

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

**Impacto da estimulação sonora de alta intensidade  
na plasticidade sináptica de longo prazo e na  
neurotransmissão hipocampal**

**Júnia Lara de Deus**

**Ribeirão Preto  
2019**

**JÚNIA LARA DE DEUS**

**Impacto da estimulação sonora de alta intensidade  
na plasticidade sináptica de longo prazo e na  
neurotransmissão hipocampal**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo  
Maurício Xavier Leão

**Ribeirão Preto  
2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

De Deus, Júnia Lara

Impacto da estimulação sonora de alta intensidade na plasticidade sináptica de longo prazo e na neurotransmissão hipocampal. Ribeirão Preto, 2019.

110 p.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Leão, Ricardo M.

1. Sistema Nervoso Central, 2. Hipocampo, 3. Estímulo sonoro,  
4. Plasticidade sináptica de longo prazo, 5. Neurotransmissão

*Dedico esta tese aos meus  
queridos pais, Mateus e Maria  
das Graças, e ao meu  
companheiro de vida, Mateus.*

## AGRADECIMENTOS

O período do doutorado me trouxe experiências e ensinamentos para a vida pessoal e científica que guardarei para sempre. Nestes quatro anos bem intensos, tive a sorte de nunca estar sozinha.

Começo agradecendo os meus pais, Maria e Mateus, por todo amor, e por acreditarem em todas as minhas escolhas, estando ao meu lado nas situações desafiadoras pelas quais passei. Às minhas irmãs, Ana Claudia e Maria Elisa pelo apoio, carinho e conselhos constantes. Aos meus sobrinhos, Luiza, Vitor, Ana Laura e Miguel por trazerem tantas alegrias e pelos questionamentos de continuar estudando mesmo depois de ter uma profissão.

Ao meu namorado, amigo e companheiro de vida, Mateus, com quem divido grandes emoções e experiências. Os desafios da Pós-graduação nos uniu e nos tornou mais fortes para vencer qualquer imposição do destino. Estar ao seu lado tornou tudo mais leve e simples, pois me faz acreditar que tudo é possível. Agradeço também sua família, que sempre foi atenciosa e preocupada com minha trajetória na Pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Leão, por ter me aceitado como aluna de doutorado e também pela confiança nestes quatro anos. O seu laboratório proporciona um ambiente convidativo à pesquisa, uma vez que une conhecimento, devido à excelente equipe de trabalho, seriedade e liberdade para o pensamento. Estas foram as características que me proporcionaram uma certa leveza durante este período. Foi um privilégio fazer parte do Laboratório de Fisiologia e Plasticidade Sináptica. Obrigada por estar ao meu lado nesta etapa, me orientando e me conduzindo para uma formação profissional de qualidade.

À querida Alê, que desempenhou tantos papéis na minha vida; ora como co-orientadora, amiga e colega de laboratório, ora muitas outras vezes como mãe de Ribeirão.

Conviver tão de perto aumentou minha admiração por você como mulher pesquisadora e me mostrou que nós podemos ser de fato tudo o que quisermos. Obrigada por tanto! Agradeço também à sua família, o querido Aldo, que me ajudou em diversas situações, como em San Diego, e também aos seus filhos, pelos quais tenho o maior carinho.

Aos amigos da Pós que não estão mais presentes, mas que ficarão guardados na memória, George, Ludmila, Procópio e Priscila, com quem tive a sorte de conviver e compartilhar momentos tão bons; obrigada pelo apoio constante. Ao amigo Cesinha, que me ensinou tanto, foi tão divertido no laboratório e que mesmo distante, se faz muito presente. Ao amigo Nicollas, companheiro de todas as horas, divertido e com um coração gigante. À amiga Aline, pela amizade, momentos de descontração e apoio.

Ao querido Fernandinho, que desde o mestrado me acompanha. Obrigada pelos ensinamentos e por toda a ajuda, resolvendo tudo que parecia sem solução nos momentos mais importantes dos experimentos. Obrigada também pelos conselhos.

Aos colegas de Laboratório, Elena, Paulo, Cahuê, Vítor, Marina e Daniela, obrigada pela convivência e troca de experiência constante.

Aos funcionários do nosso departamento, Elisa, Claudia, Fernando e Igor pela disposição e atenção em todos os momentos solicitados.

**Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do CNPq**

**(#140629/2015-7), CAPES e FAPESP.**

**“A ciência é uma disposição de aceitar os fatos mesmo quando eles são opostos aos desejos.”**

Burrhus Frederic Skinner



## RESUMO

**DE DEUS, J.L.** Impacto da estimulação sonora de alta intensidade na plasticidade sináptica de longo prazo e na neurotransmissão hipocampal. 110 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019.

O sistema nervoso central (SNC) se comporta como um sistema plástico, com capacidade de se modificar continuamente por meio da plasticidade sináptica. Este fenômeno pode se manifestar como facilitação ou depressão da neurotransmissão, e também ser caracterizado em plasticidade sináptica de longo e curto prazo. A plasticidade sináptica de longo prazo ocorre em regiões específicas, dentre as quais estão o hipocampo, onde as sinapses da via *Schaffer/CA1* são as sinapses onde os fenômenos de plasticidade a longo prazo são mais estudados. O hipocampo recebe informações sensoriais auditivas, que dependendo da intensidade e do tempo de exposição podem causar alterações na função hipocampal. Nosso laboratório mostrou que ratos submetidos a um protocolo prolongado de estímulo sonoro de alta intensidade apresentam a potenciação de longo prazo (LTP) fortemente inibida na via *Schaffer/CA1*. No presente estudo, nosso objetivo foi investigar o estímulo sonoro mínimo para que a LTP seja inibida e os mecanismos responsáveis por esta resposta. Para tanto, testamos um protocolo de estimulação de 110 dB de curta duração (1 minuto) em ratos Wistar machos (60-70 dias de idade) e após 2 horas do estímulo, realizamos o registro extracelular da LTP em fatias hipocampais, por meio de um protocolo de alta frequência na via *Schaffer/CA1*. Também foram investigados outros fatores que podem influenciar a LTP, como por exemplo, a corticosterona, que é um modulador da LTP e cujos níveis circulantes aumentam após a estimulação sonora de alta intensidade. Além disso, avaliamos possíveis alterações no BDNF que está diretamente relacionado ao desenvolvimento e manutenção da LTP. O teste de aprendizado e memória espacial e o teste do medo condicionado foram realizados a fim de avaliarmos se o animal apresenta algum déficit de aprendizado e memória. Para responder as perguntas inerentes aos mecanismos de plasticidade sináptica hipocampal pela estimulação sonora, utilizamos a técnica do *whole cell patch clamp* e investigamos possíveis alterações nas correntes sinápticas excitatórias e inibitórias que chegam aos neurônios piramidais da CA1. Os nossos resultados mostram que a exposição a único episódio de som de alta intensidade teve um efeito transitório no hipocampo, inibindo a LTP por até 24 horas e revertendo após 48 da exposição ao som. Observamos que a inibição na via *Schaffer-CA1* está diretamente relacionado à intensidade

sonora e não envolve a ativação do eixo HPA (eixo- hipotálamo-hipófise-adrenal), uma vez que os níveis de corticosterona nos animais que receberam 80 dB de estímulo e nos ratos *sham* aumentaram igualmente aos animais estimulados. O comprometimento da LTP não foi associado com alterações nos testes de memória e aprendizado espacial (Labirinto Aquático de Morris- LAM) ou com alterações no teste de medo condicionado. Além disso, os registros da neurotransmissão inibitória nos permite inferir que está havendo uma modulação dos neurônios inibitórios sobre os neurônios glutamatérgicos hipocampais, o que tem impacto direto na potenciação das sinapses da região CA1 após o som de 110 dB. Nossos dados sugerem que o som de alta intensidade pode inibir a secreção de BDNF nos animais estimulados, uma vez que após o tratamento com BDNF e seu agonista a LTP desenvolveu-se normalmente. Em conclusão mostramos que o som agudo de alta intensidade pode inibir a LTP hipocampal sem trazer prejuízos à memória dos animais; além disso, nossos dados sugerem que os interneurônios GABAérgicos podem estar influenciando esta resposta por meio do aumento das correntes inibitórias. Por fim, sugerimos que em animais estimulados, a secreção de BDNF pode estar comprometida influenciando na inibição da LTP.

**Palavras-chave:** sistema nervoso central, hipocampo, estímulo sonoro, plasticidade sináptica de longo prazo e neurotransmissão.

## ABSTRACT

**DE DEUS, J.L.** Impact of high-intensity sound stimulation on long-term plasticity and hippocampal neurotransmission. 110 p. Thesis (Ph.D.) – School of Medicine of Ribeirão Preto, 2019.

The central nervous system (CNS) behaves as a plastic system, with the ability to continuously modify itself through synaptic plasticity. This phenomenon may manifest as facilitation or depression of neurotransmission, and also be characterized in synaptic plasticity of long and short term. Long-term synaptic plasticity occurs in specific regions, including the hippocampus, where synapses of the Schaffer / CA1 pathway are the synapses where long-term plasticity phenomena are more studied. The hippocampus receives auditory sensory information, which depending on intensity and time of exposure may cause alterations in hippocampal function. Our laboratory showed that rats submitted to a long-term protocol of high intensity sound stimulus present the long-term potentiation (LTP) strongly inhibited in the Schaffer / CA1 pathway. In the present study, our objective was to investigate the minimum sound stimulus for LTP to be inhibited and the mechanisms responsible for this response. For this, we tested a protocol of stimulation of 110 dB of short duration (1 minute) in male Wistar rats (60-70 days of age) and after 2 hours of the stimulus, we performed the extracellular record of LTP in hippocampal slices, by means of a high frequency protocol in the Schaffer / CA1 pathway. Other factors that may influence LTP have also been investigated, such as corticosterone, which is a LTP modulator and whose circulating levels increase after high-intensity sound stimulation. In addition, we evaluated possible changes in BDNF that are directly related to the development and maintenance of LTP. The spatial memory and learning test and the conditioned fear test were performed to assess whether the animal has some learning and memory deficits. In order to answer the questions related to the mechanisms of hippocampal synaptic plasticity by sound stimulation, we used the whole cell patch clamp technique and investigated possible changes in the excitatory and inhibitory synaptic currents that reach CA1 pyramidal neurons. Our results show that exposure to a single episode of high intensity sound had a transient effect on the hippocampus, inhibiting LTP for up to 24 hours and reverting after 48 hours of exposure to sound. We observed that the inhibition in the Schaffer/CA1 pathway is directly related to sound intensity and does not involve the activation of the HPA axis (hypothalamic-pituitary-adrenal axis), since corticosterone levels in animals receiving 80 dB stimulation and in rats sham ratio also

increased to stimulated animals. LTP impairment was not associated with changes in memory and spatial learning tests (Morris Water Maze) or changes in the conditioned fear test. Furthermore, the records of inhibitory neurotransmission allow us to infer that there is a modulation of inhibitory neurons on hippocampal glutamatergic neurons, which has a direct impact on the potentiation of synapses of the CA1 region after the sound of 110 dB. Our data suggest that high intensity sound may inhibit BDNF secretion in stimulated animals, since after treatment with BDNF and its agonist LTP has normally developed. In conclusion we showed that high intensity acute sound can inhibit hippocampal LTP without impairing the animals' memory; in addition, our data suggest that GABAergic interneurons may be influencing this response by increasing inhibitory currents. Finally, we suggest that in stimulated animals, BDNF secretion may be compromised by inhibiting LTP.

**Keywords:** central nervous system, hippocampus, sound stimulus, long-term synaptic plasticity and neurotransmission.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frequência de potenciação e efeitos de um trem condicionante. Os gráficos mostram as mudanças produzidas em três parâmetros de resposta evocada pelo aumento da taxa em que a via perfurante foi estimulada de 0,5 a 15 estímulos durante 15 segundos. Observe que imediatamente após o trem há um breve período de potenciação acentuada seguida de depressão, e a subsequente manutenção potenciação (Bliss e Lomo, 1973). ..... 26
- Figura 2.** O APV bloqueia a indução de LTP. Os registros foram obtidos simultaneamente a partir do corpo celular (somático) e regiões dendríticas da CA1 em resposta à estimulação de baixa frequência (0,033 Hz) na via *Schaffer*. (As respostas dendríticas ilustradas foram obtidas utilizando uma menor intensidade de estímulo.) (A) Respostas na presença de 50  $\mu$ M D-APV. (B) Respostas após 15 minutos de um tétano (100 Hz, 1 s) ainda na presença de APV. (C) Respostas 15 min após um segundo tétano idêntico dado após o APV ser lavado. Escala de barras são 4 mV e 10 ms (Collingridge e Bliss, 1987). ..... 27
- Figura 3.** Anatomia básica do hipocampo. O hipocampo é tradicionalmente apresentado como um circuito trisináptico. Além do circuito trissináptico, existe uma rede associativa densa que interliga as células CA3 no mesmo lado. As células piramidais da CA3 são também inervadas por uma entrada direta das células da camada II do córtex entorrinal (não mostrado), enquanto os dendritos apicais distais dos neurônios piramidais da CA1 recebem uma entrada direta das células da camada III do córtex entorrinal. Há também substancial entrada modulatória para os neurônios do hipocampo. As três principais subregiões têm uma organização laminar elegante, na qual os corpos celulares são fortemente compactados em um arranjo interligado em forma de C, com fibras aferentes terminando em regiões seletivas da árvore dendrítica. (Neves *et al.*; 2012). ..... 32
- Figura 4.** Imagens ilustrativas de como é realizado o corte de fatias hipocâmpais. A sequência da esquerda para a direita mostra como a calota craniana é aberta, o cérebro exposto e as fatias hipocâmpais preparadas para posterior registro. Imagens retiradas do acervo pessoal. .... 46
- Figura 5.** Posicionamento da fatia do hipocampo na câmera de registro. Em A, é possível observar as fatias apoiadas pela rede de nylon, o eletrodo de estímulo e a pipeta de registro de vidro. Em B, a imagem da região CA1 do hipocampo obtida por uma objetiva de 5 vezes, o eletrodo de estímulo em preto sob as fibras colaterais de *Schaffer* e as pipetas de vidro no estrato radiado e na camada piramidal. Em C, o eletrodo de estímulo na via perfurante do giro dentado e os eletrodos de registro na camada granular e molecular externa. .... 47
- Figura 6.** Representação do decurso temporal da indução de LTP pelo protocolo de estimulação de alta frequência comparando a resposta basal (1) e a forma potenciada (2). ..... 48

**Figura 7.** Representação do labirinto aquático de Morris, seus quadrantes e exemplo de traçado de animal em fase de treinamento. Rato retirado de <http://www.clker.com/clipart-black-and-white-mouse.html>. ..... 53

**Figura 8.** Representação gráfica dos parâmetros intrínsecos das células piramidais da CA1 do hipocampo dorsal de ratos. A. Típica resposta de alteração de voltagem de um neurônio piramidal em resposta a (B.) pulsos de corrente. C. Destaque para as alterações de voltagens sublimiáveis e o *sag* da corrente h. D. Exemplo de uma VI construída a partir das voltagens no estado estacionários produzidas pela injeção da respectiva corrente. A resistência de entrada foi considerada como o valor da inclinação (*slope*) de uma função linear que ajustou os dados. E. Constante de tempo da membrana estimada como a constante de tempo de uma equação mono-exponencial padrão do tipo  $y = y_0 + A \exp \{-(x-x_0)/\tau\}$  que ajustou as alterações de potencial da membrana até 200 ms. .... 56

**Figure 9.** Efeitos da estimulação sonora de alta intensidade na neurotransmissão das sinapses na via *Schaffer*/CA1. A) Amplitudes máximas dos *volleys* aferentes de animais controle e animais sacrificados 2, 24 e 48 horas após estimulação sonora de 110 dB. B) fEPSP de animais controle e animais sacrificados 2, 24 e 48 horas após estimulação sonora de 110 dB. Nos grupos controle, os símbolos pretos representam animais *naïve* e os símbolos em cinza, animais *sham*. (C) Correlação da inclinação do fEPSP com a amplitude dos *volleys* aferentes. Linhas representam o *fitting* das funções lineares. \* P < 0,05. .... 60

**Figura 10.** Inibição da LTP por estimulação sonora de alta intensidade. (A) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do estímulo de alta frequência (EAF-seta) das sinapses *Schaffer*-CA1 em animais *naïve* e estimulados. Traçados representativos são mostrados acima do *slope*. B) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses *Schaffer*-CA1 de animais sacrificados 2 horas após a exposição ao som de 110 dB. Exemplos representativos são mostrados acima do *slope*. C) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses *Schaffer*-CA1 em animais sacrificados 24 horas após exposição sonora de 110 dB. Exemplos representativos são mostrados acima do *slope*. D) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses *Schaffer*-CA1 em animais sacrificados 48 horas após exposição sonora de 110 dB. Exemplos representativos são mostrados acima do *slope*. E) Resumo da PPT. (F) Resumo da LTP. \* P < 0,05. .... 62

**Figura 11.** Efeito da exposição sonora de 110 dB na plasticidade de curto prazo. A) Pares de fEPSP entregues em intervalos de 50, 150, 250, 350, 450 e 550 ms. (B) Razão de pulso pareado (RPP) dos fEPSP entregues nos diferentes intervalos. N = 7 para cada grupo. Dados representados como média ± EPM. .... 64

**Figura 12.** O estímulo sonoro de 80 dB não inibe a LTP. A) Amplitudes máximas dos *volleys* aferentes de animais controle e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 80 dB. B) fEPSP de animais controle e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 80 dB. C) Exemplo de traçado representativo dos fEPSP antes e depois do EAF (PPT e LTP) de um animal exposto a 80 dB de estimulação sonora. D) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e após o EAF-seta nas sinapses *Schaffer-CA1* em animais sacrificados 2 horas após o estímulo de 80 dB. E) Resumo da PPT. F) Resumo da LTP. Dados mostrados como média  $\pm$  EPM. .... 66

**Figura 13.** Som de alta intensidade inibe a LTP na via perforante do giro dentado. A) Amplitudes máximas dos *volleys* aferentes de animais *sham* e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 110 dB. B) fEPSP de animais *sham* e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 110 dB. C) Traçados representativos dos fEPSP antes e após o EAF (PPT e LTP) de um animal *sham* e de um animal exposto a 110 dB. D) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF-seta nas sinapses da via perforante de animais *sham* e sacrificados 2 horas após a exposição ao som de 110 dB. (C) Resumo da PPT. (D) Resumo da LTP. \* P <0,05..... 68

**Figura 14.** Corticosterona plasmática. Níveis de corticosterona plasmática nos grupos *naïve*, *sham*, 80 dB e 100 dB, sacrificados imediatamente (~ 30 segundos; I), 30 minutos, 2 e 24 horas após o estímulo sonoro fictício ou estimulação sonora. As linhas horizontais contínuas são a média e as linhas tracejadas  $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona dos animais do grupo *naïve*. \* P  $\leq$ 0,05. .... 70

**Figura 15.** Aprendizagem espacial e memória no LAM. A) Latência para os animais *sham*, e estimulados com 80 dB e 110 dB encontrarem a plataforma de escape em comparação aos animais *naïve*. B) Média da distância percorrida pelos animais durante as tentativas para encontrar a plataforma. C) Tempo dispendido em cada quadrante durante o teste de transferência sem plataforma. D) Latência para encontrar a plataforma durante os três re-testes. Durante o teste de transferência, a plataforma foi removida e as latências se referem à primeira vez que a imagem identificou o animal no local onde a plataforma foi colocada anteriormente. \* P <0,05 e \*\*\* P <0,005. n = 5 a 8 animais por grupo. .... 72

**Figura 16.** Teste do medo condicionado e o efeito da estimulação sonora de 110 dB no condicionamento ao medo. Na fase de condicionamento, os tons foram acompanhados pela exposição a 4 choques. Durante a fase de extinção (extinção do treinamento: 24 horas após o condicionamento), 21 tons foram apresentados e são graficamente expressos em blocos de 3 tons. Após 24 horas, o teste de extinção de aprendizagem (teste de extinção) foi realizado e 10 tons foram apresentados e estão graficamente mostrados em blocos de 3 tons. O congelamento basal foi pontuado por 2 minutos antes da apresentação do tom. Os dados são mostrados como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. .... 74

**Figura 17.** Um único episódio de alta intensidade sonora não altera as propriedades intrínsecas de neurônios piramidais. A) Potencial de repouso da Membrana (RMP) em animais *sham* e estimulados, na ausência e presença de ZD7288. B) Resistência de entrada da membrana em animais *sham* e estimulados, na ausência e presença de ZD7288. C) Constante de tempo da membrana ( $\tau$ ) em animais *sham* e estimulados, na ausência e presença de ZD7288. \*\*\*  $P < 0,0005$  com testes t pareados (antes e após o ZD7288). ..... 75

**Figura 18.** Um único episódio de alta intensidade sonora não altera as correntes *h* nem o disparo de potenciais de ação. A) Traçados representativos da análise da corrente antes e depois do ZD 7288. A corrente resultante, depois de subtração da corrente sensível ao ZD foi considerada a corrente *h*. B) A amplitude da corrente de cauda foi utilizada para estimativa da voltagem de ativação de 50% da corrente ( $V_{50}$ ) através de ajustes com equações sigmoidais do tipo Boltzman. C) Relação  $I \times V$  em neurônios piramidais de animais estimulados e animais *sham*. D) Correntes de cauda após hiperpolarização de -120 mV em neurônios de animais *sham* e estimulados. E) Curvas de correntes  $\times$  número de potenciais de ação em ratos *sham* e estimulados. .... 77

**Figura 19.** Neurotransmissão glutamatérgica evocada via receptores AMPA e NMDA. Em A, traçados representativos das correntes NMDA e AMPA. B e C, média das amplitudes das correntes AMPA/KA e NMDA, respectivamente em diferentes voltagens (curva IV). D, média das amplitudes das correntes AMPA/KA em -80 mV. D, média das amplitudes das correntes NMDA em +70 mV. Dados estão representados como média  $\pm$  EPM. .... 79

**Figura 20.** Neurotransmissão inibitória espontânea após a estimulação sonora de alta intensidade. A) Traçados representativos dos eventos espontâneos inibitórios dos animais *sham* e estimulados com 110 dB. B) Média das amplitudes das IPSCs. C) Distribuição das amplitudes de todas as IPSCs registradas. D) Média dos *rise-times* das IPSCs. E) Média das frequências das IPSCs. F) Distribuição dos intervalos entre todas as IPSCs detectadas. G) Média das *half-widths* das IPSCs. H e I) Constantes de decaimento das IPSCs rápida ( $\tau_{fast}$ ) e lenta ( $\tau_{slow}$ ). Dados estão representados como média  $\pm$  EPM. Frações cumulativas foram construídas com *bins* automáticos. .... 80

**Figura 21.** Neurotransmissão inibitória espontânea em miniatura após a estimulação sonora de alta intensidade. A) Traçados representativos dos eventos miniatura inibitórios dos animais *sham* e estimulados com 110 dB. B) Média das amplitudes das mIPSCs. C) Distribuição das amplitudes de todas as mIPSCs registradas. D) Média dos *rise-times* das mIPSCs. E) Média das frequências das mIPSCs. F) Distribuição dos intervalos entre todas as mIPSCs detectadas. G) Média das *half-widths* das mIPSCs. H e I) Constantes de decaimento das mIPSCs; rápida ( $\tau_{fast}$ ) e lenta ( $\tau_{slow}$ ). Dados estão representados como média  $\pm$  EPM. Frações cumulativas foram construídas com *bins* automáticos. .... 82



**Figura 22.** Inibição da LTP após estímulo sonoro de intensidade. A e B) *slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses da via *Schaffer-CA1* de animais *sham* e estimulados com 110 dB respectivamente. C) Representação gráfica da LTP. Teste T não pareado.  $P \leq 0.05$ . ..... 83

**Figure 23.** BDNF não altera a potenciação da LTP em animais *sham*. A) *Slope* normalizado dos fEPSP antes e depois do EAF (seta) nas sinapses da *Schaffer-CA1* de animais *sham* que tiveram suas fatias superfundidas com BDNF. B) Representação gráfica da LTP. Teste T não pareado.  $P \geq 0.05$ . ..... 84

**Figura 24.** BDNF e o agonista LM22A4 revertem a inibição da LTP após estímulo sonoro de intensidade. A e B) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses da via *Schaffer-CA1* de animais estimulados com 110 dB que tiveram suas fatias superfundidas com BDNF e LM22A4, respectivamente. C) Representação gráfica da LTP comparando os tratamentos nas fatias dos animais estimulados e o grupo estimulado. ANOVA de uma via.  $P \leq 0.05$ . ..... 85

**Figura 25.** Representação esquemática para as duas hipóteses que explicam a alteração observada na IPSCs espontâneas. Em A, temos um maior número de sinapses no mesmo neurônio GABAérgico, levando ao aumento da amplitude e não da frequência das IPSCs. B, aumento na Pr das sinapses GABAérgicas em resposta a potenciais de ação em animais estimulados com 110 dB ..... 98

## LISTA DE ABREVIATURAS

SNC: sistema nervoso central

LTP: potenciação de longo prazo do inglês, *long term potentiation*

LAM: Labirinto Aquático de Morris

PPT: potenciação pós- tetânica

RRP: pool prontamente liberável de vesículas

Pr: probabilidade de liberação de neurotransmissores

CAM/quinase II: calmodulina quinase II

PKC: proteína quinase C

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

BDNF: fator neutrófico derivado do cérebro do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*

FCEa: fluido cérebrospinal artificial

fEPSP: potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo, do inglês *field excitatory postsynaptic potentials*

PSEs: potenciais sinápticos extracelulares

ZD7288: cloreto de 4-etil-fenilamina-1,2-dimetil-6-metilaminopirimidinina

EPSCs: correntes pós-sinápticas excitatórias glutamatérgicas, do inglês *excitatory postsynaptic currents*

IPSCs: correntes pós-sinápticas inibitórias, do inglês *inhibitory postsynaptic currents*

DNQX: 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona

TTX: tetrodotoxina

LM22A4: N,N',N''Tris (2-hydroxietyl)-1,3,5-benzenetricarboxamida

EAF: estímulo de alta frequência

FPP: facilitação de pulso pareado

RPP: Razão de pulso pareado

HCN: canais para cátion ativados por hiperpolarização e nucleotídeo cíclico

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	22
1.1. Plasticidade Sináptica.....	23
1.2. O som no contexto da vida moderna .....	30
1.3. Hipocampo e sua interação com o sistema auditivo .....	31
1.4. O stress e a plasticidade sináptica hipocampal.....	35
1.5. BDNF como modulador da LTP .....	36
2. Objetivos.....	38
2.1 Objetivos gerais.....	39
2.2. Objetivos Específicos .....	39
3. Material e Métodos .....	43
3.1. Animais .....	44
3.2. Estimulação sonora .....	44
3.3. Preparo das fatias hipocampais .....	45
3.4. Registro de <i>Field Potential</i> e indução da LTP .....	46
3.5. <i>Whole cell patch clamp</i> .....	49
3.5.1. <i>Whole cell patch clamp</i> : propriedades passivas da membrana e corrente h.....	49
3.5.2. <i>Whole cell patch clamp</i> : correntes AMPA/KA e NMDA .....	50
3.5.3. <i>Whole cell patch clamp</i> : correntes GABAérgicas espontâneas e miniaturas .....	51
3.6. Dosagem da corticosterona plasmática .....	51
3.7. Tarefa de memória espacial de navegação .....	52
3.8. Teste comportamental: Medo Condicionado .....	53
3.9. Análise dos dados.....	54
4. Resultados .....	58
4.1. A neurotransmissão basal está alterada em ratos submetidos ao ESAI .....	59
4.2. Um único estímulo sonoro de 110 dB é suficiente para inibir a LTP e a PPT na via Schaffer-CA1 .....	60
4.3. Um único episódio de estimulação sonora de 110 dB não altera a facilitação de pulso pareado (FPP).....	63
4.4. Um estímulo sonoro de 80 dB não inibe a LTP .....	64
4.5. O estímulo de 110 dB inibe a LTP na sinapse da via perforante do giro dentado .....	67
4.6. A estimulação sonora de 110 dB não aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona ...	69

4.7. A exposição ao som de alta intensidade não altera a memória e aprendizado espacial no LAM.....	70
4.8. A estimulação sonora de alta intensidade não compromete a tarefa de medo condicionado .....	73
4.9. O estímulo sonoro de alta intensidade não altera as propriedades intrínsecas de membrana e o disparo de neurônios piramidais da CA1.....	74
4.10. As correntes excitatórias glutamatérgicas são semelhantes em animais sham e estimulados.....	77
4.11. A neurotransmissão GABAérgica é aumentada pelo estímulo de 110 dB.....	79
4.12. BDNF reverte a inibição da LTP após o estímulo sonoro de alta intensidade.....	83
5. Discussão .....	86
6. Conclusão.....	99
7. Referências.....	101
8. Anexos .....	110

# **1. Introdução**

## 1.1. Plasticidade Sináptica

A forma como os indivíduos aprendem a partir de experiências se deve as alterações na eficiência da comunicação em suas sinapses no cérebro. A força das sinapses, definida como a capacidade de retransmissão das informações não é fixa, podendo ser modificada por atividade, mostrando que o cérebro é plástico, ou seja, adaptável. A plasticidade sináptica é mediada por alterações nas correntes e potenciais sinápticos e constitui na principal maneira pela qual o sistema nervoso de um organismo se adapta ao ambiente externo. Dessa forma, o estudo da plasticidade sináptica representa um grande campo exploratório para a neurociência, uma vez que é crucial para o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, permitindo o indivíduo aprender e lembrar de novas informações e dessa forma, ajustar o seu comportamento (Bortolotto *et al.*, 2001).

