

# *Modulação do Processamento Auditivo por Inibição Intracortical*

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

## **Introdução**

Não é surpresa que animais como o diamante-mandarim (diamante-mandarim - *Taeniopygia guttata*), uma espécie de ave canora gregária que depende da comunicação vocal entre indivíduos da mesma espécie, mostrem refinamentos anatômicos e funcionais de suas vias auditivas centrais. Neste animal, o canto é aprendido com um tutor em um período crítico de seu desenvolvimento pós-natal e permanece estável posteriormente, durante toda a vida da ave. A habilidade de aprendizado vocal é pouco comum no reino animal e depende da função auditiva intacta: surdez ou interferência com o *feedback* auditivo normal interfere com o aprendizado vocal, um comportamento que se acredita proporcionar a base para a aquisição da fala humana. O processamento perceptivo das canções também é necessário para muitos comportamentos de aves canoras adultas incluindo a identificação individual dentro do grupo, avaliação e acesso a um potencial companheiro, e para delinear e defender o território. Assim, a detecção e a representação neural fiel dos sinais de comunicação auditiva nas aves canoras permanecem críticos durante toda a vida adulta, em ambos os sexos. Muitos esforços têm sido direcionados para a compreensão da organização anátomo-funcional das vias auditivas centrais tanto nas aves canoras em desenvolvimento como nas adultas, porque a função auditiva intacta é necessária para uma série de comportamentos na biologia social das aves canoras.

## **Processamento Auditivo Central**

Na maioria dos vertebrados, incluindo as aves canoras, a organização geral das vias auditivas centrais ascendentes é similar. Os sinais acústicos são transeridos para a cóclea e progridem até os centros do proencéfalo através de circuitos multissinápticos. O sistema ascendente, em particular, compreende uma série de estruturas pontinas, mesencefálicas e talâmicas que já foram revisadas anteriormente e, portanto, não serão discutidas no presente artigo (Vates *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1998; Mello & Pinaud, 2006). No nível do pró-encéfalo, a informação é recebida via um conjunto projeções auditivas do tálamo para uma estrutura denominada Campo L2, o equivalente funcional da camada receptora IV do tálamo, nos mamíferos (Vates *et al.*, 1996; Mello e Pinaud, 2006). Esta área envia então a informação para diversas áreas auditivas adjacentes no proencéfalo, incluindo o *nidopallium* caudomedial (NCM) e o *mesopallium* caudomedial e caudolateral (CMM e CLM, respectivamente) (Vates *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1998; Mello e Pinaud, 2006). O NCM é o foco desta revisão. É importante observar que o presente artigo não traz uma revisão abrangente da anatomia e função do NCM, mas tem seu foco nos dados de nosso grupo apresentados, em São Paulo, no VII Simpósio Internacional de Otorrinopediatria da IAPO. Para

leituras adicionais, consultar: Vates *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1998; Mello, 2002; Mello *et al.*, 2004; Mello e Pinaud, 2006. Foi demonstrado que os neurônios NCM têm propriedades complexas de resposta, com valor informativo rico. Estas células muitas vezes têm campos receptivos de multifrequência e dinâmicos. É interessante que um pouco mais da metade dos neurônios do NCM sejam inibitórios (GABAérgicos) e presume-se que a outra metade seja composta por células excitatórias (glutamatérgicas) (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Estes achados sugeriram que a transmissão inibitória possa ser crítica para a fisiologia do NCM e, conseqüentemente, para o processamento auditivo de indicações de comunicação relevantes do ponto de vista comportamental.

### **Neurônios GABAérgicos no Proencéfalo Auditivo**

No sistema auditivo, uma função primordial da transmissão GABAérgica foi suprimir as respostas neuronais a frequências que ladeiam a frequência preferida do neurônio. Os benefícios desta forma de inibição no processamento sensorial incluem a intensificação dos campos receptivos e uma eficiência melhor na codificação de sinais sensoriais. Pesquisas posteriores revelaram, especificamente, a importância da inibição GABAérgica para determinar a localização do som, bem como de outros processamentos mais complexos como a sensibilidade, a harmonia, ou os movimentos direcionalmente restritos na frequência.

Surpreendentemente, até pouco tempo atrás, a organização e as contribuições da inibição ao processamento auditivo de cantos nas aves canoras não tinha sido explorado de forma sistemática.

