

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

**THIAGO FERNANDO BECKHAUSER RODRIGUES**

**Efeitos do  $17\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal  
do nidopálio caudomedial (NCM) de *zebra finches***

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**THIAGO FERNANDO BECKHAUSER RODRIGUES**

**Efeitos do  $17\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal  
do nidopálio caudomedial (NCM) de *zebra finches***

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia  
da Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto / Universidade de São Paulo como  
requisito para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciências.**

**Área: Fisiologia**

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo Maurício  
Xavier Leão**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2010**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL OU TOTAL DESTE DOCUMENTO, POR QUALQUER VEÍCULO DE COMUNICAÇÃO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, MEDIANTE A CITAÇÃO DA FONTE BIBLIOGRÁFICA.**

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Beckhauser, Thiago Fernando

Efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal do nidopálio caudomedial (NCM) de *zebra finches*. Ribeirão Preto - SP, 2010.  
65p.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área: Fisiologia

Orientador: Leão, Ricardo Maurício

1. excitabilidade; 2. neurotransmissão; 3. eletrofisiologia; 4. 17 $\beta$ -estradiol; 5. GABA; 6. *zebra finch*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Fernando Beckhauser Rodrigues

### **Efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal do nidopálio caudomedial (NCM) de *zebra finches***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área: **Fisiologia**

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### **Banca Examinadora**

Prof.<sup>o</sup> Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof.<sup>o</sup> Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof.<sup>o</sup> Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Sináptica do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) e Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha bela família: Marlene (a matriarca), Bruna (a irmã do meio) e Camila (a caçula). Vocês são as pessoas onde eu encontro o afeto, a esperança, o carinho e o amor eterno. Não posso deixar de incluir mais uma mulher nessa família: Elaine, minha companheira de ontem, de hoje e dos dias que virão. Os sentimentos que tenho por vocês fazem com que a vida tenha mais sentido e gere frutos para alimentar os meus sonhos de todas as noites, onde eu vejo um futuro de prosperidade, equilíbrio e felicidade. Amo muito vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha existência e por me possibilitar a capacidade de aprender, de pedir perdão e perdoar e, acima de tudo, de ser fraterno para com os outros.

Família, vocês são o significado de tudo.

Elaine, minha amável companheira que suporta todas as minhas manias e, além de tudo, torna mais bonita a arte de viver.

Chefe, você é uma pessoa de muita estima, pois além de ter sido um grande orientador, você também é meu amigo. Você me ensinou muita coisa e esclareceu praticamente todas as inúmeras dúvidas que eu tinha no dia a dia do nosso laboratório. Muito obrigado!

Professor Bene, o senhor desempenhou um papel essencial para que eu pudesse concluir esta dissertação, oferecendo apoio fraterno e profissional no período mais difícil e conturbado da minha vida. Esse processo foi bastante estressante, mas sem a sua disciplina e objetividade eu não teria terminado a escrita deste trabalho. Agradeço muito ao senhor por não ter deixado o meu Mestrado se esvaír por conta dos meus problemas pessoais. Muito obrigado!

Dani, você foi a figura feminina que deixou o nosso laboratório mais animado, pois você é uma pessoa maravilhosa e que sempre estava pronta para ajudar. Você me ensinou muito sobre as várias dúvidas que eu tive em relação à farmacologia durante essa caminhada. Valeu mesmo!

Leitão (vulgo André, Dagostin, Zé, porcão ou qualquer coisa que tenha nome) você é o cara mais bagunceiro que eu já conheci em minha vida, mas em contrapartida você é a pessoa que resolve todos os problemas técnicos do nosso laboratório, com suas famosas “gambi”. Além disso, me auxiliou muito na rotina dos experimentos e, além de tudo, é um amigo para a vida toda. Valeu leitão!

Cadu (vulgo “morróida”) você é um cara nota 10, além de ser uma enciclopédia em pessoa. Pretendo sempre cultivar nossas conversas (mesmo que periódicas) sobre nossas felicidades, angústias e espiritualidade. Você é um amigo que eu gosto muito!

Adriano (ou “rabinho” se preferirem) você é o cara mais prestativo que eu conheço. Ajudou muito a mim e a Elaine quando chegamos em Ribeirão Preto, além de sempre nos animar com seu jeito ranzinza e engraçado de ser. Amigo para todas as horas e que passou por muitas coisas conosco. Valeu brother!

Pedro, você é uma pessoa que eu gosto muito e temos muitas características em comum, pois você é tão complicado quanto eu, mas sabemos que temos muito potencial. Nós sabemos que o crucial para as nossas vidas é aprender a lidar com as nossas ansiedades. Obrigado pelo apoio e pela amizade de sempre.

Leandro (o “cabeludo”) você forneceu suporte técnico e organizacional como ninguém. O seu “oi gentiiii” foi o mais aflorado do laboratório e você com esse jeito prestativo de ser, conquistou a todos nós. Valeu pela ajuda!

Agradeço também ao professor Wamberto Antonio Varanda por nos disponibilizar, sempre que necessário, os utensílios de seu laboratório.

Fernandinho, obrigado pelas dicas e por ter ensinado grande parte das “gambi” que o André aplicou em nosso laboratório.

Rapaziada do futebol de sexta-feira: esse desastre esportivo deixará saudades!

Eu não poderia deixar de agradecer aos bioteristas do nosso departamento, Eduardo e Leonardo, pelos cuidados com os inquietos *zebra finches*.

Funcionários da secretaria: Cláudia, Elisa, Fernando e Carlos. Vocês resolveram todos os assuntos burocráticos que nos acompanharam na pós-graduação.

Agradeço por último, de forma geral, a todos os funcionários da FMRP / USP que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>ABREVIações, SIGLAS &amp; SÍMBOLOS .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Animais experimentais .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Isolamento acústico .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. Confeção das fatias.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Eletrofisiologia .....</b>	<b>20</b>
<i>3.4.1. Confeção dos capilares de vidro e soluções dos microeletrodos.....</i>	<i>20</i>
<i>3.4.2. Visualização dos neurônios .....</i>	<i>22</i>
<i>3.4.3. Whole-cell patch-clamp.....</i>	<i>23</i>
<i>3.4.4. Registros na modalidade de voltage-clamp.....</i>	<i>25</i>
<i>3.4.5. Registros na modalidade de current-clamp.....</i>	<i>26</i>
<b>3.6. Drogas.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Análise dos dados.....</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Aspectos gerais da neurotransmissão espontânea no NCM .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Efeitos do 17<math>\beta</math>-estradiol sobre a neurotransmissão espontânea no NCM caudal.....</b>	<b>32</b>
<i>4.2.1. Efeitos do 17<math>\beta</math>-estradiol sobre as correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (mIPSCs) no NCM caudal .....</i>	<i>35</i>

<b>4.3. Efeitos do 17<math>\beta</math>-estradiol sobre a excitabilidade neuronal do NCM caudal.....</b>	<b>37</b>
4.3.1. <i>Efeitos do E2 sobre as propriedades elétricas passivas dos neurônios do NCM caudal.....</i>	<i>37</i>
4.3.2. <i>Efeitos do E2 sobre os potenciais de ação dos neurônios do NCM caudal .....</i>	<i>42</i>
4.3.3. <i>Efeitos do E2 sobre a frequência de disparos de PAs tônicos nos neurônios do NCM caudal.....</i>	<i>45</i>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1. Aspectos gerais da neurotransmissão espontânea do NCM .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2. Efeitos do 17<math>\beta</math>-estradiol sobre a neurotransmissão espontânea no NCM caudal.....</b>	<b>47</b>
6.2.1. <i>Efeitos do 17<math>\beta</math>-estradiol sobre as correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (mIPSCs) no NCM caudal .....</i>	<i>49</i>
<b>6.3. Efeitos do 17<math>\beta</math>-estradiol sobre a excitabilidade neuronal do NCM caudal.....</b>	<b>50</b>
6.3.1. <i>Efeitos do E2 sobre as propriedades elétricas passivas dos neurônios do NCM caudal.....</i>	<i>51</i>
6.3.2. <i>Efeitos do E2 sobre os potenciais de ação dos neurônios do NCM caudal .....</i>	<i>53</i>
6.3.3. <i>Efeitos do E2 sobre a frequência de disparos de PAs tônicos nos neurônios do NCM caudal.....</i>	<i>54</i>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

**ABREVIações, SIGLAS & SÍMBOLOS**

aCSF	fluido cérebroespinal artificial
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA	análise de variância
ATP-Mg	adenosina trifosfato, sal de magnésio
AROM	p450 aromatase
BIC	bicuculina
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
Campo L	área telencefálica auditória primária (campo L1, L2 e L3)
C <sub>m</sub>	capacitância da membrana celular
CMM	mesopálio caudomedial
CsCl	cloreto de céσιο
CsOH	hidróxido de céσιο
DIC	contraste por interferência diferencial
DMSO	dimetilsulfóxido
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
E2	17 $\beta$ -estradiol
EGTA	ácido etilenoglicol-bis (2-aminoetileter) tetra acético
E <sub>m</sub>	potencial de membrana
EPSC	corrente excitatória pós-sináptica
EPM	erro padrão da média
ER $\alpha$	receptor para estrógenos $\alpha$
ER $\beta$	receptor para estrógenos $\beta$
EREs	elementos responsivos aos estrógenos
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GTP-Li	guanosina trifosfato, sal de lítio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etano sulfônico

HVC	área motora do canto (centro vocal superior)
IEG	gene de expressão imediata
IPSC	corrente inibitória pós-sináptica
IR	infravermelho
LTD	depressão a longo-prazo
LTP	potenciação a longo-prazo
KCl	cloreto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
mEPSC	corrente excitatória pós-sináptica em miniatura
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mIPSC	corrente inibitória pós-sináptica em miniatura
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
NCM	nidopálio caudomedial
Ov	núcleo auditório talâmico ovoidal
PA	potencial de ação
PCA-Na	fosfocreatina, sal de sódio
POA	área pré-óptica
R <sub>s</sub>	resistência em série
R <sub>in</sub>	resistência de entrada
sEPSC	corrente excitatória pós-sináptica espontânea
sIPSC	corrente inibitória pós-sináptica espontânea
SNC	sistema nervoso central
T	testosterona
TTX	tetrodotoxina
<i>zenk</i>	genes <i>zif-268</i> , <i>egr-1</i> , <i>NGFI-A</i> e <i>krox-24</i>
ZENK	proteína ZENK

## RESUMO

**BECKHAUSER, T. F.** Efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal do nidopálio caudomedial (NCM) de *zebra finches*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

Além de suas conhecidas ações como hormônios, os esteróides sexuais tem mostrado agir como moduladores da atividade elétrica de muitos neurônios centrais. Eles podem agir tanto por meio de seus bem conhecidos receptores nucleares afetando a transcrição gênica e resultando em mudanças a longo-prazo da fisiologia neuronal ou, pela via não tradicional, mediada por ações rápidas (segundos a minutos) que certamente envolvem receptores de membrana. Esta via rápida de ação dos esteróides no cérebro resulta na regulação do potencial de membrana ( $E_m$ ) e da neurotransmissão por meio da modulação de canais iônicos e receptores para neurotransmissores. Desta forma, os esteróides podem influenciar o comportamento animal em segundos a minutos. É conhecido a mais de três décadas que o cérebro é um sítio de produção de estrógenos pela aromatização da testosterona (T) e que a produção local de estrógenos na área pré-óptica (POA) pode desencadear comportamentos sexuais em uma grande variedade de espécies de vertebrados. Os níveis de aromatase (AROM) cerebral podem ser aumentados pela T e sua atividade rapidamente regulada pela fosforilação de proteínas e atividade sináptica. Esta produção local de estrógenos no cérebro é crucial para gerar as altas concentrações necessárias para induzir os efeitos rápidos de membrana vistos nos neurônios centrais. O sistema nervoso central (SNC) das aves canoras (ordem passeriforme, subordem oscine) é

profundamente influenciado pelos níveis dos hormônios sexuais. Tem sido demonstrado há muito tempo a notável influência dos andrógenos e estrógenos sobre o sistema neural do canto e, desde então, as aves canoras tem sido um modelo útil para investigar a relação entre os esteróides sexuais e o sistema nervoso. Além do sistema neural do canto, o núcleo auditivo nidopálio caudomedial (NCM) tem mostrado ser um sitio de produção e ação de estrógenos e sua fisiologia é influenciada pelo  $17\beta$ -estradiol (E2) localmente produzido. Neste trabalho nós investigamos os efeitos da aplicação de E2 nos neurônios do NCM caudal de *zebra finches* (*Taeniopygia guttata*) usando registros eletrofisiológicos em fatias cerebrais. Em nossos experimentos, nós observamos como o demonstrado previamente por Tremere et al. (2009), que a rápida aplicação de E2 em fatias cerebrais contendo o NCM e áreas adjacentes rapidamente reduz a frequência das correntes pós-sinápticas espontâneas (sPSCs) GABAérgicas, mas não afetou correntes sinápticas GABAérgicas em miniatura. O E2 reduziu a resistência de entrada ( $R_{in}$ ) da membrana dos neurônios do NCM, reduzindo a constante de tempo ( $\tau$ ) e aumentando a velocidade do disparo de potenciais de ação (PAs) após injeções de corrente despolarizantes. Interessantemente, o E2 podia despolarizar ou hiperpolarizar o  $E_m$  em alguns neurônios do NCM. Nossos resultados sugerem que o E2 atua de maneira rápida (não-genômica) sobre a excitabilidade dos neurônios do NCM, onde provavelmente o E2 esteja modulando canais iônicos e/ou receptores de membrana para exercer seus efeitos.

**ABSTRACT**

**BECKHAUSER, T. F.** Effects of  $17\beta$ -estradiol on neuronal excitability of caudomedial nidopallium (NCM) of zebra finches. Thesis (Master's degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

Besides their well-known actions as hormones, sexual steroids have been shown to act as neuromodulators of the electrical activity of many central neurons. They can act either by the well known nuclear receptors to affect gene transcription resulting in long-term changes in neuronal physiology or via nontraditional, rapid (seconds to minutes) actions that certainly involve membrane receptors. This fast route of steroids action in the brain results in regulation of membrane potential ( $E_m$ ) and neurotransmission by modulating ion channels and neurotransmitter receptors. In accordance, steroids can influence animal behavior in seconds to minutes. It is known for more than three decades that the brain is a site of production of estrogens by aromatization of testosterone and local production of estrogens in the preoptical area (POA) can trigger sexual behavior in a range of vertebrate species. Brain aromatase (AROM) levels can be up-regulated by testosterone (T) and its activity fast regulated by protein phosphorylation and synaptic activity. This local production of estrogens in the brain is crucial for generating the high concentrations needed to induce fast-membrane effects seen in central neurons. The central nervous system (CNS) of songbirds (order passeriforme, suborder oscine), is deeply influenced by levels of sexual hormones. It's been long demonstrated the remarkable influence of androgens and estrogens on the neural song system and since then songbirds

have been a useful model for investigating the relationships between sexual steroids and the nervous system. Besides the neural song system, the auditory nucleus caudomedial nidopallium (NCM) has been shown to be a site of production and action of estrogens and its physiology is influenced by locally produced  $17\beta$ -estradiol (E2). In this work we investigated the effects of application of E2 on neurons of caudal NCM of zebra finches (*Taeniopygia guttata*) using electrophysiological recordings in brain slices. In our experiments we observed that in accordance to the observed previously by Tremere et al. (2009) acute application of E2 in brain slices containing the NCM and adjacent areas rapidly reduces the frequency of GABAergic spontaneous post-synaptic currents (sPSCs), but did not affect miniature GABAergic synaptic currents. E2 reduced the input membrane resistance ( $R_{in}$ ) of NCM neurons reducing its time constant ( $\tau$ ) and increasing the velocity of action potential (AP) firing after a depolarizing current injection. Interestingly, E2 could either depolarize or hyperpolarize the  $E_m$  in some NCM neurons. Our results suggest a rapid (non-genomic) effect of E2 on neuronal excitability of NCM neurons, where E2 probably modulates ion channels and/or membrane receptors to exert its effects.

## 1. INTRODUÇÃO

O hormônio estrogênico  $17\beta$ -estradiol (E2) é sintetizado a partir do colesterol e é um mensageiro químico de natureza esteroidal que exerce diversos efeitos regulatórios sobre os sistemas fisiológicos dos vertebrados (STUMPF & SAR, 1976; MCEWEN, 1979; 1991; MCCAFFREY & CZAJA, 1989). O E2 influencia o comportamento agressivo, a diferenciação sexual, a maturação e o início do comportamento reprodutivo, além de possuir funções marcantes e bem estabelecidas na regulação do sistema endócrino (GOULD et al., 1990; WOOLLEY & MCEWEN, 1992; MCEWEN & ALVES, 1999; REMAGE-HEALEY & BASS, 2006; MCCARTHY, 2008). O E2 também exerce importantes efeitos diretos sobre o funcionamento do sistema nervoso central (SNC), tais como alterações nos processos de aprendizagem e formação de memórias, participação nos processos de plasticidade sináptica (LTP e LTD) e, também exerce efeitos sobre as características morfológicas dos neurônios (por exemplo, a regulação da densidade de espinhos dendríticos em neurônios do hipocampo de ratos) e na modulação da sensibilidade a dor (GOULD et al., 1990; WEILAND, 1992; WONG & MOSS, 1992; WOOLLEY & MCEWEN, 1992; 1993; BRINTON, 1993; WOOLLEY et al., 1997; FOY et al., 1999; MCEWEN & ALVES, 1999). As múltiplas ações do E2 em diversos tecidos nos organismos vertebrados conferem a esse esteróide sexual a propriedade de ser o mais potente e biologicamente relevante estrógeno nesses indivíduos (MCCARTHY, 2008).

