por controlar o fluxo, resolução e retenção de informações acústicas nas áreas auditivas do proencéfalo.

A descoberta de que E_2 é um neuromodulador cerebral da função auditiva central ocorreu em um modelo bem estabelecido de audição em vertebrados, o pássaro diamante-mandarim (*zebra finch - Taeniopygia guttata*). Uma estação fundamental na via auditiva ascendente nesta espécie é o *nidopallium* caudomedial (NCM), uma região análoga do córtex associativo auditivo dos mamíferos. As células do NCM de animais em vigília respondem vigorosamente a estímulos auditivos, com preferência dada aos sinais de comunicação da mesma espécie (conspécíficos) se comparadas a cantos heteroespecíficos ou estímulos artificiais (Mello et al., 1992; Chew et al., 1996; Velho et al., 2005; Pinaud e Terleph, 2008). Um aspecto importante é que o NCM exibe alto nível de expressão da enzima aromatase, de síntese de estrógeno (ou estrógeno sintetase), assim como receptores de estrógeno, sugerindo que os neurônios nesta área auditiva podem tanto produzir quanto responder localmente aos estrógenos (Bernard et al., 1999; Metzdorf et al., 1999; Saldanha et al., 2000; Pinaud et al., 2006; Tremere et al., 2009; Jeong et al., 2011). Consistente com esta hipótese, a experiência auditiva resulta em aumento rápido e seletivo dos níveis de E_2 no NCM (Remage-Healey et al., 2008). A relevância funcional deste aumento dos níveis locais de E_2 dependentes de experiência só foi esclarecida recentemente. Nosso grupo obteve registros extracelulares combinados a manipulação farmacológica bilateral em diamantes-mandarim em estado de vigília e sob contenção, para determinar os efeitos de E_2 sobre a atividade das respostas neuronais do NCM.

Os neurônios do NCM respondem intensamente à execução de cantos conspécíficos. Observamos que infusões de E_2 no NCM aumentavam as taxas de descarga de unidades isoladas de forma dose-dependente (variação de 67,9-145,3%) (Tremere et al., 2009; Tremere e Pinaud, 2011). É importante observar que a cinética temporal dos efeitos de E_2 na neurofisiologia dos neurônios do NCM foi extremamente rápida (segundos) e consistente com a velocidade de neuromoduladores clássicos. Estudos subsequentes de um grupo independente revelaram resultados semelhantes em preparação anestesiada (Remage-Healey et al., 2010).

Evidências adicionais indicando que o E_2 modula diretamente o processamento auditivo central foram reveladas quando infundimos tamoxifeno (TMX) localmente, um modulador de receptores de estrógeno que age como antagonista no NCM ou ICI 182780 (ICI), um antagonista clássico e seletivo de estrógeno. O antagonismo do receptor de estrógeno com TMX reduziu as taxas de descarga neuronal evocada por estímulo auditivo de forma concentração-dependente (variação 48,4-71,4%) (Tremere et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos com a infusão de ICI no NCM. Mais especificamente, o bloqueio dos receptores de estrógeno com ICI reduziu as taxas de descarga dos neurônios do NCM em 36,4% em comparação aos níveis pré-infusão (Tremere e Pinaud, 2011).

As observações acima relatadas indicam que o E_2 modula direta e localmente a fisiologia dos neurônios do NCM. Ainda não se sabe, entretanto, se o E_2 que afeta as respostas neuronais do NCM deriva de fontes gonadais ou locais. Para resolver esta questão, bloqueamos a produção de E_2 pelos neurônios do NCM através da infusão do inibidor seletivo de aromatase 1,4,6-androstatrieno-3,17-diona (ATD) no NCM. O desfecho desta manipulação farmacológica foi a supressão da produção

local de E_2 no NCM, mantendo-se intacta a produção gonadal de esteroides. Observamos que o bloqueio da produção local de E_2 no NCM resultou em supressão significativa das respostas neuronais evocadas por estímulos auditivos (Tremere *et al.*, 2009). O tratamento com ATD reduziu especialmente a taxa de descarga dos neurônios do NCM de forma dose-dependente (variação: 43,9-78,3%). Resultados semelhantes foram também obtidos com a infusão no NCM do inibidor de aromatase não esteroide fadrozol (Tremere e Pinaud, 2011). Estes resultados demonstram que o E_2 produzido localmente no NCM tem uma influência significativa sobre as propriedades da resposta neurofisiológica desta via auditiva.