A ativação repetitiva de uma sinapse leva a alterações na amplitude dos potenciais sinápticos gerados por ela, podendo a via sináptica ser reforçada ou enfraquecida em resposta ao nível de atividade do circuito no qual ela se encontra. A plasticidade sináptica se manifesta através de dois mecanismos, facilitação da transmissão (também chamada de potenciação) e depressão da neurotransmissão, e pode ser classificada em fenômenos de plasticidade sináptica de curto prazo e de longo prazo dependendo do tempo de duração da plasticidade. Os mecanismos de curto prazo duram de frações de segundos até poucos minutos, enquanto os mecanismos de longo prazo são classificados como os que persistem por mais de uma hora (Lamprecht e LeDoux, 2004; Neves *et al.*, 2008).

Os fenômenos de plasticidade de curto prazo são normalmente pré-sinápticos e refletem majoritariamente a dinâmica das vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico. As proporções de depressão e facilitação variam grandemente de sinapse para sinapse, uma vez que estas dependem da frequência. Neste sentido, a depressão de curto prazo reflete

geralmente a depleção do estoque de vesículas liberáveis e em alguns casos, inibição das correntes pré sinápticas de  $Ca^{++}$  (Zucker e Regehr, 2002; Xu e Wu, 2005), enquanto a facilitação, como por exemplo, a potenciação pós-tetânica (PPT), resulta do acúmulo do cálcio pré-sináptico residual após um trem de estímulos em alta frequência (estímulo tetânico), causando um aumento na probabilidade de liberação de neurotransmissores (Pr), no tamanho quantal (q) e no *pool* prontamente liberável de vesículas (RRP) (Regehr, 2012; Habets, R. L. e Borst, J. G. 2005, 2007; Korogod *et al.*; 2007; Lee *et al.*, 2008; Xue, L. e Wu, L. G, 2010). Apesar de sua curta duração, os fenômenos de plasticidade de curto prazo são importantes para os processos imediatos de computação neural (Abbott e Regehr, 2004) refletindo a dinâmica das vesículas sinápticas que ocorre em todas as sinapses.

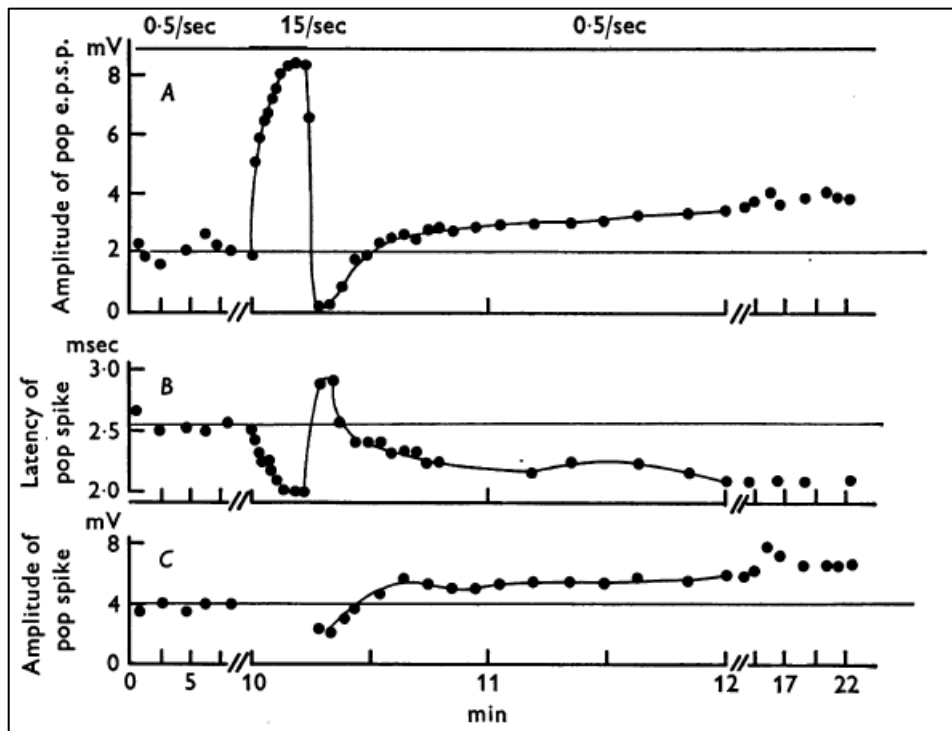
Enquanto a plasticidade a curto prazo reflete a fisiologia das sinapses e pode ser observada em todos os terminais, os fenômenos de plasticidade sináptica a longo prazo não ocorrem em todas as sinapses, estando presente em regiões específicas do sistema nervoso central, mais notadamente, no hipocampo, córtex, cerebelo e amígdala. O hipocampo é a região onde a plasticidade sináptica a longo prazo é mais investigada tanto em relação aos seus mecanismos, quanto às suas implicações no aprendizado e memória.

O hipocampo vem sendo relacionado à memória desde a cirurgia experimental de remoção bilateral do lobo medial, que ocorreu em 1953 para o tratamento de uma epilepsia intratável de um jovem paciente que foi conhecido nos anos posteriores por H.M. O paciente H.M. (Henry Gustave Molaison, como revelado após o seu falecimento) naquela época com 27 anos, apresentou após a cirurgia profunda perda de memória anterógrada, com a inteligência e memória retrógrada parcialmente preservadas. Estes resultados atribuíram ao hipocampo anterior e ao giro hipocampal um papel importante na retenção de novas experiências e formação das memórias ditas declarativas, que são memórias de locais ou eventos as quais podem ser recuperadas conscientemente (Augustinack *et al.*, 2014).



Desde 1949, Donald Hebb já havia postulado que a aprendizagem e a memória são baseadas em modificações da força sináptica entre os neurônios que estão simultaneamente ativos. Ainda sugeriu que o tempo dos eventos era crucial para os processos de aprendizagem e memória no cérebro: “Quando um axônio de uma célula A está próximo o suficiente para excitar a célula B e repetidamente ou persistentemente participa da geração de potenciais de ação da célula B, algum fator ou mudança metabólica ocorre em uma ou ambas as células aumentando a eficiência de A de gerar potenciais de ação em B”. Esse modelo, conhecido como Hebbiano, teve seu correlato neural finalmente demonstrado duas décadas depois com a descoberta da potenciação de longo prazo (LTP, de *long-term potentiation*) (Bliss e Lomo, 1973; Martin Korte e Dietmar Schmitz, 2016).

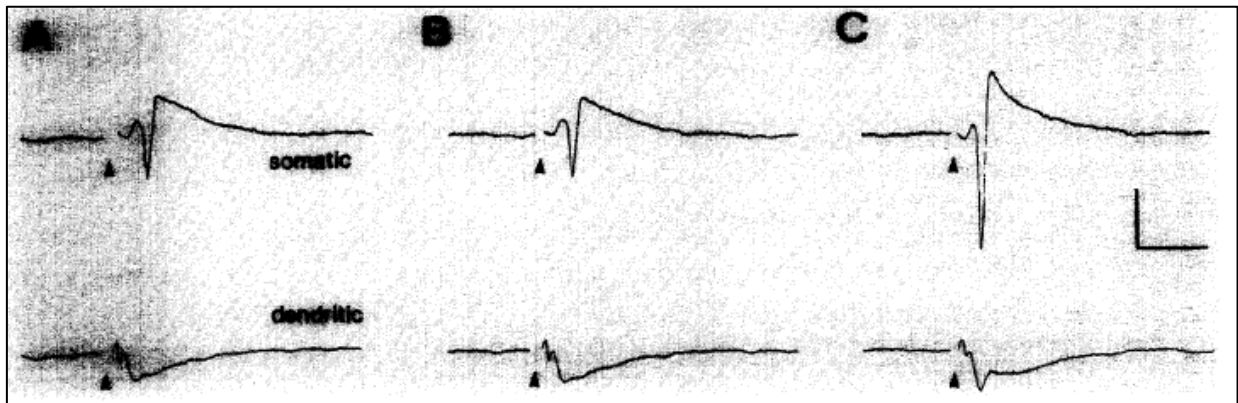
A forma mais estudada de plasticidade sináptica é a LTP, definida como um rápido, persistente e uso-dependente aumento nos potenciais ou correntes pós-sinápticas. A LTP foi primeiramente identificada em 1973 por Bliss e Lomo em coelhos anestesiados, onde observou-se que a alta frequência de estímulo na via perforante do hipocampo leva a uma potenciação prolongada dos potenciais de campo extracelulares glutamatérgicos no giro denteado (Figura 1). Entretanto, a via onde a LTP tem sido mais investigada é a via colateral de *Schaffer* que inerva os neurônios piramidais da CA1 e onde pode ser observada a LTP associativa, ou seja, dependente da despolarização tanto do terminal pré-sináptico quanto do neurônio pós-sináptico (Magee e Johnston, 1997; Lamprecht e LeDoux, 2004). Vários protocolos podem gerar a LTP nessa via (Sweat, 2003), sendo o mais utilizado o estímulo na via *Schaffer* entre 50 a 200 Hz com 1 a 3 segundos de duração.



**Figura 1. Frequência de potenciação e efeitos de um trem condicionante.** Os gráficos mostram as mudanças produzidas em três parâmetros de resposta evocada pelo aumento da taxa em que a via perforante foi estimulada de 0,5 a 15 estímulos durante 15 segundos. Observe que imediatamente após o trem há um breve período de potenciação acentuada seguida de depressão, e a subsequente manutenção potenciação (Bliss e Lomo, 1973).

A dependência da despolarização pós-sináptica pode ser evidenciada em *whole-cell-voltage-clamp*, onde a LTP pode ser induzida com frequências mais baixas de estímulo (2 Hz) se o neurônio é mantido despolarizado acima de 0 mV (Mallinow e Tsien, 1990). A LTP é um fenômeno dependente da entrada de cálcio no terminal pós-sináptico, e consequentemente a despolarização pós-sináptica é fundamental para o processo. Os íons cálcio entram no terminal sináptico principalmente através da abertura dos receptores do tipo NMDA, cujo desbloqueio pelo magnésio ocorre em potenciais despolarizados (Cotman e Monaghan, 1988). A importância destes receptores para a indução da LTP foi demonstrada na região CA1 do hipocampo (Figura 2) com a utilização do APV (antagonista seletivo do receptor NMDA), que ao ser lavado da preparação permitiu o aumento da resposta dendrítica e somática após o estímulo tetânico (Collingridge e Bliss, 1987). Além disso, o cálcio

proveniente de canais para cálcio dependentes de potencial pode contribuir para a LTP induzida por frequências de estimulação muito altas (200 Hz) (Bliss e Collingridge, 2013). É possível também gerar LTP com trens de atividade na frequência teta (5-10 Hz.), a chamada *theta-burst stimulation*, um protocolo que simula a atividade hipocampal durante a exploração espacial (Larson J e Munkácsy E, 2015).



**Figura 2. O APV bloqueia a indução de LTP.** Os registros foram obtidos simultaneamente a partir do corpo celular (somático) e regiões dendríticas da CA1 em resposta à estimulação de baixa frequência (0,033 Hz) na via *Schaffer*. (As respostas dendríticas ilustradas foram obtidas utilizando uma menor intensidade de estímulo.) (A) Respostas na presença de 50  $\mu$ M D-APV. (B) Respostas após 15 minutos de um tétano (100 Hz, 1 s) ainda na presença de APV. (C) Respostas 15 min após um segundo tétano idêntico dado após o APV ser lavado. Escala de barras são 4 mV e 10 ms (Collingridge e Bliss, 1987).

Os mecanismos de expressão da LTP podem ser pré e pós-sinápticos. Na LTP dependente de NMDA nos sistemas *Schaffer*/colateral os mecanismos mais aceitos são pós-sinápticos. Dentre os mecanismos pós-sinápticos da expressão da LTP, está bem estabelecido que a fosforilação dos receptores AMPA pela calmodulina quinase II (CAM/quinase II) e pela proteína quinase C (PKC) aumente a condutância desses receptores levando a um aumento dos potenciais pós-sinápticos vistos na LTP (Benke *et al.*, 1998; Derkach *et al.*, 1999). Tanto a CAM/quinase II como a PKC são dependentes de cálcio e podem fazer a ligação entre o influxo de cálcio e a expressão da LTP.

Outro mecanismo bastante estudado é a incorporação de novos receptores AMPA nas zonas pós-sinápticas. A incorporação de novos receptores AMPA (mas não NMDA) já foi observada em sinapses glutamatérgicas que expressaram LTP (Malinow e Malenka, 2002). Além de aumentar a condutância ao glutamato de sinapses individuais, existem evidências que a LTP aumente o número de sinapses pela incorporação de receptores AMPA nas chamadas sinapses silenciosas (Malinow and Malenka, 2002). Estas sinapses expressam apenas receptores NMDA e são chamadas silenciosas já que os receptores NMDA não são capazes de despolarizar a membrana a partir do repouso, assim a liberação de glutamato nessas sinapses não gera nenhum efeito sobre o potencial da membrana.

Após a expressão ou *early* LTP, alterações podem ser observadas por longos períodos, superiores a uma hora. Nesta fase mais longa ou *late* LTP, é necessário que ocorra a síntese de proteínas (Reymann e Frey, 2007) para manter a LTP, na fase que chamamos de manutenção. Sabe-se que uma isoforma atípica da PKC, PKM  $\zeta$ , possui um papel como mantenedora da LTP e da memória de longo prazo. Evidências mostram que o aumento persistente nas quantidades estacionárias de PKM $\zeta$  permanece estável por horas após a indução de LTP nas fatias do hipocampo e por dias a semanas após o aprendizado *in vivo*, muito mais do que a Arc ou Fos por exemplo. Além disso, o aumento persistente de PKM $\zeta$  correlaciona-se com o grau de potenciação sináptica durante a manutenção de LTP e a retenção de memória durante o armazenamento de memória de longo prazo (Sacktor e Hell, 2018). Apesar do papel da PKM $\zeta$  estar bem definido em relação à manutenção da LTP e memória de longo prazo, a utilização do seu inibidor (ZIP) em animais geneticamente modificados gerou questionamentos quanto à sua função. Evidências mostraram que em camundongos *knockout* para PKM $\zeta$  houve manutenção da LTP e na memória de longo prazo e mais ainda, que o ZIP reverte a LTP e memória não somente em animais *knockout* para PKM $\zeta$ , como também em camundongos *wild-type* deixando em aberto a participação e

necessidade da PKM $\zeta$  na manutenção da LTP e memória (Sacktor e Hell, 2018). As dúvidas geradas com estes achados foram sanadas com os experimentos de farmacogenética desenvolvidos por Tsokas e colaboradores em 2016, que identificaram uma outra isoforma da PKC, a PKC $\iota/\lambda$  em camundongos *knockout* para PKM $\zeta$  que seria responsável pela manutenção da LTP e da memória de longo prazo (Tsokas *et al.*, 2016).

Várias evidências relacionam a LTP na sinapse *Schaffer-CA1* e em outras regiões, aos processos de memória e aprendizado, sendo por isso a LTP considerada um modelo celular de memória. A deleção dos receptores do tipo NMDA na região CA1 após a terceira semana pós-natal em camundongos levou a um desempenho significativamente inferior em testes de memória espacial, concomitante com a inibição da LTP na CA1 e diminuição nas correntes excitatórias glutamatérgicas (Tsien *et al.*, 1996). Ao encontro dos achados de Tsien e colaboradores, foi mostrado que a superexpressão da subunidade NR2B dos receptores NMDA em camundongos levou a um desempenho superior aos controles nos testes de memória espacial e em outros testes comportamentais, além de maiores correntes NMDA e maior potenciação da LTP na região CA1 (Tang *et al.*, 1999). Além disso, a aplicação de antagonistas de NMDA inibe a formação de novas memórias dependentes do hipocampo (Newcomer e Farber, 2000).

Entretanto, nem todas as manipulações produzem resultados consistentes entre LTP e memória espacial em roedores, deixando ainda em aberto a função exata da LTP na formação da memória hipocampal (Martin *et al.*, 2000). Foi demonstrado por Bannerman e colaboradores, que camundongos que tiveram a subunidade GluN1 dos receptores NMDA deletada apresentavam LTP inibida na CA1 e desempenhavam de forma semelhante aos animais controle a tarefa de memória espacial (Bannerman *et al.*, 2012).

## 1.2. O som no contexto da vida moderna

O ruído é definido como um som indesejado ou uma combinação de sons que podem afetar adversamente as pessoas, provocando danos fisiológicos ou psicológicos (Kang, 2006). Os ruídos de alta intensidade são presença constante no mundo urbano moderno, compondo a poluição sonora do tráfego urbano, a exposição advinda de sons altos gerados por diferentes profissionais (músicos e militares, por exemplo) e recreação (fones de ouvido, shows de rock) que são fontes cada vez mais comuns, principalmente entre os indivíduos mais jovens (Zocoli *et al.*, 2009). Uma das consequências da exposição ao ruído é a perda auditiva, devido ao dano permanente nas células ciliadas internas da cóclea, que acomete cerca de 250 milhões de pessoas ao redor do mundo e tem um significado clínico importante uma vez que esta perda pode ser superior a 25 dB (Seidman e Standring, 2010). Outros problemas comuns associados aos sons de alta intensidade são o zumbido ou *tinnitus* (audição de um som inexistente) e hiperacusia (hipersensibilidade a sons), que são comumente tidos como comorbidades da perda auditiva (Coelho *et al.*, 2007a; Shargorodsky *et al.*, 2010; Bhatt *et al.*, 2016). Além dos déficits auditivos, a exposição intensa ao som produz efeitos deletérios mentais e sistêmicos (Ising *et al.*, 2004; Basner, 2014; Skogstad *et al.*, 2016). Um estudo demonstrou que estudantes submetidos ao ruído rosa de curta duração de até 91,5 dB apresentaram melhora no teste de memorização e que a exposição a ruídos de maior intensidade compromete a performance no mesmo teste (Skarlatos e Georgiou, 2001). Além disso, outros estudos independentes mostraram posteriormente que o comprometimento da memória independe do nível de exposição ao ruído. Em crianças cronicamente expostas ao ruído do aeroporto houve déficits de compreensão de leitura e reconhecimento de memória (Stansfeld *et al.*, 2005) da mesma forma que crianças expostas a um ambiente com ruídos menos intensos (Lercher *et al.*, 2009).

No Brasil, um estudo caracterizando o comportamento e características audiológicas de 245 jovens brasileiros em relação ao ruído mostrou: que a exposição mais comum ao ruído era por meio do uso de fones de ouvidos; 69% desses jovens apresentavam zumbido após o uso dos fones e após frequentarem casas noturnas; o zumbido era mais prevalente em mulheres (41%) do que em homens (21%) (Zocoli *et al.*, 2009).

### **1.3. Hipocampo e sua interação com o sistema auditivo**

A formação hipocampal consiste de quatro regiões corticais: o giro denteado, três subregiões do hipocampo (CA3, CA2 e CA1), complexo subicular (subículo, pré-subículo e para-subículo) e córtex entorrinal (Amaral e Witter, 1989). As subregiões do hipocampo comunicam-se com o giro dentado, com o córtex entorrinal e subículo através de um circuito trisináptico. A principal via de entrada é conduzida por axônios da via perforante, que transmitem informações sensoriais polimodais de neurônios na camada II do córtex entorrinal para o giro dentado. Em seguida, axônios das células granulosas do giro denteado os quais compõem as fibras musgosas, projetam-se para a área CA3 onde fazem sinapses excitatórias com as células piramidais. Por sua vez, os axônios das células piramidais da região CA3 projetam-se para a região CA1 formando as fibras de *Schaffer*, que se conectam com dendritos dos neurônios piramidais da região CA1 (Vellano *et al.*; 2011) (Figura 3).





de longo prazo. Outros trabalhos relacionaram o som musical à ativação do hipocampo. Estudos utilizando imagem de ressonância magnética mostraram aumento na atividade do lado direito do hipocampo quando houve recuperação da memória musical e também ativação de áreas como amígdala e hipocampo quando voluntários ouviam músicas tristes (Watanabe *et al.*; 2008 e Mitterschiffthaler *et al.*; 2007). O som musical está relacionado à formação de memórias e conseqüentemente à plasticidade sináptica hipocampal. Por exemplo, Meng e colaboradores demonstraram em 2009 que camundongos expostos à música clássica apresentavam melhora no aprendizado espacial e alteração na transmissão sináptica hipocampal. Recentemente foi mostrado que animais espontaneamente hipertensos e com distúrbios comportamentais apresentaram aumento na expressão de FosB (marcador de plasticidade) no núcleo accumbens e córtex frontal dorsolateral em comparação aos animais controle que também foram expostos ao ruído branco de 75 dB por 5 dias consecutivos (Eckernäs *et al.*, 2018).

Entretanto, a estimulação sonora de alta intensidade como a privação auditiva podem ter conseqüências danosas ao hipocampo. Por exemplo, Kraus e colaboradores (2010) observaram que a exposição a 2 horas de som de alta intensidade (126 dB) inibe a neurogênese hipocampal, o que pode ter conseqüências deletérias nos processos de memória e aprendizado. Ainda neste sentido, foi mostrado que no hipocampo de ratos submetidos a 100 dB por 12 horas ocorrem alterações na estrutura do DNA, diminuição nos níveis de dopamina e noradrenalina, diminuição na marcação para tirosina hidroxilase e aumento da expressão de GFAP (Wang *et al.*; 2017). Por outro lado, ratos neonatos que tiveram surdez temporária por perfuração timpânica apresentaram comprometimento de memória, inibição da LTP hipocampal e diminuição nas espinhas dendríticas na CA1 do hipocampo (Zhao *et al.*; 2018).

A estimulação sonora traumática também afeta a função hipocampal como demonstrado por Goble e colaboradores ao submeterem ratos a um som de 104 dB por 30 minutos. Neste estudo observaram alteração na atividade de campo local das *place cells* hipocampais (Goble *et al.*, 2009). Além disso, a estimulação sonora repetitiva de alta intensidade pode desencadear crises convulsivas generalizadas audiogênicas em ratos e camundongos suscetíveis, as quais refletem a hipsincronização e hiperativação de áreas mesencefálicas relacionadas ao processamento auditivo. A repetição destes estímulos sonoros pode levar ao recrutamento de áreas límbicas, como a amígdala e o hipocampo, fenômeno observado por registro eletroencefalográfico e comportamental (Marescaux *et al.*, 1987; Naritoku *et al.*, 1992; Garcia-Cairasco *et al.*, 1996). Nosso grupo mostrou que fatias de hipocampo de ratos Wistar submetidos a um protocolo de estimulação sonora de alta intensidade (120 dB por 1 minuto, 2 vezes ao dia por 10 dias) apresentavam a LTP na via *Schaffer-CA1* fortemente inibida (Cunha *et al.*, 2015). Isso não foi observado em fatias de hipocampo de ratos que desenvolviam crises epiléticas audiogênicas (Cunha *et al.*, 2015). Interessantemente, os animais com déficit de LTP desempenharam normalmente em um teste de aprendizado e memorização espacial o labirinto aquático de Morris, mostrando que esse déficit não comprometeu a memória e aprendizado espacial básicos.

As diferentes aferências sensoriais que chegam ao hipocampo permitem que esta estrutura do sistema nervoso central seja responsável por processos de memória, aprendizado e navegação espacial. O som é um dos estímulos sensoriais que pode modular o comportamento eletrofisiológico das células piramidais do hipocampo. Neste sentido, nosso grupo mostrou recentemente que neurônios piramidais são responsivos ao som apresentando: menor potencial de repouso de membrana, aumento na resistência de entrada e constante de tempo da membrana e diminuição do limiar do potencial de ação, devido a uma menor expressão da corrente h (mediada pelos canais HCN) nesses neurônios (Cunha *et al.*, 2018).

Além disso, os neurônios piramidais da região CA1 de animais expostos ao som dispararam mais potenciais de ação do que os neurônios de animais não expostos ao som (Cunha *et al.*, 2018). Outro estudo mostrou elegantemente que *place cells*, que normalmente disparam potenciais de ação em tarefas de memória espacial podem ser ativadas também por um padrão sonoro, mostrando que pode haver um “mapa” hipocampal de padrões sonoros, como existe com a localização espacial (Aronov *et al.*, 2017; Rueckemann e Buffalo., 2017).

Os neurônios hipocampais respondem diretamente ao som? Abe e colaboradores em 2014 já haviam demonstrado que neurônios piramidais registrados *in vivo* no modo *wholles cell patch clamp* apresentaram hiperpolarização concomitante a estimulação com tons puros com 110 dB durante 300 ms em intervalos de 6-8 segundos. Além disso, registros *in vivo* em animais acordados mostraram que a estimulação sonora produz correntes sináptica inibitórias e excitatórias em neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo (Wang *et al.*, 2017) demonstrando a responsividade direta do hipocampo a estimulação auditiva.

#### **1.4. O stress e a plasticidade sináptica hipocampal**

O estímulo sonoro de alta intensidade é um estressor que desencadeia a liberação de glicorticóides a partir da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Helfferich e Palkovits, 2003). Neste sentido, foi mostrado que exposições de 85 a 110 dB durante 30 minutos são suficientes para ativar os neurônios liberadores do hormônio liberador de corticotropina no núcleo paraventricular hipotalâmico que estimulam a secreção de corticosterona plasmática (Burrow *et al.*; 2005). A exposição ao som e a consequente liberação da corticosterona podem estar relacionadas a comprometimentos da memória e alteração na LTP, onde maiores níveis do hormônio suprimem a LTP e menores níveis facilitam a LTP no hipocampo (Shors *et al.*; 1990 e Maggio e Segal, 2007). Uma das

evidências do papel modulador do *stress* na plasticidade hipocampal mostrou que houve enfraquecimento na LTP e a potenciação da LTD na região CA1 hipocampal em animais expostos a choques de baixa intensidade (Foy *et al.*, 1987 e Shors *et al.*, 1989).

Outros trabalhos utilizaram como agente estressor ruídos crônicos de alta intensidade como forma de avaliar o comprometimento da memória e aprendizado espacial. Manikandan e colaboradores (2006) utilizaram um protocolo experimental de exposição dos animais a ruídos de 100 dB, durante 4 horas por um período de 30 dias, e observaram piora no desempenho dos testes de memória de referência e de trabalho, diminuição da densidade de dendritos nos neurônios do hipocampo, além de aumento de corticosterona no plasma e estresse oxidativo. Recentemente foi observado que a exposição de ratas prenhas a ruídos de alta intensidade compromete tanto a LTP hipocampal como a memória espacial além de aumentar os níveis de corticosterona tanto das mães como dos filhotes após o nascimento (Barzegar *et al.*, 2015), sugerindo que fatores humorais produzidos pela mãe em resposta ao *stress* devido a estimulação sonora possam passar pela placenta afetando o cérebro dos fetos. A ligação entre o evento de stress e a LTP hipocampal não é determinada apenas pelos níveis de corticosterona dependendo também da interação dos efeitos do mineralocorticóide com outros fatores (Howland e Wang, 2008).