Existem vários estudos que reportam os mecanismos clássicos de ação do E2 (PFAFF, 1980; PFAFF & SCHWARTZ-GIBLIN, 1988; CARSON-JURICA et al., 1990; SMITH et al., 1993; COUSE & KORACH, 1999; KLINGE, 2001). As ações a

longo-prazo que esse estrógeno desempenha são classicamente referidas como mecanismos de ação genômicos, onde o E2 age como um indutor de transcrição gênica. Primeiramente o E2 interage com os receptores nucleares ER $\alpha$  (KOIKE et al., 1987; SPREAFICO et al., 1992; MCKENNA et al., 1992) e/ou ER $\beta$  (KUIPER et al., 1996), os quais se ligam aos elementos responsivos à estrógenos (EREs) no DNA causando alterações na expressão gênica e na regulação da síntese proteínas, afetando funções fisiológicas com uma latência de horas a dias para que os efeitos sejam manifestados. O E2 pode também afetar de forma aguda e rápida a fisiologia de muitos neurônios centrais, como reportado pioneiramente por Teyler et al. (1980), os quais demonstraram por meio de experimentos *in vitro* que a rápida aplicação de E2 em fatias cerebrais de roedores alterou a atividade eletrofisiológica de neurônios do hipocampo, aumentando a transmissão sináptica glutamatérgica na região CA1 desses animais com uma latência menor do que 10 minutos. Kelly et al. (1976; 1977; 1978) demonstraram por meio de experimentos utilizando microeletroforese, que neurônios de diversas regiões do hipotálamo de mamíferos apresentaram rápidas respostas eletrofisiológicas a aplicação de E2, incluindo neurônios da área pré-óptica e dos núcleos arqueado e parvocelular ventromedial do hipotálamo. Essas ações rápidas do E2 (de segundos a minutos) não são compatíveis com os mecanismos genômicos clássicos de ação desse estrógeno. Assim, vários pesquisadores têm investigado a possibilidade da presença de receptores de membrana para o E2, pois tem sido evidenciada a participação do E2 na modulação de diversas vias de sinalização neuronais, incluindo a regulação de cinases e sistemas de segundo-mensageiros (MERMELSTEIN et al., 1996; WATTERS et al., 1997; BRYANT et al., 2005; MANNELLA & BRINTON, 2006). Tem sido observado que o E2 induz a ativação

de vias de sinalização intracelulares por meio de mecanismos que envolvem proteínas G (WOOLLEY, 2007), embora a estrutura de um possível receptor de membrana para o E2 ainda não tenha sido demonstrada. Ainda, o E2 pode agir como modulador alostérico de receptores ionotrópicos, tais como os de serotonina e os receptores nicotínicos (WETZEL et al., 1998; PARADISO et al., 2001) ou ainda, ligando-se diretamente as subunidades de canais iônicos, como por exemplo à subunidade  $\beta_1$  do canal “maxi-K<sup>+</sup>” (VALVERDE et al., 1999). Desta forma, fica evidente que o E2 possui um papel relevante na modulação de aspectos da transmissão sináptica e também em regular fatores determinantes da excitabilidade neuronal em várias espécies de vertebrados.

Dentre os diversos neuromoduladores que afetam as funções da circuitaria neuronal e comportamento, podemos incluir os esteróides sintetizados no cérebro (chamados de “neuroesteróides”), os quais são sintetizados a partir do colesterol ou por meio de precursores que chegam da periferia via circulação sanguínea. Um dado importante é que as concentrações locais desses esteróides no SNC são independentes dos níveis plasmáticos dos mesmos (BAULIEU, 1998). Assim, os neuroesteróides são definidos como esteróides que se acumulam no cérebro mesmo na ausência das glândulas esteróidogênicas, sendo sintetizados no cérebro a partir de precursores endógenos e catalisados por meio de enzimas que devem estar presentes *in situ* (BAULIEU & ROBEL, 1990). Desta forma, flutuações nos níveis de neuroesteróides, tais como os do E2, podem localmente modular o funcionamento da circuitaria neuronal de maneira similar aos neurotransmissores convencionais (BALTHAZART & BALL, 2006; WOOLLEY, 2007).

Um dado interessante, é que a enzima envolvida na conversão de testosterona (T) em E2, a aromatase (AROM), é altamente expressa em diversas áreas cerebrais nos vertebrados, atuando como a chave para a produção local de E2 e, conseqüentemente, gerar as flutuações locais nos níveis de E2 independentemente dos níveis plasmáticos desse hormônio. Além disso, a enzima AROM tem sido documentada na área pré-óptica do hipotálamo (POA) de quase todos os vertebrados já estudados (CALLARD et al., 1980; SCHLINGER & CALLARD, 1989; BALTHAZART & BALL, 1998). A POA é uma região primariamente envolvida no processo do comportamento reprodutivo e, a expressão de AROM em quase todos os membros pertencentes à classe dos vertebrados demonstra que esta enzima foi conservada durante o processo evolutivo do telencéfalo desses animais (MORRIS et al., 2004; FORLANO et al., 2006). A atividade da AROM no hipotálamo das aves está relacionada à intensidade do comportamento agressivo (SCHLINGER & CALLARD, 1989; SILVERIN et al., 2004) e, além disso, a atividade da AROM é agudamente regulada durante o comportamento copulatório desses animais (CORNIL et al., 2005; 2006b).

O telencéfalo dos pássaros *zebra finches* expressa grandes quantidades de AROM, assim como os receptores clássicos para E2 (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) que estão amplamente distribuídos no cérebro dessas aves (GAHR et al., 1993; SALDANHA et al., 2000, 2005). Muitos aspectos do comportamento social dos *zebra finches* são esteróide-sensíveis, como por exemplo, o canto utilizado pelos machos para atrair parceiras e demarcar o seu território. Além disso, os esteróides sexuais afetam a diferenciação sexual do sistema neural do canto (núcleos envolvidos no aprendizado e produção do canto) dos *zebra finches*, onde esse sistema é pouco

desenvolvido ou atrofiado nas fêmeas, contrastando com os machos que possuem o sistema neural do canto bem desenvolvido (KONISHI & AKUTAGAWA, 1985; ADKINS-REGAN et al., 1994). Deste modo, apenas os machos estão habilitados a aprender e a produzir o canto, porém, a administração de estrógeno às fêmeas jovens resulta na masculinização do sistema neural do canto das mesmas (limitado do dia em que o ovo choca até cerca de 40 dias depois), possibilitando que elas produzam vocalizações similares às dos machos (GURNEY & KONISHI, 1980; GURNEY, 1982; KONISHI & AKUTAGAWA, 1988; SIMPSON & VICARIO, 1990). É interessante observar que a administração de T às fêmeas adultas não masculiniza esses núcleos.

Outro aspecto interessante sobre os *zebra finches*, é que estes possuem uma alta expressão de AROM em um núcleo auditório telencefálico envolvido na percepção e discriminação dos sons utilizados na comunicação vocal desses animais, o nidopálio caudomedial (NCM). A elevada expressão de AROM nessa região sugere que o E2 pode ser produzido localmente nesse núcleo, onde o E2 poderia influenciar o processamento de informações auditivas complexas, tal qual são os sons empregados pelos *zebra finches* machos para atrair as fêmeas durante o comportamento reprodutivo. Assim, o NCM se torna uma estação central no processamento das informações auditivas provenientes das vocalizações de machos e fêmeas dessa espécie, indicando que essa área cerebral é um bom modelo para avaliar os efeitos rápidos do E2 na neurotransmissão e atividade eletrofisiológica dos neurônios presentes nessa região e, com a possibilidade de correlacionar esses efeitos do E2 com um comportamento que é marcante nessa espécie, o canto.

Embora o uso da vocalização para a comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie seja comum no reino animal, poucas espécies possuem a capacidade de aprender a vocalizar. O aprendizado vocal se caracteriza pela habilidade em aprender e produzir vocalizações por meio da imitação, além das vocalizações inatas. Dentre os mamíferos, além da espécie humana, apenas os cetáceos e alguns morcegos aprendem a vocalizar (GUINEE & PAYNE, 1988; BOUGHMAN, 1998). É de se notar que nenhum outro primata, além dos humanos, possui aprendizado vocal. Curiosamente, dentre as aves uma diversidade bem maior de espécies comunica-se por meio da vocalização usando sinais aprendidos, tais como as aves pertencentes às ordens: psittaciforme (papagaios e periquitos; JARVIS & MELLO, 2000), troquiliforme (beija-flores; BAPTISTA & SHUCHMAN, 1990) e passeriforme, subordem dos oscinos, que são as aves canoras (BRENOWITZ et al., 1997).

O uso de aves canoras como um modelo experimental para a identificação de mecanismos neurais envolvidos em processos comportamentais possui vantagens interessantes (BRENOWITZ et al., 1997a,b) que tem sido explorada por diversos grupos de pesquisa. As aves canoras aprendem a cantar quando jovens ouvindo o canto de seu tutor adulto e, algumas dessas vantagens são únicas desse modelo, como por exemplo, pelo uso de marcadores bioquímicos de atividade neural, como o fator de transcrição ZENK (MILBRANDT, 1987), por meio do qual pode se identificar os neurônios ativados pela apresentação de diferentes tipos de canto e outros sons inespecíficos (MELLO et al., 1992; RIBEIRO et al., 1998). Dessa maneira, a utilização de *zebra finches* (mandarins - *Taeniopygia guttata*, subordem dos oscinos) e de outras aves canoras como modelo experimental permite correlacionar um comportamento que envolve

aprendizado e memória, no caso o canto, com a neurofisiologia, contrastando com a dificuldade em correlacionar uma alteração neurofisiológica com uma mudança de comportamento devido ao aprendizado e/ou memória em modelos experimentais utilizando mamíferos.

O nidopálio caudomedial (NCM) é uma área telencefálica das aves que está envolvida com o processamento auditivo da canção e muito provavelmente com o armazenamento da memória da canção do tutor da ave (GOBES & BOLHUIS, 2007). O NCM recebe aferentes do núcleo auditório talâmico ovoidal (Ov) e da área telencefálica auditória primária (campo L) e, se conecta reciprocamente com o mesopálio caudomedial (CMM), que também recebe sinapses do campo L, além de enviar aferentes para a área motora do canto (HVC – *high vocal center*) (VATES et al., 1996; MELLO et al., 1998). Os circuitos internos do NCM ainda são pouco conhecidos, mas evidências sugerem que ele seja uma estrutura heterogênea, com diferentes zonas recebendo diferentes conexões (VATES et al., 1996). Devido as suas relações neuroanatômicas, o NCM representa uma estação auditiva central provavelmente envolvida em vários aspectos do processamento da canção. Comparativamente, ele seria similar as camadas supragranulares do córtex auditivo dos mamíferos (KARTEN, 1997; BOLHUIS & GAHR, 2006). Recentemente o NCM foi identificado como o sítio de armazenamento da memória da canção do tutor em *zebra finches* machos (mandarins; *Taeniopygia guttata*) (GOBES & BOLHUIS, 2007).

Genes de expressão imediata (*immediate-early genes* – IEG) são ativados em neurônios em associação com a atividade elétrica destes. Diversas evidências sugerem sua participação nos processos de plasticidade, diferenciação e formação de memórias de longo prazo (CLAYTON, 1997). Em aves canoras, o

IEG *ZENK* (também conhecido como *zif-268*, *erg-1*, *NGFI-A* e *krox-24*), um promotor de transcrição, é ativado em quase todo o cérebro quando se estimula maciçamente o sistema nervoso pela inibição do sistema GABAérgico (MELLO & CLAYTON, 1995). Entretanto quando a ave é estimulada pelo canto, a expressão do *ZENK* é bem limitada, não ocorrendo nos núcleos tradicionais do canto, nem no campo L2, onde as terminações talâmicas auditivas chegam, mas concentra-se basicamente no núcleo auditivo NCM e em suas imediações (MELLO et al., 1992; MELLO & CLAYTON, 1994). Adicionalmente, estudos eletrofisiológicos *in vivo* mostram que os neurônios do NCM disparam potenciais de ação em resposta à audição do canto da espécie da ave, mas se a apresentação do canto é intensamente repetida, a resposta decai rapidamente e permanece no mesmo patamar por 48 horas (CHEW et al., 1995; 1996; STRIPLING et al., 1997; 2001). Esse fenômeno foi denominado de habituação. De forma interessante, essa habituação ao canto é específica ao canto apresentado, sendo que o NCM apresenta uma resposta robusta à apresentação de um novo canto.

Como já mencionado, o NCM apresenta uma elevada expressão da enzima aromatase (AROM), principalmente em sua porção caudal, sendo encontrada tanto no núcleo quanto nas espinhas dendríticas e axônios dos neurônios do NCM. Assim, a presença da AROM no NCM permite a produção de E2 de forma localizada, possibilitando que os níveis de E2 sejam modulados agudamente e de forma rápida, independentemente do E2 proveniente da circulação sanguínea.

O NCM processa informações auditivas complexas, percebendo e discriminando sons baseados em sua estrutura acústica, de maneira seletiva aos sons espécie-específicos. Remage-Healey et al. (2008) demonstraram por meio de experimentos *in vivo* que durante interações sociais entre *zebra finches*

machos e fêmeas, os níveis de E2 aumentaram no telencéfalo auditivo independente da concentração de E2 ou T plasmáticas. Assim, o uso de aves canoras como modelo para o estudo de ações rápidas do E2 se torna interessante, uma vez que podemos correlacionar uma mudança de comportamento – o canto – com alterações neurofisiológicas.

Dessa forma, visto as escassas informações a respeito da influência do E2 no NCM, investigamos os efeitos da aplicação rápida de E2 sobre os neurônios da porção caudal do NCM.

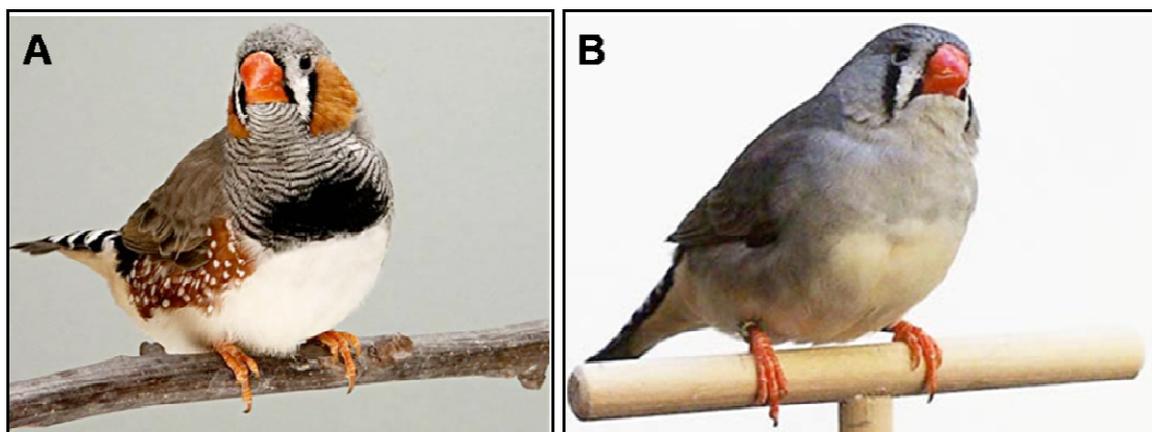
## 2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da aplicação do  $17\beta$ -estradiol (1) sobre a neurotransmissão espontânea dos neurônios do NCM caudal e (2) sobre as propriedades passivas e de potencial de ação dos neurônios da porção caudal do NCM de *zebra finches* adultos.

### 3. MATERIAL & MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

O animal adotado como modelo experimental foi o *zebra finch* (*Taeniopygia guttata*) (figura 1), conhecido como mandarim ou diamante-mandarim no Brasil. Este pássaro pertence à ordem passeriforme, subordem passeri (oscine), família passeridae e subfamília estrildidae. É nativo da região central da Austrália, Timor-Leste e Indonésia, embora também seja encontrado em países como Porto Rico, Portugal e Estados Unidos como espécie introduzida. Esse pássaro pode facilmente ser encontrado por todo o mundo e, devido a sua beleza e a alta taxa de reprodução, é com frequência domesticado como animal de estimação, além de ser muito comum encontrá-lo com criadores que o comercializam. Em seu habitat natural os *zebra finches* são vistos sempre em grupos e estão aptos para acasalar a todo momento, exceto quando não há comida e água disponível.



**Figura 1 – Espécimes de *zebra finches*.** O painel A mostra um macho, enquanto em B visualizamos o exemplar de uma fêmea. Notar o dimorfismo no fenótipo da plumagem dos machos em relação às fêmeas.

Os animais foram adquiridos de criadores locais e posteriormente alojados no biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Os pássaros foram mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum*, com o ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6h e apagadas às 18h) e temperatura controlados ( $22 \pm 1$  °C). Todos os animais utilizados em nossos experimentos encontravam-se em idade adulta.

### **3.2. Isolamento acústico**

Para a realização dos experimentos, sempre utilizamos um animal por vez. No final da tarde, um dia antes do experimento *per se*, um animal era escolhido aleatoriamente e retirado do biotério acondicionado em uma gaiola menor até chegarmos ao Laboratório de Fisiologia Sináptica. Uma vez no laboratório, a gaiola contendo o animal em questão era transferida para dentro de uma câmara com isolamento acústico (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), onde lá o animal permanecia por uma noite inteira até o amanhecer (cerca de 15 horas) com água e ração *ad libitum*. A câmara acústica continha um temporizador automático acoplado a uma luminária e, com esse artifício, controlávamos o ciclo-claro escuro dentro da câmara. O objetivo do isolamento acústico era de abolir ou de diminuir a expressão do IEG *zenk*, pois assim nós evitávamos que ruídos ou sons de outras aves estimulasse os neurônios do NCM, uma vez que os efeitos da expressão desse gene sobre a fisiologia desses neurônios ainda é incerta.

