

El Estrógeno Derivado del Cerebro Como un Modulador Rápido de la Función Auditiva

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

Se conoce que las hormonas esteroides sexuales influyen en una variedad de comportamientos, incluyendo la reproducción, la agresión, el estado de ánimo y el aprendizaje (Fillit *et al.*, 1986; McEwen, 2002; Ostlund *et al.*, 2003; Arte *et al.*, 2004; McCarthy, 2008). Mientras que muchos de estos comportamientos están influenciados por las hormonas producidas en las gónadas, es evidente que los esteroides producidos en el cerebro pueden influir considerablemente en el comportamiento y, en consecuencia, en la función cerebral. Un ejemplo claro de la influencia de los esteroides (neuroesteroides) en la función del sistema nervioso central lo constituye el nuevo rol de la clásica hormona femenina, el estrógeno 17 β -estradiol (E_2) en el procesamiento de la información sensorial, en particular en la función de la audición. En esta revisión nos centraremos específicamente en trabajos recientes de nuestro grupo de investigación que fueron presentados en el VII Simposio Internacional de Otorrinopediatria de la IAPO, en San Pablo, en 2011, junto con resultados de otros grupos. Estos hallazgos recientes han definido cómo, y en qué medida los E_2 producidos por neuronas auditivas centrales influyen en la funcionalidad de los circuitos cerebrales que apoyan la función auditiva y en última instancia impactan en el comportamiento auditivo. Para una descripción más completa y la discusión sobre el papel del E_2 en el procesamiento auditivo central, se pueden revisar los siguientes artículos: Maney y Pinaud, 2011; Pinaud y Tremere, 2012.

La noción que el E_2 podría modular la función auditiva ha evolucionado constantemente en los últimos 30 años. Algunas de las primeras indicaciones de la importancia del E_2 en el procesamiento sensorial se derivan de cambios en los umbrales de audición vinculados con el ciclo menstrual (Davis y Ahroon, 1982; Walpurger *et al.*, 2004). Además, en las pacientes con síndrome de Turner, que son deficientes en estrógeno y también en los casos en que hay disminución en los niveles de E_2 que ocurre naturalmente con el envejecimiento, anteriormente se ha demostrado que hay una fuerte correlación con el déficit en la función auditiva (Gungor *et al.*, 2000; Hederstierna *et al.*, 2009). La existencia de una conexión entre los niveles circulantes de E_2 y el funcionamiento de la audición está ahora bien establecido en los seres humanos, así como en varios modelos animales, incluyendo los roedores, monos, aves canoras, ranas y peces (Maney y Pinaud, 2011; Pinaud y Tremere, 2012).

A pesar de la evidente conexión entre los niveles de E_2 *circulantes* y la función auditiva, sólo recientemente se ha encontrado que hay roles para el E_2 *derivado del cerebro*, que son distintos de los de la hormona gonadal. Resumimos a continuación las principales conclusiones que han transformado el conocimiento

de E_2 de una hormona circulante implicada en el control de ganancia periférica del procesamiento auditivo a un neuromodulador que se genera localmente y regula el flujo, la resolución y la retención de información acústica en áreas auditivas del cerebro.

El descubrimiento de que el E_2 derivado del cerebro es un neuromodulador de la función auditiva central se realizó en un modelo bien establecido de audición en vertebrados, el ave pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*). Una estación clave en la vía auditiva ascendente en esta especie es el nidopallio caudomedial (NCM), una región que es el análogo en las aves cantoras con la corteza de asociación auditiva de los mamíferos. Las células en el NCM de los animales despiertos responden vigorosamente a la estimulación auditiva, con una preferencia por las señales de comunicación de la misma especie (conespecíficas) en relación con canciones heteroespecíficas o estímulos artificiales (Mello *et al.*, 1992; Chew *et al.*, 1996; Velho *et al.*, 2005; Pinaud y Terleph, 2008). El NCM exhibe una alta expresión de la enzima aromatasasa que es importante en la síntesis del estrógeno, así como también de receptores de estrógeno, lo que sugiere que las neuronas en esta área auditiva pueden tanto producir como responder a los estrógenos localmente (Bernard *et al.*, 1999; Metzdorf *et al.*, 1999; Saldanha *et al.*, 2000; Pinaud *et al.*, 2006; Tremere *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2011). Coherente con esta visión, durante la experiencia auditiva hay un rápido y selectivo incremento de los niveles de E_2 en el NCM (Remage-Healey *et al.*, 2008). La importancia funcional de este aumento dependiente de la experiencia en los niveles locales de E_2 sólo recientemente ha comenzado a dilucidarse. Nuestro grupo llevó a cabo la grabación de respuestas extracelulares junto con la manipulación farmacológica bilateral en los pinzones cebra restringidos que se mantuvieron despiertos, para determinar los efectos del E_2 sobre la actividad de las respuestas neuronales del NCM.