Quais mecanismos fazem com que o E_2 tenha efeito tão rápido sobre a fisiologia dos neurônios sensoriais? Notadamente, é bem improvável que seja através da chamada “resposta genômica clássica do E_2 ”, na qual receptores ativados de estrógeno modulam a expressão gênica através de regulação da transcrição, pois tais mecanismos são significativamente mais lentos que os efeitos observados. Nosso grupo, portanto, levantou a hipótese de que os efeitos de E_2 sobre a fisiologia do NCM são provavelmente mediados através de modulação da neurotransmissão rápida, como foi relatado para outras áreas cerebrais como o hipocampo (revisão de Woolley, 2007).

O NCM é intensamente populado por neurônios inibitórios e recebe alto nível de sinal GABAérgico, sendo os efeitos inibitórios pós-sinápticos mediados principalmente através de receptores $GABA_A$ (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud e Mello, 2007; Pinaud *et al.*, 2008). Além disso, a inibição via atividade de receptores $GABA_A$ é um componente vital da codificação e organização temporal das taxas de pico de descargas evocadas por música nos neurônios do NCM (Pinaud *et al.*, 2008). A justaposição densa dos elementos inibitórios e a prevalência de sinalização de E_2 no NCM sugerem uma correlação funcional entre os dois sistemas nesta área auditiva. Para determinar se o E_2 afeta a transmissão inibitória no NCM, obtivemos registros com *patch-clamp* de células inteiras em preparações de cortes de NCM, técnica previamente desenvolvida por nosso grupo (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008; Tremere *et al.*, 2009). Quando o E_2 foi aplicado aos cortes de NCM, observamos uma redução média de 52% na frequência de correntes-miniatura inibitórias pós-sinápticas (mIPSCs), mas sem alteração na amplitude destes eventos (Tremere *et al.*, 2009).

O bloqueio dos receptores de estrógeno com TMX ou a inibição da produção local de E_2 com ATD revelaram que havia efeitos opostos do E_2 sobre as propriedades das correntes mIPSC (Tremere *et al.*, 2009). Mais especificamente, o TMX e o ATD aumentaram a frequência de mIPSCs em 41,2% e 43%, respectivamente. A aplicação de TMX a cortes pré-tratados com ATD não resultou em variação nas propriedades de mIPSC se comparado a ATD isolado, indicando que não existe efeito secundário do TMX. Finalmente, usando os mesmos métodos, observamos que E_2 não exerce efeito sobre as propriedades de correntes-miniatura excitatórias pós-sinápticas (mEPSCs) farmacologicamente isoladas. Estes resultados indicam que o E_2 amplifica as respostas evocadas pela audição ao suprimir seletivamente a transmissão inibitória local dos receptores $GABA_A$. Além disso, como o E_2 afeta a frequência, mas não a amplitude de mIPSCs, isto é sugestivo de que estes

efeitos sejam pré-sinápticos e provavelmente relacionados a um efeito de E_2 sobre a probabilidade de liberação de GABA nos neurônios do NCM. Finalmente, estes resultados sugerem que o E_2 pode estabelecer um tônus basal inibitório para o processamento de sinais de comunicação acústica, uma possibilidade que está sendo estudada em nosso laboratório.

Em conjunto, os achados acima descritos indicam que o E_2 produzido no cérebro intensifica as taxas de descarga das respostas neurais, provavelmente através de um mecanismo que envolve a desinibição da transmissão pré-sináptica mediada por GABA_A. Entretanto, quais seriam as consequências funcionais da modulação da fisiologia neuronal do NCM por E_2 ? Para responder esta pergunta, recentemente desenvolvemos e utilizamos ferramentas teóricas computadorizadas para quantificar o processamento de informações pelos neurônios do NCM (Tremere e Pinaud, 2011). Ao computar as informações referentes a informações mútuas entre estímulos e resposta neural, observamos que o E_2 aumenta o número de informações transmitidas pelos neurônios do NCM sobre a estrutura do estímulo. Por outro lado, o bloqueio dos receptores de estrógeno ou a supressão da produção local de E_2 no NCM reduz significativamente as taxas de informação no cérebro em vigília (Tremere e Pinaud, 2011). Estas observações sugerem que a codificação das informações nos neurônios do NCM é acentuada por E_2 produzido localmente.