### 3.3. Confeção das fatias

Os protocolos experimentais referentes à confecção das fatias e eletrofisiologia foram realizados conforme reportado por Pinaud et al. (2004, 2008). Na manhã seguinte ao isolamento do animal, cerca de 15 minutos após as luzes serem acesas dentro da câmara de isolamento acústico, o pássaro era sacrificado por decapitação (nessas condições, a expressão basal de *zenk* no NCM é baixa). Imediatamente após a decapitação, o cérebro do *zebra finch* era exposto e cuidadosamente removido, sendo rapidamente imerso em uma placa de Petri contendo uma solução gelada ( $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de líquido cérebrospinal artificial (aCSF), modificada para corte, contendo (mM): 87 NaCl; 2,5 KCl; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 75 sacarose; 25 glicose; 3 mio-inositol; 7 MgCl<sub>2</sub>; 0,2 CaCl<sub>2</sub>; 2 piruvato de sódio e 0,4 ácido ascórbico, continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub>; pH 7,4) e osmolalidade entre 330 - 350 mOsm / Kg.H<sub>2</sub>O. É importante destacar que a osmolaridade plasmática dos *zebra finches* é bastante superior do que a maioria das soluções de aCSF padrão e, na média, encontra-se em torno de 350 mOsm nos animais em idade adulta (BOTTJER, 2005). Após os hemisférios do *zebra finch* serem mergulhados no aCSF modificado, eles foram então separados por meio de uma lâmina de bisturi e colados independentemente em uma plataforma, apoiados em um bloco de agar (4%), para corte em um vibrátomo (Vibratome, 1000 Plus Manual Series) (figura 2), onde foram feitos cortes parassagitais de 200  $\mu\text{m}$  de espessura, sendo estes orientados da porção medial para a porção lateral.

O NCM, entretanto, não possui limites facilmente detectáveis em sua porção lateral e, devido a essa dificuldade em nosso protocolo de corte, retiramos no máximo quatro fatias de 200  $\mu\text{m}$  de cada hemisfério.

Depois de cortadas as fatias, as mesmas eram transferidas para um copo de Becker contendo a mesma solução utilizada para o corte, sendo continuamente borbulhada com a mistura carbogênica, mas nesta etapa a solução encontrava-se em temperatura ambiente e as fatias permaneciam incubadas por um período máximo de 45 minutos antes de serem utilizadas para os registros eletrofisiológicos.



**Figura 2 – Vibrátomo utilizado para a confecção das fatias do cérebro do *zebra finch*. Vibratome® 1000 Plus Manual Series.**

### **3.4. Eletrofisiologia**

#### ***3.4.1. Confecção dos capilares de vidro e soluções dos microeletrodos***

Capilares de vidro de borossilicato com filamento interno (Sutter Instruments CO., modelo 150-86-10, EUA) foram usados para produzir os microeletrodos em um estirador horizontal (Sutter Instruments CO., modelo P-97, EUA) (figura 3,

painéis A e B, respectivamente). Uma vez confeccionados, os microeletrodos são preenchidos com uma das seguintes soluções, contendo (mM): A) 140 CsCl; 5 EGTA; 10 HEPES; 4 ATP-Mg; 20 PCA-Na e 0,3 GTP-Li (osmolalidade entre 310 – 330 mOsm / Kg.H<sub>2</sub>O, pH 7,3 - 7,4, ajustado com CsOH), ou B) 140 KCl; 5 EGTA; 10 HEPES; 4 ATP-Mg; 20 PCA-Na e 0,3 GTP-Li (osmolalidade entre 310 – 330 mOsm / Kg.H<sub>2</sub>O, pH 7,3 - 7,4 ajustado com KOH). O KCl foi utilizado para os registros eletrofisiológicos na modalidade de *current-clamp*, enquanto o CsCl foi utilizado para os registros na modalidade de *voltage-clamp*. As soluções foram filtradas com filtros de 20 µm (Milex®-GN, Millipore, USA) e a resistência final dos microeletrodos preenchidos com essas soluções quando mergulhados na solução de registro ficaram entre 3 e 7 MΩ.

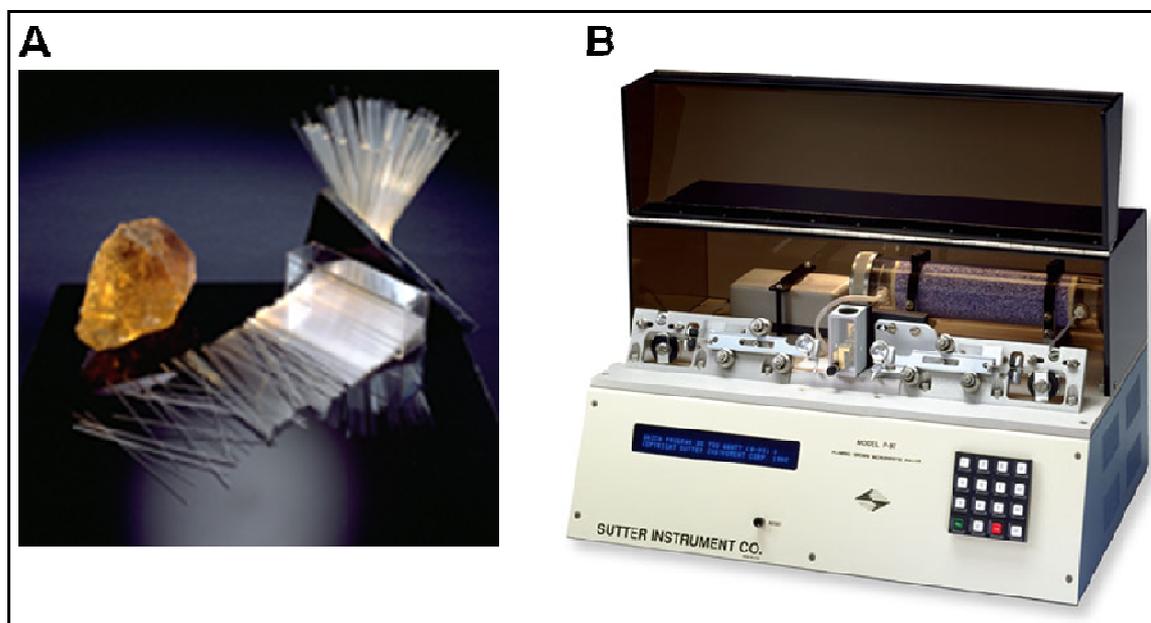


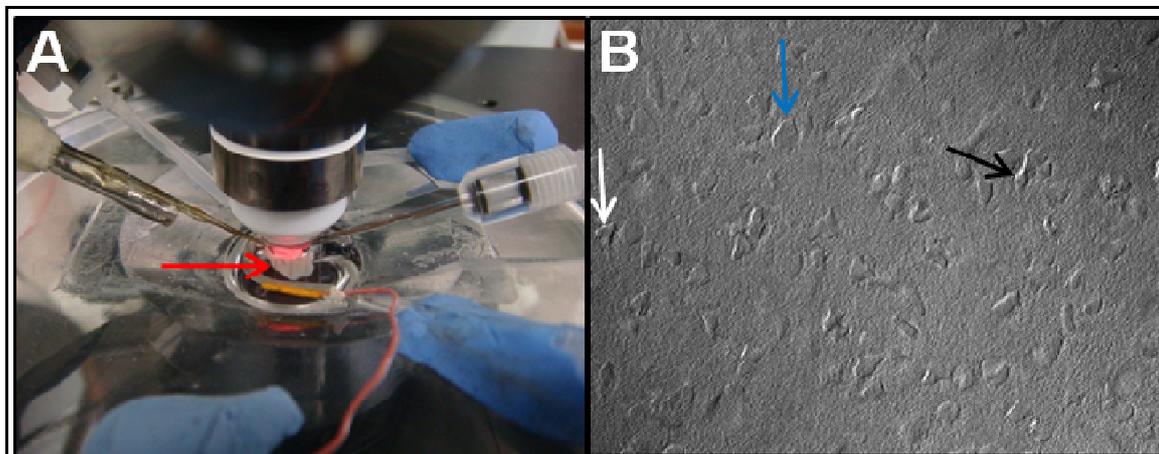
Figura 3 — A) Capilares de vidro de borossilicato com filamento interno e B) Estirador horizontal de capilares.

### **3.4.2. Visualização dos neurônios**

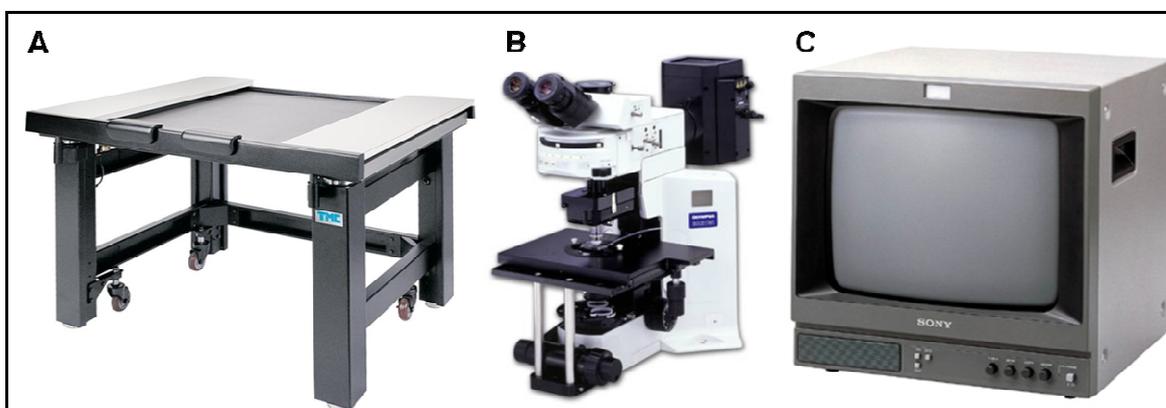
A fatia contendo o NCM era imobilizada na câmara de submersão por meio de uma rede de fios de *nylon* e os neurônios do NCM presentes nesta fatia eram visualizados (figura 4, painéis A e B, respectivamente) por intermédio de um microscópio (Olympus, modelo BX51WI, Japão) equipado com óptica de contraste por interferência diferencial e infravermelho (DIC – IR) que estava acoplado a uma câmara (Hamamatsu Photonics K. K., modelo C7500-50, Japão) sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho e esta, conectada a um monitor monocromático (Sony Corporation, modelo PVM – 137, Japão). Nota-se na figura 4 (painel B) que ao visualizar os neurônios do NCM no monitor, estes não apresentam uma morfologia distinta, embora estejam distribuídos de forma homogênea. Todo o sistema era permanentemente mantido sobre uma mesa pneumática (TMC, modelo 63-531, EUA) para o isolamento mecânico do ambiente. A figura 5 mostra a mesa pneumática, o microscópio e o monitor utilizados nos experimentos (painéis A, B e C, respectivamente).

A solução de registro na qual a fatia era submersa era o aCSF, contendo (mM): 125 NaCl; 2,5 KCl; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 glicose; 3 mio-inositol; 1 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 2 piruvato de sódio e 0,4 ácido ascórbico, continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub>; pH 7,4) e osmolalidade entre 320 - 340 mOsm / Kg.H<sub>2</sub>O. A solução de registro e as drogas utilizadas foram aplicadas às fatias por meio de um sistema de perfusão de múltiplas vias impelido por força gravitacional controlado por válvulas (ValveLink™ 8, AutoMate Scientific Inc., EUA). A remoção das soluções que

perfundiam a câmara de submersão foi feita por meio da aplicação de pressão negativa gerada por uma bomba de sucção.



**Figura 4 – Visualização dos neurônios do NCM.** O painel A mostra uma fatia do cérebro de um *zebra finch* (contendo o NCM e núcleos adjacentes) imobilizada na câmara de submersão por meio de fios de nylon (indicada pela seta vermelha) e o painel B mostra a imagem de neurônios do NCM capturada por intermédio do sistema DIC – IR com uma objetiva de 60x. As setas coloridas no painel B indicam a morfologia heterogênea de três neurônios do NCM.



**Figura 5 – Equipamentos utilizados para a visualização dos neurônios do NCM.** A – mesa pneumática, B – microscópio e C – monitor.

### 3.4.3. Whole-cell patch-clamp

O sistema de registro era composto por um amplificador (HEKA Elektronik, modelo EPC 10, Germany) conectado diretamente via fibra óptica a uma placa de

aquisição integrada (LIH 1600) acoplada a um computador tipo PC, no qual era realizado o processamento e armazenamento dos dados no disco rígido. A análise dos dados era realizada *offline* depois de terminados os experimentos. Todos os registros foram feitos na configuração *whole-cell patch-clamp*, ora fixando a voltagem (*voltage-clamp*) para visualizar as correntes sinápticas, ora fixando a corrente (*current-clamp*) para averiguar as alterações sobre as propriedades elétricas passivas ou de potencial de ação do neurônio a ser estudado.

Depois de visualizado e escolhido um neurônio caudal do NCM, um microeletrodo devidamente preenchido com a solução de interesse (descritas anteriormente) foi acoplado ao *probe* com um eletrodo de prata cloretado e por meio de um micromanipulador hidráulico (SD Instruments, EUA) o microeletrodo de registro foi mergulhado no aCSF do banho e uma pressão positiva foi aplicada por meio de uma seringa de 1 mL, seguido do posicionamento do microeletrodo sobre a membrana do neurônio. Após a ponta do microeletrodo entrar em contato com a membrana do neurônio em questão, novamente por intermédio de uma seringa, a pressão do microeletrodo era igualada à pressão atmosférica e, em seguida, aplicava-se uma breve sucção. Neste momento a resistência do microeletrodo aumentava rapidamente até atingir um valor maior que 1 G $\Omega$ , caracterizando a configuração *cell-attached* e a capacitância do microeletrodo era eletronicamente cancelada. Com um pouco mais de sucção, o retalho da membrana do neurônio (o retalho corresponde ao diâmetro da boca do microeletrodo) que estava em contato com a ponta do microeletrodo era rompido e assim a configuração *whole-cell* era alcançada. A partir desse momento a

solução iônica contida no microeletrodo se misturava ao citoplasma do neurônio e então toda a célula ficava sob controle experimental.

#### **3.4.4. Registros na modalidade de voltage-clamp**

Os dados referentes às correntes pós-sinápticas espontâneas (sPSCs) foram adquiridos com o software PULSE (HEKA Elektronik, Germany) e as correntes dos neurônios pertencentes a porção caudal do NCM foram adquiridas a 10 KHz e filtradas *low-pass* a 3 KHz. As correntes foram registradas em segmentos de 2 minutos de duração mediante a condição experimental proposta (na ausência ou presença do  $17\beta$ -estradiol). Os registros na modalidade de *voltage-clamp*, após a configuração *whole-cell* ser alcançada, tiveram a voltagem transmembrana dos neurônios fixada a -70 mV e assim obtínhamos os valores da capacitância da membrana ( $C_m$ ) e resistência em série ( $R_s$ ). Os valores da  $R_s$  foram constantemente monitorados e a maioria dos registros teve sua  $R_s$  compensada digitalmente (lag de 10  $\mu$ s) em até 60%. Neurônios cujos valores de  $R_s$  foram superiores a 30 m $\Omega$  foram descartados das análises.

Todos os registros foram iniciados 5 minutos após a configuração *whole-cell* ter sido alcançada, sendo este o tempo necessário para a estabilização do sistema. Para o protocolo no qual havia aplicação de droga, o registro era realizado após um período de 5 minutos após ter sido iniciada a passagem da solução com a droga pelo banho (aproximadamente 5 mL). Em todos os registros, cada neurônio era seu próprio controle, ou seja, primeiramente fazia-se o registro sem droga (apenas com aCSF) e depois adicionava-se a droga ao sistema de perfusão. Os microeletrodos utilizados nestes registros continham a CsCl como

soluto principal (solução A - descrita anteriormente no subitem 3.4.1). As correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (mIPSCs) foram isoladas por meio da aplicação de 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX) e tetrodotoxina (TTX).

#### **3.4.5. Registros na modalidade de *current-clamp***

Os registros na modalidade de *current-clamp* objetivaram identificar as propriedades elétricas passivas (potencial de membrana no repouso e resistência de entrada da membrana) e algumas características do potencial de ação dos neurônios pertencentes à porção caudal do NCM, na presença ou ausência do 17 $\beta$ -estradiol (E2). Observamos, mediante a aplicação de pulsos quadrados de corrente, o comportamento desses neurônios em situações hiperpolarizadas e despolarizadas. As etapas preliminares até o momento do início do registro consistem nas mesmas descritas no subitem anterior. A solução utilizada nos microeletrodos de registro consistia em KCl como soluto principal (solução B – descrita anteriormente no subitem 3.4.1).

#### **3.6. Drogas**

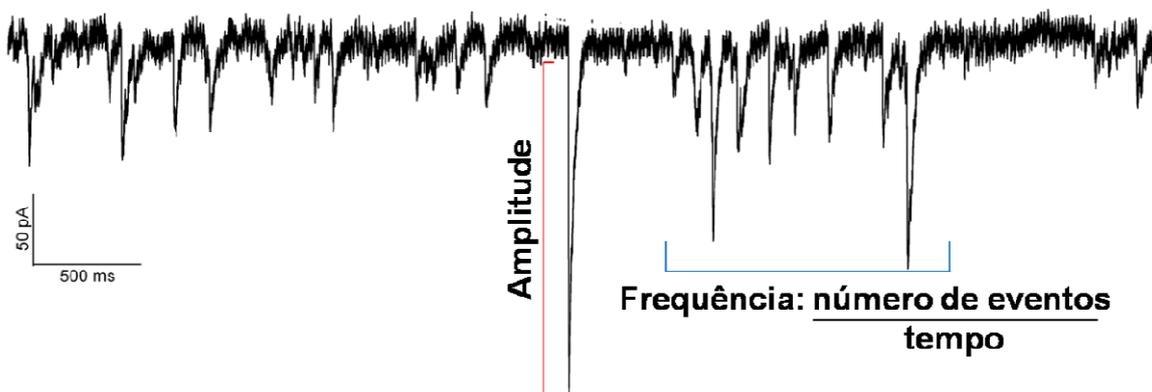
As drogas utilizadas nos experimentos foram: 1) E2 (17 $\beta$ -estradiol), nas concentrações de 5, 50 ou 500 nM (os experimentos em *current-clamp* foram todos realizados na concentração de 500 nM); 2) DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona), na concentração de 10  $\mu$ M e 3) TTX (tetrodotoxina), na concentração de 1  $\mu$ M.

A solução de E2 foi preparada diariamente dissolvida em etanol, sendo que a diluição final do veículo em aCSF não era maior do que 0,005% do volume total. A solução de DNQX foi dissolvida em DMSO e a concentração deste no perfusato foi sempre menor do que 0,5% do volume total em aCSF.

### **3.7. Análise dos dados**

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa Prism (GraphPad, versão 5.00). As tabelas foram construídas no programa Excel (Microsoft, versão 2007).