Em nossos estudos iniciais, tínhamos como objetivo identificar os neurônios inibitórios no pró-encéfalo auditivo da ave canora. Com esta finalidade clonamos o homólogo do gene descarboxilase do ácido glutâmico 65 kDa (zGAD65) do diamante-mandarim, uma das enzimas sintéticas para GABA, e utilizamos este cDNA para gerar sondas ribossômicas específicas do diamante-mandarim para a hibridização *in-situ* (Pinaud *et al.*, 2004).

Um ponto importante é que também caracterizamos um anticorpo que reconhece GABA nos tecidos do diamante-mandarim (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud e Mello, 2007; Pinaud *et al.*, 2008b). O perfil molecular gerado com a hibridização *in-situ* para zGAD65 espelhou os resultados obtidos com imunohistoquímica direcionada ao GABA, permitindo a confirmação da produção de GABA pelas células no NCM. Nossos estudos histológicos revelaram que há pelo menos duas categorias de células GABAérgicas no NCM, neurônio de diâmetro pequeno (3,3–10  $\mu\text{m}$ ) e grande (15–20,8  $\mu\text{m}$ ). Ainda que não tenham sido testados empiricamente, os neurônios menores geralmente dão suporte às funções do circuito local. Este tipo de célula respondeu pela maioria dos neurônios inibitórios dentro do NCM (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Um segundo tipo de neurônio revelado pelos nossos estudos foram neurônios GABA-positivo grandes, encontrados apenas ocasionalmente no NCM, e que podem ser neurônios de projeção (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b).

Para compreender a extensão em que os neurônios inibitórios são ativados como parte do processamento do canto, desenvolvemos um protocolo de hibridização *in-situ* com fluorescência dupla para a detecção de duas espécies de mRNA,

com resolução de uma única célula (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008a; Jeong *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2011). Com este método, pudemos usar um gene dependente da atividade, denominado *zenk*, para mapear os neurônios que respondem ao canto, e as nossas sondas zGAD65 para identificar os neurônios inibitórios. Determinamos que os neurônios produtores de GABA presentes no NCM são diretamente ativados pela experiência auditiva em aves de comportamento livre (Pinaud *et al.*, 2004). Estas observações são consistentes com a noção de que a transmissão inibitória local, durante o processamento auditivo é fisiologicamente relevante, e parte da base neural da comunicação vocal.

### **Atividade Sináptica Tônica GABAérgica que Regula os Circuitos Excitatórios do NCM**

Usando uma preparação de cortes contendo NCM, iniciamos os esforços direcionados para determinar de que forma a inibição influencia a fisiologia dos neurônios do NCM (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Observamos que todos os neurônios do NCM têm altos níveis de atividade sináptica espontânea que foi, em média, de 3,1 Hz. Em sua maioria, estes eventos eram inibitórios, mediados pelo receptor GABA<sub>A</sub> e eram abolidos pela aplicação em banho de bicuculina (BIC), um antagonista seletivo do receptor GABA<sub>A</sub> (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). As correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas (sIPSCs) foram observadas em quase todas as células de nossa preparação, e os eventos sinápticos tinham amplitude média de 48 pA, com um tempo de decaimento constante ( $\tau$ ) de 6,9ms. Estes achados são consistentes com as observações relatadas para as propriedades do receptor GABA<sub>A</sub> em diversas preparações comparáveis. O bloqueio farmacológico dos eventos sinápticos espontâneos mediados por GABA<sub>A</sub> foi usado para determinar a importância funcional potencial da inibição existente. Quando a inibição foi interrompida, houve picos grandes, potentes, de atividade sináptica inibitória (média: 232 pA) que ocorreram com frequências muito baixas (média: 0,08 Hz) (Pinaud *et al.*, 2008b). Os eventos foram completamente bloqueados pela aplicação em banho de 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), indicando que são mediados por transmissão glutamatérgica não NMDA. Assim, um dos papéis funcionais para a liberação tônica de GABA no NCM é para suprimir a atividade espontânea da rede excitatória.