Também desenvolvemos e aplicamos um método de decodificação baseado em um classificador linear para quantificar o poder de discriminação dos neurônios do NCM de uma série de estímulos acústicos, de acordo com suas respostas neurais. Observamos que, enquanto o E_2 promovia maior desempenho de nosso decodificador, o bloqueio dos receptores de estrógeno e a supressão da produção local de E_2 no NCM reduzia significativamente este desempenho (Tremere e Pinaud, 2011). De maneira geral, estas observações indicam que o E_2 tem efeito positivo sobre a codificação neural; aumenta o nível de informações transmitidas sobre a estrutura do estímulo para promover maior discriminação neural de cantos no NCM de animais em estado de vigília.

Por fim, nosso grupo se interessou em identificar em que grau o aumento da discriminação neural dos estímulos acústicos mediada por E_2 se traduzia em melhor desempenho de discriminação auditiva em nível comportamental. Para este fim, aves de comportamento livre foram submetidas a manipulação farmacológica bilateral e expostas a tarefas de discriminação auditiva (Tremere e Pinaud, 2011). Observamos que o bloqueio bilateral dos receptores de estrógeno e a supressão da capacidade dos neurônios do NCM de produzir E_2 afetava significativamente a discriminação auditiva em nível comportamental (Tremere e Pinaud, 2011).

Em resumo, nossos resultados demonstraram que o E_2 produzido por neurônios auditivos centrais promove o ganho de respostas auditivas neuronais em escala temporal, relevante para o processamento sensorial. Este efeito neuromodulatório rápido do E_2 é mediado através de um mecanismo não genômico que envolve a supressão pré-sináptica da transmissão GABAérgica local. Finalmente, um dos desfechos funcionais dos efeitos do E_2 é promover maior transmissão de informações pelos neurônios do NCM sobre a estrutura do estímulo para aperfeiçoar a discriminação neural e comportamental dos sinais de comunicação acústica.

Achados recentes revelaram que o córtex auditivo de camundongos, macacos e seres humanos é altamente povoado por estes neurônios produtores e sensíveis a estrógenos (Yague *et al.*, 2006; Yague *et al.*, 2008; Tremere *et al.*, 2011). Estas observações sugerem que a modulação da neurofisiologia auditiva central por E₂ produzido localmente pode ser uma característica compartilhada por vertebrados e não uma especialização do pró-encéfalo auditivo de aves canoras.

Em resumo, os achados acima discutidos revelam que o estradiol produzido no pró-encéfalo auditivo, diferentemente do estrógeno gonadal, exerce uma influência aguda e rápida sobre a resposta e as propriedades de processamento dos neurônios auditivos centrais em uma escala temporal que é relevante para o processamento sensorial. Tal papel posiciona este hormônio esteroide com um neuromodulador inédito da função auditiva e abre a discussão sobre o uso de terapia à base de estrógeno para modular a função auditiva e tratar a disfunção, uma possibilidade que deve ser explorada em pesquisas futuras.

Agradecimentos: As pesquisas conduzidas no Laboratório Pinaud recebem o suporte de financiamentos do *National Institutes of Health* (DC-010181), *National Science Foundation* (IOS-1064684), *Brain Research Foundation* e *Searle Leadership Fund*.