As análises das correntes espontâneas quanto à amplitude e a frequência (figura 6) foram realizadas no programa Mini Analysis (Synaptosoft, USA). Os registros de interesse, primeiramente foram escolhidos e transformados em um formato legível pelo sistema (.ABF), em seguida, os parâmetros de análise do programa foram ajustados para cada arquivo individual e as correntes visualizadas uma a uma e, marcadas manualmente. O programa nos retornou os dados em questão em forma de tabela com as médias de cada um dos registros e, a partir daí, foram digitados e organizados em planilhas do programa Excel (Microsoft, versão 2007).

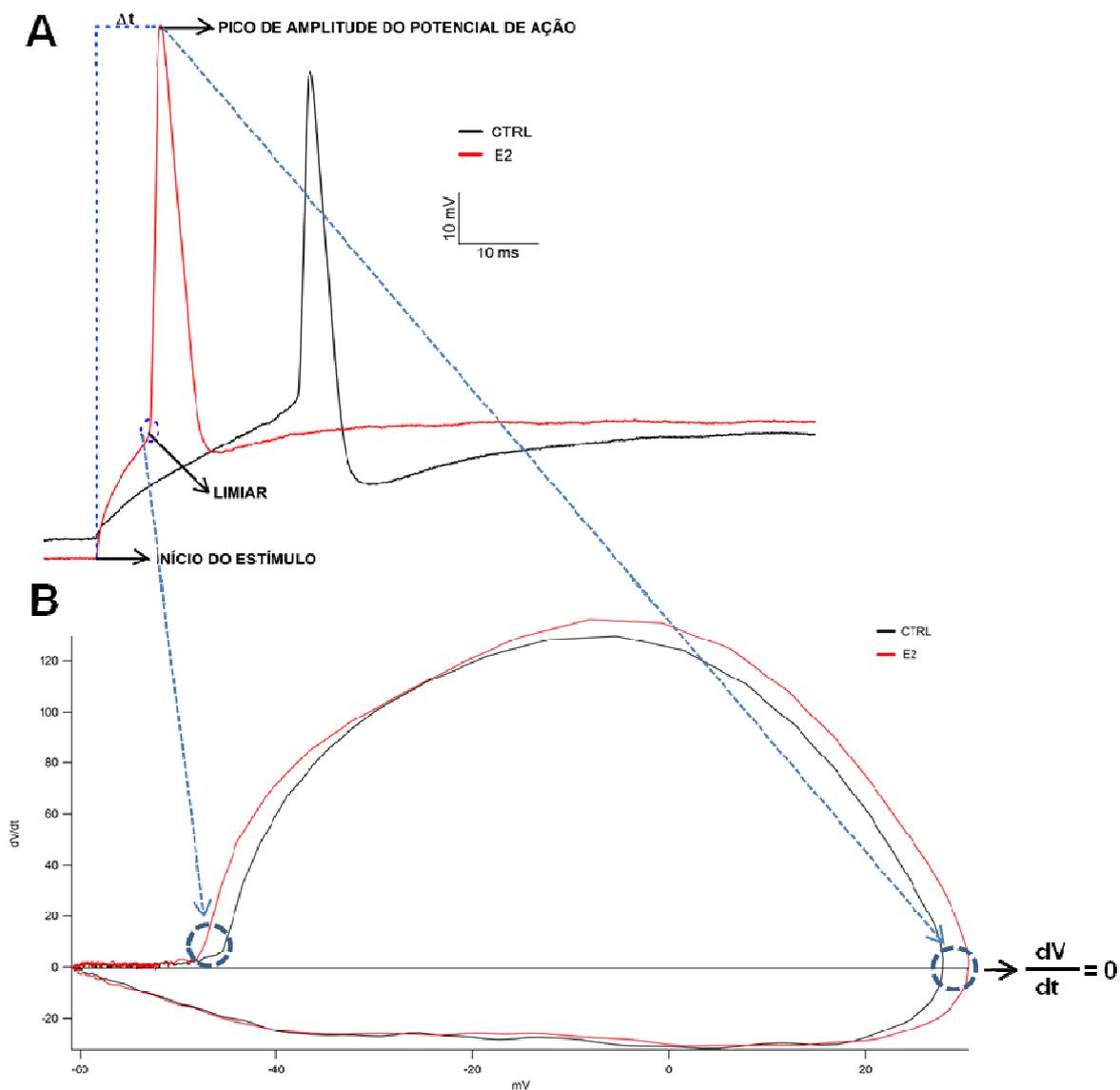


**Figura 6 – Registro representativo das sPSCs de um neurônio do NCM caudal.** A figura indica os parâmetros analisados: amplitude (barra vermelha) e frequência (barra azul). O potencial de membrana estava fixado em -70 mV.

As análises referentes aos registros no modo *current-clamp* foram realizadas por meio do programa IGOR Pro (WaveMetrics, USA, versão 6.0). Quando aplicamos pulsos quadrados de correntes hiperpolarizantes (-200 pA à 0 pA) e após observarmos a variação da voltagem transmembrana, pudemos calcular qual era a resistência de entrada ( $R_{in}$ ) daquele neurônio dividindo a voltagem obtida (potencial de membrana no repouso menos a voltagem produzida pelo pulso mais hiperpolarizante) pela corrente injetada. Além disso, foi calculada a velocidade da fase de decaimento da voltagem transmembrana ( $\tau_1$  – rápido e  $\tau_2$  – lento) pelo ajuste da curva por meio de uma função exponencial dupla. Ainda, utilizando o programa IGOR Pro (WaveMetrics, USA, versão 6.0), foram visualizados os registros nos quais foram aplicados os pulsos despolarizantes e estes então foram analisados quanto a  $\Delta t$  desde o início do estímulo (injeção de corrente) até o pico de amplitude do PA. O limiar para o disparo do PA e o pico de amplitude do PA foram analisados por meio da construção e a visualização de planos de fase das duas condições em questão (com ou sem droga) (figura 7).

Planos de fase são visualizações gráficas úteis para a análise do comportamento de sistemas oscilatórios, tal qual é a variação da voltagem

transmembrana durante um PA. Inicialmente, o  $E_m$  encontra-se em um estado estacionário e varia linearmente no tempo até ser atingido o limiar para a deflagração do PA. Após o limiar ser atingido, a voltagem varia no tempo de forma exponencial e então entra em um estado estacionário muito breve (o pico de amplitude do PA) e varia exponencialmente novamente até retornar ao valor do  $E_m$  no repouso novamente. Assim, por meio dessa ferramenta, nós podemos extrair, entre outros, os valores do pico de amplitude e do limiar para o disparo do PA (figura 7).

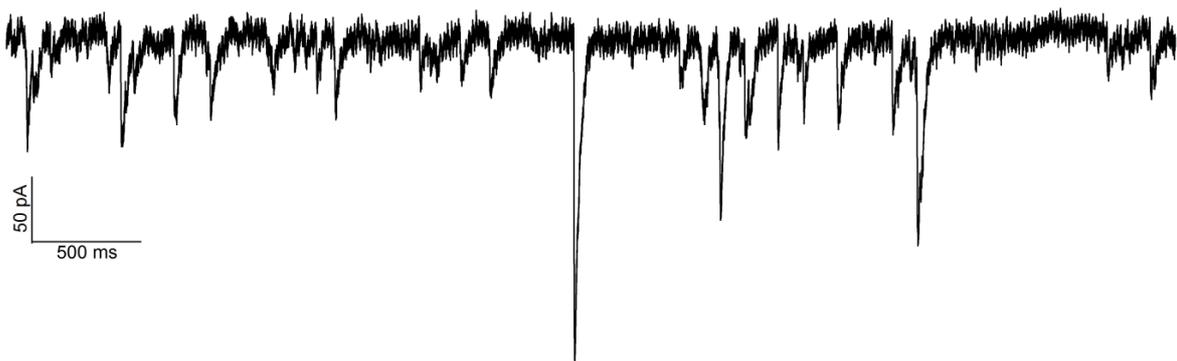


**Figura 7 – Potenciais de ação antes e após a aplicação de E2.** No painel A podemos observar o registro de dois PAs (o traçado preto representa a situação CTRL e o traçado vermelho o registro na presença de E2) indicando os parâmetros que foram avaliados. O painel B ilustra dois planos de fase (nas mesmas condições experimentais de A) evidenciando a região onde foi feita a leitura para a análise do limiar e do pico de amplitude do PA.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aspectos gerais da neurotransmissão espontânea no NCM

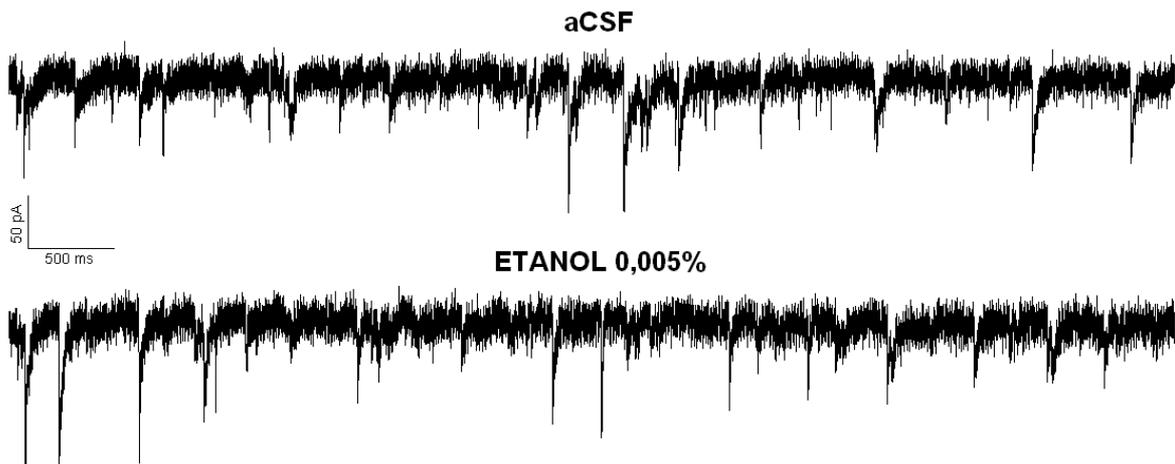
Usando a técnica de *whole-cell patch-clamp*, na modalidade de *voltage-clamp*, observamos a presença de correntes pós-sinápticas espontâneas (sPSCs) nos neurônios do NCM. As sPSCs são caracterizadas por rápidas deflexões da linha de base seguidas por um retorno a linha de base mais lento, com um perfil de decaimento exponencial (figura 8). Essas sPSCs refletem a liberação de neurotransmissores pelos neurônios que fazem sinapses com o neurônio registrado. A maioria das sPSCs no NCM são GABAérgicas e dependentes de potenciais de ação, já que são fortemente inibidas por bicuculina (BIC) e tetrodotoxina (TTX) (PINAUD et al., 2008; DAGOSTIN, 2008).



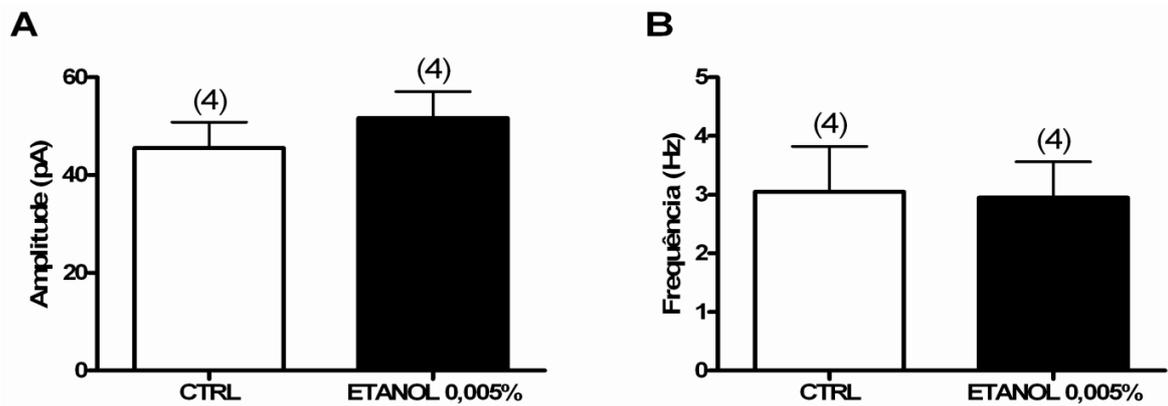
**Figura 8 - Traçado representativo do registro das correntes pós-sinápticas espontâneas (sPSCs) de um neurônio do NCM.** O experimento foi realizado na configuração *whole-cell*, na modalidade de *voltage-clamp*. Todos os registros das sPSCs foram realizados com o  $E_m$  fixado em -70 mV e os microeletrodos continham CsCl como soluto principal.

#### 4.2. Efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a neurotransmissão espontânea no NCM caudal

Para estudar os efeitos do 17 $\beta$ -estradiol (E2) sobre a neurotransmissão na porção caudal do NCM, primeiramente fizemos registros eletrofisiológicos para averiguar se o veículo utilizado para a diluição do E2 não afetaria a neurotransmissão nesse núcleo (figura 9). Para tal, perfundimos as fatias com aCSF contendo 0,005% de etanol, sendo que esta porcentagem do veículo era equivalente a usada nas diluições do E2. Observamos que nessa concentração o etanol não afetou significativamente a amplitude média (de  $45,55 \pm 5,29$  pA para  $51,65 \pm 5,41$  pA;  $n = 4$ ;  $p > 0,05$ ) e nem a frequência média (de  $3,05 \pm 0,77$  Hz para  $2,95 \pm 0,61$  Hz;  $n = 4$ ;  $p > 0,05$ ) das sPSCs registradas nos neurônios do NCM (figura 10, painéis A e B, respectivamente).

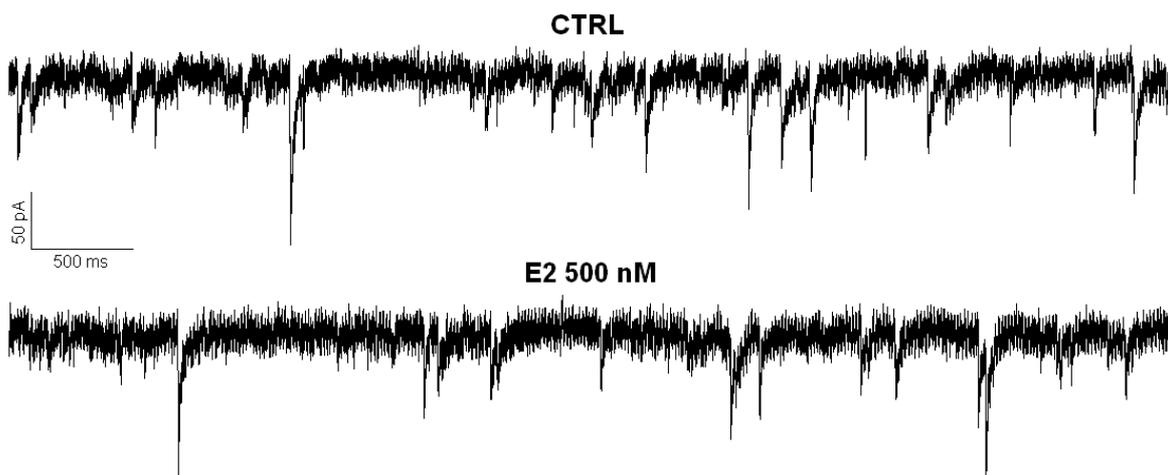


**Figura 9 – Traçado representativo do registro das sPSCs de um neurônio do NCM antes e depois da aplicação de etanol 0,005% . O traçado superior mostra o registro na situação CONTROLE (aCSF), enquanto o traçado inferior mostra o registro na presença do VEÍCULO (etanol 0,005%) usado na diluição do 17 $\beta$ -estradiol.**

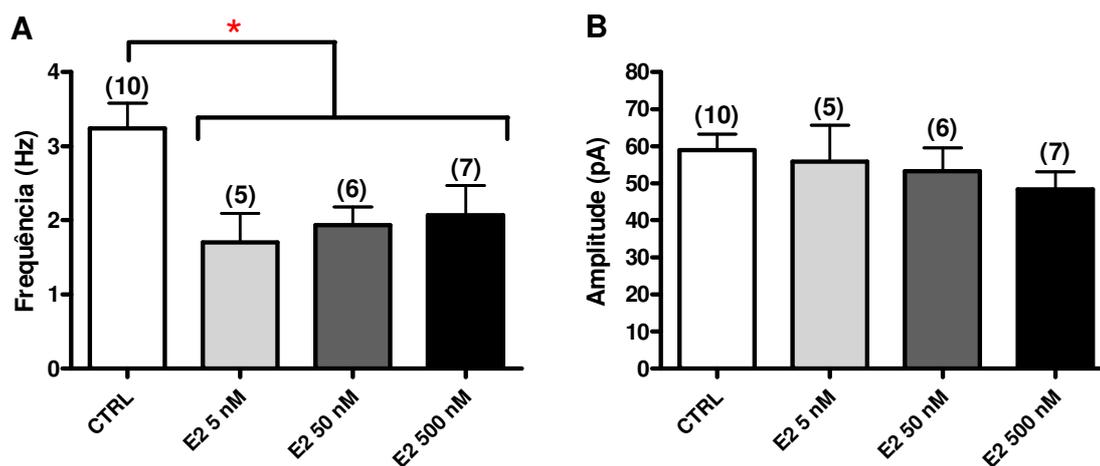


**Figura 10 – Efeitos do veículo do E2 (etanol 0,005%) sobre a amplitude média (A) e frequência média (B) das sPSCs dos neurônios do NCM.** Os números entre os parênteses indicam o número de neurônios registrados.  $p > 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

Em nossos experimentos, testamos três concentrações de E2 (5, 50 e 500 nM) sobre as sPSCs (figura 11) para determinarmos a concentração mais efetiva. Observamos que o E2 foi capaz de inibir significativamente a frequência média das sPSCs nas três concentrações testadas de forma similar (de [CTRL:  $3,24 \pm 0,33$  Hz;  $n = 10$ ] para [E2 5 nM:  $1,70 \pm 0,39$  Hz;  $n = 5$ ]; [E2 50 nM:  $1,93 \pm 0,24$  Hz;  $n = 6$ ]; [E2 500 nM:  $2,07 \pm 0,39$  Hz;  $n = 7$ ];  $p < 0,05$ ). Por outro lado, as três concentrações de E2 supracitadas não afetaram de maneira significativa a amplitude média das sPSCs (de [CTRL:  $58,96 \pm 4,32$  pA;  $n = 10$ ] para [E2 5 nM:  $55,90 \pm 9,78$  pA;  $n = 5$ ]; [E2 50 nM:  $53,32 \pm 6,22$  pA;  $n = 6$ ]; [E2 500 nM:  $48,34 \pm 4,75$  pA;  $n = 7$ ];  $p > 0,05$ ) (figura 12, painéis A e B, respectivamente).