Las neuronas en el NCM responden enérgicamente a la reproducción de canciones de sus congéneres. Encontramos que la infusión de E_2 en el NCM aumentó las tasas de estimulación de unidades aisladas, en una forma dosis dependiente (rango entre 145.3 67.9%) (Tremere *et al.*, 2009; Tremere y Pinaud, 2011). De importancia, los efectos temporales del E_2 en la neurofisiología de las neuronas del NCM fueron muy rápidos (segundos) y coherente con la rapidez de un neuromodulador clásico. Estudios posteriores en un grupo independiente revelaron resultados similares en aves anestesiadas (Remage-Healey *et al.*, 2010).

Más evidencias que indican que el E_2 modula directamente el procesamiento auditivo central fueron reveladas cuando se realizó una infusión local con tamoxifeno (TMX), un modulador del receptor de estrógeno que actúa como antagonista en el NCM, o ICI 182780 (ICI), un antagonista del receptor de estrógeno selectivo y clásico. El antagonismo de los receptores de estrógeno con el TMX redujo las tasas de estímulo auditivo evocado dependiente de la concentración (rango de 48.4-71,4%) (Tremere *et al.*, 2009). Se obtuvieron resultados similares cuando se infunde ICI en el NCM. Específicamente, el bloqueo de los receptores de estrógeno con ICI disminuyó las tasas de estímulo de las neuronas del NCM 36,4% en relación con los niveles pre-infusión (Tremere y Pinaud, 2011).

Los resultados anteriores indican que el E_2 modula directa y localmente la fisiología de las neuronas en el NCM. No está claro, sin embargo, si el E_2 que afecta las respuestas neuronales del NCM se deriva de fuentes locales o gonadales. Para solucionar este problema, nuestro grupo bloqueó la capacidad de las neuronas del NCM para producir E_2 por la infusión de un inhibidor selectivo de aromataasa, el 1,4,6-Androstatrieno-3,17-diona (ATD) en el NCM. El resultado de esta manipulación farmacológica fue que la producción de E_2 en el NCM fué suprimida, mientras que la producción gonadal de esteroides estaba intacta. Encontramos que ese bloqueo de la producción local de E_2 en el NCM suprimió en gran medida las respuestas auditivas evocadas por las células nerviosas (Tremere *et al.*, 2009). En particular el tratamiento con ATD disminuyó la tasa de estímulo de las neuronas del NCM de forma dosis dependiente (gama: 43,9 78.3%). También se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó el fadrozole un inhibidor no esteroide de la aromataasa en el NCM (Tremere y Pinaud, 2011). Estos resultados demostraron que el E_2 producido localmente en el NCM influye fuertemente en la respuesta neurofisiológica de esta área auditiva.

¿Qué mecanismos permiten que el E_2 afecte tan rápidamente la fisiología de las neuronas sensoriales? En particular, es poco probable que sea la forma llamada “ respuesta clásica genómica de E_2 ”, mediante la cual los receptores estrogénicos activados modulan la expresión génica a través de la regulación de la transcripción, pues estos mecanismos son mucho más lentos que los efectos observados. Nuestra hipótesis es que probablemente los efectos de E_2 en la fisiología del NCM se da a través de un modelo de neurotransmisión rápida, como ha sido reportado para otras áreas del cerebro, como el hipocampo (revisado por Woolley, 2007).

El NCM está densamente poblado de neuronas inhibitorias y recibe estímulos GABAérgicos fuertes con efectos inhibitorios postsinápticos mediados por abrumadora mayoría a través de receptores $GABA_A$ (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud y Mello, 2007; Pinaud *et al.*, 2008). Por otra parte, la inhibición a través de la actividad del receptor $GABA_A$ es un componente vital de la organización temporal y de la codificación de las tasas de impulsos evocados por canciones en las neuronas del NCM (Pinaud *et al.*, 2008). La densa yuxtaposición de elementos inhibitorios y la prevalencia de señalización E_2 en el NCM sugieren una relación funcional entre los dos sistemas en esta área auditiva. Para determinar si el E_2 afecta la transmisión inhibitoria en NCM, llevamos a cabo grabaciones de células con la técnica *patch-clamp* (técnica electrofisiológica para medir la corriente eléctrica que pasa a través de la membrana en un canal sencillo en las células) en una preparación de un corte del NCM que previamente fue desarrollado por nuestro grupo (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008; Tremere *et al.*, 2009). Cuando el E_2 se aplicó en las divisiones del NCM, observamos una media de 52% de disminución en la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias mínimas (mIPSCs), pero ningún cambio en la amplitud de estos eventos (Tremere *et al.*, 2009).