### **1.5. BDNF como modulador da LTP**

Das diversas neurotrofinas secretadas no sistema nervoso central, o BDNF (de *brain-derived neurotrophic factor*) tem ação no hipocampo bem documentada, facilitando a LTP via a interação com receptores Trk-B (Figurov *et al.*, 1996; Korte *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2008). Protocolos de estimulação para indução de LTP promovem concomitante secreção de BDNF, enquanto estimulações de baixa frequência que levam a LTD, diminuem ou não

alteram a secreção de BDNF (Aicardi *et al.*, 2004). O BDNF é crucial para o desenvolvimento da LTP precoce (*early-LTP*) e para a formação de memórias episódicas de curto prazo, além de manter a LTP (*late-LTP*) e formar memórias de longo prazo (Lu *et al.*, 2008). A aplicação de BDNF em fatias de hipocampo recupera a LTP em fatias de ratos submetidos à hipóxia crônica intermitente, que apresentam um déficit da LTP hipocampal (Xie *et al.*, 2010). Além disso, em animais transfectados para expressão de BDNF com a sequência exon IV e VI e co-expressão fluorescente de CFP e YFP, foi observado que o enriquecimento acústico com 80 dB melhora as respostas auditivas no tronco encefálico, causa potenciação da LTP nas colaterais de *Schaffer*, melhora o desempenho dos animais no LAM e aumenta a transcrição de BDNF, ao passo que animais submetidos ao trauma acústico de 120 dB não apresentam aumento na transcrição de BDNF e potenciação da LTP, e apresentam piora no desempenho no LAM (Matt *et al.*, 2018).

O papel do BDNF na potenciação sináptica pode ser devido a mecanismos pré-sinápticos, por meio da liberação de glutamato ou pós-sinápticos, através da fosforilação dos receptores dos neurotransmissores. A relevância do BDNF na plasticidade sináptica justifica-se pela localização estratégica do receptor Trk-B no hipocampo em regiões dos neurônios como em axônios, terminais axônicos excitatórios, espinhas dendríticas, soma e eixo dendrítico em células piramidais e granulares, além dos segmentos iniciais axônicos de interneurônios e terminais axônicos somáticos formando sinapses inibitórias no soma e no eixo dendrítico (Drake *et al.*, 1999).

## **2.Objetivos**

## 2.1 Objetivos gerais

Considerando que a estimulação sonora repetida pode alterar a dinâmica das sinapses hipocâmpais e inibir fenômenos de plasticidade sináptica, o presente trabalho propõe a investigação de qual seria o estímulo sonoro mínimo para que a inibição da LTP seja observada. Sabendo-se da relação entre o *stress* e LTP, em que os níveis de corticosterona aumentados estariam diretamente envolvidos na supressão da LTP hipocâmpal, e do papel do BDNF no desenvolvimento e manutenção da plasticidade a longo prazo, investigamos de que forma o *stress* e o BDNF poderiam influenciar a inibição da plasticidade sináptica hipocâmpal na via *Schaffer-CA1* e dessa forma, tentamos compreender os mecanismos que ligam a exposição do animal a sons de alta intensidade e a inibição da LTP.

## 2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Objetivo 1: Estudar a dinâmica e os mecanismos do efeito da estimulação sonora de alta intensidade sobre a plasticidade sináptica hipocâmpal.

- Pergunta 1: Qual é a janela de efeito da estimulação sonora?

Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que um protocolo prolongado de estimulação sonora de alta intensidade (20 estímulos de 1 minuto, por 10 dias- 2 estímulos diários), é capaz de inibir a LTP hipocâmpal na via *Schaffer-CA1* quando medida até 10 dias depois do último estímulo (Cunha *et al.*, 2015). Este protocolo prolongado é usado originalmente para produzir o abramamento audiogênico em animais que apresentam suscetibilidade a crises epiléticas audiogênicas e foi escolhido por nós, pois estávamos

originalmente objetivando estudar a LTP nesses animais, especialmente após as crises epilépticas produzidas pelo abrasamento. Neste estudo, investigamos qual seria o estímulo sonoro mínimo necessário para observarmos a inibição da LTP na região CA1 do hipocampo. Para a estimulação aguda utilizamos apenas um protocolo de 1 minuto de exposição ao som de alta intensidade (110 dB) e o animal foi sacrificado 2 horas depois do estímulo. Havendo inibição da LTP, as fatias foram registradas até que observemos o retorno da potenciação. Foi avaliada a neurotransmissão na via *Schaffer-CA1* e o desenvolvimento da LTP e da PPT, como em Cunha *et al.*, 2015. Confirmando o efeito agudo do som, estudamos também o impacto da intensidade sonora, testando o estímulo não traumáticos de 80 dB.

2.2.2 Objetivo 2: Estudar a dinâmica e os mecanismos do efeito da estimulação sonora de alta intensidade sobre a plasticidade sináptica hipocampal.

- Pergunta 2: Os efeitos da estimulação sonora de alta intensidade sobre a LTP seriam mediados por alterações nos receptores para glutamato, na neurotransmissão GABAérgica e/ou na excitabilidade dos neurônios piramidais da CA1?

Em experimentos prévios (Cunha *et al.*, 2015) foram realizados usando-se registros extracelulares para se medir os potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo das sinapses Schaffer-CA1, uma técnica mais apropriada para se estudar a LTP hipocampal. Porém, nela não se obtém informações detalhadas sobre os tipos de correntes sinápticas e sobre as correntes iônicas dos neurônios piramidais da CA1. O efeito inibitório sobre a LTP poderia ser causado por exemplo, por uma inibição das correntes via receptores NMDA, por um aumento da inibição GABAérgica ou por uma menor excitabilidade dos neurônios piramidais. Para isto, experimentos usando-se *whole-cell patch-clamp* foram realizados para estudar o efeito da estimulação sonora de alta intensidade nas: (1) correntes sinápticas



glutamatérgicas dos tipos AMPA/KAINATO e NMDA, (2) correntes sinápticas inibitórias GABAérgicas e na (3) excitabilidade dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo dorsal de ratos.

### 2.2.3 Objetivo 3: Investigar se o som de 110 dB atua como um estressor

- Pergunta 3: Qual é a participação dos corticosteróides nos efeitos da estimulação sonora de alta intensidade?

Uma das hipóteses para os efeitos da estimulação sonora de alta intensidade sobre a LTP hipocampal seria pelo efeito da corticosterona liberada durante a estimulação sonora de alta intensidade (Burow *et al.*, 2005). A corticosterona afeta a LTP de forma dose-dependente, inibindo em doses altas, via receptores de glucocorticóides (GR) de baixa afinidade pela corticosterona e facilitando via receptores de mineralocorticoides (MR) de alta afinidade pela corticosterona (Shors *et al.* 1990; Avital *et al.*, 2006; Maggio e Segal, 2007). Para estudarmos a relação entre a inibição da LTP hipocampal pela estimulação sonora de alta intensidade e a corticosterona, dosamos a corticosterona plasmática do sangue coletado em diferentes tempos após o estímulo de alta intensidade agudo.

### 2.2.4 Objetivo 4: Investigar se o BDNF pode reverter a inibição da LTP

- Pergunta 4: Seria a inibição do LTP relacionada com uma deficiência na secreção de BDNF?

O BDNF é crucial para o desenvolvimento da LTP. Um déficit na liberação de BDNF gerado pela estimulação sonora de alta intensidade poderia explicar a consequente inibição da LTP

hipocampal. Por exemplo, Xie *et al.*, (2010) mostraram que perfusão de BDNF na fatia reverte a inibição da LTP causada por um protocolo de hipóxia crônica intermitente. Testaremos então se a perfusão de BDNF na fatia pode reverter o déficit de LTP nos animais submetidos ao protocolo de estimulação aguda, bem como o efeito da perfusão do BDNF em fatias de animais controle.

## **3. Material e Métodos**

Todos os protocolos experimentais envolvendo animais foram elaborados de acordo com as regras de pesquisa em Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA # 006/2015) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

### **3.1. Animais**

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos de 60-70 dias de idade fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os ratos eram acondicionados em caixas plásticas cobertas com maravalha e mantidos em quantidade de até quatro animais por caixa no Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), em ciclo claro/escuro de 12/12 h em temperatura controlada (22-24 °C) e com livre acesso a ração e água.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: ratos *naïve* (retirados diretamente de suas caixas), *sham* (ratos colocados na caixa de estímulo sonoro, mas que não recebiam nenhum tipo de estímulo sonoro), ratos submetidos ao estímulo sonoro de 110 dB (estimulação sonora de alta intensidade) e ratos submetidos ao estímulo sonoro de 80 dB.

### **3.2. Estimulação sonora**

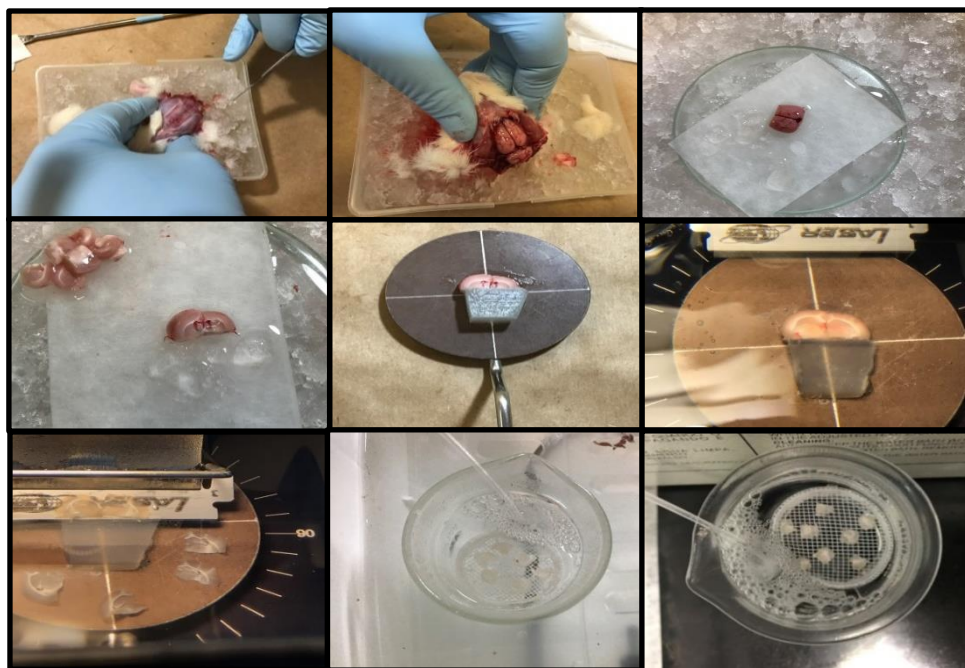
Os ratos foram colocados em uma arena acrílica (altura: 32 cm, diâmetro: 30 cm), localizada no interior de uma câmara isolada acusticamente (45 × 45 × 40 cm), com 2 alto-falantes colocados no topo da arena. Após um minuto de aclimatação, os animais foram submetidos ao estímulo sonoro de um minuto de duração de 110 dB ou 80 dB, que consiste em uma gravação de campainha digitalmente modificada, que abrange frequências de 3 a 15 kHz (Romcy-Pereira e Garcia-Cairasco, 2003). Após a estimulação, os animais eram

mantidos na arena por mais um minuto e retornavam às suas caixas onde permaneciam por duas, 24 ou 48 horas até o início da preparação das fatias hipocampais. Os animais *sham* foram colocados na arena durante 3 minutos, sem qualquer estímulo sonoro. O ruído ambiente dentro da câmara acústica era de 55 dB, e a intensidade do som no interior da arena era verificada e calibrada regularmente com um decibelímetro (Extech 407730- Sound Level Meter). Alguns animais que apresentaram sintomas de crises mesencefálicas durante a estimulação sonora não foram utilizados neste estudo (Cunha *et al.*, 2015).

### 3.3. Preparo das fatias hipocampais

Após duas, 24 e 48 horas do estímulo sonoro, os animais foram anestesiados com isoflurano e decapitados. Os cérebros foram rapidamente removidos da calota craniana e colocados em uma solução gelada (corte) contendo (mM): 87 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 sacarose, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, oxigenado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Os hemisférios foram separados e posicionados lado a lado com a porção medial voltada para cima, em seguida fixados com cola de cianoacrilato (SuperBonder®) e apoiados em um gel de ágar colado em um suporte inserido dentro da câmara do vibrátomo (VT1000Plus, Vibratome), onde eram preparadas fatias de 400 µm (experimentos de *field potential*) e de 200 µm (experimentos de *whole cell patch clamp*). Posteriormente, o córtex foi isolado do hipocampo utilizando pinça (Biologie #5) e bisturi e, cada fatia foi colocada em uma câmara de repouso contendo fluido cérebroespinal artificial (FCEa) continuamente oxigenado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, com a seguinte composição em mM: 125 NaCl, 2,8 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 20 Dextrose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> (Figura 4). As fatias permaneciam no FCEa em temperatura de 34-35 ° C por 45 minutos até serem transferidas para temperatura ambiente onde permaneciam por no mínimo uma hora antes de serem utilizadas. As fatias hipocampais registradas na região do giro dentado, tiveram mantidos íntegros o córtex, e ao

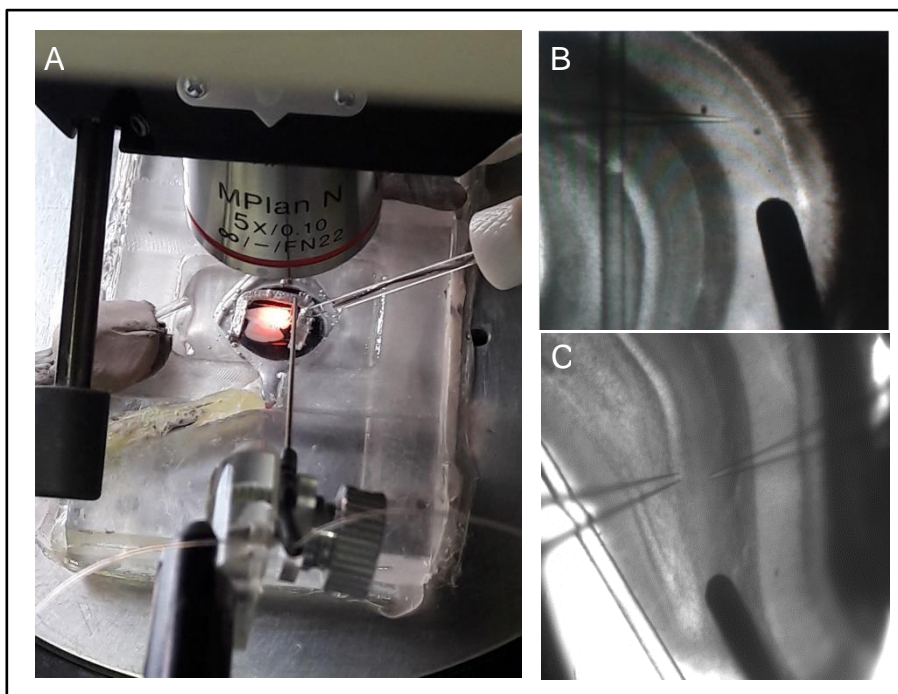
FCEa foi adicionado 20  $\mu$ M de picrotoxina (antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>) durante o registro de *field potential*.



**Figura 4. Imagens ilustrativas de como é realizado o corte de fatias hipocâmpais.** A sequência da esquerda para a direita mostra como a calota craniana é aberta, o cérebro exposto e as fatias hipocâmpais preparadas para posterior registro. Imagens retiradas do acervo pessoal.

### 3.4. Registro de *Field Potential* e indução da LTP

Para o registro dos sinais foi usado um amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, USA) conectado a uma interface Digidata 1440A AC/DC (Molecular Devices, USA). As fatias foram colocadas na câmara de registro onde eram mantidas com o auxílio de uma rede de fios de nylon fixados a uma platina. As fatias receberam continuamente FCEa (1 mL/min) oxigenado com mistura carbogênica e a temperatura foi controlada (32-34 ° C) usando um controlador de temperatura *inline* (Warner Instruments, USA). Para o estímulo das fibras aferentes, utilizamos um microeletrodo bipolar concêntrico (FHC - Bowdoin, Maine, USA), conectado ao estimulador de voltagem Master-9 (A.M.P.I., Israel) que foi posicionado nas fibras colaterais de *Schaffer* ou na via perforante (Figura 5).

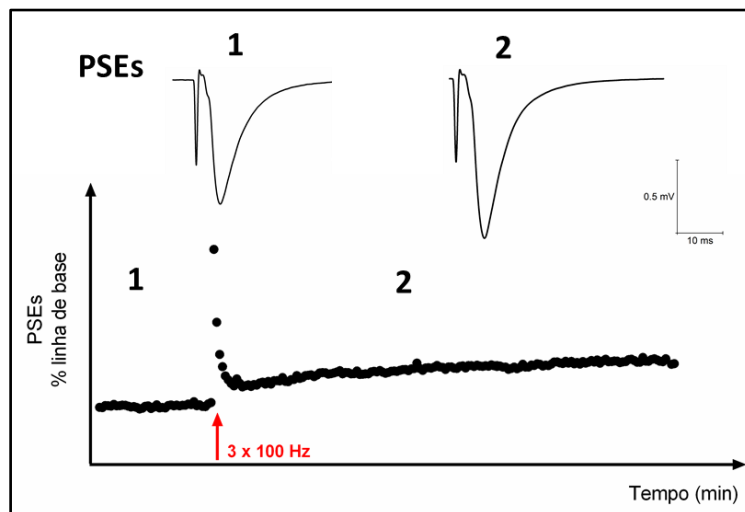


**Figura 5.** Posicionamento da fatia do hipocampo na câmara de registro. Em A, é possível observar as fatias apoiadas pela rede de nylon, o eletrodo de estímulo e a pipeta de registro de vidro. Em B, a imagem da região CA1 do hipocampo obtida por uma objetiva de 5 vezes, o eletrodo de estímulo em preto sob as fibras colaterais de *Schaffer* e as pipetas de vidro no estrato radiado e na camada piramidal. Em C, o eletrodo de estímulo na via perforante do giro dentado e os eletrodos de registro na camada granular e molecular externa.

Os potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (*field potentials*; fEPSP) foram registrados na camada do estrato radiado da CA1 ou na camada molecular externa do giro dentado no modo *current-clamp*,  $I = 0$ . No eletrodo posicionado na camada do estrato radiado ou na camada molecular externa do giro dentado, medimos as alterações de potenciais sinápticos extracelulares (PSEs) evocados por estímulos de voltagem nas vias de *Schaffer* e na via Perforante, respectivamente. Para os estudos da LTP, primeiramente construímos uma curva intensidade-estímulo das PSEs, aumentando gradativamente o estímulo necessário para evocar as PSEs. A partir desse estímulo máximo, escolhemos a intensidade de estímulo que produz uma PSE equivalente a aproximadamente 50% do PSE máximo. Em seguida, 50 PSEs foram registrados nessa intensidade, sendo os PSEs estimulados a cada 30 segundos. Após o registro da linha de base, o protocolo de indução da LTP foi aplicado, o qual consistiu de 3

trens de 1 segundo cada, de estímulos em alta frequência (100 Hz) dados em intervalos de 1 segundo na via *Schaffer* e de 20 segundos na via perforante. O protocolo de indução de LTP com intervalo de 1 segundo entre os trens foi testado no giro dentado, porém sem sucesso. Dessa forma, aumentamos o intervalo entre os trens para 20 segundos (Okada *et al.*, 2003) e conseguimos induzir a LTP, padronizando este protocolo no laboratório. Logo após a aplicação dos protocolos, os PSEs continuaram sendo registrados por 80 minutos na mesma frequência (1 estímulo a cada 30 segundos) para avaliarmos a eficácia dos protocolos em gerar LTP (Figura 6). Nos experimentos que investigamos a modulação do BDNF na LTP, o BDNF (25 ng/ml) e seu agonista (LM-22A4- 5 $\mu$ M) foram perfundidos nos 5 minutos finais da linha de base e nos primeiros 5 minutos pós-LTP.

Os sinais foram adquiridos a 100 kHz, filtrados (passa baixa; Bessel de 8 polos) a 3 kHz e armazenados em computador para análise posterior.



**Figura 6.** Representação do decurso temporal da indução de LTP pelo protocolo de estimulação de alta frequência comparando a resposta basal (1) e a forma potenciada (2).



### **3.5. *Whole cell patch clamp***

Os experimentos em *whole cell patch clamp* foram feitos com fatias hipocâmpais de 200  $\mu\text{m}$  colocadas em uma câmara de repouso continuamente perfundida com FCEa suplementado com picrotoxina (antagonista do receptor GABA-20  $\mu\text{M}$ ), exceto no registro da neurotransmissão GABAérgica, e em temperatura de 34 °C controlada com aquecedor *inline* (Scientifica). Os neurônios piramidais da região CA1 foram visualizados com um microscópio Olympus BX51WI através de uma objetiva de imersão em água de 40x e óptica de contraste de interferência diferencial (DIC). As células piramidais da região CA1 foram escolhidas seguindo o critério da morfologia (forma piramidal) e de posição, no meio da camada piramidal, a fim de evitar diferenças eletrofisiológicas conforme observado por Maroso e colaboradores (2016). Os eletrodos de registro, preenchidos com a solução interna de pipeta escolhida para cada conjunto de experimentos, foram fabricados a partir de capilares de borosilicato (BF150-86-10, 15 Sutter Instruments) com as resistências de ponta entre 4-5  $\text{M}\Omega$ . Os registros eletrofisiológicos no modo *whole cell patch clamp* foram realizados através de um amplificador Heka EPC10, com uma taxa de amostragem de 50 kHz, com um filtro de passa baixa de 3 kHz (Bessel).

#### **3.5.1. *Whole cell patch clamp*: propriedades passivas da membrana e corrente h**

Cinco minutos após o estabelecimento do modo *whole cell*, iniciamos os protocolos para medida das propriedades passivas dos neurônios. Neste caso, registramos as respostas do potencial de membrana em *current clamp* frente a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes e construímos curvas Voltagem x Corrente (V x I) medindo as alterações de voltagem no estado estacionário a partir do potencial de repouso da membrana ( $I=0$ ).

Por outro lado, as correntes *h* foram registradas no modo *voltage clamp* mantendo-se inicialmente o potencial de membrana em -70 mV a partir de pulsos de voltagem hiperpolarizantes de -70 a -120 mV, com incrementos de -10 mV e 2 s de duração. Para obtenção da corrente *h*, subtraímos as correntes registradas antes e após a perfusão com ZD7288 (20  $\mu$ M) (bloqueador das correntes *h*).

A resistência em série foi compensada em 60% e as voltagens foram corrigidas *off-line* utilizando um potencial de junção de -10 mV (Dagostin, 2012). Para os registros das propriedades passivas de membrana e a corrente *h* utilizamos uma solução interna de pipeta que consistiu em mM: 138 K-gluconato, 8 KCl, 10 Hepes, 0,5 EGTA, 10 fosfocreatina, 4 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP. O pH foi ajustado para 7,3 com KOH e a osmolaridade permanecia em torno de 290 mOsm / kgH<sub>2</sub>O.

### **3.5.2. Whole cell patch clamp: correntes AMPA/KA e NMDA**

As correntes pós-sinápticas excitatórias glutamatérgicas (EPSCs) foram evocadas a partir do estímulo das fibras *Schaffer* com um microeletrodo bipolar concêntrico conectado a um estimulador de voltagem SD9 Grass (Natus Medical Incorporated, Warwick, RI, USA). O registro das EPSCs ocorreu sob a perfusão das fatias com FCEa com picrotoxina (20  $\mu$ M) utilizando uma solução interna composta em mM: 130 CsCl, 10 Hepes, 5 EGTA, 5 fosfocreatinina, 4 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 10 TEA, 5 QX 314, com pH 7.3 ajustado com CsOH e osmolaridade  $\approx$ 290 mOsm/kgH<sub>2</sub>O. As correntes AMPA e NMDA foram registradas em potenciais de -70 a +80 mV com incrementos de +30 mV, utilizando voltagens mínimas suficientes para evocar uma corrente máxima. Para obtenção das correntes NMDA, bloqueamos as correntes AMPA/KA com DNQX (antagonista dos receptores AMPA/KA: 10  $\mu$ M) durante 10 minutos e, as correntes AMPA foram calculadas após subtração das correntes antes e após perfusão com DNQX.

### **3.5.3. Whole cell patch clamp: correntes GABAérgicas espontâneas e miniaturas**

As correntes pós-sinápticas inibitórias GABAérgicas (IPSCs) foram registradas em -70 mV utilizando a seguinte solução interna de pipeta em mM: 145 KCl, 10 Hepes, 0.5 EGTA, 10 fosfocreatina, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, com pH 7.3 ajustado com KOH e osmolaridade  $\approx 290$  mOsm/kgH<sub>2</sub>O. As IPSCs espontâneas foram registradas na presença de DNQX (10  $\mu$ M) por 10 minutos. Em seguida, as IPSCs em miniatura foram isoladas a partir do bloqueio dos potenciais de ação pela tetrodotoxina (TTX: bloqueador dos canais N<sub>av</sub> - 0.5  $\mu$ M). As IPSCs espontâneas e em miniaturas foram posteriormente selecionadas manualmente de forma que apenas as correntes com bom sinal foram consideradas.

### **3.6. Dosagem da corticosterona plasmática**

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado em tubos de heparina em quatro tempos distintos: imediatamente, 30 minutos, 2 e 24 horas após o estímulo *sham* ou sonoro (110 dB e 80 dB). As amostras de sangue foram centrifugadas a 13000 RPM (4 °C, 20 minutos) e o plasma reservado a -70 °C até ser utilizado. O grupo controle (*naïve*) foi usado como linha de base para comparação.

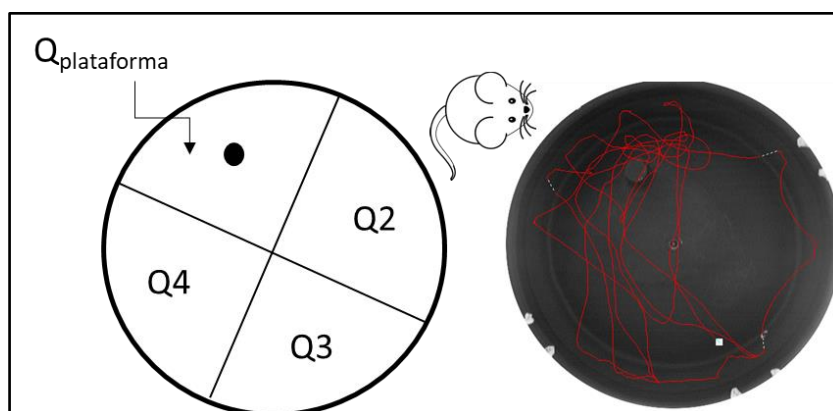
Os experimentos de extração hormonal e o radioimunoensaio foram realizados no Laboratório do Prof. Dr. Antunes José Rodrigues da FMRP, conforme descrito em Vecsei e colaboradores *em* 1979. Inicialmente, a corticosterona foi extraída a partir de 25  $\mu$ l de plasma com 1 ml de etanol absoluto gelado e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 RPM (4 °C, 15 minutos) e liofilizadas. Para o radioimunoensaio, foram adicionados 100  $\mu$ l de anticorpo anti-corticosterona (AB-cort-17984) e 100  $\mu$ l de hormônio marcado (corticosterona 1,2-3 (H), New England Nuclear) a 500  $\mu$ l das amostras ressuspensas que em seguida,

foram agitadas e reservadas a 4 °C por 24 horas. No dia seguinte, o carvão-dextran (0,5/0,05%) foi adicionado às amostras que foram agitadas, mantidas em repouso (15 minutos) e centrifugadas a 2500 RPM (4 °C, 15 minutos). Posteriormente, o sobrenadante foi vertido em tubos de cintilação onde foram adicionados 4 ml de líquido de cintilação. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 2 horas até que a radioatividade fosse determinada através de um contador beta.

