

# *Modulación del Procesamiento Auditivo por Inhibición Intracortical*

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

## **Introducción**

No es sorprendente que animales como el pinzón cebrado, una especie de pájaro muy sociable que canta, y que depende en gran medida de la comunicación vocal entre sus congéneres, presente mejoras anatómicas y funcionales en sus vías auditivas centrales. En este animal, la canción se aprende de un tutor en un período crítico del desarrollo postnatal y posteriormente se mantiene estable a lo largo de la vida. Esta capacidad de aprendizaje de sonidos es inusual en el reino animal y depende de que la función auditiva esté intacta: una sordera o una interferencia en la retroalimentación auditiva normal interrumpe en gran medida el aprendizaje vocal, y se piensa que este comportamiento puede proporcionar una base para entender la adquisición del habla en los humanos. El procesamiento perceptual de canciones también se requiere para muchos comportamientos en las aves cantoras adultas incluyendo la identificación del individuo dentro de un grupo, la evaluación y acceso a una pareja potencial y para delinear y defender su territorio. Como tal, la detección y la fiel representación neural de las señales de comunicación auditiva en las aves cantoras sigue siendo crítica en la edad adulta en ambos sexos. Debido a que se requiere que la función auditiva se mantenga intacta para que se den los comportamientos normales en la biología social de las aves cantoras, se han realizado importantes esfuerzos para comprender la organización anatómico-funcional de las vías auditivas centrales en aves cantoras tanto durante el periodo del desarrollo como en los individuos adultos.

## **Procesamiento auditivo central**

La organización general de las vías auditivas centrales ascendentes es similar en la mayoría de los vertebrados incluyendo las aves cantoras. Las señales acústicas se traducen en la cóclea y se dirigen a los centros del cerebro a través de circuitos multisinápticos. En particular, el sistema ascendente comprende una serie de estructuras pontinas, mesencefálicas y talámicas que ya han sido revisados en otros trabajos y, en consecuencia, no se discutirán en este artículo (Vates *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1998; Mello y Pinaud, 2006). Es importante, que a nivel del prosencefalo, la información es recibida a través de un conjunto de proyecciones auditivas talámicas hacia una estructura denominada Campo L2, el equivalente funcional de la capa talamocortical Campo IV en los mamíferos (Vates *et al.*, 1996; Mello y Pinaud, 2006). Esta área, a continuación, envía la información a un número de áreas adyacentes al lóbulo auditivo incluyendo el nidopallio caudomedial (NCM), y el mesopallio caudomedial y caudolateral (MCM y MCL, respectivamente) (Vates *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1998; Mello y Pinaud, 2006). El NCM es el objetivo de esta revisión. Es importante señalar que el presente artículo no proporciona una revisión completa de la anatomía y la función del NCM,

pero más bien se centra en los datos de nuestro grupo presentados durante el VII Simposio Internacional de Otorrinopediatria de la APO, en San Pablo, en 2011. Para lecturas adicionales consulte (Vates *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1998; Mello, 2002; Mello *et al.*, 2004; Mello y Pinaud, 2006).

Las neuronas del NCM se ha demostrado que poseen propiedades de respuesta complejas con gran valor informativo. A menudo, estas células tienen múltiples frecuencias y campos receptivos dinámicas. Curiosamente, algo más de la mitad de las neuronas en el NCM son inhibitorias (GABAérgica) con la otra mitad presumiblemente compuesta de células excitatorias (glutamatérgicas) (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Estos hallazgos sugieren que la transmisión inhibitoria puede ser crítica en la fisiología del NCM y, en consecuencia, para el procesamiento auditivo de las señales de comunicación de conducta pertinentes.