**Figura 11** - Traçado representativo do registro das sPSCs de um neurônio do NCM antes e após a aplicação de E2 (500 nM). O traçado superior mostra o registro na situação CONTROLE (aCSF), enquanto o traçado inferior mostra o registro na presença de 500 nM de E2.



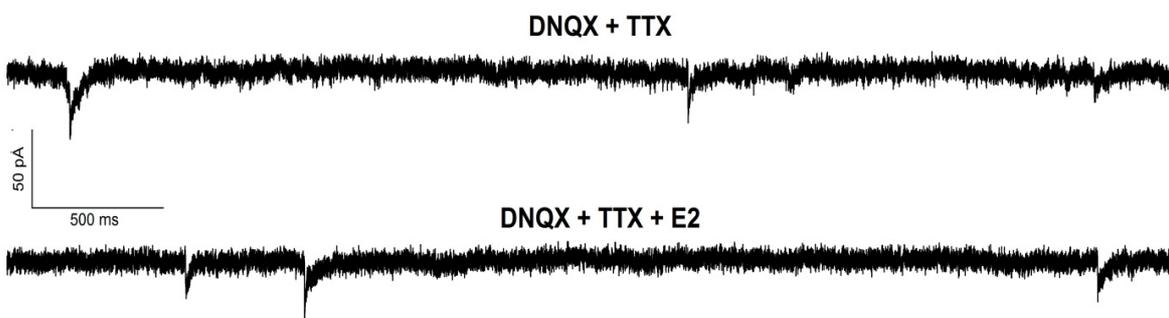
**Figura 12** – Efeitos da aplicação de E2 (5, 50 e 500 nM) sobre a amplitude média (A) e frequência média (B) das sPSCs dos neurônios do NCM. \* $p < 0,05$ ; teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

Tendo em vista a semelhança dos efeitos do E2 nas três concentrações testadas sobre a frequência média das sPSCs, optamos por utilizar a concentração máxima de E2 (500 nM) nos experimentos subsequentes.

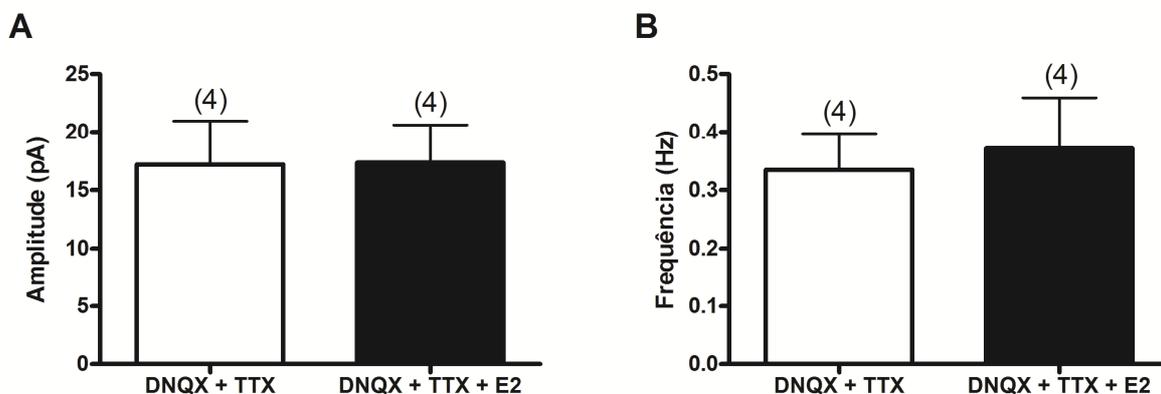
#### **4.2.1. Efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre as correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (mIPSCs) no NCM caudal**

Decidimos investigar qual seria o mecanismo pelo qual o E2 estaria alterando a frequência média das sPSCs, uma vez que essas alterações ou tiveram origem pela ação do E2 na probabilidade de liberação de neurotransmissores ou por meio de alterações na excitabilidade celular dos neurônios registrados, alterando a probabilidade do disparo de PAs. Investigamos então o efeito da aplicação do E2 sobre as correntes pós-sinápticas em miniatura (mPSCs) utilizando o bloqueador de canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem tetrodotoxina (TTX), o qual impede o disparo de PAs. A maioria das sPSCs no NCM são GABAérgicas, devido a sua sensibilidade à aplicação do antagonista dos receptores tipo GABA<sub>A</sub>, bicuculina (BIC) (PINAUD et al., 2008) e, pela frequência das sPSCs não dependerem da excitação glutamatérgica (PINAUD et al., 2008). O efeito observado do E2 em inibir a frequência média das sPSCs no NCM foi maior do que a fração das sPSCs que é atribuída a neurotransmissão glutamatérgica nesse núcleo (PINAUD et al., 2008; DAGOSTIN, 2008) e, dessa maneira, muito provavelmente o E2 está atuando na neurotransmissão GABAérgica no NCM. Confirmando essa hipótese, Tremere et al. (2009) observaram que o E2 inibe as sIPSCs no NCM de *zebra finches*. Isolamos então as mPSCs GABAérgicas por meio do antagonista dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos tipo AMPA/kainato (DNQX) (figura 13). Observamos que a aplicação de E2 não alterou significativamente a amplitude média (de 17,20  $\pm$  3,75 pA para 17,35  $\pm$  3,25 pA; n = 4; p > 0,05) e nem a frequência média (de 0,33  $\pm$  0,06 Hz para 0,37  $\pm$  0,08 Hz; n = 4; p > 0,05) das correntes inibitórias pós-

sinápticas em miniatura (mIPSCs) no NCM caudal dos *zebra finches* (figura 14, painéis A e B, respectivamente).



**Figura 13 – Traçado representativo das correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (mIPSCs) de um neurônio do NCM.** O traçado superior mostra um registro na situação CONTROLE (TTX 1  $\mu$ M + DNQX 10  $\mu$ M), enquanto o traçado inferior mostra o efeito da aplicação de 500 nM de E2 (também na presença de TTX 1  $\mu$ M + DNQX 10  $\mu$ M) sobre a neurotransmissão quantal GABAérgica. Todos os registros das mIPSCs foram realizados com o  $E_m$  fixado em -70 mV e os microeletrodos continham CsCl como soluto principal.



**Figura 14 - Efeitos da aplicação de 500 nM de E2 sobre a amplitude média (A) e frequência média (B) das mIPSCs dos neurônios do NCM.**  $p > 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

Assim, podemos inferir que o E2 não deve afetar os mecanismos de liberação vesicular das sinapses GABAérgicas e, que o efeito inibitório do E2 sobre as sPSCs deve ser sobre a excitabilidade neuronal, reduzindo a frequência do disparo de PAs dos neurônios GABAérgicos.

### 4.3. Efeitos do $17\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal do NCM caudal

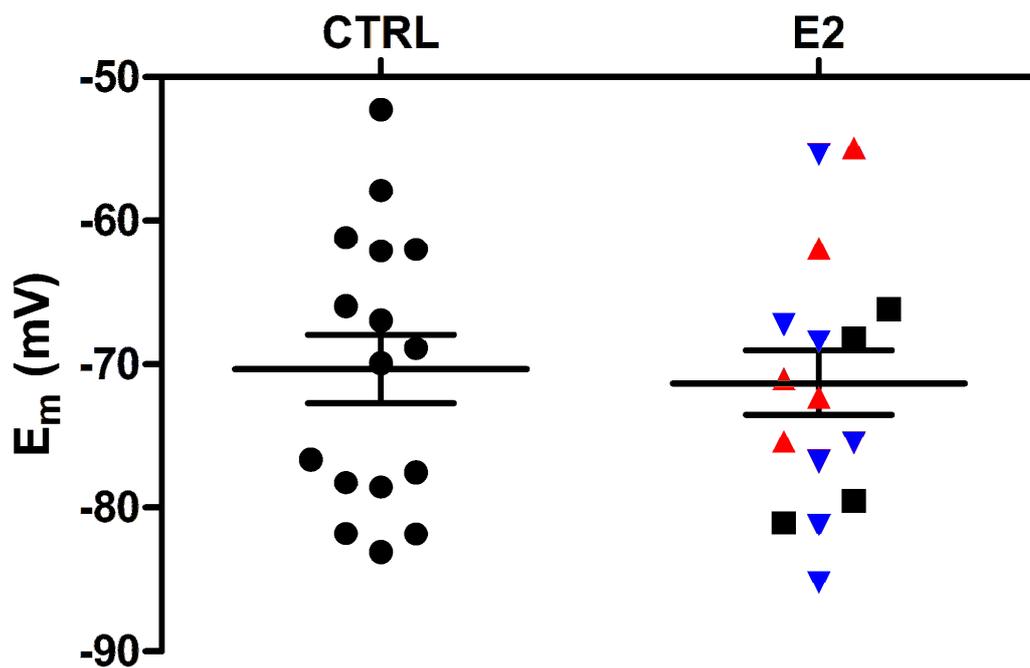
#### 4.3.1. Efeitos do E2 sobre as propriedades elétricas passivas dos neurônios do NCM caudal

Para estudar os efeitos do E2 sobre a excitabilidade dos neurônios do NCM caudal, realizamos registros na modalidade de *current-clamp* para avaliar as propriedades elétricas passivas (potencial de membrana no repouso e resistência de entrada da membrana) dos neurônios do NCM caudal. Em um primeiro momento, analisamos o efeito do E2 sobre o potencial de membrana no repouso ( $E_m$ ) de todos os neurônios registrados. Observamos, por meio de uma média, que o  $E_m$  dos neurônios após a aplicação de E2 não sofreram alterações significativas (de  $-70,30 \pm 2,40$  mV para  $-71,28 \pm 2,22$  mV,  $n = 16$ ,  $p > 0,05$ ) (figura 15), mas ao analisarmos a dispersão dos valores do  $E_m$  desses neurônios, verificamos que os mesmos apresentaram respostas variadas ao E2, embora nenhum critério *a priori* tenha sido proposto ao registrarmos esses neurônios. Na seqüência, nos permitimos separar esses neurônios de acordo com as características do  $E_m$ .

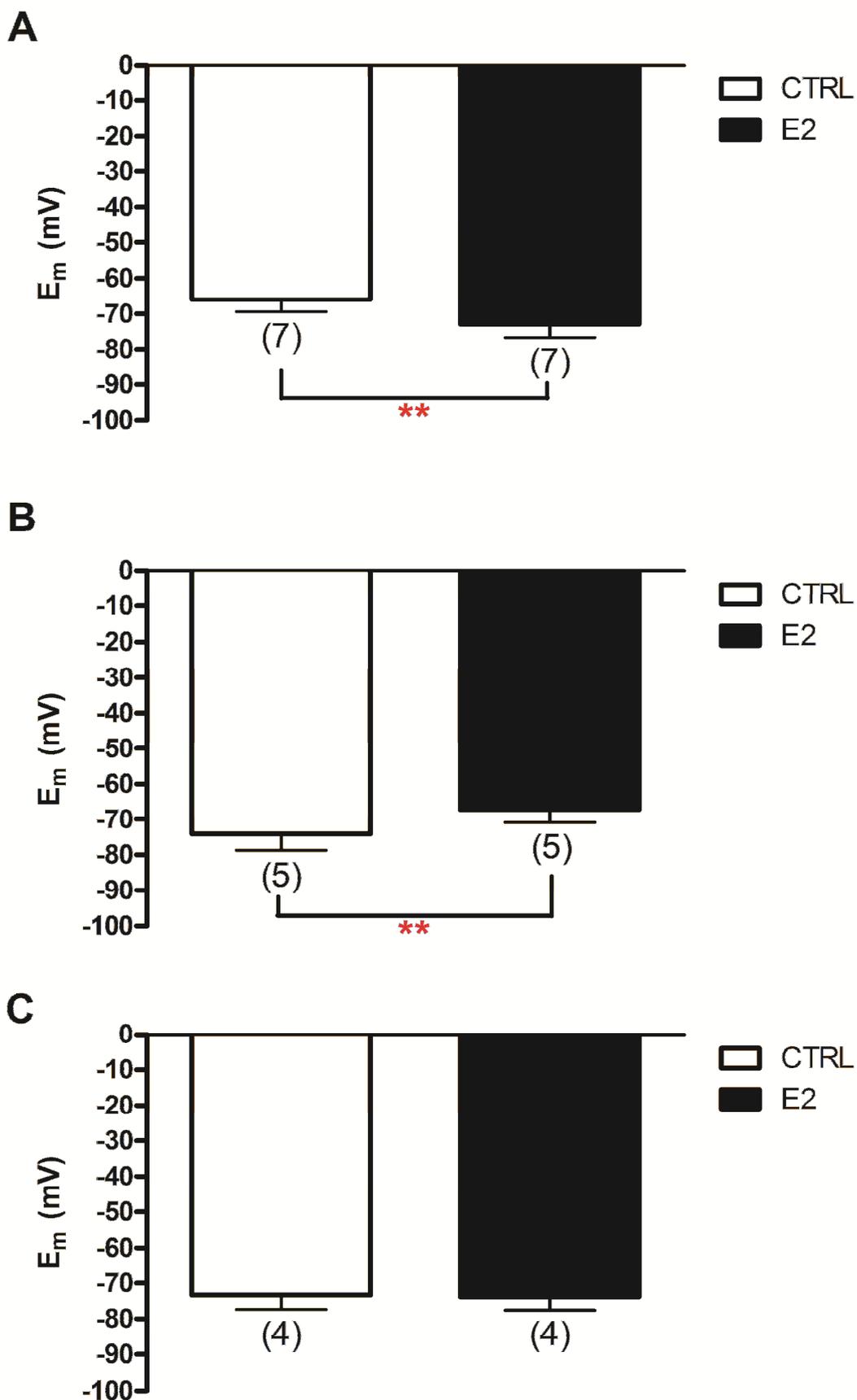
Observamos que a aplicação de E2 resultou em efeitos rápidos e distintos sobre o  $E_m$  desses neurônios (figura 16). Em um grupo de neurônios, o E2 exerceu efeitos hiperpolarizantes sobre o  $E_m$  (de  $-65,89 \pm 3,50$  mV para  $-72,84 \pm 3,78$  mV;  $n = 7$ ;  $p < 0,01$ ) (figura 16, painel A), enquanto em outro grupo de neurônios, o E2 exerceu um efeito oposto, despolarizando a membrana dos mesmos (de  $-74,07 \pm 4,65$  mV para  $-67,11 \pm 3,78$  mV;  $n = 5$ ;  $p < 0,01$ ) (figura 16, painel B). Em quatro células registradas, o E2 não causou alterações sobre o  $E_m$

(CTRL:  $-73,32 \pm 4,02$  mV;  $n = 4$ ;  $p > 0,05$ ; E2:  $-73,76 \pm 3,82$  mV;  $n = 4$ ;  $p > 0,05$ )

(figura 16, painel C).



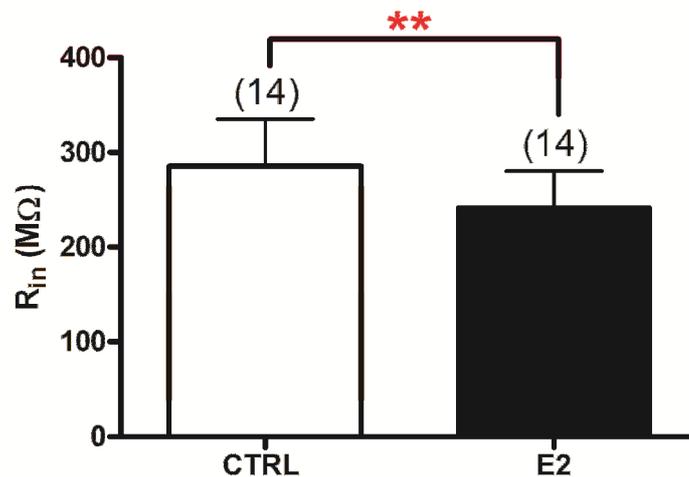
**Figura 15 – Efeitos do E2 sobre o potencial de membrana no repouso dos neurônios do NCM caudal.** Nota-se que na média o E2 não alterou o  $E_m$  de maneira significativa. Separando os neurônios pelas características dos valores do  $E_m$  após a aplicação de E2: triângulo invertido azul – efeito hiperpolarizante; triângulo vermelho – efeito despolarizante e quadrado preto – sem alterações.  $p > 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.



**Figura 16 – Efeitos do E2 sobre o potencial de membrana no repouso dos neurônios NCM caudal segregados em relação às características dos valores do  $E_m$ .** Podemos observar os efeitos distintos que o E2 gerou sobre o  $E_m$  dessas células: em A, um efeito hiperpolarizante; em B, um efeito despolarizante e em C, a ausência de alterações. \*\*  $p < 0,01$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

Tendo em vista que o E2 alterou o  $E_m$  desses neurônios, decidimos investigar quais seriam os efeitos do E2 sobre a resistência de entrada ( $R_{in}$ ) desses neurônios, uma vez que a resistência de uma membrana está diretamente relacionada à voltagem transmembrana da mesma ( $R = V/I$ ).