### **3.7. Tarefa de memória espacial de navegação**

Este experimento foi realizado no laboratório do Prof. Sebastião Almeida no Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. O LAM consiste de uma piscina circular na cor preta (1.40 metros de diâmetro x 50 cm de profundidade) preenchida com água a 23 °C, com uma plataforma preta levemente submersa (9 cm - diâmetro) colocada em um dos quatro quadrantes virtuais. Pistas visuais foram colocadas nas paredes ao redor da piscina para facilitar o direcionamento do animal. Os ratos (*sham*, *naïve*, estimulados com 110 e 80 dB) foram colocados na piscina voltados para a borda, de forma aleatória nos quadrantes, exceto no quadrante em que a plataforma estava (Figura 7). Os ratos foram estimulados em uma sala contígua à sala do teste, para evitar algum *stress* envolvido no transporte dos animais entre os prédios da FMRP e da FFCLRP. Os animais exploravam a piscina por 90 segundos ou até encontrarem a plataforma e lá permaneciam por 30 segundos. Caso o animal não encontrasse a plataforma após 90 s, estes eram gentilmente retirados da água e colocados sobre a plataforma por 30 s até o início da próxima tentativa. Durante o experimento, a plataforma permaneceu na mesma posição a fim de que os ratos pudessem encontrá-la. Os ratos foram submetidos a 12 tentativas por dia durante dois dias de teste. No final do segundo dia de treinamento, a plataforma foi retirada

da piscina para que a sessão de teste fosse realizada (25<sup>a</sup> tentativa- teste de transferência). Após 24 horas, subsequentemente ao último dia de treinamento (R1), e após uma semana (R2), os ratos foram colocados na piscina no quadrante oposto ao quadrante alvo a fim de avaliarmos a memorização para o quadrante alvo (os ratos exploravam a piscina por 180 segundos). O treinamento e as sessões de teste foram registrados por uma câmera de vídeo (SA-3 Tracker, USA) colocada no topo da piscina. O sistema de rastreamento Ethovision (Noldus Information Technology, Holanda) registrou todas as sessões experimentais as quais foram automaticamente analisadas pelo mesmo programa e de onde foram calculadas a latência e a distância percorrida para encontrar a plataforma submersa.



**Figura 7. Representação do labirinto aquático de Morris, seus quadrantes e exemplo de traçado de animal em fase de treinamento.** Rato retirado de <http://www.clker.com/clipart-black-and-white-mouse.html>.

### 3.8. Teste comportamental: Medo Condicionado

O ambiente para o teste do medo condicionado consistiu de duas caixas diferentes: contexto A (23 × 20 × 21 cm; paredes brancas, um piso de grade contendo 23 hastes de aço inoxidável de 2 mm de diâmetro, com espaços de 1,0 cm de distância entre as hastes e conectados para gerar choque nas patas); contexto B (23 × 20 × 21 cm; paredes pretas e brancas e chão branco). Após 2 horas do estímulo sonoro ou estímulo fictício (*sham*), os

animais foram colocados no contexto A antes de receberem choques nas patas (4 choques, 0,85 mA, 1 s - estímulo não condicionado) pareados com um tom auditivo (30 s, 1 kHz, 70 dB- estímulo condicionante). Após 24 horas do contexto A, durante o treinamento de extinção, os animais foram colocados em um contexto B em uma sala diferente, enquanto 21 tons foram apresentados sem choque nas patas. No dia seguinte, 10 tons foram apresentados para testar o aprendizado da extinção ainda no contexto B. O comportamento de congelamento foi avaliado durante as três fases, sendo caracterizada pela ausência de movimentos, exceto aqueles necessários para a respiração.

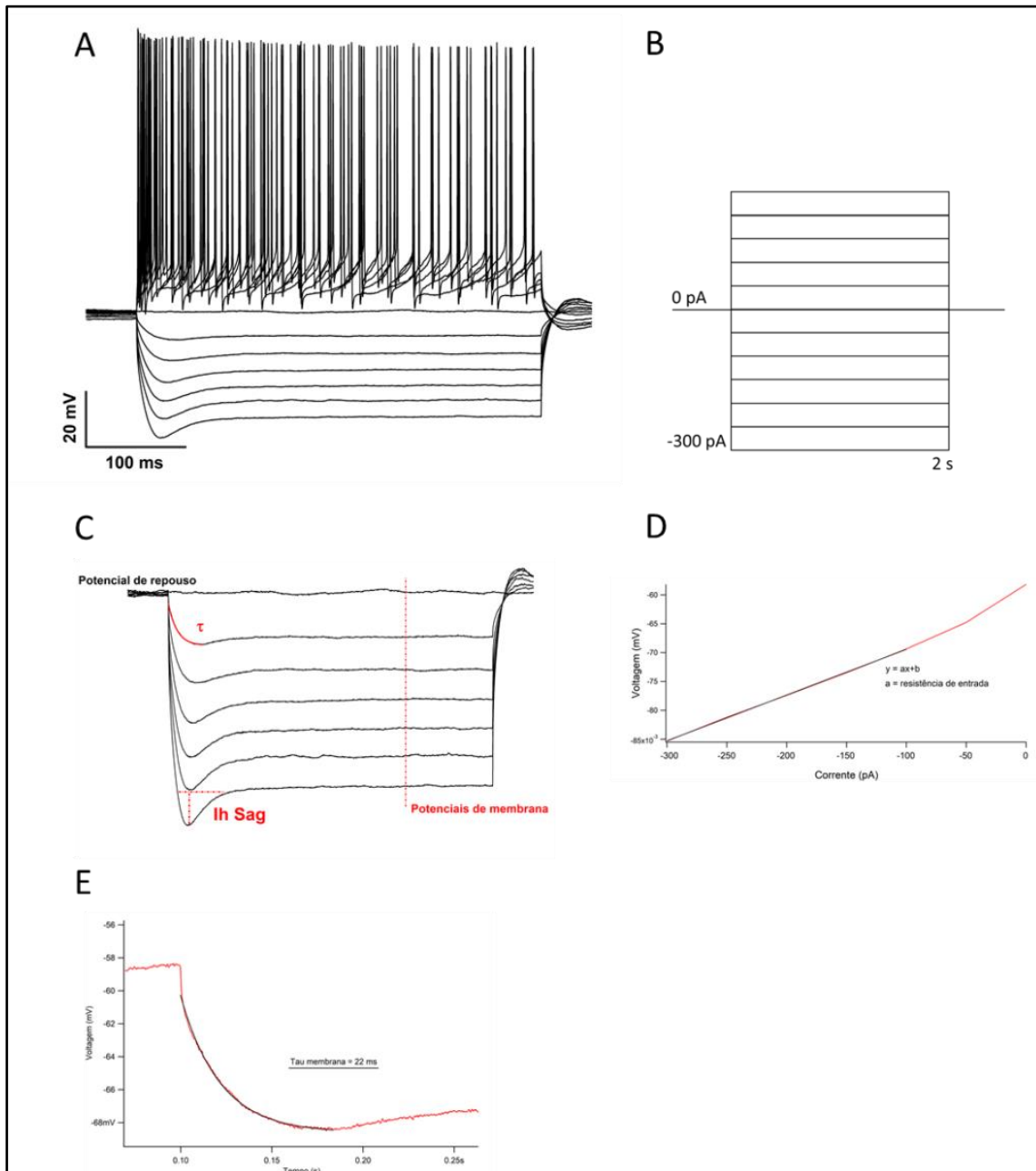
### 3.9. Análise dos dados

Os dados referentes à LTP foram analisados utilizando o software *Clampfit* 10.2. Para as análises, os registros foram filtrados em um filtro passa-baixo (500 Hz) e as inclinações (*slopes*) do fEPSP foram obtidas ajustando a região correspondente a aproximadamente 10-90% da deflexão com uma função linear. Os dados de cada experimento foram normalizados em relação à linha de base obtida antes da indução da LTP. A LTP foi quantificada como a média dos *slopes* dos fEPSP nos últimos 35 minutos dos 80 minutos de registro após a indução de alta frequência. A PPT correspondeu à média do primeiro fEPSP após indução da LTP. As curvas de entrada e saída para os fEPSP e para os volleys aferentes foram ajustadas com uma função linear e seus *slopes* foram comparados. A comparação entre os grupos foi feita usando o teste T de *Student* não-pareado ou o ANOVA de uma via com o pós-teste de *Fischer*. Os dados do LAM foram analisados usando o ANOVA de duas vias com medidas repetidas e não repetidas com pós-teste de *Student Newman-Keuls*.

Na figura 8 pode-se observar como foram estimadas as propriedades intrínsecas das células a partir das alterações de potencial (Fig. 8A) obtidas pela injeção de pulsos de correntes em *current clamp* (Fig. 8B). A resistência de entrada da membrana foi calculada

como a inclinação da relação V-I em resposta a pulsos de correntes de -300 pA à +50 pA, partindo de 0 pA até a corrente máxima sem gerar disparo de potenciais de ação pelo neurônio (Fig. 8 C-D). A despolarização da membrana após uma hiperpolarização (*sag*), foi medida como a diferença do potencial gerado no início da aplicação de uma corrente de -200 pA e no final (Figura 8 D). Para análise da constante de tempo da membrana foi feito um ajuste com uma única função exponencial da resposta de voltagem a pulsos de correntes hiperpolarizantes de -50 pA a partir do início do decaimento RC de voltagem ao pico da hiperpolarização (Figura 8 E).

Para análise das propriedades intrínsecas, foram utilizadas rotinas em *IgorPro* (Wavemetrics, Portland, OR, USA) especialmente escritas pelo Dr. André Andreotti Dagostin.



**Figura 8. Representação gráfica dos parâmetros intrínsecos das células piramidais da CA1 do hipocampo dorsal de ratos.** A. Típica resposta de alteração de voltagem de um neurônio piramidal em resposta a (B.) pulsos de corrente. C. Destaque para as alterações de voltagens sublimiáres e o *sag* da corrente h. D. Exemplo de uma VI construída a partir das voltagens no estado estacionários produzidas pela injeção da respectiva corrente. A resistência de entrada foi considerada como o valor da inclinação (*slope*) de uma função linear que ajustou os dados. E. Constante de tempo da membrana estimada como a constante de tempo de uma equação mono-exponencial padrão do tipo  $y = y_0 + A \exp \{-(x-x_0)/\tau\}$  que ajustou as alterações de potencial da membrana até 200 ms.



Para análise das possíveis alterações da corrente  $h$  foi utilizada uma rotina desenvolvida em *Matlab* (MathWorks, Natick, MA, USA) pelo Dr. Cesar Celis Ceballos. Nestas análises foram estimadas as correntes no estado estacionário resultante de pulsos de voltagem hiperpolarizantes. Além das correntes estacionárias, foram estimadas as amplitudes das correntes de cauda as quais foram normalizadas pela corrente máxima. As amplitudes normalizadas foram então analisadas em função da voltagem e ajustadas com equações sigmoidais do tipo Boltzman onde  $Y = 1 + [(1-I_{min}/I_{max})/(1+\exp(V_{50} - X/slope))]$  para estimativas das voltagem de ativação de 50% da corrente  $h$ .

As correntes excitatórias foram analisadas com o auxílio de rotinas em *Matlab* (MathWorks, Natick, MA, USA) especialmente escritas pelo Dr. Cesar Celis Ceballos. Nestas análises foram estimadas as amplitudes das correntes para AMPA-kainato e NMDA. A partir da amplitude das correntes, foram construídas as relações IV as quais foram comparadas entre os grupos de animais.

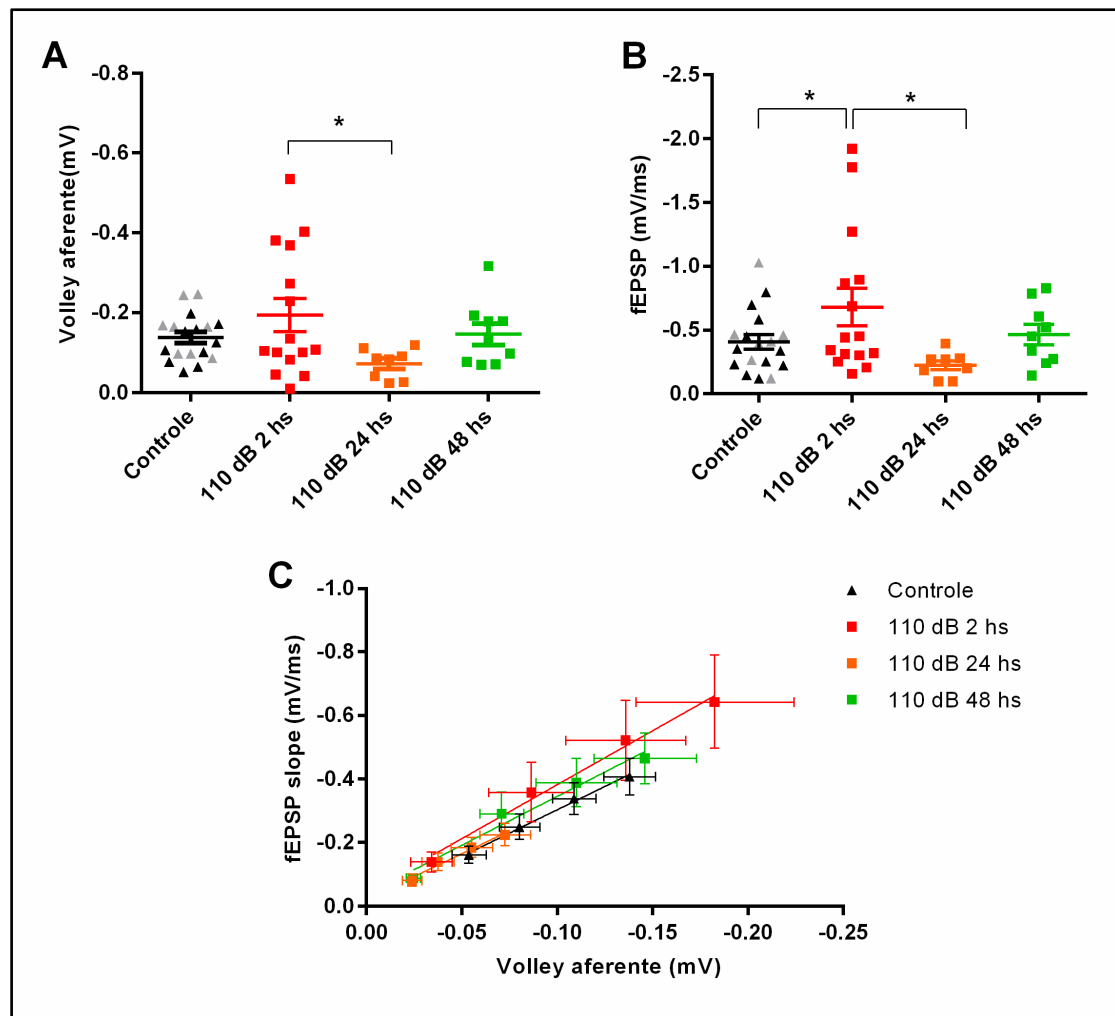
As correntes inibitórias foram detectadas manualmente, sendo o tempo, a amplitude e *rise time* estimados automaticamente pelo programa *Mini Analysis* (Synaptosoft 6.0.3, Fort Lee, NJ, USA). As constantes de tempo de decaimento e *half-widths* das correntes foram obtidas a partir de ajuste de duplas exponenciais a cada uma das correntes detectadas. Foram descartadas as correntes cujo ajuste obteve valores de  $r < 0.7$ . Foram construídos histogramas com os intervalos entre correntes e amplitudes, sendo estes juntamente com as frequências cumulativas comparados entre os animais estimulados e controles.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* 6.0 e os dados são mostrados como média e EPM (erro padrão da média). O nível de significância considerado foi de  $P \leq 0,05$ .

## **4. Resultados**

#### 4.1. A neurotransmissão basal está alterada em ratos submetidos ao ESAI

Dados prévios do nosso laboratório mostraram que ratos expostos durante 10 dias a episódios curtos (1 minuto) de som de alta intensidade (120 dB, duas vezes por dia) possuem a LTP inibida na sinapse da via *Schaffer*-CA1 após 1 semana do final do protocolo (Cunha *et al*, 2015). No presente trabalho, o nosso principal objetivo foi investigar qual seria o estímulo sonoro mínimo para observarmos inibição da LTP hipocampal. Dessa forma, inicialmente investigamos a neurotransmissão basal de ratos após 2, 24 e 48 horas de exposição a 1 episódio de som de 110 dB durante 1 minuto. Observamos que a estimulação da *Schaffer*-CA1 produziu fEPSP com *slopes* máximos e *volleys* aferentes similares nos animais controle e *sham* ( $P>0.05$ ; teste T não pareado; Figuras 9A e 9B). Pelo fato de não termos encontrado alteração nos *slopes* e *volleys* aferentes nos animais *sham* e controle, agrupamos esses dados e eles foram usados como o grupo controle. Ao compararmos todos os grupos, constatamos que tanto os *volleys* aferentes quanto os *slopes* do fEPSP foram significativamente diferentes no estímulo máximo de voltagem (50 volts) ( $P<0.05$ , ANOVA de uma via). O *slopes* dos fEPSP dos animais após 2 horas do estímulo sonoro foram significativamente maiores do que os *slopes* do fEPSP dos animais controle e após 24 horas do estímulo (Figura 9B). O *volley* aferente foi significativamente diferente entre os grupos que receberam estímulo e tiveram suas fatias registradas após 2 e 24 horas (Figura 9A;  $p<0.05$ ; LSD de Fischer). Nós analisamos os *slopes* dos fEPSP em função dos *volleys* aferentes (Figura 9C) em resposta a uma intensidade crescente de estímulo e não encontramos diferença na relação entre os *slopes* e os *volleys* aferentes nos diferentes grupos ( $P>0.05$ ).

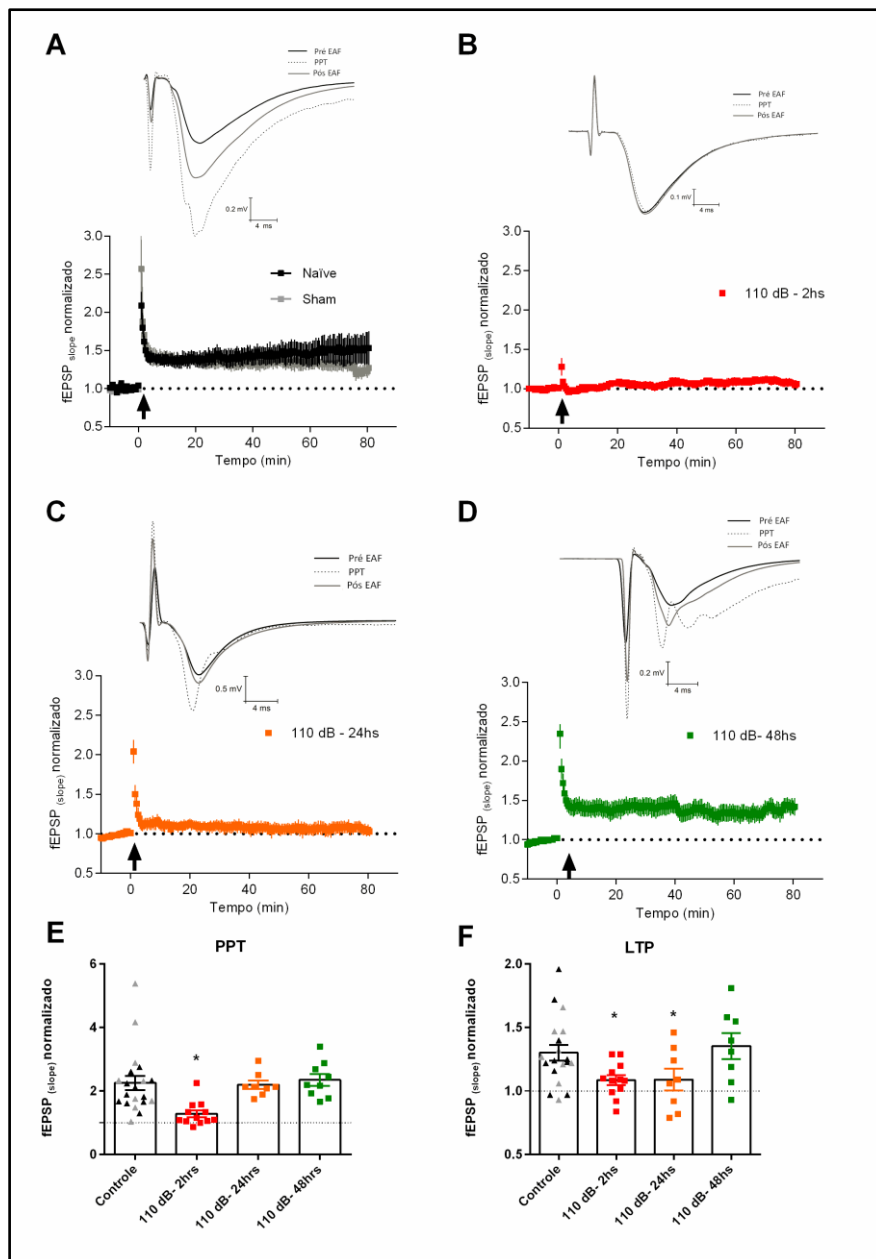


**Figure 9. Efeitos da estimulação sonora de alta intensidade na neurotransmissão das sinapses na via Schaffer/CA1.** A) Amplitudes máximas dos *volleys* aferentes de animais controle e animais sacrificados 2, 24 e 48 horas após estimulação sonora de 110 dB. B) fEPSP de animais controle e animais sacrificados 2, 24 e 48 horas após estimulação sonora de 110 dB. Nos grupos controle, os símbolos pretos representam animais *naïve* e os símbolos em cinza, animais *sham*. (C) Correlação da inclinação do fEPSP com a amplitude dos *volleys* aferentes. Linhas representam o *fitting* das funções lineares. \*  $P < 0,05$ .

#### 4.2. Um único estímulo sonoro de 110 dB é suficiente para inibir a LTP e a PPT na via Schaffer-CA1

Em seguida, testamos se a LTP foi alterada pela exposição ao som de alta intensidade. Nestes experimentos, a estimulação de 100 Hz nas fibras colaterais de Schaffer induziu similarmente uma forte PPT nos grupos *naïve* e *sham* ( $2,0 \pm 0,13$ ;  $2,56 \pm 0,46$ ;  $n = 11$  e  $9$ ,

respectivamente.  $P = 0,224$ , teste T de *Student* não pareado) seguido de uma LTP (que durou pelo menos 80 minutos após o protocolo) que não foi diferente entre os grupos *naïve* e *sham* ( $1,34 \pm 0,09$ ;  $1,29 \pm 0,7$ ;  $n = 11$  e  $9$ , respectivamente.  $P = 0,68$ , teste T de *Student* não pareado). Semelhante ao descrito na seção anterior, como não observamos diferença significativa entre o grupo *naïve* e *sham*, os dados foram então novamente agrupados como um grupo controle. Por outro lado, tanto a PPT como a LTP de animais submetidos a 110 dB de estimulação sonora foram fortemente inibidos quando comparados ao controle 2 horas após o estímulo (Figura 10E e 10F; PTP:  $1,28 \pm 0,11$ ;  $F(3, 43) = 5,47$ ;  $P = 0,0027$ ; ANOVA de uma via.  $P < 0,001$ , teste LSD de Fischer; LTP:  $1,09 \pm 0,04$ ;  $F(3, 43) = 3,572$ ;  $P = 0,0215$ ; ANOVA de uma via.  $P < 0,05$ , teste LSD de Fischer). Em fatias obtidas dos animais após 24 horas da estimulação sonora, a PPT retornou a valores semelhantes ao controle (Figura 10E.  $2,2 \pm 0,13$ ;  $n = 8$ ;  $P > 0,05$ , teste LSD de *Fischer*), mas a LTP foi ainda significativamente menor do que o controle ( $1,09 \pm 0,08$ ;  $n = 8$ ;  $P < 0,05$ , teste de LSD de Fischer). No entanto, após 48 horas do estímulo sonoro, a PTP e a LTP retornaram a valores semelhantes aos níveis do controle (PTP:  $2,35 \pm 0,19$ ; LTP:  $1,35 \pm 0,1$ ;  $n = 9$ .  $P > 0,05$ , teste LSD de *Fischer*). Com estes resultados, concluímos que 1 minuto de estímulo sonoro de 110 dB é suficiente para inibir reversivelmente a LTP e a PPT na via *Schaffer / CA1*.



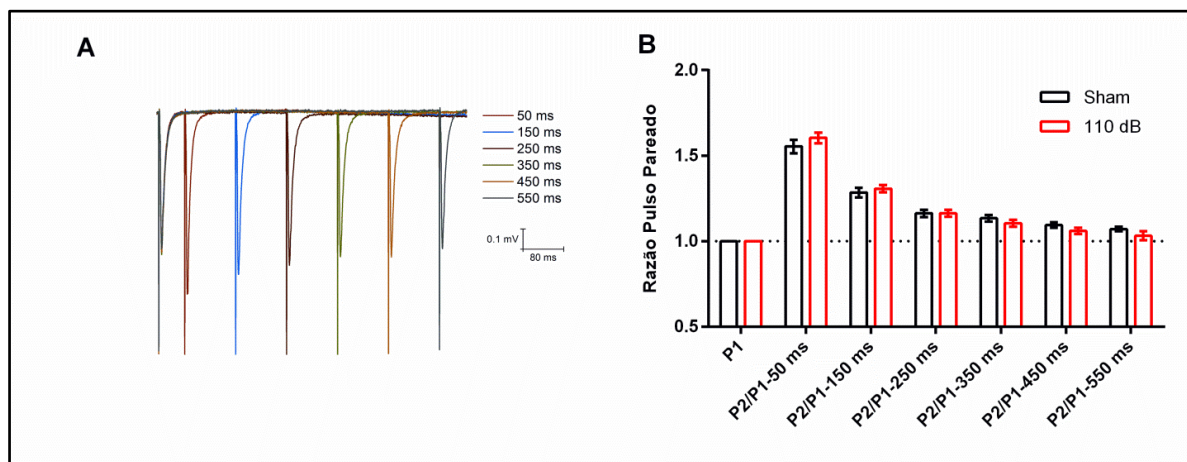
**Figura 10. Inibição da LTP por estimulação sonora de alta intensidade.** (A) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do estímulo de alta frequência (EAF-seta) das sinapses *Schaffer-CA1* em animais *naïve* e estimulados. Traçados representativos são mostrados acima do *slope*. (B) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses *Schaffer-CA1* de animais sacrificados 2 horas após a exposição ao som de 110 dB. Exemplos representativos são mostrados acima do *slope*. (C) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses *Schaffer-CA1* em animais sacrificados 24 horas após exposição sonora de 110 dB. Exemplos representativos são mostrados acima do *slope*. (D) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses *Schaffer-CA1* em animais sacrificados 48 horas após exposição sonora de 110 dB. Exemplos representativos são mostrados acima do *slope*. (E) Resumo da PPT. (F) Resumo da LTP. \*  $P < 0,05$ .

### 4.3. Um único episódio de estimulação sonora de 110 dB não altera a facilitação de pulso pareado (FPP)

Mostramos que a PPT foi reduzida por um único estímulo sonoro de 110 dB com um minuto de duração e que o *slope* do fEPSP e o *volley* aferente foram maiores após 2 horas de exposição ao som. Embora a LTP na via *Schaffer-CA1* seja um fenômeno principalmente pós-sináptico (Lüscher, C. e Malenka, 2012), a PPT é uma forma pré-sináptica de plasticidade de curto prazo que dura alguns segundos e é dependente do aumento no cálcio residual que pode aumentar a probabilidade de exocitose vesicular ( $P_r$ ), o tamanho do *pool* de vesículas sinápticas ( $n$ ) e o tamanho quantal ( $m$ ). (Habets, R. L. e Borst, J. G. 2005, 2007 ; Korogod *et al.*; 2007; Lee *et al.*, 2008; Xue, L. e Wu, L. G, 2010). Por outro lado, a FPP dura milissegundos e depende do acúmulo de cálcio residual no terminal sináptico gerando um aumento na probabilidade de liberação (Xue, L. e Wu, L. G, 2010). Alterações nos parâmetros pré-sinápticos, como a probabilidade de liberação ou tamanho do *pool* de vesículas afetariam a razão do segundo fEPSP em relação ao primeiro na FPP. Para saber se as alterações na PPT foram causadas por alterações nos parâmetros básicos pré-sinápticos, ou por mecanismos específicos da PPT, medimos a FPP evocada por 2 estímulos distribuídos em intervalos curtos (50, 150, 250, 350, 450 e 550 ms).