Referências bibliográficas

1. Bernard DJ, Bentley GE, Balthazart J, Turek FW, Ball GF (1999) Androgen receptor, estrogen receptor alpha, and estrogen receptor beta show distinct patterns of expression in forebrain song control nuclei of European starlings. *Endocrinology* 140:4633-4643.
2. Chew SJ, Vicario DS, Nottebohm F (1996) A large-capacity memory system that recognizes the calls and songs of individual birds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1950-1955.
3. Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM (2004) Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain* 8:397-411.
4. Davis MJ, Ahroon WA (1982) Fluctuations in susceptibility to noise-induced temporary threshold shift as influenced by the menstrual cycle. *J Aud Res* 22:173-187.
5. Fillit H, Weinreb H, Cholst I, Luine V, McEwen B, Amador R, Zabriskie J (1986) Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type. *Psychoneuroendocrinology* 11:337-345.
6. Gungor N, Boke B, Belgin E, Tuncbilek E (2000) High frequency hearing loss in Ullrich-Turner syndrome. *Eur J Pediatr* 159:740-744.
7. Hederstierna C, Hultcrantz M, Rosenhall U (2009) Estrogen and hearing from a clinical point of view; characteristics of auditory function in women with Turner syndrome. *Hear Res* 252:3-8.
8. Jeong JK, Burrows K, Tremere LA, Pinaud R (2011) Neurochemical organization and experience-dependent activation of estrogen-associated circuits in the songbird auditory forebrain. *Eur J Neurosci* 34:283-291.
9. Maney D, Pinaud R (2011) Estradiol-dependent modulation of auditory processing and selectivity in songbirds. *Front Neuroendocrinol* 32:287-302.
10. McCarthy MM (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 88:91-124.
11. McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57:357-384.
12. Mello CV, Vicario DS, Clayton DF (1992) Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6818-6822.
13. Metzdorf R, Gahr M, Fusani L (1999) Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and nonsongbirds. *J Comp Neurol* 407:115-129.

13. Ostlund H, Keller E, Hurd YL (2003) Estrogen receptor gene expression in relation to neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1007:54-63.
14. Pinaud R, Mello CV (2007) GABA immunoreactivity in auditory and song control brain areas of zebra finches. *J Chem Neuroanat* 34:1-21.
15. Pinaud R, Terleph TA (2008) A songbird forebrain area potentially involved in auditory discrimination and memory formation. *J Biosci* 33:145-155.
16. Pinaud R, Tremere LA (2012) Control of central auditory processing by a brain-generated oestrogen. *Nature Rev Neurosci* (in press).
17. Pinaud R, Fortes AF, Lovell P, Mello CV (2006) Calbindin-positive neurons reveal a sexual dimorphism within the songbird analogue of the mammalian auditory cortex. *J Neurobiol* 66:182-195.
18. Pinaud R, Velho TA, Jeong JK, Tremere LA, Leao RM, von Gersdorff H, Mello CV (2004) GABAergic neurons participate in the brain's response to birdsong auditory stimulation. *Eur J Neurosci* 20:1318-1330.
19. Pinaud R, Terleph TA, Tremere LA, Phan ML, Dagostin AA, Leao RM, Mello CV, Vicario DS (2008) Inhibitory network interactions shape the auditory processing of natural communication signals in the songbird auditory forebrain. *J Neurophysiol* 100:441-455.
20. Remage-Healey L, Maidment NT, Schlinger BA (2008) Forebrain steroid levels fluctuate rapidly during social interactions. *Nat Neurosci* 11:1327-1334.
21. Remage-Healey L, Coleman MJ, Oyama RK, Schlinger BA (2010) Brain estrogens rapidly strengthen auditory encoding and guide song preference in a songbird. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3852-3857.
22. Saldanha CJ, Tuerk MJ, Kim YH, Fernandes AO, Arnold AP, Schlinger BA (2000) Distribution and regulation of telencephalic aromatase expression in the zebra finch revealed with a specific antibody. *J Comp Neurol* 423:619-630.
23. Tremere LA, Pinaud R (2011) Brain-generated estradiol drives long-term optimization of auditory coding to enhance the discrimination of communication signals. *J Neurosci* 31:3271-3289.
24. Tremere LA, Jeong JK, Pinaud R (2009) Estradiol shapes auditory processing in the adult brain by regulating inhibitory transmission and plasticity-associated gene expression. *J Neurosci* 29:5949-5963.
25. Tremere LA, Burrows K, Jeong JK, Pinaud R (2011) Organization of estrogen-associated circuits in the mouse primary auditory cortex. *J Exp Neurosci* 5:45-60.
26. Velho TA, Pinaud R, Rodrigues PV, Mello CV (2005) Co-induction of activity-dependent genes in songbirds. *Eur J Neurosci* 22:1667-1678.
27. Walpurger V, Pietrowsky R, Kirschbaum C, Wolf OT (2004) Effects of the menstrual cycle on auditory event-related potentials. *Horm Behav* 46:600-606.
28. Woolley CS (2007) Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:657-680.
29. Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2006) Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138:389-401.
30. Yague JG, Wang AC, Janssen WG, Hof PR, Garcia-Segura LM, Azcoitia I, Morrison JH (2008) Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res* 1209:115-127.