### **Neuronas GABAérgicas en el lóbulo auditivo**

En el sistema auditivo, una función principal identificada para la transmisión GABAérgica es la de suprimir las respuestas neuronales a frecuencias que flanquean la frecuencia preferida de una neurona. Los beneficios de esta forma de inhibición en el procesamiento sensorial incluyen el estrechamiento de los campos receptivos y mejora de la eficiencia en la codificación de señales sensoriales. Investigaciones posteriores revelaron específicamente la importancia de la inhibición GABAérgica en determinar la ubicación del sonido así como otros procesos más complejos como la sensibilidad a los armónicos o frecuencia.

Sorprendentemente, la organización y las contribuciones de la inhibición en el procesamiento auditivo de canciones en aves cantoras no habían sido sistemáticamente exploradas hasta hace poco.

En nuestros estudios iniciales se procuró identificar las neuronas inhibitorias en el lóbulo auditivo de aves cantoras. Para eso hemos clonado el homólogo del pájaro pinzón cebra de 65 kDa ácido glutámico decarboxilasa gen (zGAD65), una de las enzimas sintéticas para GABA y se utilizó este cDNA para generar ribosondas Taeniopygia específicos para hibridación *in situ* (Pinaud *et al.*, 2004). Lo que es importante, también se caracterizó un anticuerpo que reconoce el GABA en el tejido del pájaro pinzón cebra (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud y Mello, 2007; Pinaud *et al.*, 2008b). El perfil molecular generado con la hibridación *in situ* para zGAD65 reflejaba los resultados obtenidos con inmunocitoquímica dirigido a GABA permitiendo la confirmación de la producción de GABA por las células en NCM. Nuestros estudios histológicos revelaron que, según el tamaño de la neurona, hay al menos dos categorías de células GABAérgicas en NCM, pequeño (3.3–10  $\mu\text{m}$ ) y neuronas de gran diámetro (15–20.8  $\mu\text{m}$ ). Mientras no empíricamente probado, las neuronas más pequeñas normalmente admiten funciones del circuito local. Este tipo de célula representaba la mayoría de las neuronas inhibitorias en el NCM (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Un segundo tipo de neurona revelada con nuestros estudios fue una gran neurona GABA-positivo, que eran sólo ocasionales en el NCM y pueden ser las neuronas de proyección (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b).

Para evaluar cómo se activan las neuronas inhibitorias como parte del procesamiento de la canción, desarrollamos un protocolo de hibridación de doble

fluorescencia *in situ* para la detección de dos especies de ARNm, en una misma célula (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008a; Jeong *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2011). Con este método, hemos podido utilizar un gen dependiente de actividad con el nombre *zenk*, para asignar las neuronas sensibles a la canción y nuestras sondas zGAD65 para identificar las neuronas inhibitoras. Se determinó que las neuronas que producen GABA en NCM se activan directamente por la experiencia auditiva en aves que están en libertad (Pinaud *et al.*, 2004). Estas observaciones son consistentes con la idea de que la inhibición de la transmisión local durante el procesamiento auditivo es fisiológicamente relevante y parte de la base neuronal de la comunicación vocal.

### **La actividad sináptica tónica GABAérgica regula los circuitos excitatorios de la NCM**

Utilizando un corte que contiene NCM, iniciamos esfuerzos encaminados a determinar cómo la inhibición influye en la fisiología de las neuronas del NCM (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Observamos que todas las neuronas del NCM tienen altos niveles de actividad sináptica espontánea que fue, en promedio, 3,1 Hz. La mayoría de estos eventos fueron inhibitorios, mediados por los receptores GABA<sub>A</sub> y fueron abolidos por aplicación de un baño de bicuculline (BIC), un antagonista selectivo del receptor GABA<sub>un</sub> (Pinaud *et al.*, 2004; Pinaud *et al.*, 2008b). Corrientes espontáneas postsinápticas inhibitorias (sIPSCs) se observaron en casi todas las células de nuestra preparación y los eventos sinápticos fueron en promedio 48 pA en amplitud con una constante de tiempo de decaimiento ( $\tau$ ) de 6.9 ms. Estos hallazgos son consistentes con las observaciones registradas sobre las propiedades del receptor GABA<sub>A</sub> en una variedad de preparaciones comparables. El bloqueo farmacológico de eventos sinápticos espontáneos mediados por GABA<sub>A</sub> fue utilizado para abordar la importancia funcional potencial de la inhibición. La liberación de la inhibición reveló grandes y potentes ráfagas de actividad sináptica excitatoria (promedio: 232 pA) que se produjo en frecuencias muy bajas (promedio: 0.08 Hz) (Pinaud *et al.*, 2008b). Estos eventos fueron completamente bloqueados por la aplicación de baños con 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX), indicando que están mediados por transmisión glutamatérgica no-NMDA. Por lo tanto, uno de los roles funcionales para la liberación de GABA en NCM es el de suprimir la actividad espontánea de la red excitatoria.