Nós não encontramos nenhuma mudança na FPP nos intervalos inter-estímulos nas sinapses da *Schaffer-CA1* em fatias de ratos submetidos a 1 minuto de 110 dB de estimulação sonora (Figura 11; *sham*: 50 ms:  $1,55 \pm 0,03$ ; 150 ms:  $1,28 \pm 0,02$ ; 250 ms:  $1,16 \pm 0,02$ ; 300 ms:  $1,13 \pm 0,01$ ; 350 ms:  $1,09 \pm 0,01$ ; 450 ms:  $1,07 \pm 0,01$ . Estimulados: 50 ms:  $1,60 \pm 0,03$ ; 150 ms:  $1,30 \pm 0,02$ ; 250 ms:  $1,16 \pm 0,01$ ; 300 ms:  $1,10 \pm 0,01$ ; 350 ms:  $1,06 \pm 0,01$ ; 450 ms:  $1,03 \pm 0,02$ ;  $P > 0,05$  para todos os intervalos, teste t múltiplo, corrigido para múltiplas comparações com o teste Holm Sídák). O decaimento da FPP foi avaliado ajustando uma única função exponencial de decaimento aos dados, e as constantes de tempo não foram

consideradas diferentes ( $K = 0,008 \pm 0,001$ - *sham* e  $0,007 \pm 0,001$ - 110 dB, resultando em *tau* de 124 e 143 ms, respectivamente,  $P > 0,05$ ). Com estes achados, concluímos que os mecanismos pré-sinápticos de exocitose vesicular basicamente não são afetados pelo nosso protocolo de estimulação sonora de alta intensidade, e que as diferenças na PPT refletem provavelmente mudanças específicas nos mecanismos relativos à PPT.



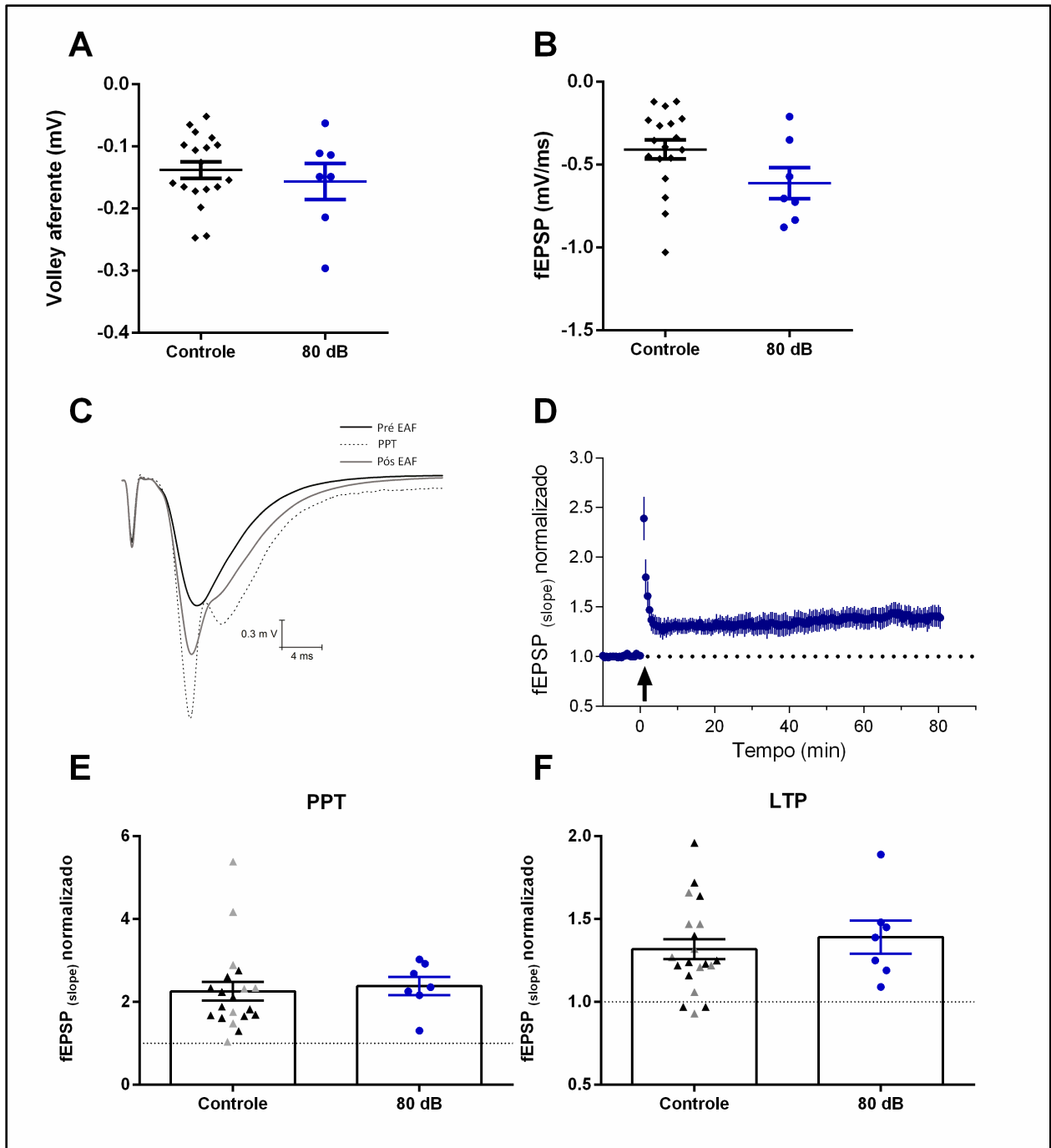
**Figura 11. Efeito da exposição sonora de 110 dB na plasticidade de curto prazo.** A) Pares de fEPSP entregues em intervalos de 50, 150, 250, 350, 450 e 550 ms. (B) Razão de pulso pareado (RPP) dos fEPSP entregues nos diferentes intervalos.  $N = 7$  para cada grupo. Dados representados como média  $\pm$  EPM.

#### 4.4. Um estímulo sonoro de 80 dB não inibe a LTP

Nós então testamos se a inibição da LTP está relacionada à intensidade sonora. Para isso, os animais foram submetidos a um estímulo sonoro moderado de 80 dB por um minuto, e sacrificados 2 horas depois. Nenhuma diferença foi encontrada no *slope* máximo do fEPSP e no *volley* aferente (Figura 12A e 12B) dos ratos estimulados em comparação aos ratos controle (*volley* aferente: controle:  $-0,14 \pm 0,013$  mV; 80 dB:  $-0,16 \pm 0,08$  mV;  $P = 0,513$ , teste t não pareado; fEPSP: controle:  $-0,41 \pm 0,06$  mV / ms; 80 dB:  $-0,62 \pm 0,09$  mV / ms;  $P = 0,07$ , teste t não pareado). Após o estímulo de 100 Hz, ambas LTP e PPT desenvolveram-se



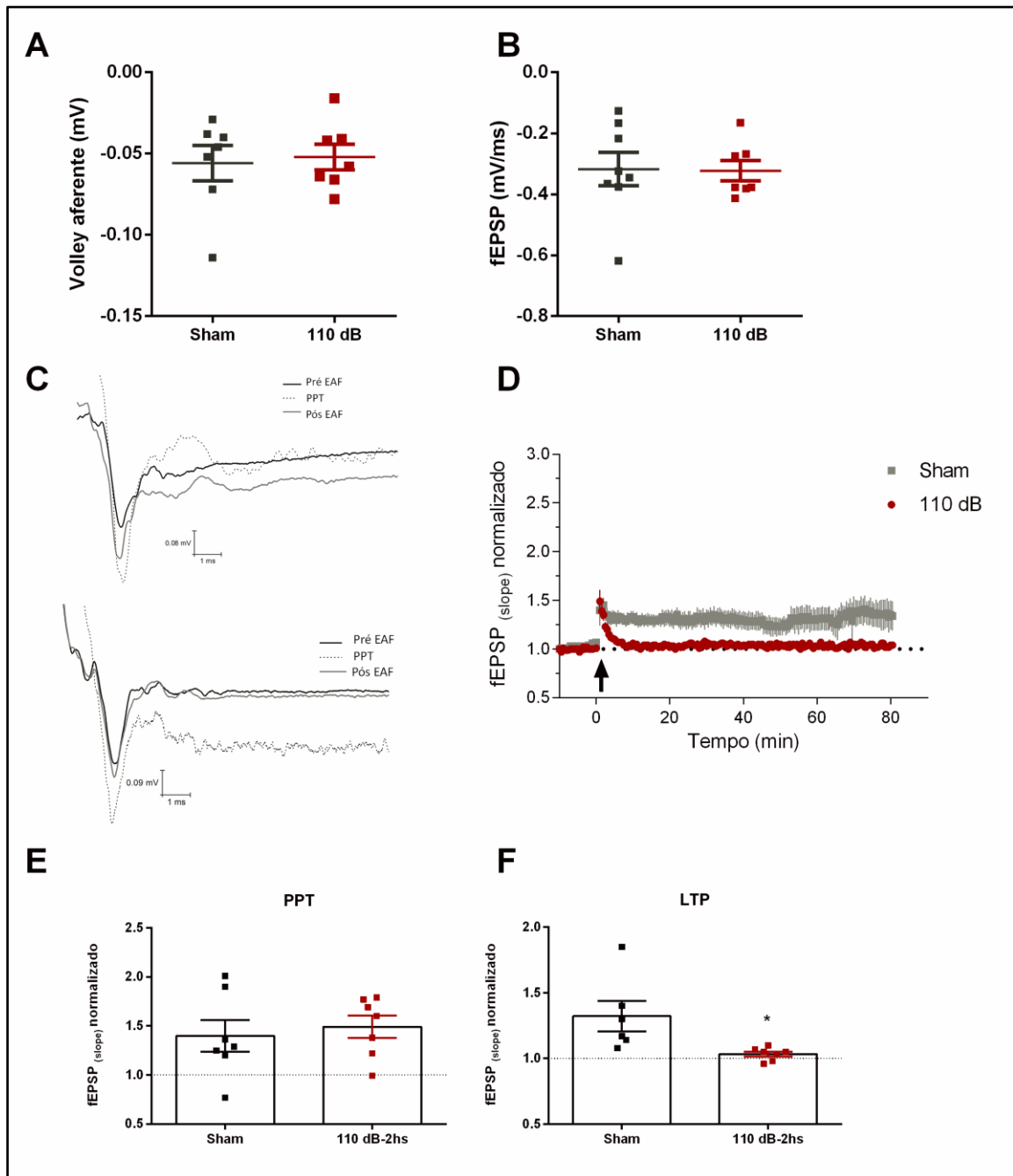
normalmente nas fatias desses animais, não sendo diferente do grupo controle (PPT 80 dB:  $2.38 \pm 0.2$ ; LTP 80 dB:  $1.39 \pm 0.09$ ;  $P = 0.54$ ,  $n = 7$ ; Figura 12E e 12F). A partir destes achados, concluímos que os efeitos do estímulo sonoro na LTP hipocampal é dependente da intensidade sonora.



**Figura 12. O estímulo sonoro de 80 dB não inibe a LTP.** A) Amplitudes máximas dos *volleys* aferentes de animais controle e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 80 dB. B) fEPSP de animais controle e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 80 dB. C) Exemplo de traçado representativo dos fEPSP antes e depois do EAF (PPT e LTP) de um animal exposto a 80 dB de estimulação sonora. D) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e após o EAF-seta nas sinapses *Schaffer-CA1* em animais sacrificados 2 horas após o estímulo de 80 dB. E) Resumo da PPT. F) Resumo da LTP. Dados mostrados como média  $\pm$  EPM.

#### 4.5. O estímulo de 110 dB inibe a LTP na sinapse da via perforante do giro dentado

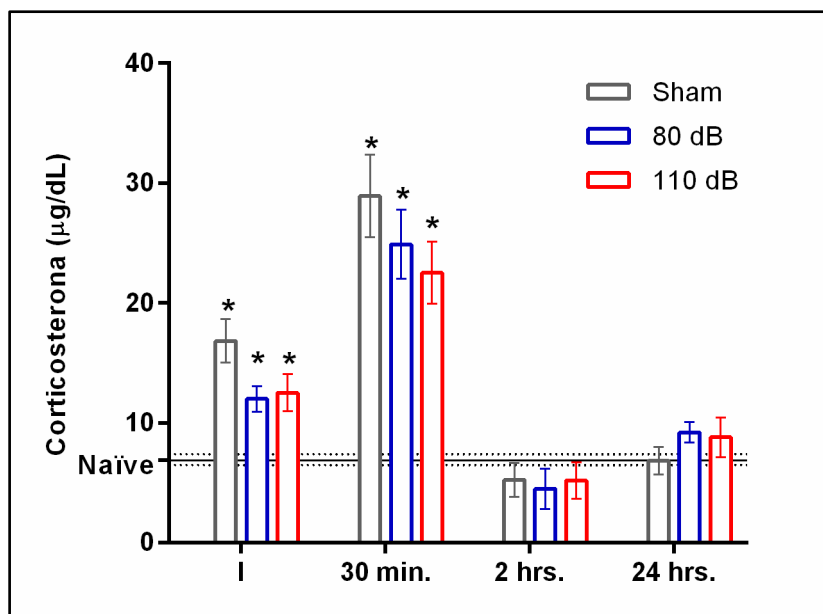
A partir dos resultados que mostraram a inibição da LTP na *Schaffer-CA1* após estímulo de alta intensidade, nos perguntamos se o efeito do som era exclusivo dessa sinapse ou poderia ocorrer na primeira sinapse do circuito trisináptico, a via perforante do giro dentado, que também apresenta LTP associativa (Sambandan *et al.*, 2010). O estímulo da via perforante medial gerou na camada molecular externa do giro dentado fEPSP semelhantes nos ratos *sham* e estimulados (fEPSP: *sham*,  $-0.31 \pm 0.05$  mV/ms e estimulados:  $-0,32 \pm 0,03$  mV/ms; teste T não pareado;  $P > 0,05$ ,  $n=8$  e  $7$  respectivamente. Figura 13B). Também não foram encontradas diferenças para os *volleys* aferentes de ambos os grupos (*sham*:  $-0,05 \pm 0,010$  mV e estimulados:  $-0,05 \pm 0,007$  mV/ms; teste T;  $P > 0,05$ ,  $n=8$  e  $7$  respectivamente. Figura 13A ). Por outro lado, encontramos uma LTP significativamente menor em fatias de animais submetidos ao estímulo de 110 dB (*sham*:  $1,3 \pm 0,11$ ; estimulados:  $1,03 \pm 0,01$ ; teste T não pareado;  $P < 0,05$ ,  $n=6$  e  $7$  respectivamente), mas nenhum efeito na PPT (*sham*:  $1.39 \pm 0.16$  e estimulados:  $1.49 \pm 0.11$ ; teste T não pareado;  $P > 0.05$ ,  $n=7$  para ambos os grupos; Figura 13E e 13F). Estes achados mostram que o efeito do protocolo de estimulação aguda de 110 dB não é restrito à via *Schaffer-CA1*.



**Figura 13. Som de alta intensidade inibe a LTP na via perforante do giro dentado.** A) Amplitudes máximas dos *volleys* aferentes de animais *sham* e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 110 dB. B) fEPSP de animais *sham* e animais sacrificados 2 horas após estimulação sonora de 110 dB. C) Traçados representativos dos fEPSP antes e após o EAF (PPT e LTP) de um animal *sham* e de um animal exposto a 110 dB. D) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF-seta nas sinapses da via perforante de animais *sham* e sacrificados 2 horas após a exposição ao som de 110 dB. (C) Resumo da PPT. (D) Resumo da LTP. \* P < 0,05.

#### **4.6. A estimulação sonora de 110 dB não aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona**

Como o aumento da corticosterona plasmática induzida pelo *stress* afeta a LTP hipocampal (Jöels e Krugers, 2007) e o ruído de alta intensidade é, por sua vez, um estímulo estressor que aumenta a corticosterona plasmática, (Barzegar *et al.*., 2015), decidimos investigar se os efeitos da estimulação sonora poderiam estar relacionados com a ativação do eixo HPA medindo a secreção de corticosterona após estimulação sonora. Nós dosamos a corticosterona plasmática nos ratos *sham*, submetidos ao estímulo sonoro de 110 e 80 dB, e comparamos com os animais *naïve* ( $6,9 \pm 0,55$   $\mu\text{g/dl}$ ) em diferentes períodos após a estimulação. Surpreendentemente, nós encontramos que a corticosterona plasmática aumentou nos 3 grupos imediatamente (*sham*:  $16,8 \pm 1,8$   $\mu\text{g/dl}$ ; 110 dB:  $12,5$   $\mu\text{g/dl}$ ; 80 dB:  $12,0 \pm 1,0$   $\mu\text{g/dl}$ ) [ $F(3, 16) = 9.38$ ,  $P = 0.0008$ , ANOVA de uma via] e 30 minutos após a estimulação (*sham*:  $28,9 \pm 0,55$   $\mu\text{g/dl}$ ; 110 dB:  $22,5 \pm 2,6$   $\mu\text{g/dl}$ ; 80 dB:  $24,9 \pm 2,9$   $\mu\text{g/dl}$ ) [ $F(3, 16) = 3.71$ ,  $P = 0.0001$ , ANOVA de uma via] mas retornou ao nível basal (controle) após 2 horas (*sham*:  $5,2 \pm 1,402$   $\mu\text{g/dl}$ ; 110 dB:  $5,2 \pm 1,5$   $\mu\text{g/dl}$ ; 80 dB:  $4,5 \pm 1,6$   $\mu\text{g/dl}$ ) e 24 horas (*sham*:  $6,8 \pm 1,12$   $\mu\text{g/dl}$ ; 110 dB:  $8,8 \pm 1,6$   $\mu\text{g/dl}$ ; 80 dB:  $9,2 \pm 0,84$   $\mu\text{g/dl}$ ) depois do estímulo (Figura 14). Diante dos resultados, podemos concluir que devido aos níveis de corticostereona serem similares entre todos os grupos, e o efeito da LTP estar restrito aos ratos submetidos ao estímulo sonoro de 110 dB, os níveis de corticosterona não estão diretamente relacionados à inibição da LTP hipocampal.



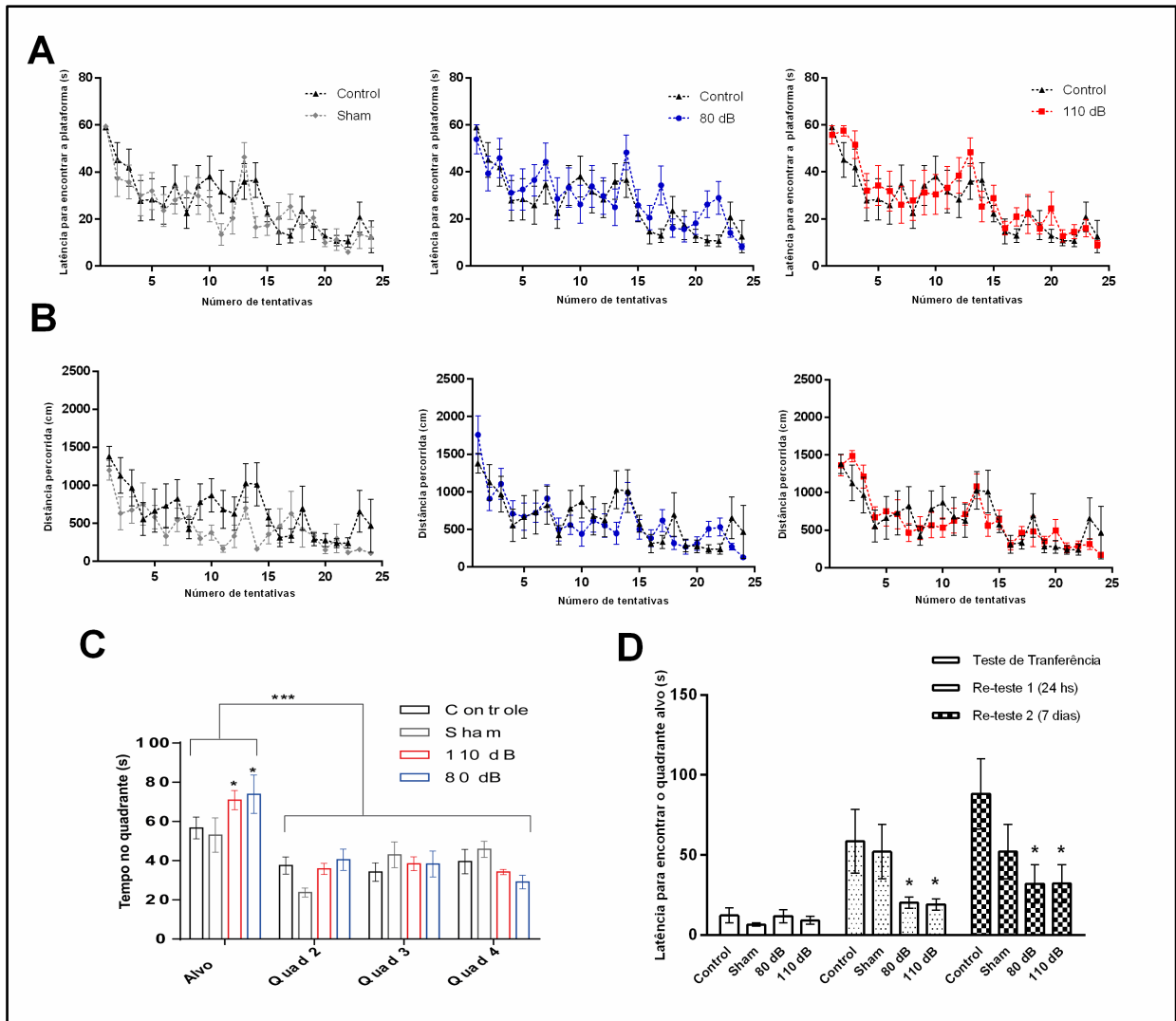
**Figura 14. Corticosterona plasmática.** Níveis de corticosterona plasmática nos grupos *naïve*, *sham*, 80 dB e 100 dB, sacrificados imediatamente (~ 30 segundos; I), 30 minutos, 2 e 24 horas após o estímulo sonoro fictício ou estimulação sonora. As linhas horizontais contínuas são a média e as linhas tracejadas  $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona dos animais do grupo *naïve*. \*  $P \leq 0,05$ .

#### 4.7. A exposição ao som de alta intensidade não altera a memória e aprendizado espacial no LAM

Dados da literatura mostram que a LTP hipocampal é relevante para a memória e aprendizado espacial (Tsien *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1999), e o LAM é um teste que avalia o aprendizado espacial que tem sido usado para investigar os efeitos da plasticidade sináptica no hipocampo (Vorhees e Williams, 2006). Dessa forma, testamos o desempenho de ratos submetidos a 110 dB e comparamos com ratos *naïve*, *sham* e submetidos a 80 dB no LAM.

Como esperado, as latências para encontrar a plataforma submersa diminuíram com as tentativas; [ $F(23, 23) = 14,19$ ;  $P < 0,001$ ] (ANOVA de duas vias), mas todos os grupos aprenderam a encontrar a plataforma de escape com latências semelhantes, sem diferença entre os grupos experimentais e o grupo controle com [ $F(3, 23) = 1,1$ ;  $P = 0,54$ ] (ANOVA de duas vias) (Figura 15A). Nós não observamos diferenças na interação estímulo versus

experimento ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, a distância percorrida para encontrar o quadrante alvo não diferiu entre os grupos, [ $F(3, 23) = 1,27$ ;  $P = 0,30$ ] (Fig. 15B). Entretanto, quando o re-teste foi realizado sem a plataforma, após a última tentativa, todos os grupos permaneceram mais tempo no quadrante alvo, [ $F(3, 69) = 12,90$ ;  $P < 0,001$ ], mas os ratos que receberam 110 dB e 80 dB ficaram significativamente mais tempo no quadrante alvo do que os ratos *naïve* e sham [ $F(3, 23) = 44,24$ ;  $P < 0,001$ ] (teste LSD de Fischer,  $P < 0,05$ ). Quando analisamos o tempo gasto no quadrante alvo em blocos de 45 segundos, descobrimos que todos os grupos tinham padrões semelhantes de ocupação do quadrante alvo. Os animais passaram mais tempo no quadrante alvo nos primeiros 45 segundos e conseqüentemente passaram significativamente menos tempo nos outros quadrantes; [ $F(3, 72) = 18,03$ ;  $P < 0,05$ ] (Figura 15C). Quando realizamos os re-testes 24 horas e 7 dias após o último teste para identificar qualquer déficit de retenção de memória, encontramos diferenças significativas nos testes de tentativa, com os animais levando mais tempo para encontrar o quadrante alvo, 1 e 7 dias mais tarde [ $F(2, 69) = 12,08$ ;  $P < 0,0001$ ] (ANOVA de duas vias), mas curiosamente, os animais submetidos a 80 ou 110 dB apresentaram latências significativamente menores para encontrar o quadrante-alvo [ $F(3,69) = 4,95$ ;  $P = 0,0036$ ] (ANOVA de duas vias com pós teste LSD de Fischer  $P < 0,05$ , Fig. 15D). Concluímos que a inibição da LTP hipocampal após exposição sonora aguda de 110 dB, não compromete a aprendizagem espacial e memória em ratos, semelhante ao que encontramos em resposta à estimulação sonora de longa duração (Cunha, *et al.* 2015). Interessantemente, a apresentação ao som pareceu melhorar a retenção de memória.

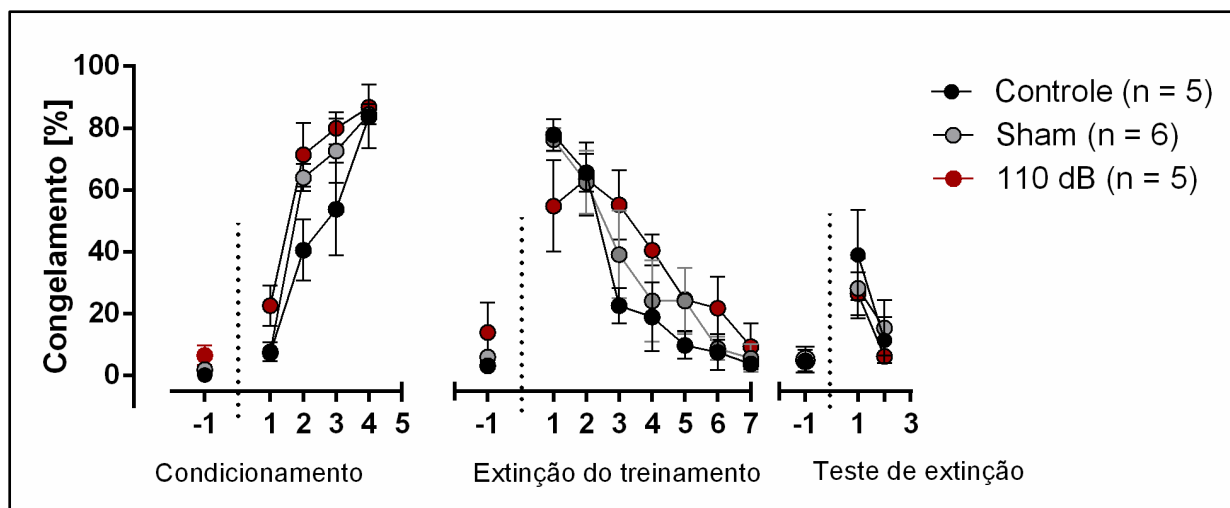


**Figura 15. Aprendizagem espacial e memória no LAM.** A) Latência para os animais *sham*, e estimulados com 80 dB e 110 dB encontrarem a plataforma de escape em comparação aos animais *naïve*. B) Média da distância percorrida pelos animais durante as tentativas para encontrar a plataforma. C) Tempo dispendido em cada quadrante durante o teste de transferência sem plataforma. D) Latência para encontrar a plataforma durante os três re-testes. Durante o teste de transferência, a plataforma foi removida e as latências se referem à primeira vez que a imagem identificou o animal no local onde a plataforma foi colocada anteriormente. \*  $P < 0,05$  e \*\*\*  $P < 0,005$ .  $n = 5$  a 8 animais por grupo.