### **Inibição que Formata a Codificação do Canto no Cérebro Desperto**

A seguir investigamos como a transmissão inibitória no NCM formata o processamento do canto no cérebro desperto. Com este objetivo, combinamos registros feitos com múltiplos eletrodos extracelulares bilaterais com manipulações farmacológicas locais no NCM de diamante-mandarins adultos, sob contenção. As respostas acionadas pelo canto ocorreram por todo o NCM e uma sequência de pulsos acionados pelo canto geralmente captam grande parte da organização temporal da estrutura do estímulo (Pinaud *et al.*, 2008b). O bloqueio da inibição GABAérgica alterou dramaticamente a precisão temporal entre o estímulo e a relação pico resposta. No nível das sílabas individuais do canto, unidade que traz a informação, as respostas sustentadas eram instantaneamente convertidas em respostas altamente fásicas, do tipo liga/desliga. O resultado desta mudança é que o canto codificado (série de pulsos) refletiu menos características do canto e, oca-

sionalmente, não estava alinhado com o estímulo devido a alterações na relação temporal entre estímulo e resposta. As alterações totais de voltagem, integradas durante o período do som tocado não mudou, assim, os resultados não refletem o aumento da atividade nos neurônios desinibitórios, mas alterações inconsistentes que se seguem à apresentação do estímulo adequado. Surpreendentemente, BIC ocluiu a responsividade dos neurônios do NCM a certas sílabas do canto (Pinaud *et al.*, 2008b). É importante que as atenuações na fidelidade da codificação causada pelo antagonismo dos receptores GABA<sub>A</sub> não foram devidas à incapacidade dos neurônios do NCM de discriminar entre frequências, uma vez que as curvas de afinação de frequência não foram afetadas pelo bloqueio de receptor GABA<sub>A</sub>.

### **Observações Finais**

Os achados apresentados nesta revisão mostram uma forte presença de inter-neurônios GABAérgicos putativos locais em uma estação anatômica chave na via auditiva ascendente da ave canora, o NCM. Além disso, o NCM abriga um pequeno número de neurônios GABAérgicos grandes, provavelmente neurônios de projeção. Os estudos fisiológicos mencionados nesta revisão indicam que as sinapses GABAérgicas no NCM são críticas para a manutenção da inibição da linha basal para suprimir a atividade da rede excitatória espontânea. Em estados naturais de ativação, como é observado no registro de respostas neuronais acionadas pelo canto em animais despertos, os papéis da transmissão sináptica GABAérgica na codificação do canto são robustos. O bloqueio local da transmissão inibitória no NCM causou uma deterioração considerável na organização temporal da codificação do canto, com uma perda completa da representação de certos elementos do canto.

**As consistências na organização anatômica e funcional dos circuitos inibitórios no sistema auditivo, observadas entre aves canoras e a maioria das espécies de vertebrados, enfatizam a importância da transmissão GABAérgica na codificação e processamento da informação sensorial.**

### **Referências bibliográficas**

1. Jeong JK, Chen Z, Tremere LA, Pinaud R (2010) Double fluorescence in situ hybridization in fresh brain sections. *J Vis Exp*.42: 2102
2. 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.
3. Mello CV (2002) Immediate early gene (IEG) expression mapping of vocal communication areas in the avian brain. In: Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction (Kaczmarek L, Robertson HA, eds), pp 59-101. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
4. Mello CV, Pinaud R (2006) Immediate early gene regulation in the auditory system. In: Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders (Pinaud R, Tremere LA, eds), pp 35-56. New York: Springer-Verlag.5.Mello CV, Velho TA, Pinaud R (2004) Song-induced gene expression: a window on song auditory processing and perception. *Ann N Y Acad Sci* 1016:263-281.6.Mello CV, Vates GE, Okuhata S, Nottebohm F (1998) Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Comp Neurol* 395:137-160.7.Pinaud R, Mello CV (2007) GABA immunoreactivity in auditory and song control brain areas of zebra finches. *J Chem Neuroanat* 34:1-21.

8. Pinaud R, Mello CV, Velho TA, Wynne RD, Tremere LA (2008a) Detection of two mRNA species at single-cell resolution by double-fluorescence in situ hybridization. *Nat Protoc* 3:1370-1379.
9. 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.
10. Pinaud R, Terleph TA, Tremere LA, Phan ML, Dagostin AA, Leao RM, Mello CV, Vicario DS (2008b) Inhibitory network interactions shape the auditory processing of natural communication signals in the songbird auditory forebrain. *J Neurophysiol* 100:441-455.
11. Vates GE, Broome BM, Mello CV, Nottebohm F (1996) Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches. *J Comp Neurol* 366:613-642.