El bloqueo de los receptores de estrógeno con el TMX, o la inhibición de la producción local del E_2 con ATD, revelaron efectos opuestos a los observados para E_2 en las propiedades de mIPSC (Tremere *et al.*, 2009). Más específicamente, TMX y ATD aumentaron la frecuencia de mIPSCs en 41,2% y 43% respectivamente. La

aplicación de TMX en cortes tratados previamente con ATD no indujo cambios en las propiedades de la mIPSC en relación con la condición de ATD sola, lo que indica que no hay ningún efecto secundario de TMX. Finalmente, utilizando los mismos métodos, encontramos que el E_2 no ejerce ningún efecto sobre las propiedades de las corrientes postsinápticas aisladas farmacológicamente (mEPSCs). Estos resultados indican que el E_2 mejora la respuesta auditiva evocada al suprimir selectivamente la transmisión inhibitoria local por los receptores $GABA_A$. Por otra parte, debido a que el E_2 afecta la frecuencia, pero no la amplitud de mIPSCs, esto sugiere que estos efectos son presinápticos y probablemente implican un efecto del E_2 sobre la probabilidad de liberación de GABA sobre las neuronas NCM. Finalmente, estos resultados sugieren que el E_2 puede ajustar el tono basal inhibitorio para el procesamiento de las señales de comunicación acústica, una posibilidad que está siendo estudiada actualmente en nuestro laboratorio.

Los hallazgos descritos anteriormente indican que el E_2 generado por el cerebro mejora las tasas de descarga de respuestas neurales presumiblemente a través de un mecanismo que involucra la desinhibición de la transmisión mediada por $GABA_A$ pre-sinápticamente. Queda por responder ¿cuál es la consecuencia funcional de la modulación del E_2 en la fisiología neuronal del NCM? Para dilucidar este tema recientemente implementamos y utilizamos recursos computacionales y herramientas teóricas para cuantificar la información que manejan las neuronas del NCM (Tremere y Pinaud, 2011). Al evaluar esta información entre estímulos y respuestas neurales, encontramos que el E_2 aumenta la información de las neuronas en el NCM. En contraste, el bloqueo de los receptores de estrógeno, o la supresión de la producción local de E_2 en NCM disminuyó marcadamente el ritmo de información en el cerebro despierto (Tremere y Pinaud, 2011). Estos hallazgos sugieren que la codificación de la información por las neuronas NCM es realizada por derivados locales de E_2 .

También implementamos y utilizamos un método de decodificación basado en un clasificador lineal para cuantificar cómo las neuronas del NCM discriminan a través de estímulos acústicos basados en sus respuestas neuronales. Hemos encontrado que mientras que el E_2 mejora el rendimiento de nuestro decodificador, el bloqueo de los receptores de estrógeno y la supresión de la producción local de E_2 en NCM significativamente disminuyen su rendimiento (Tremere y Pinaud, 2011). En conjunto estos hallazgos indican que el E_2 es beneficioso para la codificación neural; mejora la información sobre la estructura del estímulo para mejorar la discriminación neuronal de las canciones en el NCM de animales despiertos.

Finalmente, nuestro grupo se interesó en entender si la mejora en la discriminación neuronal de estímulos acústicos mediada por E_2 se traduce en un mejor rendimiento de la discriminación auditiva a nivel conductual. Para ello, animales en estado de libertad fueron sometidos a manipulaciones farmacológicas bilaterales y expuestos a una tarea de discriminación auditiva (Tremere y Pinaud, 2011). Encontramos que el bloqueo bilateral de los receptores estrogénicos y la supresión de la capacidad de las neuronas del NCM para producir E_2 severamente interrumpen la discriminación auditiva a nivel conductual (Tremere y Pinaud, 2011).

En resumen, nuestros resultados demuestran que el E₂ producido por neuronas auditivas centrales aumentan la ganancia auditiva en una escala que es relevante para el procesamiento sensorial. Este efecto rápido debido al E₂ es mediado a través de un mecanismo no genómico que implica la supresión de la transmisión GABAérgica local, pre-sinápticamente. Finalmente, uno de los resultados funcionales del efecto del E₂ es mejorar la información que las neuronas del NCM tienen sobre la estructura del estímulo para optimizar la discriminación neuronal y el comportamiento de las señales de la comunicación acústica.

Descubrimientos recientes han revelado que la corteza auditiva de ratones, monos y los seres humanos están densamente pobladas con neuronas productoras de estrógeno y sensibles al estrógeno (Yague *et al.*, 2006; Yague *et al.*, 2008; Tremere *et al.*, 2011). Estas observaciones sugieren que la modulación de la neurofisiología auditiva central por el E₂ generado localmente puede ser una característica compartida entre los vertebrados y no una especialización de los pájaros cantores.

En resumen, los hallazgos mencionados revelan que el **estradiol producido en el lóbulo auditivo, diferente de los estrógenos gonadales, aguda y rápidamente influye en las respuestas y las propiedades de las neuronas auditivas centrales en un plazo que es relevante para el procesamiento sensorial. Ese papel posiciona a este esteroide como un nuevo neuromodulador de la función auditiva y abre el debate sobre el uso de la terapia con estrógeno para modular la disfunción y la función auditiva, una posibilidad que debe ser explorada en futuras investigaciones.**

Agradecimientos: Las investigaciones del Laboratorio de Pinaud están apoyadas por subvenciones del Instituto Nacional de Salud (NIH) (DC-010181), la National Science Foundation (IOS-1064684), la Fundación para la Investigación del Cerebro y el Fondo de Liderazgo Searle.

Referencias 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. 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.
12. 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.