#### **4.8. A estimulação sonora de alta intensidade não compromete a tarefa de medo condicionado**

A fim de investigarmos se a inibição da LTP após exposição ao som de alta intensidade era capaz de comprometer outros tipos de memória dependente do hipocampo, nós submetemos os animais ao protocolo de medo condicionado, um teste de memória associativa que tem um componente hipocampal (Maren e Fanselow, 1995). Durante o teste, todos os grupos (*naïve*, *sham* e 110 dB) mostraram níveis semelhantes de congelamento durante o condicionamento [Tempo:  $F(3, 39) = 1,07$ ,  $P = 0,39$ ; Tratamento  $F(2, 13) = 3,67$ ,  $P = 0,054$ ], extinção do treinamento [Tempo:  $F(6, 78) = 40,5$ ,  $P < 0,001$ ; Tratamento:  $F(2, 13) = 0,44$ ,  $P = 0,65$ ; e no teste de extinção. [Tempo:  $F(2, 26) = 30,44$ ,  $P < 0,001$ ; Tratamento:  $F(2, 13) = 0,35$ ,  $P < 0,70$ ] (Fig. 16). Durante todas as três fases, os grupos de animais apresentaram diferenças significativas no comportamento de congelamento em cada sessão, mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos. Com estes resultados concluímos que o som de alta intensidade não compromete a expressão e a extinção de memórias aversivas.

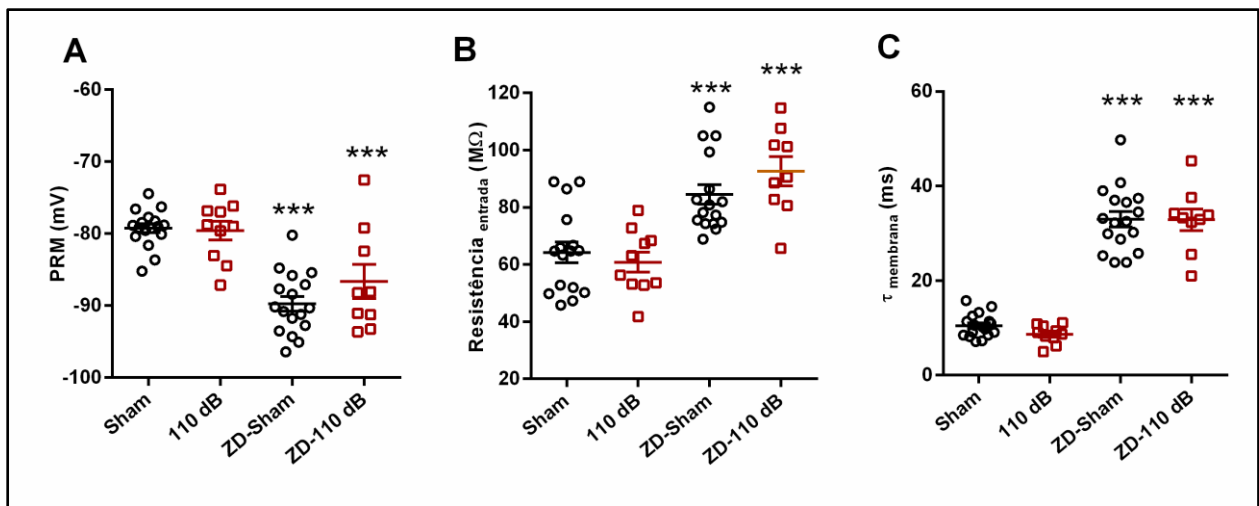


**Figura 16. Teste do medo condicionado e o efeito da estimulação sonora de 110 dB no condicionamento ao medo.** Na fase de condicionamento, os tons foram acompanhados pela exposição a 4 choques. Durante a fase de extinção (extinção do treinamento: 24 horas após o condicionamento), 21 tons foram apresentados e são graficamente expressos em blocos de 3 tons. Após 24 horas, o teste de extinção de aprendizagem (teste de extinção) foi realizado e 10 tons foram apresentados e estão graficamente mostrados em blocos de 3 tons. O congelamento basal foi pontuado por 2 minutos antes da apresentação do tom. Os dados são mostrados como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

#### 4.9. O estímulo sonoro de alta intensidade não altera as propriedades intrínsecas de membrana e o disparo de neurônios piramidais da CA1.

Foi observado que neurônios hipocâmpais da CA1 de ratos submetidos ao protocolo prolongado de estimulação sonora de alta intensidade (10 dias) eram mais despolarizados e apresentavam resistência e constante de tempo de membrana maior e mais longa, respectivamente (Cunha *et al.*, 2018). Esses efeitos foram relacionados a uma diminuição da expressão da corrente h, mediada pelos canais HCN (nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização). Além disso, foi observado que nesses animais, os neurônios piramidais da CA1 disparavam mais potenciais de ação, embora esse efeito não esteja relacionado com a inibição da corrente h (Cunha *et al.*, 2018). Testamos então se um episódio único de 1 minuto de som a 110 dB poderia também gerar esses efeitos.

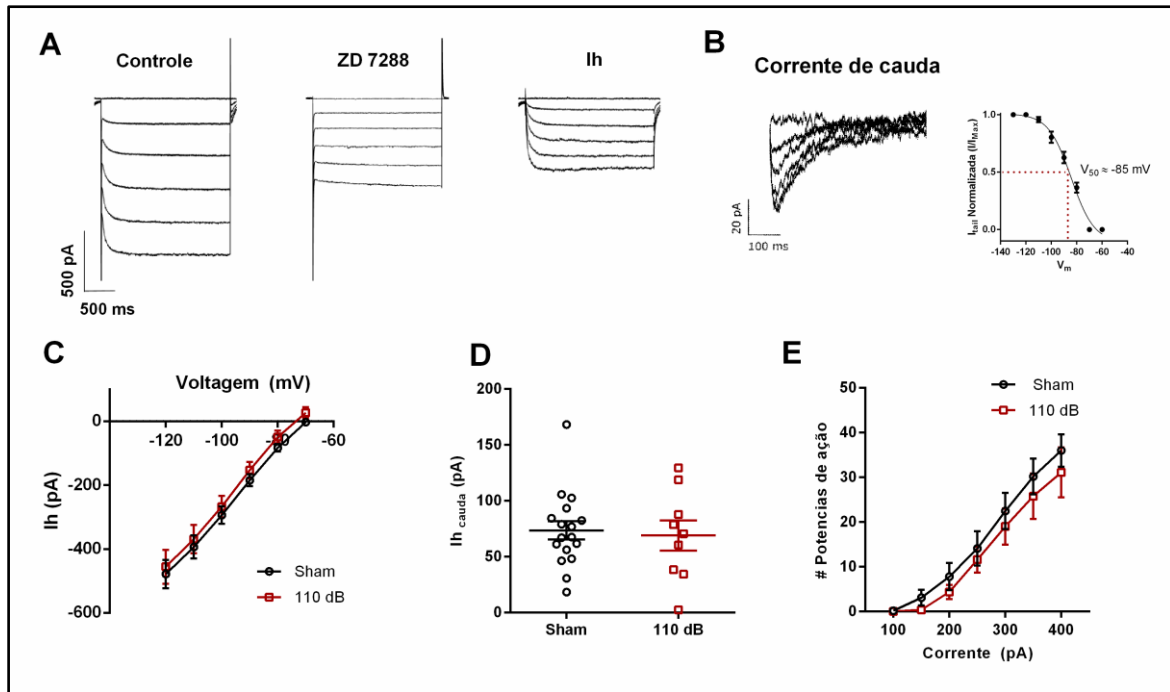
Os resultados mostraram que fatias de neurônios piramidais da CA1, registrados após os animais receberem o estímulo agudo de 110 dB (n=10 neurônios de 6 ratos) apresentam valores semelhantes do potencial de repouso da membrana (*sham*:  $-79.3 \pm 0.6$  mV; estimulados:  $-79.6 \pm 1.3$  mV), resistência de entrada (*sham*:  $64.2 \pm 3.6$  M $\Omega$ ; estimulados:  $60.8 \pm 5.6$  M $\Omega$ ) e constante de tempo da membrana (*sham*:  $10.5 \pm 16.0$  ms; estimulados:  $8.7 \pm 0.6$  ms) em comparação aos ratos *sham* (17 neurônios de 10 ratos),  $p > 0.05$ . Quando utilizamos o bloqueador das correntes *h*, ZD7288 (20  $\mu$ M) observamos diminuição no potencial de repouso da membrana (*sham*:  $-89.7 \pm 1$  mV; estimulados:  $-86.6 \pm 2.4$  mV;  $p < 0.010$ ) e aumento na resistência de entrada da membrana (*sham*:  $84.5 \pm 3.5$  M $\Omega$ ; estimulados:  $92.6 \pm 5.1$  M $\Omega$ ) de forma similar nos dois grupos (Figura 17).



**Figura 17. Um único episódio de alta intensidade sonora não altera as propriedades intrínsecas de neurônios piramidais.** A) Potencial de repouso da Membrana (RMP) em animais *sham* e estimulados, na ausência e presença de ZD7288. B) Resistência de entrada da membrana em animais *sham* e estimulados, na ausência e presença de ZD7288. C) Constante de tempo da membrana ( $\tau$ ) em animais *sham* e estimulados, na ausência e presença de ZD7288. \*\*\*  $P < 0,0005$  com testes t pareados (antes e após o ZD7288).

Ao analisarmos as correntes *h*, não encontramos nenhuma diferença significativa entre o grupo *sham* e estimulado (corrente a -120 mV: *sham*:  $-478,6 \pm 44,7$  pA; estimulados:  $-455,9 \pm 53$  pA,  $P = 0,75$ ; corrente a -130 mV: *sham*:  $-551,8 \pm 51$  pA; estimulados:  $-500,6 \pm$

69,7 pA,  $p= 0,55$  (Figura 18C). Da mesma forma, não encontramos nenhuma diferença na amplitude da corrente de cauda ( $I_{tail}$  após -130 mV de hiperpolarização: *sham*:  $-73,6 \pm 8$  pA; estimulados:  $-69 \pm 13$  pA,  $P=0.76$ ), na  $V_{50}$  de ativação da  $I_h$  (*sham*:  $-81,4 \pm 1,6$  mV; estimulados:  $-84,6 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$ .  $P=0.58$  (Figura 18D). Além disso, o disparo de potenciais de ação dos neurônios piramidais de animais *sham* e estimulados também não apresentou diferença estatística [ $F(1,25= 0.53$ ;  $p= 0.47$ ; ANOVA de duas vias; Figura 18E). Diante dos resultados podemos concluir que o estímulo agudo de alta intensidade sonoro não foi suficiente para alterar as correntes  $h$  e o disparo de neurônios piramidais da CA1 como observado nos neurônios piramidais da CA1 de animais estimulados de forma prolongada (Cunha *et al.*, 2018).



**Figura 18 Um único episódio de alta intensidade sonora não altera as correntes  $h$  nem o disparo de potenciais de ação.** A) Traçados representativos da análise da corrente antes e depois do ZD 7288. A corrente resultante, depois de subtração da corrente sensível ao ZD foi considerada a corrente  $h$ . B) A amplitude da corrente de cauda foi utilizada para estimativa da voltagem de ativação de 50% da corrente ( $V_{50}$ ) através de ajustes com equações sigmóides do tipo Boltzman. C) Relação I x V em neurônios piramidais de animais estimulados e animais *sham*. D) Correntes de cauda após hiperpolarização de -120 mV em neurônios de animais *sham* e estimulados. E) Curvas de correntes x número de potenciais de ação em ratos *sham* e estimulados.

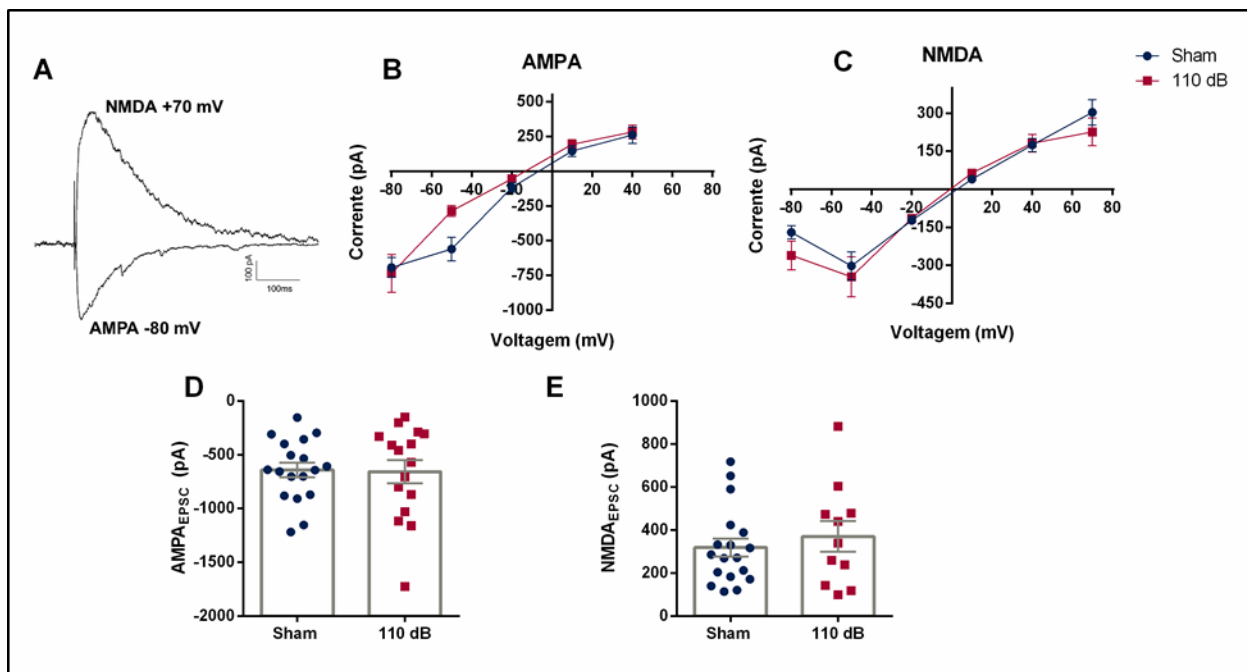
#### 4.10. As correntes excitatórias glutamatérgicas são semelhantes em animais *sham* e estimulados

Nas sinapses da via *Schaffer*-CA1 dos neurônios piramidais do hipocampo, a LTP é dependente da ativação de receptores NMDA (Collingridge e Bliss, 1987; Tang *et al.*, 1999 e Tsien *et al.*, 1996). A inibição da LTP observada anteriormente poderia ser devido a uma inibição das correntes mediadas pelos receptores NMDA gerada pelo estímulo de alta intensidade. Sendo assim, realizamos o registro das correntes mediadas pelo receptor NMDA, além das correntes medidas pelos receptores AMPA/Kainato (AMPA/KA; não-NMDA) a fim de investigarmos se a inibição da LTP observada após estimulação aguda poderia estar

relacionada a alterações da neurotransmissão sináptica glutamatérgica NMDA ou não-NMDA.

Nestes experimentos, observamos que as EPSCs mediadas pelos receptores AMPA/KA (sensíveis a DNQX) e NMDA (resistentes a DNQX) são semelhantes em todas as voltagens testadas quando comparamos os grupos *sham* e estimulado (Figura 19B e 19C). Comparamos as amplitudes das EPSCs mediadas pelos receptores AMPA/Kainato no potencial de -80 mV nos animais *sham* ( $-640,5 \pm 68,09$  pA; n=18) e estimulados ( $-657,2 \pm 108,2$  pA; n=16) e não vimos diferenças significativas (teste t de Student não pareado;  $p = 0,89$ ) (Figura 19D).

Ao analisarmos EPSCs mediadas por NMDA em +70 mV também não observamos diferença entre o grupo *sham* ( $318,4 \pm 42,11$  pA; n=18) e o estimulado ( $370,7 \pm 71,43$  pA; n=11), (teste t de Student não pareado;  $p=0,50$ ) (Figura 19E). Os nossos dados mostram que estímulo sonoro de 110 dB de 1 minuto de duração não altera a neurotransmissão glutamatérgica hipocampal. Dessa forma, a inibição da LTP não deve ser devida a uma alteração nas correntes glutamatérgicas nos neurônios piramidais da região CA1.

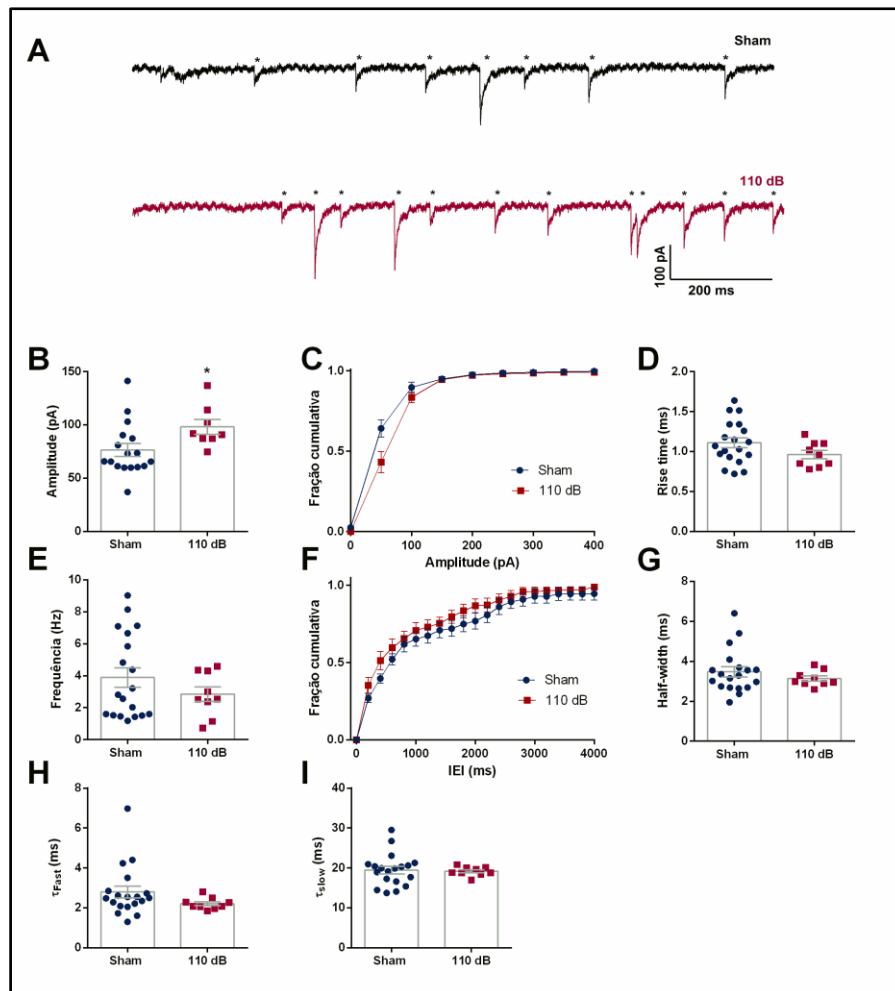


**Figura 19. Neurotransmissão glutamatergica evocada via receptores AMPA e NMDA.** Em A, traçados representativos das correntes NMDA e AMPA. B e C, média das amplitudes das correntes AMPA/KA e NMDA, respectivamente em diferentes voltagens (curva IV). D, média das amplitudes das correntes AMPA/KA em -80 mV. E, média das amplitudes das correntes NMDA em +70 mV. Dados estão representados como média  $\pm$  EPM.

#### 4.11. A neurotransmissão GABAérgica é aumentada pelo estímulo de 110 dB

O registro das IPSCs espontâneas nas células piramidais da região CA1 mostra a atividade da rede de interneurônios conectados aos neurônios piramidais que são excitatórios. Ao compararmos a amplitude das IPSCs espontâneas em fatias de animais estimulados ( $98,17 \pm 6,92$  pA;  $n = 8$ ), observamos que houve um aumento significativo em comparação às fatias registradas de ratos *sham* ( $76,43 \pm 5,98$  pA;  $n = 17$ ), (teste t de Student não pareado;  $P = 0,039$ ; Figura 20B). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas em outros parâmetros, como o *rise time* (*sham*:  $1,11 \pm 0,06$  ms,  $n = 19$ ; estimulados:  $0,96 \pm 0,05$  ms,  $n=9$ ;  $P = 0,13$ ; Figura 20D), frequência (*sham*:  $3,89 \pm 0,60$  Hz,  $n = 19$ ; estimulado:  $2,84 \pm 0,46$  Hz  $n=9$ ;  $P = 0,27$ ; Figura 20E), *half-widths* (*sham*:  $3,47 \pm 0,25$  ms,  $n = 19$ ; estimulado:

$3,13 \pm 0,13$  ms,  $n = 9$ ;  $P = 0,37$ ; Figura 20G), *decay time* rápido (*sham*:  $2,79 \pm 0,29$  ms,  $n = 19$ ; estimulado:  $2,21 \pm 0,09$  ms,  $n = 9$ ;  $P = 0,19$ ; Figura 20H) e o *decay time* lento (*sham*:  $19,49 \pm 0,92$  ms,  $n = 19$ ; estimulado:  $19,18 \pm 0,38$  ms,  $n = 9$ ;  $P = 0,19$ ; Figura 20I) (teste t de Student não pareado).

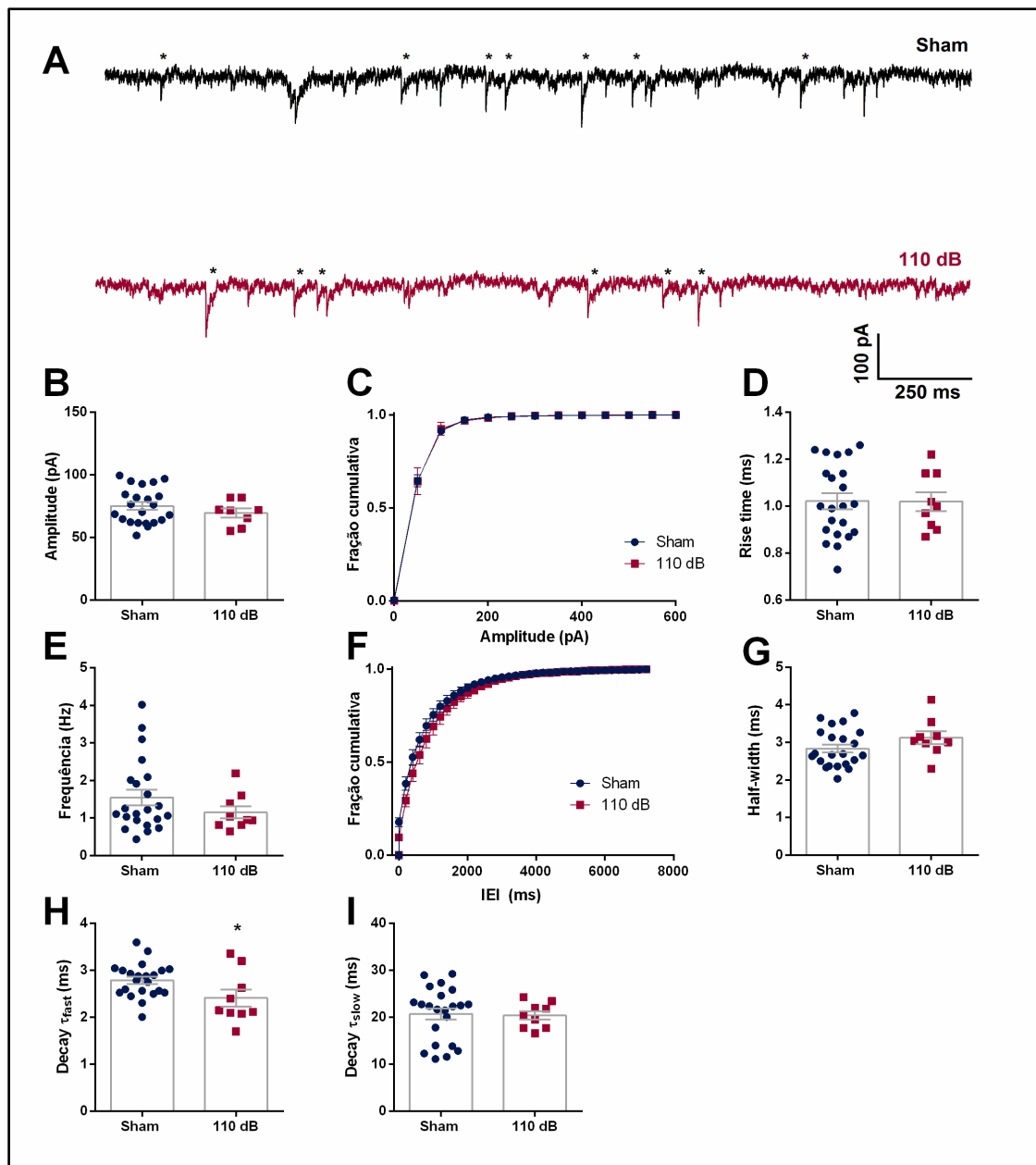


**Figura 20. Neurotransmissão inibitória espontânea após a estimulação sonora de alta intensidade.** A) Traçados representativos dos eventos espontâneos inibitórios dos animais sham e estimulados com 110 dB. B) Média das amplitudes das IPSCs. C) Distribuição das amplitudes de todas as IPSCs registradas. D) Média dos *rise-times* das IPSCs. E) Média das frequências das IPSCs. F) Distribuição dos intervalos entre todas as IPSCs detectadas. G) Média das *half-widths* das IPSCs. H e I) Constantes de decaimento das IPSCs rápida ( $\tau_{fast}$ ) e lenta ( $\tau_{slow}$ ). Dados estão representados como média  $\pm$  EPM. Frações cumulativas foram construídas com *bins* automáticos.



A diferença encontrada na amplitude das correntes GABAérgicas não foi observada nas correntes miniatura após a aplicação da TTX: (*sham*:  $75,22 \pm 3,03$  pA n=22; estimulados:  $69,63 \pm 3,52$  pA n = 8; teste t de Student não pareado P = 0,31; Figura 21B). Para as outras variáveis analisadas também não foram observadas alterações significativas entre os grupos: *rise time* (*sham*:  $1,02 \pm 0,03$  ms, n = 22; estimulado:  $1,02 \pm 0,03$  ms, n = 9; P = 0,98; Figura 21D), frequência (*sham*:  $1,54 \pm 0,20$  Hz, n=22; estimulado:  $1,15 \pm 0,16$  Hz n=9; P= 0,25; Figura 21E), *half-widths* (*sham*:  $2,83 \pm 0,10$  ms, n=22; estimulado:  $3,12 \pm 0,16$  ms, n=9; P= 0,15; Figura 21G), e *decay time* lento (*sham*:  $20,73 \pm 1,22$  ms, n=22; estimulado:  $20,42 \pm 0,90$  ms, n = 9; P = 0,87; Figura 21I). Entretanto, observamos uma diminuição significativa no *decay time* rápido nas fatias dos animais estimulados ( $2,41 \pm 0,18$  ms; n = 9) em comparação às fatias de ratos *sham* ( $2,79 \pm 0,07$  ms; n = 22; P = 0,03; Figura 21H).

Os resultados mostram que o estímulo agudo de 110 dB aumentou a amplitude das IPSCs espontâneas, mas não das correntes miniaturas. Esses resultados sugerem que os interneurônios inibitórios possam estar mais excitáveis, aumentando o tônus inibitório sobre os neurônios piramidais. Esse efeito sobre a neurotransmissão GABAérgica pode ter alguma influência inibitória sobre a LTP na via *Schaffer-CA1*.