### **La inhibición influye en la codificación de la canción en el cerebro despierto**

Posteriormente investigamos cómo la inhibición de la transmisión en el NCM influye en el procesamiento de las canciones en el cerebro despierto. Para ello combinamos múltiples electrodos bilaterales extracelulares con manipulaciones farmacológicas locales en el NCM de pinzones cebra adultos restringidos. Las respuestas producidas por las canciones ocurren en todo el NCM y estas respuestas neuronales suelen ocupar gran parte de la organización temporal de la estructura (Pinaud *et al.*, 2008b). El bloqueo de la inhibición GABAérgica altera drásticamente la precisión temporal entre el estímulo y la respuesta. A nivel de las sílabas específicas de la canción, la unidad de información de la canción, las respuestas se convirtieron instantáneamente en respuestas altamente fásicas, tipo

*on / off*. El resultado de este cambio fue que la canción codificada refleja menos características de la canción y en ocasiones no se alinearon con el estímulo debido a cambios en la relación temporal entre el estímulo y la respuesta. De importancia, los cambios de tensión total integrados durante el período de la canción tocada no cambiaron por lo que los resultados no reflejan un aumento de la actividad de las neuronas desinhibitorias sino cambios incoherentes tras la presentación de los estímulos adecuados. Sorprendentemente, BIC anula la capacidad de respuesta de las neuronas NCM a algunas sílabas de la canción (Pinaud *et al.*, 2008b). Las atenuaciones en la fidelidad de la codificación causada por antagonismo a receptores GABA<sub>A</sub> no se debieron a la incapacidad de las neuronas del NCM para discriminar entre frecuencias, ya que las curvas de frecuencia no se vieron afectadas por el bloqueo del receptor GABA<sub>A</sub>.

### **Observaciones finales**

Los trabajos presentados en esta revisión muestran una fuerte presencia de neuronas GABAérgicas en una estación clave anatómica en la ascendente vía auditiva de aves cantoras en el NCM. Además, el NCM alberga a un número bajo de neuronas grandes, probablemente neuronas de proyección. Estudios fisiológicos mencionados en esta revisión indican que las sinapsis GABAérgicas en el NCM son críticas para mantener la inhibición básica para suprimir la actividad de la red excitatoria espontánea. En los estados de activación normales, como los observados durante la grabación de la canción en animales despiertos, los roles de la transmisión sináptica GABAérgica en la codificación de canciones son robustos. El bloqueo local de la transmisión inhibitoria en el NCM causó deterioro considerable en la organización temporal de la codificación de la canción con una pérdida completa de la representación de ciertos elementos de la canción. Consistencias en la organización anatómica y funcional de circuitos inhibitorios en el sistema auditivo, entre las aves y especies vertebradas, subrayan la importancia de la transmisión GABAérgica en la información sensorial, codificación y procesamiento.

### **Referencias bibliográficas**

1. Jeong JK, Chen Z, Tremere LA, Pinaud R (2010) Double fluorescence in situ hybridization in fresh brain sections. *J Vis Exp*: 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.