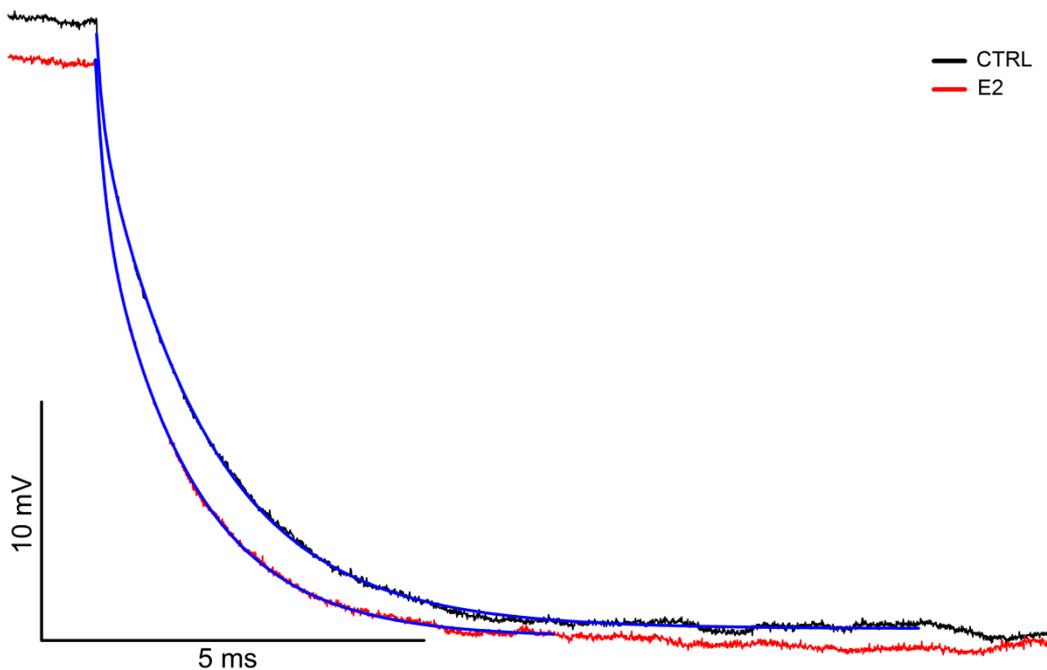
A figura 17 mostra que o E2 reduziu a  $R_{in}$  da maioria dos neurônios registrados quando aplicamos 500 nM de E2 ao banho (de  $285,8 \pm 49,04 \text{ M}\Omega$  para  $241,7 \pm 38,94 \text{ M}\Omega$ ;  $n = 14$ ;  $p < 0,01$ ).



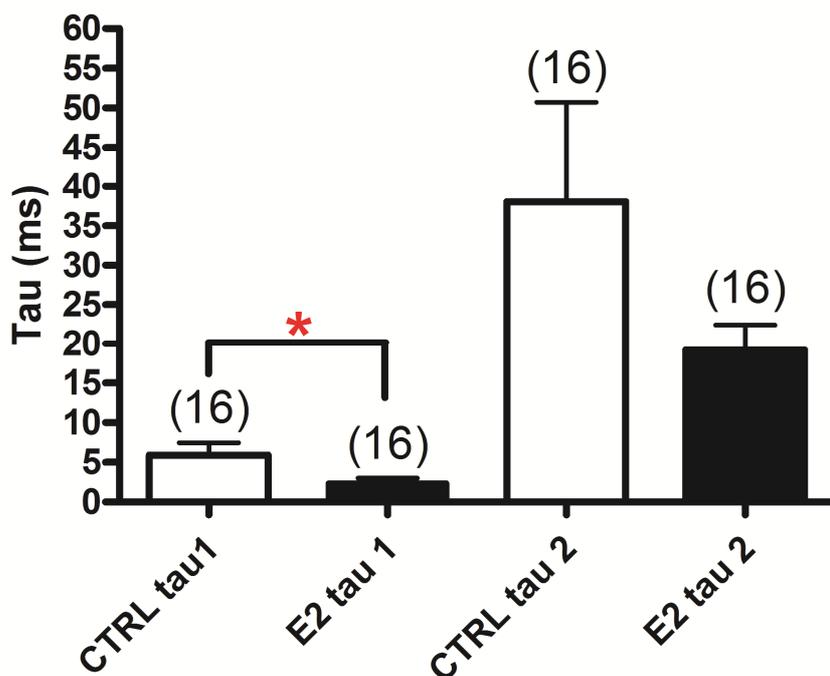
**Figura 17 – Efeitos do E2 sobre a resistência de entrada ( $R_{in}$ ) dos neurônios do NCM caudal. \*\*  $p < 0,01$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.**

Sabendo que a  $R_{in}$  está diretamente relacionada com a constante de tempo da membrana ( $\tau$ ), decidimos averiguar se a aplicação de 500 nM de E2 alteraria o tempo para o decaimento exponencial da voltagem transmembrana após a injeção de pulsos de corrente hiperpolarizantes nos neurônios do NCM. Tendo em vista as alterações promovidas pelo E2 na  $R_{in}$  dos neurônios do NCM e, lembrando que  $R_m \times C_m = \tau$  da membrana, onde a capacitância de um

neurônio dificilmente muda, já era esperada alguma alteração no tau desses neurônios. Pelo ajuste da fase de decaimento do potencial de membrana com uma função exponencial dupla (figura 18), é possível obter os valores dos componentes rápidos e lentos do tempo desse decaimento (tau 1 e tau 2, respectivamente). O E2 reduziu significativamente o tau rápido (de  $5,93 \pm 1,53$  ms para  $2,41 \pm 0,62$  ms;  $n = 16$ ;  $p < 0,05$ ), enquanto que o tau lento não sofreu alterações significativas (de  $38,10 \pm 12,61$  ms para  $19,16 \pm 3,25$  ms;  $n = 16$ ;  $p > 0,05$ ) (figura 19).



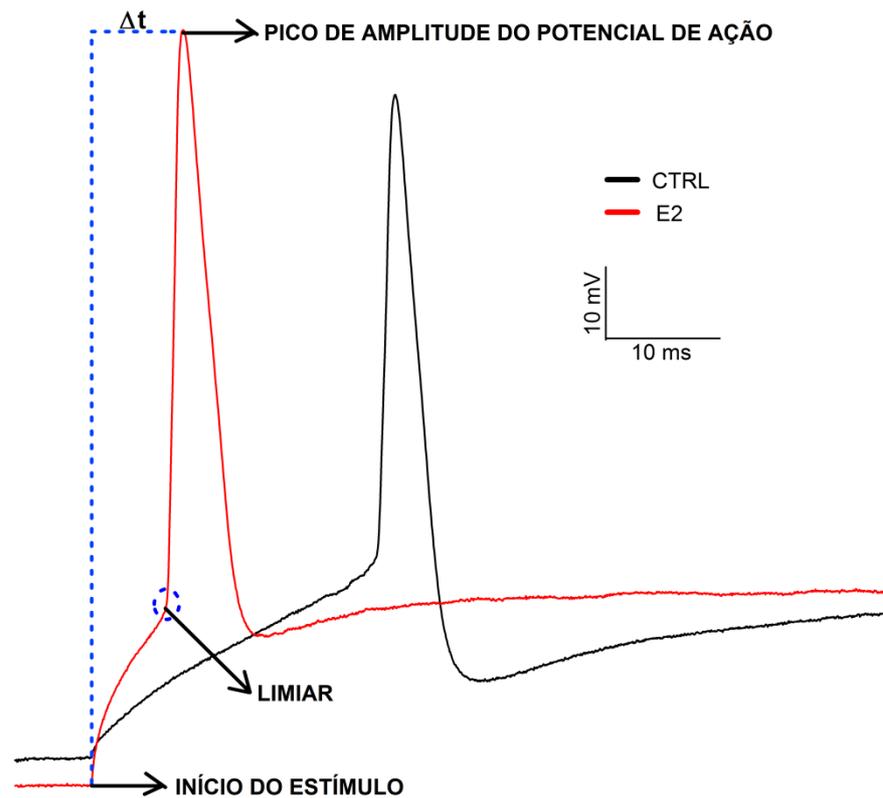
**Figura 18 – Registros demonstrativos do tempo do decaimento exponencial do  $E_m$  (tau) de um neurônio do NCM caudal.** Foram injetados pulsos de corrente hiperpolarizantes e então calculadas as constantes de tempo (tau) antes (traçado preto) e depois (traçado vermelho) da aplicação de 500 nM de E2 ao banho. Os traçados em azul mostram o ajuste realizado por uma função exponencial dupla, de onde foram extraídos os valores do tau rápido e lento.



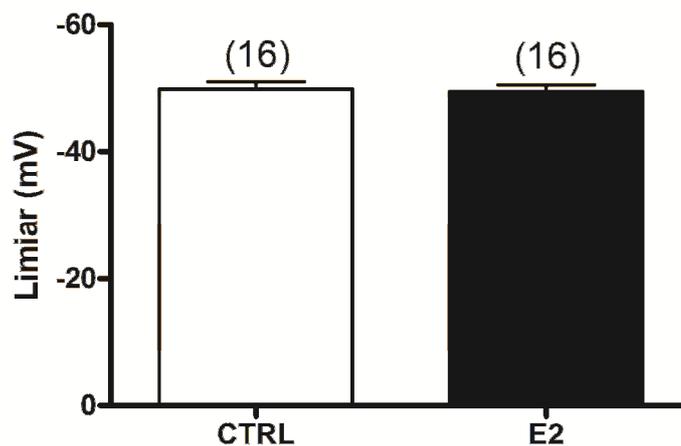
**Figura 19 – Efeitos do E2 sobre a constante de tempo da membrana (tau) após a aplicação de pulsos hiperpolarizantes de corrente nos neurônios do NCM caudal.** O gráfico mostra que a aplicação de 500 nM de E2 reduziu significativamente a constante de tempo rápida da membrana (tau 1), enquanto a constante de tempo lenta da membrana (tau 2) não sofreu alterações significativas. \*  $p < 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

#### **4.3.2. Efeitos do E2 sobre os potenciais de ação dos neurônios do NCM caudal**

Para estudar os efeitos do E2 sobre as propriedades do PA dos neurônios do NCM caudal, foram injetados pulsos de corrente despolarizantes até que se atingisse o limiar para o disparo de PAs e, posteriormente analisamos os registros *offline* em relação ao limiar, à  $\Delta t$  entre o início do estímulo até o pico de amplitude do PA e também quanto ao pico de amplitude do PA (figura 20). Observamos que a aplicação de E2 não afetou o limiar para o disparo de PAs (de  $-49,94 \pm 1,14$  mV para  $-49,53 \pm 1,05$  mV;  $n = 16$ ;  $p > 0,05$ ) dos neurônios registrados (figura 21). Embora o E2 não tenha alterado o limiar desses neurônios, ele exerceu efeitos significativos sobre os dois outros parâmetros supracitados.

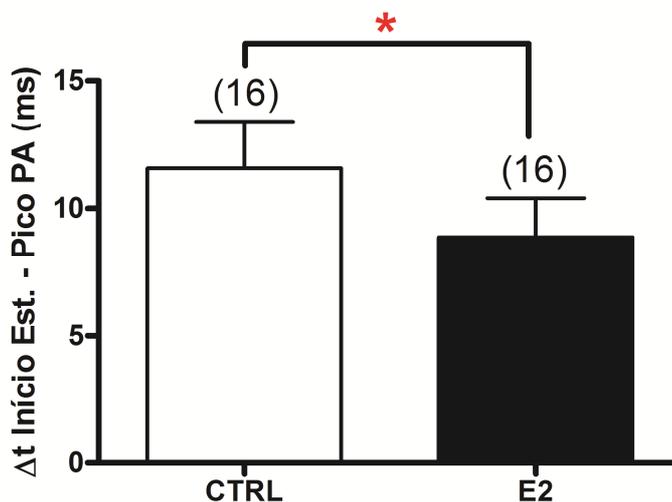


**Figura 20 – Registros demonstrativos do PA de um neurônio do NCM caudal indicando os parâmetros avaliados após a injeção de pulsos de corrente despolarizantes.** A figura mostra o efeito da aplicação de 500 nM de E2 (traçado vermelho) em relação ao registro CONTROLE (traçado preto) demonstrando que o E2 diminuiu o tempo para atingir o pico de amplitude do PA, assim como teve o efeito de aumentar o pico de amplitude do PA (relativo apenas aos neurônios cujo E2 hiperpolarizou o  $E_m$ ).



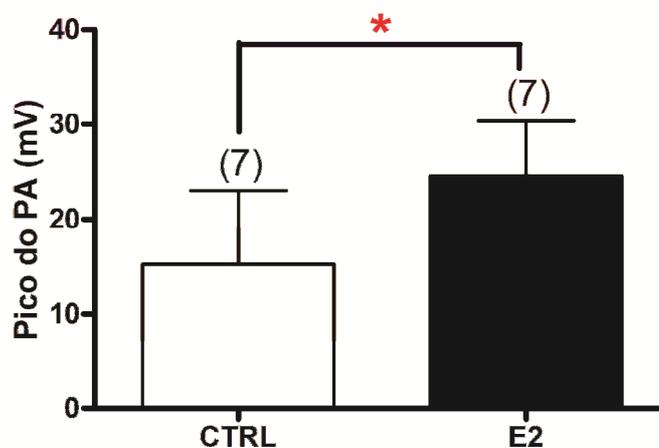
**Figura 21 – Efeito do E2 sobre o limiar para a deflagração de PA.** A figura mostra que a aplicação de 500 nM de E2 não alterou o limiar para o disparo de PAs nos neurônios da porção caudal do NCM.  $p > 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

A aplicação de E2 (500 nM) diminuiu de maneira significativa a  $\Delta t$  entre o início do estímulo até o pico de amplitude do PA (de  $11,57 \pm 1,83$  ms para  $8,88 \pm 1,52$  ms;  $n = 16$ ;  $p < 0,05$ ), tornando-os mais rápidos (figura 22).



**Figura 22** – Efeito do E2 sobre a variação do tempo a partir do início do estímulo (corrente despolarizante) até atingir o pico de amplitude do PA. \*  $p < 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

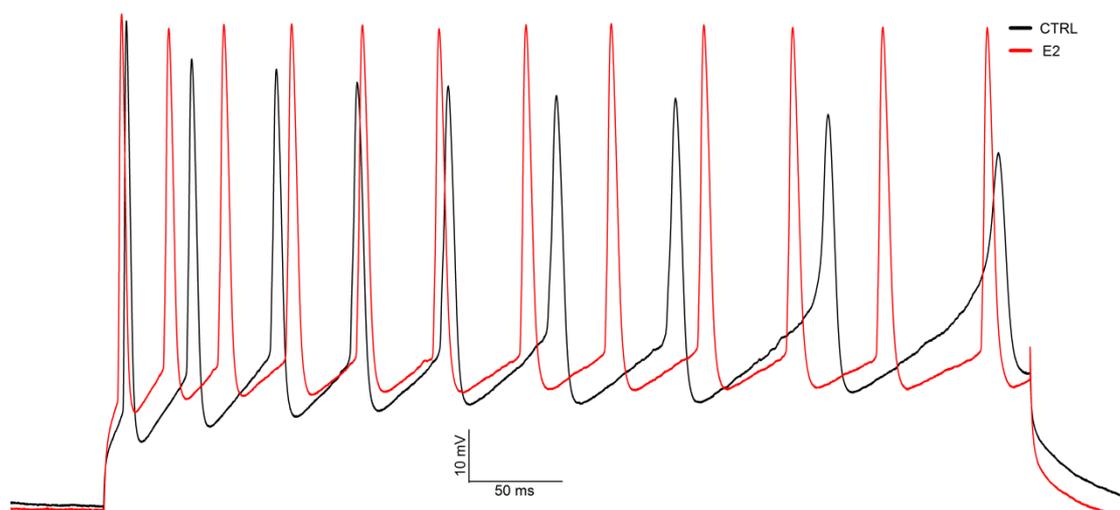
Além dos efeitos sobre o  $\Delta t$  até o pico de amplitude do PA, a aplicação de E2 aumentou de maneira significativa o pico de amplitude do PA (de  $15,22 \pm 7,83$  mV para  $24,57 \pm 5,79$  mV;  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ), embora esse efeito só tenha sido observado naqueles neurônios em que o E2 hiperpolarizou o  $E_m$  (figura 23).



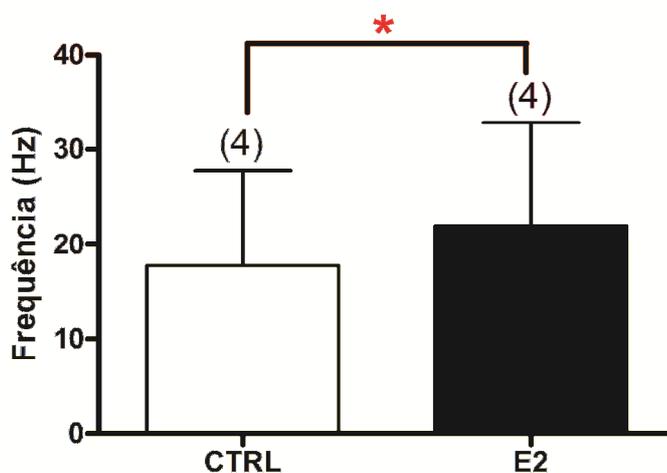
**Figura 23** – Efeito do E2 sobre o pico de amplitude do PA dos neurônios do NCM caudal. O aumento do pico de amplitude do PA promovido pelo E2 foi observado nos sete neurônios cujo  $E_m$  foi hiperpolarizado. \*  $p < 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

### 4.3.3. Efeitos do E2 sobre a frequência de disparos de PAs tônicos nos neurônios do NCM caudal

Curiosamente, em quatro neurônios registrados com perfil de PA tônico, a aplicação de 500 nM de E2 levou a um aumento da frequência de disparos de PA nos neurônios do NCM caudal (figura 24), alterando significativamente esse parâmetro (de  $17,75 \pm 10,02$  Hz para  $22,00 \pm 10,86$  Hz;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ) (figura 25).



**Figura 24 – Registro demonstrativo de PAs com perfil tônico.** A figura mostra que a aplicação de 500 nM de E2 (traçado vermelho) aumentou a frequência de disparos de PA em relação ao registro CONTROLE (traçado preto).