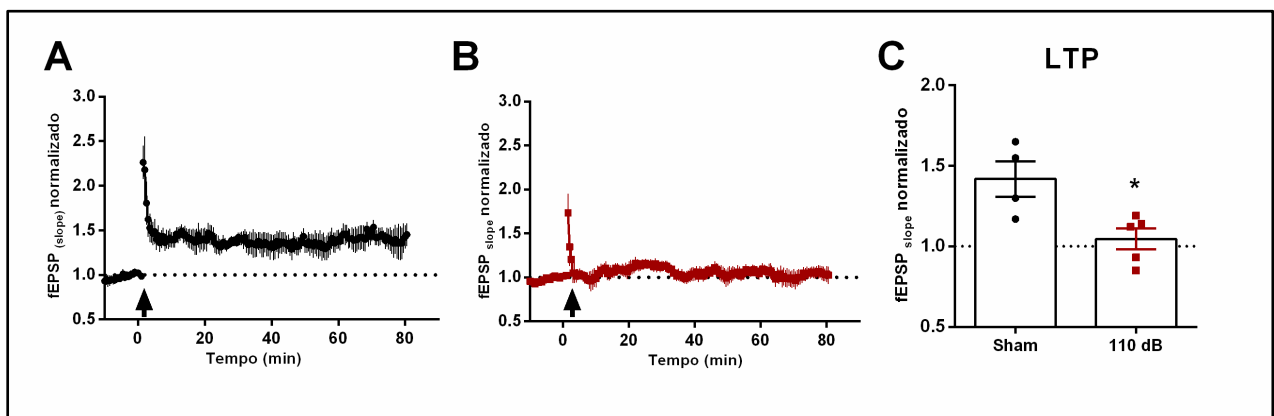


**Figura 21. Neurotransmissão inibitória espontânea em miniatura após a estimulação sonora de alta intensidade.** A) Traçados representativos dos eventos miniatura inibitórios dos animais *sham* e estimulados com 110 dB. B) Média das amplitudes das mIPSCs. C) Distribuição das amplitudes de todas as mIPSCs registradas. D) Média dos *rise-times* das mIPSCs. E) Média das frequências das mIPSCs. F) Distribuição dos intervalos entre todas as mIPSCs detectadas. G) Média das *half-widths* das mIPSCs. H e I) Constantes de decaimento das mIPSCs; rápida ( $\tau_{fast}$ ) e lenta ( $\tau_{slow}$ ). Dados estão representados como média  $\pm$  EPM. Frações cumulativas foram construídas com *bins* automáticos.

#### 4.12. BDNF reverte a inibição da LTP após o estímulo sonoro de alta intensidade

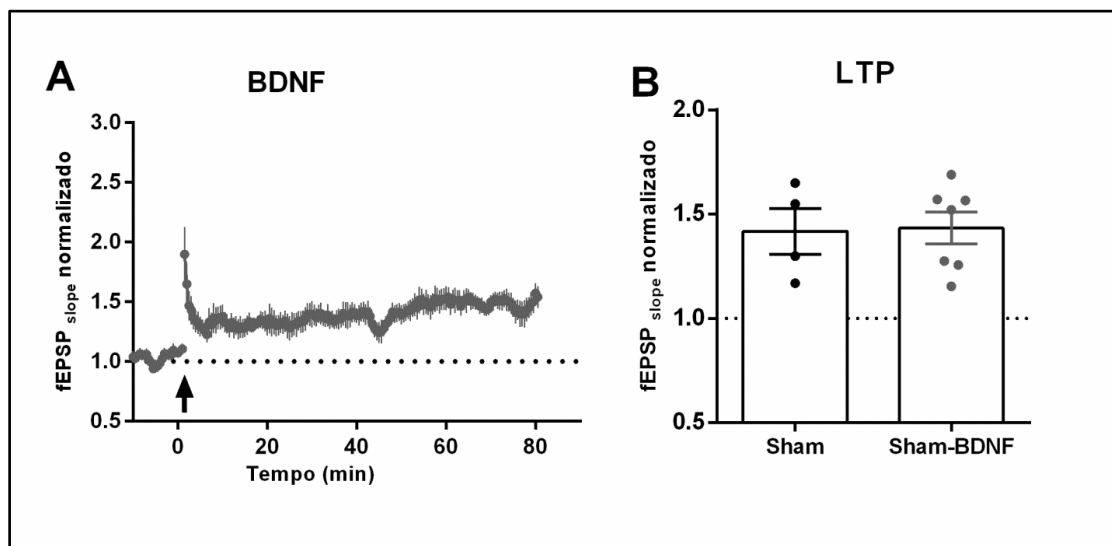
O BDNF é uma neurotrofina conhecida como facilitadora da LTP no hipocampo que atua por meio da interação com seus receptores Trk-B (Figurov *et al.*, 1996; Korte *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2008). Conforme mostramos anteriormente, as fatias de animais submetidos a 110 dB apresentam um déficit na LTP. Sendo assim, decidimos investigar se o tratamento com o BDNF e com o agonista do receptor TrkB (LM22A4) poderia reverter a inibição da LTP nos animais estimulados.

Inicialmente, submetemos os animais ao estímulo de 110 dB e ao estímulo fictício a fim de reproduzirmos nossos dados (Figura 22). Os resultados mostram que houve inibição da LTP nas fatias dos animais estimulados ( $1,04 \pm 0,06$ ;  $n = 5$ ) em comparação aos ratos *sham* ( $1,41 \pm 0,11$ ;  $n = 4$ ),  $P = 0,01$ .



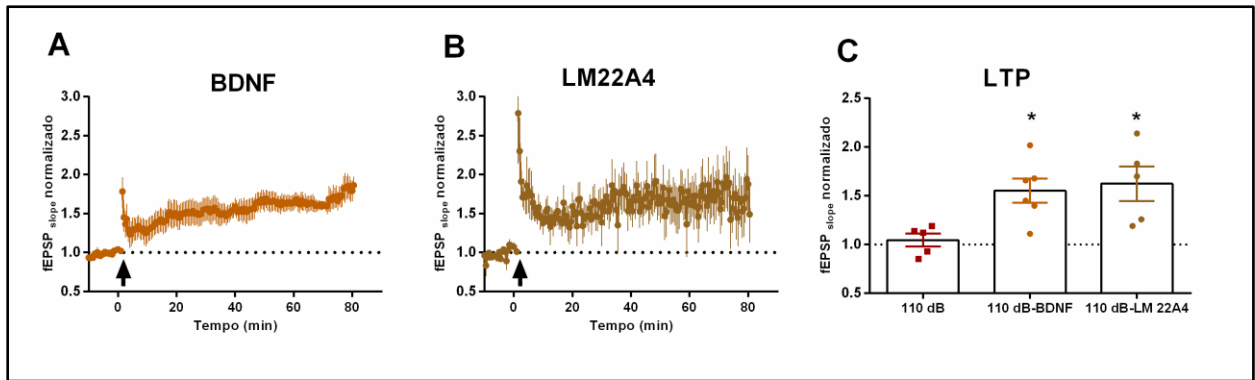
**Figura 22. Inibição da LTP após estímulo sonoro de intensidade.** A e B) *slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses da via *Schaffer-CA1* de animais *sham* e estimulados com 110 dB respectivamente. C) Representação gráfica da LTP. Teste T não pareado.  $P \leq 0.05$ .

Em seguida, tratamos as fatias dos animais *sham* com BDNF ( $1,43 \pm 0,07$ ;  $n = 7$ ) e não observamos diferença significativa em relação às fatias dos animais que não foram tratadas ( $1,41 \pm 0,11$ ;  $n = 4$ ),  $P = 0,90$ ; Figura 23.



**Figure 23. BDNF não altera a potenciação da LTP em animais sham.** A) *Slope* normalizado dos fEPSP antes e depois do EAF (seta) nas sinapses da *Schaffer-CA1* de animais *sham* que tiveram suas fatias superfundidas com BDNF. B) Representação gráfica da LTP. Teste T não pareado.  $P \geq 0,05$ .

A partir destes resultados, tratamos as fatias dos ratos submetidos a 110 dB e observamos que houve potenciação da LTP nas fatias que receberam BDNF ( $1,55 \pm 0,12$ ;  $n=6$ ) e também nas fatias tratadas com o agonista Trk-B LM22A4 ( $1,62 \pm 0,17$ ;  $n = 5$ ) quando comparamos com as fatias dos animais estimulados ( $1,04 \pm 0,06$ ;  $n = 5$ ,  $P=0,02$ ; Figura 24). Os resultados sugerem que o som pode estar gerando uma inibição na secreção de BDNF e por consequência uma inibição da LTP.



**Figura 24. BDNF e o agonista LM22A4 revertem a inibição da LTP após estímulo sonoro de intensidade.** A e B) *Slopes* normalizados dos fEPSP antes e depois do EAF nas sinapses da via *Schaffer-CA1* de animais estimulados com 110 dB que tiveram suas fatias superfundidas com BDNF e LM22A4, respectivamente. C) Representação gráfica da LTP comparando os tratamentos nas fatias dos animais estimulados e o grupo estimulado. ANOVA de uma via.  $P \leq 0.05$ .

## **5. Discussão**

Neste estudo inicialmente investigamos a tríade, memória-*stress*-LTP em ratos submetidos à estimulação aguda de alta intensidade. Nós mostramos que um único episódio de som de alta intensidade (110 dB) é capaz de inibir a LTP nas sinapses da via *Schaffer-CA1* do hipocampo entre 2 e 24 horas da exposição ao som. Essa inibição é dependente da intensidade sonora, não está relacionada à secreção de corticosterona plasmática e não está associada ao comprometimento da aprendizagem espacial e memória, observadas no LAM e no teste de medo condicionado. A inibição da LTP pode também ser observada em outra sinapse glutamatérgica da formação hipocampal, a via perforante/células granulares do giro dentado. Interessantemente, fatias de hipocampo de animais estimulados tratadas com BDNF, ou com o agonista do receptor Trk-B apresentaram LTP em porcentagens semelhantes aos grupos controle, indicando um possível envolvimento dessa neurotrofina na inibição da LTP.

A análise das propriedades elétricas das células piramidais e da neurotransmissão, por meio do *whole cell patch clamp* mostrou que as propriedades intrínsecas de membrana e o padrão de disparo dos neurônios não são modificados com a exposição sonora. No entanto, encontramos aumento na amplitude das correntes inibitórias GABAérgicas espontâneas, ao passo que não houve alteração nas correntes em miniatura, bem como nas correntes glutamatérgicas mediadas por receptores NMDA ou AMPA/Kainato

Embora tenha sido demonstrado que a exposição a sons de alta intensidade pode alterar a função hipocampal (Goble *et al.*, 2009 e Kraus *et al.*, 2010), seu efeito na plasticidade sináptica do hipocampo foi relatada apenas para exposição sonora de longo prazo (7 a 10 dias) (Barzegar *et al.*, 2015 e Cunha *et al.*, 2015). Curiosamente, Barzegar e colaboradores demonstraram que a exposição pré-natal ao som de 95 dB durante 1 a 4 horas por 7 dias, compromete a LTP do hipocampo e o desempenho no LAM da prole, e induz aumentos concomitantes nos níveis de corticosterona plasmática, tanto na mãe como na prole,

contrastando com os dados apresentados nesse trabalho. Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que a LTP foi inibida até 10 dias após o fim do protocolo de exposição sonora de longo prazo (Cunha *et al.*,2015), enquanto aqui mostramos que inibição da LTP pela exposição aguda sonora de 110 dB foi revertida após 48 horas da exposição. No conjunto, esses dados mostram que tanto a exposição de longo prazo quanto uma única exposição sonora de alta intensidade podem alterar a função do hipocampo e a plasticidade sináptica, embora diferenças existam nos efeitos crônicos e agudos.

Identificamos também que, diferente do que foi observado com o protocolo de exposição sonora de longo prazo, os *slopes* dos fEPSP e os *volleys* aferentes foram alterados após estimulação sonora aguda. Encontramos *slopes* para os fEPSP e *volleys* aferentes significativamente maiores no grupo de animais que recebeu o estímulo de 110 dB e tiveram suas fatias registradas após 2 horas quando comparados aos outros grupos. Por outro lado, a relação *input-output* quando normalizada pelos *volleys* aferentes não foi diferente em todos os grupos. Esses dados sugerem que a excitabilidade dos axônios aferentes pode ser aumentada pela exposição ao som de alta intensidade, resultando em um maior recrutamento de fibras aferentes, gerando maiores fEPSP. Neste caso, a probabilidade de liberação glutamatérgica não está alterada, pois a relação *volley* aferente e fEPSP é semelhante no controle e no grupo estimulado com 110 dB, e porque não houve diferença na relação da FPP (facilitação de pulso pareado) entre os grupos após a exposição sonora. Além disso, como a relação *volley* aferente e fEPSP foi semelhante em todos os grupos, não acreditamos que a inibição da LTP seja causada por uma saturação da LTP por sinapses já potencializadas após exposição sonora.

Também encontramos uma inibição significativa da PPT após 2 horas da estimulação sonora, que foi revertida após 24 horas do estímulo sonoro agudo a valores semelhantes ao encontrado na PPT de fatias de animais controle. No protocolo de estimulação sonora de



longo prazo, observamos uma diminuição na PPT que permaneceu após 10 dias do final do protocolo. A PPT é um processo de plasticidade de curto prazo que é atribuído ao aumento no cálcio residual pré-sináptico após o trem tetânico, causando um aumento na probabilidade de liberação do neurotransmissor (Pr), tamanho quantal ( $q$ ) e no *pool* de vesículas prontamente liberável (Habets, R. L. e Borst, J. G. 2005, 2007 ; Korogod *et al.*; 2007; Lee *et al.*, 2008; Xue, L. e Wu, L. G, 2010). O fato de não observarmos diferenças na RPP (razão de pulso pareado), mostra que o sistema rápido de tamponamento de cálcio dessas sinapses provavelmente não é alterado pela estimulação sonora, mas o sistema de alta capacidade de tamponamento, que é relevante para a PPT, pode estar alterado. Além disso, os efeitos sobre a PPT poderiam estar relacionados aos processos desencadeados pelo influxo de cálcio, ou a um tamanho reduzido do *pool* de vesículas, que pode não ser detectado pelo protocolo RPP. Como a LTP foi inibida por até 24 horas após a estimulação sonora, mas a PTP voltou a valores semelhantes ao controle, acreditamos que os mecanismos que produzem a inibição da LTP e da PPT são provavelmente distintos.

Uma das hipóteses para a inibição da LTP após os animais serem expostos ao som de alta intensidade por 10 dias, é a de que a neurotransmissão poderia estar potencializada nas sinapses anteriores no circuito hipocampal tri-sináptico, provocando uma resposta adaptativa na via Schaffer-CA1. Para testar essa hipótese nos animais submetidos à estimulação aguda, investigamos a LTP nas sinapses da via perforante, com as células granulares do giro dentado. Encontramos resultados semelhante nos *slopes* máximos dos fEPSP e nas amplitudes dos *volleys* aferentes nos grupos *sham* e 110 dB, e assim como na sinapse *Schaffer-CA1*, uma inibição da LTP nas fatias dos animais expostos agudamente ao som de 110 dB. Dessa forma, concluímos que a inibição da LTP na *Schaffer-CA1* não é uma resposta compensatória ao aumento da neurotransmissão ou aumento da LTP nas sinapses anteriores a

via *Schaffer*. Além disso, podemos inferir que o efeito da estimulação sonora de alta intensidade na LTP hipocampal não se restringe às sinapses da via *Schaffer*-CA1.

Sabe-se que os sons de alta intensidade são considerados estressores por promoverem a ativação do eixo HPA e a liberação de corticosterona (Liu, L. *et al.*, 2016; Helfferich, F. e Palkovits, M, 2003), que também atua como supressora da LTP hipocampal (Shors *et al.*, 1990; Maggio, N e Segal, M, 2007). Assim, testamos a hipótese de que a inibição da LTP induzida pelo som estaria relacionada à secreção de corticosterona durante a exposição à alta intensidade sonora. De fato, encontramos um aumento na secreção de corticosterona plasmática imediatamente e após 30 minutos de exposição ao som de alta intensidade sonora. No entanto, encontramos aumentos similares na corticosterona plasmática tanto em animais *sham* quanto em animais submetidos ao estímulo sonoro de 80 dB que não apresentaram inibição da LTP. Neste sentido, dados da literatura mostraram que ratos expostos a sons que variam entre 85-110 dB apresentam após 30 minutos aumento nos níveis de corticosterona plasmática (Burrow *et al.*; 2005). Portanto, concluímos que o efeito do som de alta intensidade na LTP está relacionado com a ativação de vias neurais pela intensidade do som e não como consequência da secreção de corticosterona em resposta ao estresse acústico.

Devido à relação estreita entre LTP e aprendizagem espacial, testamos a capacidade dos animais submetidos ao som de alta intensidade em executar o LAM, um teste tradicionalmente utilizado para avaliar os efeitos da plasticidade sináptica no hipocampo (Tsien *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1999; Vorhees e Williams, 2016). Dados anteriores do laboratório mostraram que ratos submetidos ao protocolo de estimulação sonora crônica de alta intensidade realizavam normalmente o LAM, apesar de apresentarem a LTP inibida (Cunha *et al.*, 2015). Neste caso, a explicação para a contradição entre LTP e memória foi de que, durante a exposição de longo prazo, há uma adaptação no cérebro ao déficit na LTP, resultando em memória espacial e aprendizado normais. Dados semelhantes foram

encontrados após um único estímulo agudo de 1 minuto, mostrando que animais que apresentaram LTP diminuída, desempenharam de forma similar o LAM quando comparados aos animais dos grupos naïve, *sham* e 80 dB durante as fases de aquisição e no re-teste imediato. Neste caso, encontramos tempos semelhantes para encontrar a plataforma em todos os grupos. Dessa forma, inferimos que mesmo com a LTP comprometida, os animais submetidos a um único episódio de estimulação sonora de alta intensidade apresentaram aprendizagem espacial e memória normais, avaliadas pelo desempenho no LAM. A dissociação entre a memória espacial e aprendizagem utilizando o LAM, e a LTP hipocampal, também foi observado em animais com deleções genéticas hipocampais de subunidades dos receptores NMDA (von Engelhardt, *et al.*, 2008 e Bannerman *et al.*, 2012) que apresentaram LTP reduzida ou ausente nas sinapses da via *Schaffer-CA1*, mas apresentaram desempenho normal no LAM. No entanto, é provável que, como observado em camundongos *knockout* para receptores NMDA hipocampais, que outros processos de aprendizagem não testados podem estar prejudicados pela LTP diminuída (von Engelhardt *et al.*, 2008 e Bannerman *et al.*, 2012), ou que a diminuição da LTP que observamos não seja suficiente para impactar a aprendizagem espacial. Diferentemente de nossos resultados, Liu e colaboradores em 2016 mostraram que animais submetidos ao estímulo de 123 dB apresentaram pior desempenho no LAM, 3 meses após a exposição ao som. Os resultados obtidos por Liu e colaboradores podem estar mais relacionados à perda auditiva subsequente ao som do que a própria exposição sonora (Zhao *et al.*, 2018). Da mesma forma, Manikandan e colaboradores em 2006 também encontraram déficits na memória espacial medida com o Labirinto Radial após uma exposição crônica (30 dias, 4 horas por dia) a sons de alta intensidade (100 dB), que foram correlacionados com um aumento da corticosterona plasmática. Esses dados contrastam com nossos resultados atuais e anteriores (Cunha *et al.*, 2015) que não mostraram déficits na aprendizagem espacial e memória. Curiosamente, no re-

teste realizado sem a plataforma, imediatamente após as 12 tentativas, os ratos expostos aos sons de 80 e 110 dB gastaram mais tempo no quadrante alvo do que os animais *sham* e *naïve*, e além disso, apresentaram latências menores para encontrar o quadrante alvo nos re-testes posteriores (24 horas e 7 dias), sugerindo uma melhora na retenção de memória devida à estimulação sonora. Resultados semelhantes aos nossos foram observados por Sanyal e colaboradores, mostraram que pintinhos na fase pré-natal (10 dias de período embrionário) expostos a 110 dB, durante 15 minutos por hora até nascimento, apresentam melhora na orientação espacial e aprendizado (Sanyal *et al.*, 2013)

Os animais submetidos ao som também foram analisados em outro teste que avalia a memória aversiva, o teste do medo condicionado. Devido às características do estímulo auditivo, decidimos usar o tom (70 dB) como o estímulo condicionante, a fim de observarmos se alguma alteração poderia ser detectada neste tarefa após o estímulo sonoro de alta intensidade. Da mesma forma que no LAM, observamos que o estímulo de alta intensidade não altera o aprendizado e memória aversiva, que são codificados pela LTP no hipocampo e em outras regiões (Whitlock, *et al.*, 2006 e Gruart *et al.*, 2006). No teste de medo condicionado, os processos de LTP estão associados a núcleos amigdalóides e projeções para outras regiões, incluindo a região CA1 do hipocampo (Maren e Fanselow, 1995; Maren *et al.*, 2013 e Izquierdo *et al.*, 2016). Além disso, a apresentação do estímulo condicionante *per se* é necessária e suficiente para acionar a extinção do medo condicionado que depende da atividade do hipocampo e da LTP dependente do receptor de NMDA (Fiorenza *et al.*, 2012; Orsini e Maren., 2012). Nossos resultados mostraram que a inibição da LTP no hipocampo induzida pela estimulação sonora de alta intensidade, não é suficiente para alterar o aprendizado de medo condicionado e a extinção. Devido ao som de alta intensidade inibir a LTP *in vitro*, mas não alterar a aprendizagem e memória dependentes do hipocampo, é possível que *in vivo*, as sinapses do hipocampo sejam capazes de produzir LTP ou possam ser

compensadas pela LTP de outras sinapses prosencefálicas (von Engelhardt *et al.*, 2008). É interessante notar que a resposta ao EAF foi muito variável, e embora a média da LTP nas fatias de animais submetidos ao som de alta intensidade fosse muito pequena, encontramos fatias em que a neurotransmissão foi potenciada, enquanto em outras encontramos depressão mesmo após o EAF, sugerindo que nem todas as sinapses são igualmente afetadas pelo som de alta intensidade. Outra hipótese para a inibição da LTP é uma mudança nas regras da LTP, um efeito chamado metaplasticidade (Abraham e Bear, 1996).

Estas mudanças na plasticidade sináptica hipocampal induzidas pelo som de alta intensidade podem ser importantes para o controle da excitabilidade homeostática do hipocampo, enquanto permite a função normal do hipocampo. Curiosamente, nosso grupo demonstrou que em ratos geneticamente suscetíveis a convulsões audiogênicas (Doretto, M. C. *et al.*, 2006), a exposição sonora de longo prazo que nestes animais levam a crises epilépticas límbicas, não inibiu a LTP (Cunha *et al.*, 2015), sugerindo que este efeito poderia ser importante para a prevenção de crises límbicas.

A fim de entender de maneira isolada como os neurônios piramidais respondem ao estímulo sonoro de curta duração, investigamos inicialmente as propriedades intrínsecas de membrana, e se esses neurônios disparam mais ou menos potenciais de ação após os ratos serem submetidos ao estímulo sonoro. Neste mesmo experimento, investigamos também se as correntes *h*, mediada pelos canais HCN, poderiam ser alteradas pelo estímulo de 110 dB. Em relação às propriedades intrínsecas, nossos resultados mostraram que não houve diferença no potencial de repouso, resistência de entrada e constante de tempo de membrana. Além disso, os neurônios piramidais dos animais *sham* e estimulados dispararam o mesmo número de potenciais de ação e não apresentaram alteração nas correntes *h*. Ao contrário do que foi observado no presente estudo, recentemente mostramos em Cunha e colaboradores (2018), que os neurônios piramidais de animais submetidos ao protocolo de estimulação crônica

mostraram potencial de repouso mais hiperpolarizado, maior resistência de entrada de membrana, constante de tempo da membrana mais lenta e diminuição do limiar de potencial de ação em comparação aos animais controle, que foram atribuídos à menor expressão da corrente *h* (Cunha *et al.*, 2018). O estudo da corrente *h* se deu devido a essas correntes serem moduladas em diversas situações incluindo a plasticidade sináptica (Brager e Johnston, 2007 e Fan *et al.*, 2005), e também devido à sua potenciação por endocanabinoides inibir a LTP por diminuição na integração espacial dos EPSPs. (Maroso *et al.*, 2016).

Um outro estudo (Abe *et al.*, 2014) utilizando um estímulo de 110 dB mostrou que neurônios piramidais registrados *in vivo* hiperpolarizam ao mesmo tempo em que ocorre o estímulo sonoro. Abe e colaboradores mostraram por meio de análises que a hiperpolarização induzida pelo som foi produzida por *bursts* (rajadas) de disparos de interneurônios inibitórios, o que justifica a diferença no comportamento dos neurônios registrados nos estudos. Além disso, validando a relevância do nosso estudo, foi mostrado recentemente, que *place cells*, que comumente disparam potenciais de ação em tarefas de memória espacial podem ser ativadas também por um padrão sonoro, mostrando que pode haver um “mapa” hipocampal de padrões sonoros, como existe com a localização espacial (Aronov *et al.*, 2017; Rueckemann e Buffalo., 2017).

Na busca dos mecanismos para explicar a inibição da LTP, investigamos as correntes excitatórias glutamatérgicas e as GABAérgicas inibitórias após os animais serem submetidos a 110 dB por 1 minuto. Uma das nossas hipóteses mais fortes da inibição da LTP era de que pudesse estar ocorrendo uma inibição das correntes via receptores NMDA ou aumento da inibição GABAérgica, influenciando diretamente a ausência de potenciação nas sinapses da via *Schaffer/CA1*. A análise para as correntes glutamatérgicas mediadas por receptores AMPA/kainato em -80 mV e para as correntes NMDA em +70 mV não mostrou nenhuma diferença entre os grupos *sham* e estimulado. No entanto, ao analisarmos as IPSCs

espontâneas, observamos aumento significativo na amplitude das correntes nos neurônios dos animais estimulados em comparação aos *sham*. O fato de encontrarmos aumento nas IPSCs espontâneas e nenhuma modificação nas IPSCs miniatura, pode ser devido à participação individual de algumas sinapses em ambos os eventos, e de sinapses com alto grau de ativação mostrarem uma tendência por um modo de transmissão. Isso foi demonstrado por Peled e colaboradores ao realizarem um estímulo de alta frequência na junção neuromuscular de *Drosophila* e notarem que não havia aumento na transmissão evocada em detrimento da espontânea, mas sim, uma diminuição na liberação de neurotransmissores em sinapses que eram ativas nos eventos evocados (Peled *et al.*, 2014). Outra hipótese seria um maior número de sinapses do mesmo neurônio GABAérgico, levando ao aumento da amplitude das IPSCs mas não na frequência, pelo fato das vesículas serem liberadas simultaneamente em resposta a um potencial de ação. Neste caso, com o bloqueio dos potenciais de ação, a frequência dos IPSCs miniaturas deveria estar maior no grupo estimulado. Entretanto, talvez a Pr basal dessas novas sinapses seja muito baixa para serem detectados eventos espontâneos na presença de TTX (Figura 25A). Outra hipótese seria que a Pr das sinapses GABAérgicas em resposta a potenciais de ação estaria aumentada após o estímulo sonoro, mas a Pr basal não (Figura 25B). Mais experimentos deverão ser feitos para entender melhor essa discrepância.