**Figura 25 - Efeito do E2 sobre a frequência de disparos de PA pelos neurônios do NCM caudal cujo perfil de disparo era tônico.** \*  $p < 0,05$ ; teste t pareado de Student. As barras representam médias  $\pm$  EPM.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Aspectos gerais da neurotransmissão espontânea do NCM

Usando registros eletrofisiológicos na modalidade de *voltage-clamp*, na configuração *whole-cell*, podemos observar correntes pós-sinápticas espontâneas (sPSCs) com relativa facilidade no NCM (figura 8). Pinaud et al. (2004) demonstraram previamente que o NCM possui ao menos duas populações distintas de neurônios identificadas de acordo com os neurotransmissores que eles produzem e liberam e, estas populações eram compostas por neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos. Adicionalmente, estudos reportados por Dagostin (2008) demonstraram que o GABA (responsável pelas sIPSCs) e o glutamato (responsável pelas sEPSCs) são os neurotransmissores predominantes na neurotransmissão espontânea dos neurônios desse núcleo e, que em termos de contribuição percentual, as correntes GABAérgicas são dominantes no NCM. Outro dado importante é que essas correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (sIPSCs) são dependentes do disparo de potenciais de ação (PAs) pelos neurônios que fazem sinapse com o neurônio registrado para ocorrerem, devido a sua sensibilidade à tetrodotoxina (TTX). Em contrapartida, as correntes pós-sinápticas espontâneas em miniatura desse núcleo são mais abundantes em seu componente excitatório, pois quando correlacionados os EPSCs com os mEPSCs, esses não diferem estatisticamente quanto à amplitude e a frequência das correntes, indicando que os sEPSCs são na verdade eventos quantais que ocorrem sem a necessidade de PAs. Além disso, a aplicação do antagonista dos

receptores ionotrópicos glutamatérgicos o tipo AMPA/kainato (DNQX) não mostra efeito em inibir as sPSCs no NCM (DAGOSTIN, 2008; PINAUD et al., 2008).

Fundamentados nos estudos reportados por Dagostin (2008) e Pinaud et al. (2008), passamos a analisar os efeitos do E2 sobre a neurotransmissão do NCM, visto as escassas informações sobre o papel desse estrógeno no funcionamento da circuitaria neuronal desse núcleo.

## **6.2. Efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a neurotransmissão espontânea no NCM caudal**

No NCM dos *zebra finches* são encontrados receptores para E2 (GAHR et al., 1993), assim como a enzima envolvida na conversão da testosterona em E2, a aromatase (AROM), presente principalmente na porção caudal desse núcleo (SALDANHA et al., 2000, 2005; PETERSON et al., 2005; PINAUD et al., 2006). Primeiramente, nos coube verificar qual seria a concentração mais efetiva de E2 a ser aplicada sobre os neurônios do NCM caudal. Observamos que o E2 reduziu significativamente a frequência média das sPSCs nas três concentrações (5, 50 e 500 nM) testadas, embora não tenha exercido efeitos significativos sobre a amplitude média dessas correntes (figura 12). Há muita discussão a respeito de qual a concentração de E2 teria função fisiológica significativa no SNC, uma vez que as concentrações plasmáticas de E2 em ambos os sexos de *zebra finches* encontra-se aproximadamente em 500 pM, embora recentemente Remage-Healey et al. (2008) demonstraram que a concentração local de E2 no NCM estava em torno de 55 pM, aumentando rapidamente para 92 pM durante interações sociais entre *zebra finches* em experimentos *in vivo*. Em contrapartida,

a concentração efetiva de E2 ao nível sináptico (em sinapses aromatase-positivas) pode ser bem maior do que aquela verificada no plasma ou no cérebro como um todo nos *zebra finches*, destacando a elevada expressão de AROM no soma, nas fibras axonais e nos botões sinápticos dos neurônios do NCM, sugerindo uma grande produção ao nível sináptico de E2 mediada pela conversão de andrógenos circulantes. Além disso, os níveis de E2 na veia jugular são maiores que na artéria carótida de *zebra finches* machos, sugerindo que o E2 produzido no cérebro é realmente liberado para o corpo todo (SCHLINGER & ARNOLD, 1992), de acordo com trabalhos onde é reportado que o cérebro dessa ave é o principal local de síntese de E2 desse animal (SCHLINGER & ARNOLD, 1991; SCHLINGER & LONDON, 2006). Assim, embora as três concentrações de E2 por nós testadas tenham tido efeitos similares, optamos por utilizar a concentração de 500 nM de E2 em todos os experimentos subseqüentes. Em nossos experimentos, a aplicação de E2 reduziu significativamente a frequência média das correntes espontâneas dos neurônios do NCM caudal (figura 12), corroborando com os achados de Tremere et al. (2009), os quais demonstraram que a aplicação de E2 rapidamente reduz a frequência das correntes GABAérgicas espontâneas. A partir desse conjunto de informações, duas questões foram levantadas quanto aos efeitos do E2 observados no NCM: (1) o E2 poderia estar alterando os mecanismos de liberação vesicular dos neurônios GABAérgicos e/ou (2) alterando a excitabilidade da membrana desses neurônios.

### **6.2.1. Efeitos do $17\beta$ -estradiol sobre as correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (mIPSCs) no NCM caudal**

Com o objetivo de verificar se o E2 estaria alterando os mecanismos de liberação vesicular de GABA nos neurônios do NCM, isolamos farmacologicamente a neurotransmissão em miniatura GABAérgica desses neurônios, por meio da aplicação de TTX e DNQX (figura 13). Observamos que o E2 não alterou a amplitude e nem a frequência média das mIPSCs dos neurônios desse núcleo (figura 14), em contraposição ao que foi demonstrado por Tremere et al. (2009), os quais reportaram que o E2 reduziu a frequência média das mIPSCs no NCM. É interessante notar que as mIPSCs observadas no NCM são bem menos frequentes do que as sIPSCs, não estando de acordo com o que foi demonstrado por Tremere et al. (2009), onde a frequência das mIPSCs reportada por eles correspondem a frequência das sIPSCs observadas em nossos experimentos. De acordo com nossos dados, o E2 não deve estar alterando os mecanismos de liberação de GABA pelos neurônios desse núcleo, levando-nos a investigar se o E2 afetaria a excitabilidade dos neurônios da porção caudal do NCM dos *zebra finches*, uma vez que a probabilidade de liberação vesicular desses neurônios não foi afetada. Então, para tentar elucidar os mecanismos pelo qual o E2 diminuiu a frequência média das sPSCs (figura 12), nos interessou investigar como o E2 poderia estar alterando a excitabilidade celular dos neurônios registrados, fato que explicaria, ao menos em parte, a redução na frequência das sPSCs observadas.

### 6.3. Efeitos do $17\beta$ -estradiol sobre a excitabilidade neuronal do NCM caudal

Nossos experimentos demonstraram que a aplicação de E2 na solução que banha as fatias cerebrais contendo o NCM provoca uma diminuição na  $R_{in}$  da membrana da maioria dos neurônios registrados (figura 17), além de promover um disparo mais rápido de um PA em resposta a um estímulo de corrente despolarizante (figura 22). Além disso, o E2 exerceu efeitos diversos sobre o  $E_m$  dos neurônios da porção caudal do NCM, onde em uma fração dos neurônios esses efeitos foram hiperpolarizantes, em outra fração dos neurônios registrados esses efeitos foram despolarizantes e, ainda, em uma menor fração desses neurônios, o  $E_m$  não foi alterado (figura 16). Esses dados indicam que o E2 aumenta a condutância da membrana neuronal, possivelmente por diferentes mecanismos de ação, entretanto os dados apresentados ainda são pouco esclarecedores de como o E2 atua para promover esses efeitos rápidos sobre a excitabilidade celular. Outro fator que dificulta a elucidação dos efeitos observados é a heterogeneidade morfológica dos neurônios do NCM (figura 4).

Estudos em andamento em nosso laboratório têm demonstrado que os neurônios da região caudal do NCM se comportam de maneira distinta quando despolarizados por aplicações de correntes que induzem a deflagração de PAs (comunicação pessoal – Dagostin, 2009). Esses neurônios disparam três tipos de PA, podendo ser apenas um PA (neurônios fásicos - tipo I), ou disparam alguns PAs e cessam esse disparo logo em seguida (neurônios acomodativos – tipo IIa), ou ainda alguns neurônios que disparam PAs de forma ininterrupta (neurônios tônicos – tipo IIb) após a aplicação de pulsos de corrente despolarizantes. Esses padrões de disparo de PA exibidos pelos neurônios do NCM caudal também

foram observados em nossos experimentos, onde a grande maioria dos PAs foram do tipo fásico e, também observamos quatro neurônios com perfil de disparo de PA tônico, onde o E2 de maneira interessante aumentou a frequência média do disparo de PA nesses neurônios (figuras 24 e 25). Essa variedade nos perfis do disparo de PA pelos neurônios do NCM caudal, assim como os efeitos do E2 em hiperpolarizar e despolarizar o  $E_m$  desses neurônios (figura 16, painéis A e B, respectivamente), podem ser um indicativo de que o E2 possa estar modulando diferentes tipos de canais iônicos, ou ainda que distintas populações de canais iônicos estejam presentes nestes neurônios.

### ***6.3.1. Efeitos do E2 sobre as propriedades elétricas passivas dos neurônios do NCM caudal***

A aplicação de 500 nM de E2 no banho que continha o NCM dos *zebra finches* rapidamente alterou o potencial de membrana dos neurônios desse núcleo, demonstrando dois efeitos opostos. Em uma fração dos neurônios o E2 causou hiperpolarização do  $E_m$ , enquanto em outra fração de neurônios o  $E_m$  foi despolarizado (figura 16, painéis A e B, respectivamente). Esses dados corroboram com a literatura que há muito tempo reporta efeitos rápidos do E2 em vários tipos celulares, inclusive neurônios. Diversos grupos de pesquisa estudam a vários anos os efeitos rápidos do E2 (KELLY & WAGNER, 1999; KELLY et al., 2003; RONNEKLEIV & KELLY, 2005; BRYANT et al., 2005), principalmente em neurônios hipotalâmicos e hipocámpais de roedores, sendo estas as principais fontes sobre os possíveis mecanismos de ação rápidos do E2 (KELLY et al., 2003; SHINGO & KITO, 2005; KELLY & RONNEKLEIV, 2008). Evidências

sugerem que o E2 pode agir por meio de múltiplos mecanismos de ação iniciados na superfície da membrana neuronal, podendo modular várias vias de sinalização intracelular, incluindo aquelas em que estão envolvidas os segundos-mensageiros como PKA, PKC, MAPK e PLC (ZHOU et al., 1996; KELLY et al., 1999; ZHAO et al., 2005), onde em última instância essas cascatas de sinalização intracelular promovem a modulação de canais iônicos (inclusive os de K<sup>+</sup>) (ROEPKE et al., 2007), receptores e vários fatores de transcrição (WATTERS & DORSA, 1998; WENG et al., 1999; DEISSEROTH et al., 2003; WALTEREIT & WELLER, 2003; THOMAS & HUGANIR, 2004; TORAN-ALLERAND, 2004). Possíveis receptores de membrana próprios para o E2 são atualmente alvo de muita especulação, sendo ainda um assunto muito controverso e, dentre os possíveis candidatos à receptores de membrana para E2, estão incluídos os receptores clássicos ER $\alpha$  e ER $\beta$  (possivelmente acoplados a proteínas G) e GPR30 (receptor órfão descrito recentemente), com os quais o E2 poderia interagir para exercer os seus efeitos rápidos sobre a eletrofisiologia dos neurônios do SNC, incluindo os efeitos rápidos sobre o E<sub>m</sub> observados em nossos experimentos. A estimulação das fibras dos colaterais de Schaffer em fatias do hipocampo de ratos também demonstrou efeitos rápidos do E2 em potencializar as EPSPs mediadas por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (FOY et al., 1999) e, também foi demonstrado que neurônios da região CA1 do hipocampo quando expostos ao E2 exibiram uma excitação mediada por receptores glutamatérgicos do tipo kainato via ativação da cascata de sinalização envolvendo cAMP/PKA (GU & MOSS, 1996; 1998; GU et al., 1999), sugerindo que exista algum receptor de membrana acoplado a proteína G<sub>s</sub> onde o E2 possa interagir para mediar esses efeitos no hipocampo de ratos.

Quando analisamos os efeitos do E2 sobre a  $R_{in}$  e a constante de tempo da membrana ( $\tau$ ) ( $R_{in}$  e  $\tau$  são grandezas diretamente proporcionais) observamos que o E2 reduziu significativamente a  $R_{in}$  da maioria dos neurônios registrados (figura 17) e também o  $\tau$  rápido dos neurônios do NCM caudal (figura 19) e, de acordo com a lei de Ohm (onde o potencial transmembrana é diretamente proporcional ao produto da resistência pela corrente), quanto maior a  $R_{in}$ , menor é a corrente (inibitória ou excitatória) necessária para gerar uma variação no  $E_m$ . Assim, como o E2 reduziu a  $R_{in}$  desses neurônios, aumentando a condutância da membrana dos mesmos, possivelmente o E2 deve estar modulando algum canal de  $K^+$ , uma vez que esses canais estão envolvidos nos processos de regulação do  $E_m$  e dos PAs.

### ***6.3.2. Efeitos do E2 sobre os potenciais de ação dos neurônios do NCM caudal***

Nossos experimentos demonstraram que o E2 tornou os PAs dos neurônios da porção caudal do NCM mais rápidos em resposta a aplicações de corrente despolarizantes (figura 22), além de aumentar o pico de amplitude do PA nos neurônios que tiveram o  $E_m$  hiperpolarizado após a aplicação do E2 (figura 23). Tendo em vista a grande variedade de canais de  $K^+$  presentes nas membranas celulares, talvez estes sejam os possíveis alvos da modulação do E2, o que justificaria, ao menos em parte, os efeitos do E2 observados nas propriedades passivas de membrana e de PA dos neurônios do NCM. A principal função atribuída aos canais de  $K^+$  é deprimir a excitação, pois quando abertos tendem a aproximar o  $E_m$  da célula ao potencial de equilíbrio eletroquímico do íon

$K^+$ , que no caso é mais negativo que os  $E_m$  comumente observados nos neurônios do SNC. Os canais de  $K^+$  também ajustam o  $E_m$ , mantêm os PAs mais curtos, encerram períodos de atividade neuronal intensa, além de determinar o intervalo de tempo entre os PAs durante disparos repetitivos (HILLE, 2001).

Estudos em nosso laboratório (comunicação pessoal – DAGOSTIN, 2009) indicam a presença de correntes de  $K^+$  do tipo A (atuam no controle do disparo do PA, diminuindo a frequência destes) e retificadoras retardadas (atuam na repolarização da membrana após um disparo de PA), além de correntes de  $K^+$  do tipo “leak” (vazantes), as quais modulam a manutenção do  $E_m$ . Desta forma, em nossos experimentos o E2 poderia estar modulando ao menos parte dos canais de  $K^+$  supracitados, fornecendo substrato para os efeitos sobre o  $E_m$  e PA observados.

### ***6.3.3. Efeitos do E2 sobre a frequência de disparos de PAs tônicos nos neurônios do NCM caudal***

Em quatro neurônios registrados na porção caudal do NCM, observamos PAs com perfil de disparoônico (figura 24), onde o E2 modulou a frequência de disparo dos mesmos, aumentando significativamente a frequência média de disparo destes PAs (figura 25). Assim, analisando esses efeitos do E2 sobre os disparos de PA do tipoônico desses neurônios, surge um indicativo de que o E2 possa estar modulando correntes de  $K^+$  do tipo A, impedindo que esses canais se abram e conseqüentemente permitindo que haja um aumento na frequência do disparo de PAs, ou ainda modulando correntes do tipo  $I_h$  mediadas por canais

ativados por hiperpolarização, os quais são canais iônicos não-seletivos a cátions monovalentes.

Com a finalidade de consolidar essas observações preliminares, serão necessários mais experimentos que visem isolar as correntes mediadas pelos canais de  $K^+$  e testar os possíveis efeitos que o E2 possa exercer sobre os mesmos, o que possivelmente nos proporcionará mais informações a respeito dos mecanismos pelos quais o E2 modula o  $E_m$  e aspectos dos PAs dos neurônios do NCM caudal.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados observados em nossos experimentos demonstraram que a rápida aplicação de E2 alterou a eletrofisiologia dos neurônios do NCM caudal. Dentre os parâmetros avaliados, verificamos que o E2 reduziu a frequência média das sPSCs e, ressaltando que estas correntes correspondem em sua maioria às sIPSCs (mediadas pelo neurotransmissor GABA), o E2 provavelmente exerceu os seus efeitos sobre canais iônicos, diminuindo a frequência das correntes GABAérgicas. O E2 não alterou a amplitude e nem a frequência das mIPSCs e, visto que a amplitude destas foi inalterada, provavelmente o E2 não influenciou a liberação de vesículas sinápticas GABAérgicas. Assim, o efeito do E2 sobre os neurônios do NCM deve ocorrer sobre a excitabilidade dos mesmos.

Analisando o  $E_m$  dos neurônios após a rápida aplicação de E2, verificamos que o E2 não alterou esse parâmetro, mas quando analisamos esses neurônios separadamente de acordo com a dispersão dos valores do  $E_m$ , encontramos efeitos significativos sobre eles, pois uma fração dos neurônios tiveram seu  $E_m$  hiperpolarizado, enquanto outros apresentaram uma despolarização em resposta ao E2. Corroborando com os achados sobre o  $E_m$ , o E2 também alterou a  $R_{in}$  dos neurônios do NCM caudal, indicando que canais iônicos foram modulados, possibilitando a passagem de correntes inibitórias e/ou excitatórias.

Em respeito às ações do E2 sobre o disparo dos PAs, observamos que o E2 não alterou o limiar para a deflagração dos mesmos, porém deixou os PAs mais rápidos e com o pico de amplitude maior, nos possibilitando sugerir alguma modulação de canais ativados por hiperpolarização. A possibilidade da

modulação de canais de  $K^+$  por esse estrógeno não deve ser descartada e, deverá ser investigada em experimentos futuros.

Para elucidar os mecanismos de ação pelos quais o E2 alterou a excitabilidade neuronal da porção caudal do NCM, mais experimentos serão necessários, tais como a aplicação de antagonistas do E2, além de uma investigação mais aprofundada sobre os efeitos deste esteróide sobre os receptores de membrana ionotrópicos e metabotrópicos se fará necessário para esclarecer os efeitos do E2 observados no NCM.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS-REGAN, E.; MANSUKHANI, V.; SEIWERT, C. & THOMPSON, R. (1994). Sexual differentiation of brain and behavior in the zebra finch: critical periods for effects of early estrogen treatment. *J. Neurobiol.*, **25**:865-877.
- BALTHAZART, J. & BALL, G. F. (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *TRENDS in Neurosci.*, **21**:243-249.
- BALTHAZART, J. (2004). Preoptic aromatase modulates male sexual behaviour: slow and fast mechanisms of action. *Physiol. Behav.*, **83**:247-270.
- BALTHAZART, J. & BALL, G. F. (2006). Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *TRENDS in Neurosci.*, **29**:241-249.
- BAPTISTA, L. & SCHUCHMANN, K. L. (1990). Song learning in the Anna's hummingbird, *Calypte anna*. *Ethology*, **84**:15-20.
- BAULIEU, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, **23**:963-987.
- BOLHUIS, J. J. & GAHR, M. (2006). Neural mechanisms of birdsong memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**:151-159.
- BOTTJER, S. W. (2005). Silent synapses in a thalamo-cortical circuit necessary for song learning in zebra finches. *J. Neurophysiol.*, **94**:3698-3707.
- BOUGHMAN, J. W. (1998). Vocal learning by greater Spear-nosed Bats. *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, **265**:227-233.
- BRENOWITZ, E. A.; MARGOLIASH, D. & NORDEEN, K. W. (1997a). An introduction to birdsong and the avian song system. *J. Neurobiol.*, **33**:495-500.
- BRENOWITZ, E. A. (1997b). Comparative approaches to the avian song system. *J. Neurobiol.*, **33**:517-531.
- BRINTON, R. D. (1993). Estrogen induction of rapid changes in the growth of cultured hippocampal nerve cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, **4**:36-46.

- BRYANT, D. N.; BOSCH, M. A.; RONNEKLEIV, O. K. & DORSA, D. M. (2005). 17 $\beta$ -estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. *Neuroscience*, **133**:343-352.
- CALLARD, C. V.; PETRO, Z. & RYAN, K. J. (1980). Aromatization of androgen to estrogen by cultured turtle brain. *Brain Res.*, **202**:117-130.
- CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T. & O'MALLEY, B. W. (1990). Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr. Rev.*, **11**:201-220.
- CHEW, S. J.; MELLO, C. V.; NOTTEBOHM, F.; JARVIS, E. D. & VICARIO, D. S. (1995). Decrements in auditory responses to a repeated conspecific song are long-lasting and require two periods of protein synthesis in the songbird forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:3406-3410.
- CHEW, S. J.; VICARIO, D. S. & NOTTEBOHM, F. (1996). A large-capacity memory system that recognizes the calls and songs of individual birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:1950-1955.
- CLAYTON, D. F. (1997). Role of gene regulation in song circuit development and song learning. *J. Neurobiol.*, **33**:549-571.
- CORNIL, C. A.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; DEJACE, C. & BALTHAZART, J. (2005). Sexual behavior affects preoptic aromatase activity and brain monoamines' levels. *Endocrinology*, **146**:3809-3820.
- CORNIL, C. A.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; BAILLIEN, M. & BALTHAZART, J. (2006a). Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. *Behav. Brain Res.*, **66**:110-123.
- CORNIL, C. A.; TAZIAUX, M.; BAILLIEN, M.; BALL, G. F. & BALTHAZART, J. (2006b). Rapid effects of aromatase inhibition on male reproductive behaviors in Japanese quail. *Horm. Behav.*, **49**:45-67.
- CORNIL, C. A.; BALL, G. F. & BALTHAZART, J. (2006c). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res.*, **1126**:2-26.
- COUSE, J. F. & KORACH, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.*, **20**:358-417.
- DEISSEROTH, K.; MERMELSTEIN, P. G.; XIA, H. & TSIEN, R. W. (2003). Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**:354-365.

- DEVOOGD, T. J. & NOTTEBOHM, F. (1981). Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult brain. *Science*, **214**:202-204.
- FORLANO, P. M.; SCHLINGER, B. A. & BASS, A. H. (2006). Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems. *Front. Neuroendocrinol.*, **27**:247-274.
- FOY, M. R.; XU, J.; XIE, X.; BRINTON, R. D.; THOMPSON, R. F. & BERGER, T. W. (1999).  $17\beta$ -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J. Neurophysiol.*, **81**:925-929.
- GAHR, M.; GUTTINGER, H. R. & KROODSMA, D. E. (1993). Estrogen receptors in the avian brain: survey reveals general distribution and forebrain areas unique to songbirds. *J. Comp. Neurol.*, **327**:112-122.
- GOBES, M. H. & BOLHUIS, J. J. (2007). Birdsong memory: a neural dissociation between song recognition and production. *Curr. Biology*, **17**:789-793.
- GOULD, E.; WOOLLEY, C. S.; FRANKFURT, M. & MCEWEN, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.*, **10**:1286-1291.
- GU, Q. & MOSS, R. L. (1996).  $17\beta$ -estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J. Neurosci.*, **16**:3620-3629.
- GU, Q. & MOSS, R. L. (1998). Novel mechanism for non-genomic action of  $17\beta$ -estradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, **506**:745-754.
- GU, Q.; KORACH, K. S. & MOSS, R. L. (1999). Rapid action of  $17\beta$ -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology*, **140**:660-666.
- GUINEE, L. N. & PAYNE, K. B. (1988). Rhyme-like repetitions in songs of Humpback Whales. *Ethology*, **79**:295-306.
- GURNEY, M. E. & KONISHI, M. (1980). Hormone-induced sexual differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Science*, **208**:1380-1383.
- GURNEY, M. E. (1982). Behavioral correlates of sexual differentiation in the zebra finch song system. *Brain Res.*, **231**:153-173.
- HILLE, B. (2001). Ionic Channels of Excitable Membranes. Massachusetts, Sinauer.

- JARVIS, E. D. & MELLO, C. V. (2000). Molecular mapping of brain areas involved in parrot vocal communication. *J. Comp. Neurol.*, **419**:1-31.
- KARTEN, H. J. (1997). Evolutionary developmental biology meets the brain: the origins of mammalian cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:2800-2804.
- KELLY, M. J.; MOSS, R. L. & DUDLEY, C. A. (1976). Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoretically applied estrogen during the estrous cycle. *Brain Res.*, **114**:152-157.
- KELLY, M. J.; MOSS, R. L. & DUDLEY, C. A. (1977). The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp. Brain Res.*, **30**:53-64.
- KELLY, M. J.; MOSS, R. L. & DUDLEY, C. A. (1978). The effects of ovariectomy on the responsiveness of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen. *Neuroendocrinology*, **25**:204-211.
- KELLY, M. J.; LAGRANGE, A. H.; WAGNER, E. J. & RONNEKLEIV, O. K. (1999). Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids*, **64**:64-75.
- KELLY, M. J. & WAGNER, E. J. (1999). Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *TRENDS Endocrinol. Metab.*, **10**:369-374.
- KELLY, M. J.; QIU, J.; WAGNER, E. J. & RONNEKLEIV, O. K. (2003). Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **83**:187-193.
- KELLY, M. J. & RONNEKLEIV, O. K. (2008). Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **290**:14-23.
- KLINGE, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.*, **29**:2905-2919.
- KOIKE, S.; SAKAI, M. & MURAMATSU, M. (1987). Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **15**:2499-2513.
- KONISHI, M. & AKUTAGAWA, E. (1985). Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain. *Nature*, **315**:145-147.

- KONISHI, M. & AKUTAGAWA, E. (1988). A critical period for estrogen action on neurons of the song control system in the zebra finch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:7006-7007.
- KUIPER, C. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:5925-5930.
- MANNELLA, P. & BRINTON, R. D. (2006). Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action. *J. Neurosci.*, **26**:9439-9447.
- MCCAFFREY, T. A. & CZAJA, J. A. (1989). Diverse effects of estradiol-17 beta: concurrent suppression of appetite, blood pressure and vascular reactivity in conscious, unrestrained animals. *Physiol. Behav.*, **45**:649-657.
- MCCARTHY, M. M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev.*, **88**:91-124.
- MCEWEN, B. S. (1979). Steroid hormone interactions with the brain: cellular and molecular aspects. *Rev. Neurosci.*, **4**:1-30.
- MCEWEN, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *TRENDS Pharmacol. Sci.*, **12**:141-147.
- MCEWEN, B. S. & ALVES, S. H. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.*, **20**:279-307.
- MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B. & O'MALLEY, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.*, **20**:321-344.
- MELLO, C. V.; VICARIO, D. S. & CLAYTON, D. F. (1992). Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:6818-6822.
- MELLO, C. V. & CLAYTON, D. F. (1994). Song-induced ZENK gene expression in auditory pathways of songbird brain and its relation to the song control system. *J. Neurosci.*, **14**:6652-6666.
- MELLO, C. V. & CLAYTON, D. F. (1995). Differential induction of the ZENK gene within the avian forebrain and song control circuit after metrazole-induced depolarization. *J. Neurobiol.*, **26**:145-161.

- MELLO, C. V.; VATES, G. E.; OKUHATA, S. & NOTTEBOHM, F. (1998). Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Neurol.*, **395**:137-160.
- MERMELSTEIN, P. G.; BECKER, J. B. & SURMEIER, D. J. (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.*, **16**:595-604.
- MILBRANDT, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*, **238**:797-799.
- MORRIS, J. A.; JORDAN, C. L. & BREEDLOVE, S. M. (2004). Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat. Neurosci.*, **7**:1034-1039.
- NAFTOLIN, F.; RYAN, K. J.; DAVIES, I. J.; REDDY, V. V.; FLORES, F.; PETRO, Z.; KUHN, M.; WHITE, R. F.; TAKAOKA, Y. & WOLIN, L. (1975). The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog. Horm. Res.*, **31**:295-319.
- NOTTEBOHM, F. (1980). Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries. *Brain Res.*, **189**:429-443.
- PARADISO, K.; ZHANG, J. & STEINBACH, J. H. (2001). The C terminus of the human nicotinic  $\alpha 4\beta 2$  receptor forms a binding site required for potentiation by an estrogenic steroid. *J. Neurosci.*, **21**:6561-6568.
- PETERSON, R. S.; YARRAM, L.; SCHLINGER, B. A. & SALDANHA, C. J. (2005). Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proc. Biol. Sci.*, **272**:2089-2096.
- PFAFF, D. W. (1980). Estrogen and Brain Function. New York, Springer.
- PFAFF, D. W. & SCHWARTZ-GIBLIN, S. (1988). Cellular Mechanisms of Female Reproductive Behavior: The Physiology of Reproduction. New York, Raven.
- PINAUD, R.; VELHO, T. A.; JEONG, J. K.; TREMERE, L. A.; LEÃO, R. M.; VONGERSDORFF, H. & MELLO, C. V. (2004). GABAergic neurons participate in the brain's response to birdsong auditory stimulation. *Eur. J. Neurosci.*, **20**:1318-1330.
- PINAUD, R.; FORTES, A. F.; LOVELL, P. & MELLO, C. V. (2006). Calbindin-positive neurons reveal a sexual dimorphism within the songbird analogue of the mammalian auditory cortex. *J. Neurobiol.*, **66**:182-195.

- PINAUD, R.; TERLEPH, T. A.; TREMERE, L. A.; PHAN, M. L.; DAGOSTIN, A. A.; LEÃO, R. M.; MELLO, C. V. & VICARIO, D. S. (2008). Inhibitory network interactions shape the auditory processing of natural communication signals in the songbird auditory forebrain. *J. Neurophysiol.*, **100**:441-455.
- REMAGE-HEALEY, L. & BASS, A. H. (2006). A rapid neuromodulatory role for steroid hormones in the control of reproductive behavior. *Brain Res.*, **1126**:27-35.
- REMAGE-HEALEY, L.; MAIDMENT, N. T. & SCHLINGER, B. A. (2008). Forebrain steroid levels fluctuate rapidly during social interactions. *Nat. Neurosci.*, **11**:1327-1334.
- REMAGE-HEALEY, L.; OYAMA, R. K. & SCHLINGER, B. A. (2009). Elevated aromatase activity in forebrain synaptic terminals during song. *J. Neuroendocrinol.*, **21**:19-199.
- RIBEIRO, S.; CECCHI, G. A.; MAGNASCO, M. O. & MELLO, C. V. (1998). Toward a song code: evidence for a syllabic representation in the canary brain. *Neuron*, **21**:359-371.
- ROEPKE, T. A.; MALYALA, A.; BOSCH, M. A.; KELLY, M. J. & RONNEKLEIV, O. K. (2007). Estrogen regulation of genes important for K<sup>+</sup> channel signaling in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, **148**:4937-4951.
- RONNEKLEIV, O. K. & KELLY, M. J. (2005). Diversity of ovarian steroid signalling in the hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.*, **26**:65-84.
- SALDANHA, C. J.; TUERK, M. J.; KIM, Y. H.; FERNANDES, A. O. & SCHLINGER, B. A. (2000). Distribution and regulation of telencephalic aromatase expression in the zebra finch revealed with a specific antibody. *J. Comp. Neurol.*, **423**:619-630.
- SALDANHA, C. J. & COOMARALINGAM, L. (2005). Overlap and co-expression of estrogen synthetic and responsive neurons in the songbird brain - a double-label immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **141**:66-75.
- SCHLINGER, B. A. & CALLARD, G. V. (1989). Localization of aromatase in synaptosomal and microsomal subfractions of quail (*Coturnix coturnix japonica*) brain. *Neuroendocrinology*, **49**:434-441.
- SCHLINGER, B. A. & ARNOLD, A. P. (1991). Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:4191-4194.

- SCHLINGER, B. A. & ARNOLD, A. P. (1992). Circulating estrogens in a male songbird originate in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:7650-7653.
- SCHLINGER, B. A. (1997). Sex steroids and their actions on the birdsong system. *J. Neurobiol.*, **33**:619-631.
- SCHLINGER, B. A. & LONDON, S. E. (2006). Neurosteroids and the songbird model system. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.*, **305**:743-748.
- SHINGO, A. S. & KITO, S. (2002). Estrogen induces elevation of cAMP-dependent protein kinase activity in immortalized hippocampal neurons: imaging in living cells. *J. Neural Transm.*, **109**:171-174.
- SILVERIN, B.; BAILLIEN, M. & BALTHAZART, J. (2004). Territorial aggression, circulating levels of testosterone, and brain aromatase activity in free-living pied flycatchers. *Horm. Behav.*, **45**:225-234.
- SIMPSON, B. & VICARIO, D. S. (1990). Early estrogen treatment of female zebra finches masculinizes the brain pathway for learned vocalizations. *J. Neurobiol.*, **22**:777-793.
- SMITH, C. L.; CONNEELY, O. M. & O'MALLEY, B. W. (1993). Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6120-6124.
- SPREAFICO, E.; BETTINI, E.; POLLIO, G. & MAGGI, A. (1992). Nucleotide sequence of estrogen receptor cDNA from Sprague-Dawley rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **227**:353-356.
- STRIPLING, R.; VOLMAN, S. F. & CLAYTON, D. F. (1997). Response modulation in the zebra finch neostriatum: relationship to nuclear gene regulation. *J. Neurosci.*, **17**:3883-3893.
- STRIPLING, R.; KRUSE, A. A. & CLAYTON, D. F. (2001). Development of song responses in the zebra finch caudomedial neostriatum: role of genomic and electrophysiological activities. *J. Neurobiol.*, **48**:163-180.
- STUMPF, W. E. & SAR, M. (1976). Steroid hormone target sites in the brain: the differential distribution of estrogen, progestin, androgen and glucocorticosteroid. *J. Steroid Biochem.*, **7**:1163-1170.
- TEYLER, T. J.; VARDARIS, R. M.; LEWIS, D. & RAWITCH, A. B. (1980). Gonadal steroids: effect on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science*, **209**:1017-1019.

- THOMAS, G. M. & HUGANIR, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**:173-183.
- TORAN-ALLERAND, C. D. (2004). Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*, **145**:1069-1074.
- TREMERE, L. A.; JEONG, J. K. & 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.
- VALVERDE, M. A.; ROJAS, P.; AMIGO, J.; COSMELLI, D.; ORIO, P.; BAHAMONDE, M. I.; MANN, G. E.; VERGARA, C. & LATORRE, R. (1999). Acute activation of maxi-K<sup>+</sup> channels (hSlo) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science*, **285**:1929-1931.
- VATES, G. E.; BROOME, B. M.; MELLO, C. V. & 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.
- WALTEREIT, R. & WELLER, M. (2003). Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.*, **27**:99-106.
- WATTERS, J. J.; CAMPBELL, J. S.; CUNNINGHAM, M. J.; KREBS, E. G. & DORSA, D. M. (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*, **138**:4030-4033.
- WATTERS, J. J. & DORSA, D. M. (1998). Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms. *J. Neurosci.*, **18**:6672-6680.
- WEILAND, N. G. (1992). Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the NMDA receptor complex in the CA1 region of the hippocampus. *Endocrinology*, **131**:662-668.
- WENG, G.; BHALLA, U. S. & IYENGAR, R. (1999). Complexity in biological signaling systems. *Science*, **284**:92-96.
- WETZEL, C. H.; HERMANN, B.; BEHL, C.; PASTEL, E.; RAMMES, G.; ZIEGLGANSBERGER, W.; HOLSBOER, F. & RUPPRECHT, R. (1998). Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol. Endocrinol.*, **12**:1441-1451.

- WONG, M. & MOSS, R. L. (1992). Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci.*, **12**:2549-2554.
- WOOLLEY, C. & MCEWEN, B. S. (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J. Neurosci.*, **12**:2549-2554.
- WOOLLEY, C. S. & MCEWEN, B. S. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **336**:293-306.
- WOOLLEY, C. S.; WEILAND, N. G.; MCEWEN, B. S. & SCHWARTZKROIN, P. A. (1997). Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cell to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J. Neurosci.*, **17**:1848-1859.
- WOOLLEY, C. S. (2007). Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**:657-680.
- ZHAO, L.; CHEN, S.; WANG, J. M. & BRINTON, R. D. (2005). 17beta-estradiol induces  $Ca^{2+}$  influx, dendritic and nuclear  $Ca^{2+}$  rise and subsequent cyclicAMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience*, **132**:299-311.
- ZHOU, Y.; WATTERS, J. J. & DORSA, D. M. (1996). Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology*, **137**:2163-2166.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)