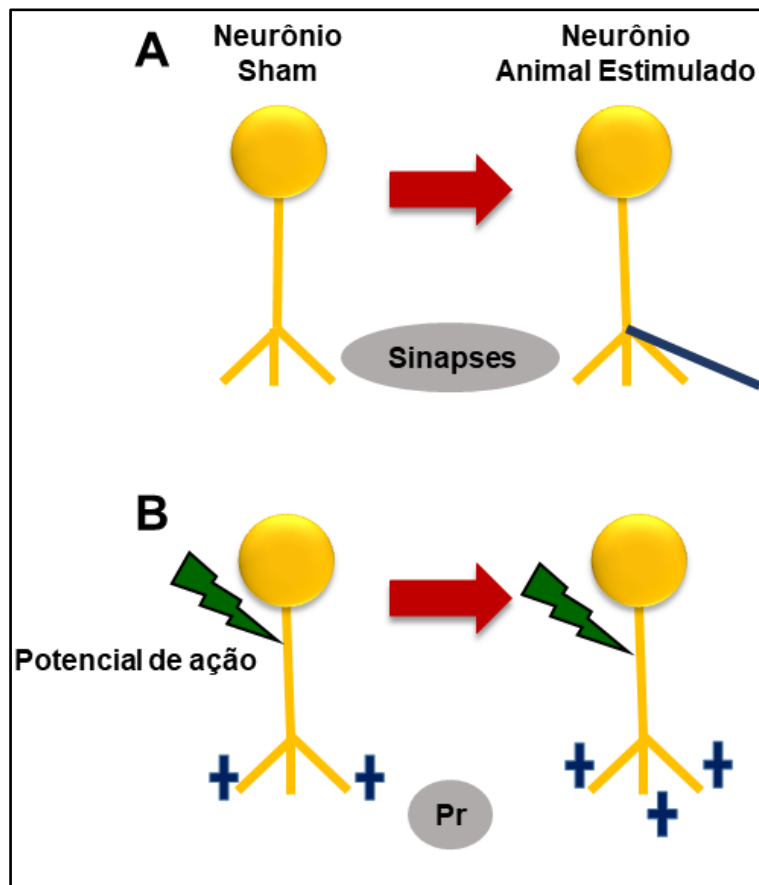
O registro da atividade espontânea inibitória reflete a conexão da rede de interneurônios piramidais com os neurônios piramidais excitatórios, enquanto os registros das IPSCs em miniaturas refletem a atividade de cada sinapse, sem influência da rede ou de potenciais de ação que podem liberar GABA em diversos compartimentos do mesmo neurônio principal pós-sináptico. Além disso, um trabalho recente do nosso grupo (dados ainda não publicados) mostra que neurônios piramidais de animais submetidos ao protocolo de estimulação sonora crônica apresentam amplitudes maiores nas IPSCs espontâneas e miniaturas e nenhuma alteração nas correntes glutamatérgicas. Isso pode sugerir que no

protocolo crônico ocorra um aumento dos receptores GABA<sub>A</sub> nas zonas ativas, enquanto no protocolo agudo ocorre uma alteração na liberação de GABA em resposta a um potencial de ação. A inibição da LTP foi observada tanto em fatias de animais submetidos ao protocolo de estimulação aguda conforme mostrado aqui, como em animais em que o som foi apresentado durante 10 dias (Cunha *et al.*, 2015). Além disso, pelo menos em parte, com base na investigação das IPSCs espontâneas e nas EPSCs, os efeitos do som de alta intensidade são parcialmente compartilhados nos dois grupos de animais (agudo e crônico), apesar do tempo de exposição ao som ser diferente.

Por último, submetemos as fatias hipocâmpais ao tratamento com o BDNF e com o agonista do receptor TrkB, o LM22A4, a fim de investigarmos um possível comprometimento de BDNF nas fatias de animais estimulados. O papel funcional do BDNF para a expressão de LTP foi demonstrada há mais de 20 anos por Korte e colaboradores, ao utilizarem camundongos transgênicos para o BDNF. Neste experimento observaram uma fraca LTP na região CA1 de fatias de animais transgênicos para o BDNF e a recuperação da LTP em fatias de animais submetidos à reexpressão de BDNF (Korte *et al.*, 1996). Nossos resultados mostraram que fatias de animais *sham* não apresentaram aumento da potenciação da LTP após superfusão com BDNF, ao passo que em fatias de animais submetidos ao protocolo de estimulação aguda, que apresentavam inibição da LTP, após o tratamento com o BDNF ou com o agonista do receptor TrkB, desenvolveram LTP normalmente. De acordo com nossos achados, foi mostrado recentemente por Matt e colaboradores em 2018, que animais submetidos ao estímulo sonoro de 80 dB apresentam LTP potenciada e aumento da expressão de BDNF, ao passo que animais expostos a 120 dB mostraram LTP inibida e diminuição da expressão de BDNF. Em outra situação, como a exposição à hipóxia crônica intermitente, a superfusão de BDNF nas fatias hipocâmpais reverteu a inibição da LTP (Xie *et al.*, 2010). Apesar de ainda não termos realizado a dosagem de BDNF no hipocampo dos



animais expostos ao estímulo de 110 dB, acreditamos que nestes animais o som pode estar inibindo a síntese ou a secreção deste fator neurotrófico, que é um dos responsáveis pela manutenção da LTP (Lu *et al.*, 2008). Em 1992, Patterson e colaboradores mostraram que fatias hipocâmpais que desenvolvem LTP após serem estimuladas têm os níveis de BDNF aumentados na região CA1, o que não foi observado na ausência de estímulo (Patterson *et al.*, 1992). Mais tarde, em 2015, Pang e colaboradores demonstraram que o BDNF maduro é essencial para a *late*-LTP, mas que esta fase inicialmente requer a secreção de pro-BDNF existente seguido de clivagem extracelular pela tPA/plasmina (Pang *et al.*, 2015). Neste sentido, nossos dados sugerem que a estimulação sonora parece alterar os níveis basais de BDNF necessários para o desenvolvimento da LTP, além do mais, após o tratamento com BDNF, os animais *sham* não apresentaram uma potenciação maior da LTP do que as fatias controle, mostrando que parece haver um nível mínimo e indispensável de BDNF para que a LTP se desenvolva.



**Figura 25. Representação esquemática para as duas hipóteses que explicam a alteração observada na IPSCs espontâneas.** Em A, temos um maior número de sinapses no mesmo neurônio GABAérgico, levando ao aumento da amplitude e não da frequência das IPSCs. B, aumento na Pr das sinapses GABAérgicas em resposta a potenciais de ação em animais estimulados com 110 dB.

## **6. Conclusão**

Em conclusão, mostramos que um único episódio de som de alta intensidade tem um efeito rápido no hipocampo, inibindo a LTP por até 24 horas. A inibição na via *Schaffer-CA1* está diretamente relacionado à intensidade sonora e não envolve a ativação do eixo HPA. Apesar da inibição da LTP, esse efeito foi incapaz de comprometer a aprendizagem de navegação espacial e a memória avaliada no LAM, bem como interferir na aquisição de memória e aprendizado aversivo, avaliados pelo teste de medo condicionado. Além disso, os nossos achados nos permitem inferir que está havendo uma alteração na liberação de GABA em resposta a potenciais de ação, o que poderia ter impacto direto na potenciação das sinapses da região CA1 após o estímulo sonoro de 110 dB. Por fim, podemos sugerir que as fatias dos animais estimulados podem apresentar um déficit na síntese ou na secreção de BDNF, uma vez que houve potenciação da LTP após o tratamento com BDNF e seu agonista e também porque em animais *sham* que apresentam LTP, não houve aumento na potenciação após o tratamento com a neurotrofina.

## **7. Referências**

- Abbott, L. F., Regehr, W. G. Synaptic computation. *Nature*. 431, 796–803 (2004).
- Abe, R., Sakaguchi, T., Matsumoto, N., Matsuki, N., et al. Sound-induced hyperpolarization of hippocampal neurons. *Neuroreport*. 25,1013-7 (2014).
- Abraham, W. C., Bear, M. F. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 19, 126–130 (1996).
- Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., et al. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(44):15788-92 (2004).
- Amaral, D.G., Witter, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31(3):571-91(1989).
- André Luiz Andreotti Dagostin. Caracterização eletrofisiológica dos neurônios do Nidopálio Caudomedial, uma área responsável pelo processamento auditivo em aves canoras.2012. Tese (Doutorado em Fisiologia). Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Aronov, D., Nevers, R. & Tank, D. W. Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal-entorhinal circuit. *Nature*. 543, 719–722 (2017).
- Augustinack, J.C., van der Kouwe, A J., Salat, D. H, Benner, T., et al. H.M.'s contributions to neuroscience: a review and autopsy studies. *Hippocampus*. 24, 1267-86 (2014).
- Avital, A., Segal, M., Richter-Levin, G. Contrasting roles of corticosteroid receptors in hippocampal plasticity. *J Neurosci*. 26, 9130-4 (2006).
- Bannerman, D. M., Bus, T., Taylor, A., Sanderson, D. J., et al. Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 15, 1153-9 (2012).
- Barzegar, M., Sajjadi, F. S., Talaei, S. A., Hamidi, G. & Salami, M. Prenatal exposure to noise stress: anxiety, impaired spatial memory, and deteriorated hippocampal plasticity in postnatal life. *Hippocampus*. 25, 187–96 (2015).
- Basner, M., Babisch, W., Davis, A., Brink, M., et al. Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet*. 383, 1325–32 (2014).
- Benke, T. A., Lüthi, A., Isaac, J. T., Collingridge, G. L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*. 393,793-7 (1998).
- Bhatt, J. M., Lin, H. W., Bhattacharyya, N. Prevalence, Severity, Exposures, and Treatment Patterns of Tinnitus in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 21 (2016).
- Bliss, T. V., Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. Jul; 232, 331-56. (1973)
- Bliss, T.V, Collingridge, G. L. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol Brain*. 6:5 (2013).

- Bortolotto, Z. A., Amici, M., Anderson, W. W., Isaac, J. T., et al. Synaptic plasticity in the hippocampal slice preparation. *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 6:Unit 6.13 (2011).
- Brager, D. H., Johnston, D. Plasticity of intrinsic excitability during long-term depression is mediated through mGluR-dependent changes in  $I_h$  in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*. 27, 13926–13937 (2007).
- Burow, A., Day, H., Campeau, S. A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis and brain activation. *Brain Research*. 1062, 63–73 (2005).
- Cheng, L., Wang, S. H., Chen, Q. C., Liao, X. M. Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiol Behav*. 104, 981-8 (2011).
- Cheng, L., Wang, S. H., Huang, Y., Liao, X. M. The hippocampus may be more susceptible to environmental noise than the auditory cortex. *Hear Res*. 333, 93-7 (2016).
- Coelho, C. B., Sanchez, T. G., Tyler, R. S. Hyperacusis, sound annoyance, and loudness hypersensitivity in children. *Prog Brain Res*. 166, 169–78 (2007a).
- Collingridge, G. L., Bliss, T. V. P. NMDA receptors— their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci*. 7, 288–293 (1987).
- Cotman, C.W., Monaghan, D.T. Excitatory Amino Acid Neurotransmission: NMDA Receptors and Hebb-Type Synaptic Plasticity. *Ann. Rev. Neurosci*. 11: 61-80 (1988).
- Cunha, A. O. S., Oliveira, J. A. C., Garcia-Cairasco, N., Leão, R. M. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high intensity sound stimulation. *Neuroscience*. 310, 114–127 (2015).
- Cunha, A.O.S, Ceballos, C.C., de Deus, J. L., Leão, R. M. Long-term high-intensity sound stimulation inhibits  $I_h$  current ( $I_h$ ) in CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*. 47, 1401-1413 (2018).
- Derkach V., Barria A., Soderling, T. R.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 3269-74 (1999).
- Doretto, M. C. et al. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav Genet*. 33, 33–42 (2003).
- Drago, F. et al. Behavioral and neurochemical alterations induced by reversible conductive hearing loss in aged male rats. *Neurosci Lett*. 205, 1–4 (1996).
- Drake, C. T., Milner, T. A., Patterson, S.L. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*. 19, 8009-26 (1999)
- Eckernäs, D., Hieronymus, Fredrik., Carlsson, T. Bergquist, F. Acoustic white noise ameliorates reduced regional brain expression of CaMKII and  $\Delta$ FosB in the spontaneously hypertensive rat model of ADHD. *IBRO Reports*. 6, 31-39 (2019).

Fan, Y., Fricker, D., Brager, D. H., Chen, X., Hui-Chen, L., Chitwood, R. A., & Johnston, D. Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in Ih. *Nature Neuroscience*, 8, 1542 (2005).

Figurov A., Pozzo-Miller, L. D., Olafsson, P., Wang, T., Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 381, 706-9 (1996).

Fiorenza, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I. & Myskiw, J. C. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav Brain Res*. 232, 210–216 (2012).

Foy, M. R., Stanton, M. E., Levine, S., Thompson, R. F. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behav Neural Biol*. 48, 138-49 (1987)

Garcia-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J. A. C., Gomes, E. L.T, et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res*. 26, 177–192 (1996).

Goble, T. J., Møller, A. R., Thompson, L. T. Acute high-intensity sound exposure alters responses of place cells in hippocampus. *Hear Res*. 253, 52–9 (2009).

Gruart, A., Muñoz, M. D., Delgado-García, J. M. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*. 26, 1077–1087 (2006).

Haack, D., Vecsei, P., Lichtwald, K., Vielhauer, W. Corticosteroid and corticosteroid metabolite levels in animals immunized against corticosteroids. *J. Steroid Biochem*. 11, 971–980 (1979).

Habets, R. L. & Borst, J. G. Dynamics of the readily releasable pool during post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse. *J Physiol*. 581, 467–78 (2007).

Habets, R. L., Borst, J. G. Post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse. *J Physiol* 564, 173–187 (2005).

Helfferich, F., Palkovits, M. Acute audiogenic stress-induced activation of CRH neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. *Brain Res*. 975, 1–9 (2003).

Howland, J.G., Wang, Y.T. Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus *Prog Brain Res*. 169,145-58 (2008).

Ising, H., Kruppa, B. Health effects caused by noise: Evidence in the literature from the past 25 years. *Noise Health*. 6, 5–13 (2004).

Izquierdo, I., Furini, C. R., Myskiw, J. C. Fear Memory. *Physiol Rev*. 96, 695–750 (2016).

Joëls, M., Krugers, H. J. LTP after Stress: Up or Down? *Neural Plast*. 93202, 1-6 (2007).

Kim, H., Lee, M. H., Chang, H. K., Lee, T. H., et al. Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev*. 28, 109–14 (2006).



- Korogod, N., Lou, X., Schneggenburger, R. Posttetanic potentiation critically depends on an enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vesicle fusion mediated by presynaptic PKC. *Proc Natl Acad Sci*. 104, 15923–15928 (2007).
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., et al. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 8856-60 (1995).
- Korte, M., Schmitz, D. Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiol Rev*. 96, 647-93 (2016).
- Korte, M., Staiger, V., Griesbeck, O., Thoenen, H., et al. J The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *Physiol Paris*. 90, 157-64 (1996).
- Kraus, K. S., Canlon, B. Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear Res*. 288, 34–46 (2012).
- Kraus, K. S., Mitra, S., Jimenez, Z., Hinduja, S., et al. Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 167,1216-26 (2010).
- Lamprecht, R., LeDoux, J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci*. 5, 45-54 (2004).
- Larson, J., Munkácsy, E. Theta-burst LTP. *Brain Res*. 1621, 38–50 (2015).
- Lee, J. S., Kim, M. H., Ho, W. K., Lee, S. H. Presynaptic release probability and readily releasable pool size are regulated by two independent mechanisms during posttetanic potentiation at the calyx of Held synapse. *J Neurosci*. 28, 7945–53 (2008).
- Lercher, P., Evans, G. W. & Meis, M. Ambient noise and cognitive processes among primary schoolchildren. *Environment and Behavior*. 35, 725–735 (2003).
- Liu, L., Shen, P., He, T., Chang, Y., et al. Noise induced hearing loss impairs spatial learning/memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Sci Rep*. 6, 20374 (2016).
- Lu, Y., Christian, K., Lu, B. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*. 89, 312–323 (2008)
- Lüscher, C., Malenka, R. NMDA. Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspectives Biology* 4, a005710 (2012).
- Magee, J. C., Johnston, D. A Synaptically Controlled, Associative Signal for Hebbian Plasticity in Hippocampal Neurons. *Science*. 275, 209-213 (1997).
- Maggio, N., Segal, M. Striking variations in corticosteroid modulation of long-term potentiation along the septotemporal axis of the hippocampus. *J Neurosci*. 27, 5757–65 (2007).
- Malinow, R., Malenka, R. C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 25, 103-26 (2002).
- Malinow, R., Tsien, R. W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature*. 346, 177-80 (1990).

- Manikandan, S., Padma, M. K., Srikumar, R., Jeya Parthasarathy, N. et al. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration. *Neurosci Lett.* 399, 17–22 (2006).
- Manikandan, S., Padma, M. K., Srikumar, R., Jeya Parthasarathy, N., Muthuvel, A., Sheela Devi, R. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration. *Neurosci Lett.* 399, 17–22 (2006).
- Maren, S., Fanselow, M. S. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci.* 15, 7548–7564 (1995).
- Maren, S., Phan, K. L., Liberzon, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci.* 14, 417–428 (2013).
- Marescaux, C., Vergnes, M., Kiesmann, M., Depaulis, A., Micheletti, G., Warter, J. M. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. *Exp Neurol.* 97, 160-168 (1987).
- Maroso, M., Szabo, G. G., Kim, H. K., Alexander, A., Bui, A. D., Lee, S.H., Lutz, B., Soltesz, I. Cannabinoid control of learning and memory through HCN channels. *Neuron*, 89, 1059–1073. (2016).
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 23, 649-711 (2000).
- Matt, L., Eckert, P., Panford-Walsh, R., Geisler, H. S., Bausch, A.E., Manthey, M., Müller, N. I. C., Harasztosi, C., Rohbock, K., Ruth, P., Friauf, E., Ott, T., Zimmermann, U., Rüttiger, L., Schimmang, T., Knipper, M., Singer, W. Visualizing BDNF transcript usage during sound-induced memory linked plasticity. *Front Mol Neurosci.* 11, 260 (2018).
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4, a005751 (2012).
- Milad, M. R., Quirk, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu. Rev. Psychol.* 63, 129–151 (2012).
- Mitterschiffthaler, M. T., Fu, C. H., Dalton, J. A., Andrew, C. M., Williams, S. C. A functional MRI study of happy and sad affective states induced by classical music. *Hum Brain Mapp.* 28, 1150-1062 (2007).
- Naritoku, D. K., Mecozzi, L. B., Aiello, M. T., Faingold, C. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp Neurol.* 115, 317–324 (1992).
- Neves, G., Cooke, S. F., Bliss, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality *Nat Rev Neurosci.* 9, 65-75 (2008).
- Newcomer, J. W., Farber, N. B., Olney, J. W. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci.* 2, 219–232 (2000).


- Okada, T., Yamada, N., Tsuzuki, K., Horikawa, H. P., Tanaka, K., Ozawa, S. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci.* 17, 341-349 (2003).
- Orsini, C. A., Maren, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 36, 1773–1802 (2012).
- Pang, P.T., Nagappan, G., Guo, W., Lunj, B. Extracellular and intracellular cleavages of proBDNF required at two distinct stages of late-phase LTP. *Science of Learning.* 1, 16003 (2016)
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., Bothwell, M. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron.* 9, 1081-1088 (1992).
- Peled, E. S., Newman, Z. L., Isacoff, E. Y. Evoked and spontaneous transmission favored by distinct sets of synapses. *Curr Biol.* 24, 484-493 (2014).
- Regehr, W. G. Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 4, a005702 (2012).
- Reymann, K. G., Frey, J. U. The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, ‘synaptic tagging’, ‘late-associativity’ and implications. *Neuropharmacology.* 52 (2007)
- Romcy-Pereira, R. N., Garcia-Cairasco, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience.* 119, 533–546 (2003).
- Rueckemann, J. W., Buffalo, E. A. Auditory landscape on the cognitive map. *Nature.* 543, 631-632 (2017).
- Sacktor, T. C., Hell, J. W. The genetics of PKM $\zeta$  and memory maintenance. *Sci Signal.* 10, pii: eaao2327 (2017).
- Sambandan, S., Sauer, J. F., Vida, I., Bartos, M. Associative plasticity at excitatory synapses facilitates recruitment of fast-spiking interneurons in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience.* 30, 11826-11837 (2010).
- Sanyal, T., Kumar, V., Nag, T. C., Jain, S., Sreenivas, V., Wadhwa, S. Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in one day-old chicks. *PLoS One.* 8, e67347 (2003).
- Seidman, M. D., Standring, R. T. Noise and quality of life. *Int J Environ Res Public Health.* 7, 3730-3738 (2010).
- Shargorodsky, J., Curhan, G. C., Farwell, W. R. Prevalence and characteristics of tinnitus among US adults. *Am J Med.* 123, 711–718 (2010).

- Shors, T. J., Levine, S., Thompson, R. F. Effect of adrenalectomy and demedullation on the stress-induced impairment of long-term potentiation. *Neuroendocrinology*. 51, 70–75 (1990).
- Shors, T. J., Seib, T. B., Levine, S., Thompson, R. F. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science*. 244, 224–226 (1989).
- Skarlatos, D., Georgiou, A. Memorization of young people under loud pink noise of short duration. *Percept Mot Skills*. 92, 89–94 (2001).
- Skogstad, M., Johannessen, H. A., Tynes, T., Mehlum, I. S., Nordby, K. C., Lie, A. Systematic review of the cardiovascular effects of occupational noise. *Occup Med (Lond)*. 66, 10–6 (2016).
- Squire, L. R., Schmolck, H. & Stark, S. M. Impaired auditory recognition memory in amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Learn Mem*. 8, 252–256 (2001).
- Stansfeld, S. A., Berglund, B., Clark, C., Lopez-Barrio, I., Fischer, P., Ohrström, E., Haines, M. M., Head, J., Hygge, S., van Kamp, I., Berry, B. F.; RANCH study team. Aircraft and road traffic noise and children's cognition and health: a cross-national study. *Lancet*. 365, 1942–1949 (2005).
- Sweat, D. Long-term potentiation as a physiological phenomenon. In *Mechanisms of Memory*. Elsevier Academic Press. 93–116 (2003).
- Tamura, R., Ono, T., Fukuda, M., Nakamura, K. Recognition of egocentric and allocentric visual and auditory space by neurons in the hippocampus of monkeys. *Neurosci. Lett*. 109, 293–298 (1990).
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*. 401, 63–69 (1999).
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., Tonegawa, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 87, 1327–1338 (1996).
- Tsokas, P., Hsieh, C., Yao, Y., Lesburguères, E., et al. Compensation for PKM $\zeta$  in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice. *Elife*. 5, pii: e14846 (2016).
- Vellano, C. P., Lee, S. E., Dudek, S. M., Hepler, J. R. RGS14 at the interface of hippocampal signaling and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*. 32, 666–674 (2011).
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., Collingridge, G. L. Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res*. 1621, 5–16 (2015).
- von Engelhardt, J., Doganci, B., Jensen, V., Hvalby, Ø., et al. Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron*. 60, 846–860 (2008).

- Vorhees, C. V., Williams, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 1, 848–858 (2006).
- Wang, N., Gan, X., Liu, Y., Xiao, Z. Balanced Noise-Evoked Excitation and Inhibition in Awake Mice CA3. *Front Physiol.* 21, 8:931 (2017).
- Watanabe, T., Yagishita, S., Kikio., H. Memory of music: roles of right hippocampus and left inferior frontal gyrus. *Neuroimage.* 1:39, 438-91(2007).
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 313, 1093–1097 (2006).
- Xie, H., Leung, K. L., Chen, L., Chan, Y. S, et al. Brain-derived neurotrophic factor rescues and prevents chronic intermittent hypoxia-induced impairment of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Neurobiol Dis.* 40,155-62 (2010).
- Xu, J., Wu, L. G. The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuro.* 46, 633-45. (2005).
- Xue, L., Wu, L. G. Post-tetanic potentiation is caused by two signalling mechanisms affecting quantal size and quantal content. *J Physiol.* 588, 4987-4994 (2010).
- Zhao, H., Wang L., Chen, L., Zhang, J., et al. Temporary conductive hearing loss in early life impairs spatial memory of rats in adulthood. *Brain Behav.* 8, e01004 (2018).
- Zocoli, A. M., Morata, T. C., Marques, J. M., Corteletti, L. J. Brazilian young adults and noise: attitudes, habits, and audiological characteristics. *Int. J. Audiol.* 48, 692–9 (2009).
- Zucker, R. S., Regehr, W. G. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64:355-405 (2002).

## **8. Anexos**

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## A single episode of high intensity sound inhibits long-term potentiation in the hippocampus of rats

J. L. de Deus<sup>1</sup>, A. O. S. Cunha<sup>1</sup>, A. L. Terzian<sup>2</sup>, L. B. Resstel<sup>2</sup>, L. L. K. Elias<sup>1</sup>, J. Antunes-Rodrigues<sup>1</sup>, S. S. Almeida<sup>3</sup> & R. M. Leão<sup>1</sup> 


Exposure to loud sounds has become increasingly common. The most common consequences of loud sound exposure are deafness and tinnitus, but emotional and cognitive problems are also associated with loud sound exposure. Loud sounds can activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis resulting in the secretion of corticosterone, which affects hippocampal synaptic plasticity. Previously we have shown that long-term exposure to short episodes of high intensity sound inhibited hippocampal long-term potentiation (LTP) without affecting spatial learning and memory. Here we aimed to study the impact of short term loud sound exposure on hippocampal synaptic plasticity and function. We found that a single minute of 110 dB sound inhibits hippocampal Schaffer-CA1 LTP for 24 hours. This effect did not occur with an 80-dB sound exposure, was not correlated with corticosterone secretion and was also observed in the perforant-dentate gyrus synapse. We found that despite the deficit in the LTP these animals presented normal spatial learning and memory and fear conditioning. We conclude that a single episode of high-intensity sound impairs hippocampal LTP, without impairing memory and learning. Our results show that the hippocampus is very responsive to loud sounds which can have a potential, but not yet identified, impact on its function.

Loud noises are a constant presence in the modern urban world. Not only sound pollution from urban traffic, but also the exposure to loud sounds from occupational (musicians and military personnel, for instance) and recreational (headphones, rock concerts) sources are increasingly common, especially among younger individuals<sup>1</sup>. The most common problems associated with loud noise exposure are hearing loss, tinnitus (hearing of a constant non-existent sound) and hyperacusia, which are commonly expressed as comorbidities<sup>2-4</sup>. Besides the auditory deficits, intense noise exposure produces deleterious mental and systemic effects<sup>5-7</sup>. For instance, children chronically exposed to airport noise present reading comprehension and recognition memory deficits<sup>8</sup>, and even in children exposed to an environment with less intense noises presented similar cognitive deficits<sup>9</sup>. Additionally, traumatic blast also can have deleterious emotional and cognitive consequences in humans and rats<sup>10-12</sup>.

The hippocampus is a region traditionally implicated in the formation of declarative and spatial memories, and presents several forms of synaptic plasticity, including long-term potentiation and depression (LTP and LTD, respectively). These forms of synaptic plasticity are considered to be a form of synaptic memory, reinforcing the more efficient synapses in generating action potentials in the post-synaptic neurons<sup>13</sup>. In the hippocampus, the most studied form of synaptic plasticity is the associative NMDA receptor-dependent LTP of the Schaffer-CA1 pathway<sup>14</sup>. The hippocampus is functionally connected to the central auditory pathway indirectly from the frontomedial cortex, insula and amygdala and also connects back to the amygdala and auditory cortex via the entorhinal cortex<sup>15</sup>. This pathway is implicated in the formation of long-term auditory memories<sup>16</sup>, and auditory cues can be used in the formation of spatial memories<sup>17</sup>. Recently it has been demonstrated that hippocampal place cells can be activated by an auditory dimension task<sup>18</sup>.

<sup>1</sup>Department of Physiology, FMRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. <sup>2</sup>Department of Pharmacology, FMRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. <sup>3</sup>Department of Psychology, FFCLRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.M.L. (email: [leao@fmrp.usp.br](mailto:leao@fmrp.usp.br))

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Intrinsic and synaptic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain, a genetic model of epilepsy

Alexandra Olimpio Siqueira Cunha<sup>1</sup> , Cesar Celis Ceballos<sup>1,2</sup>, Júnia Lara de Deus<sup>1</sup>, Rodrigo Felipe de Oliveira Pena<sup>2</sup> , José Antonio Cortes de Oliveira<sup>1</sup>, Antonio Carlos Roque<sup>2</sup>, Norberto Garcia-Cairasco<sup>1</sup> & Ricardo Maurício Leão<sup>1</sup> 

Despite the many studies focusing on epilepsy, a lot of the basic mechanisms underlying seizure susceptibility are mainly unclear. Here, we studied cellular electrical excitability, as well as excitatory and inhibitory synaptic neurotransmission of CA1 pyramidal neurons from the dorsal hippocampus of a genetic model of epilepsy, the Wistar Audiogenic Rat (WARs) in which limbic seizures appear after repeated audiogenic stimulation. We examined intrinsic properties of neurons, as well as EPSCs evoked by Schaffer-collateral stimulation in slices from WARs and Wistar parental strain. We also analyzed spontaneous IPSCs and quantal miniature inhibitory events. Our data show that even in the absence of previous seizures, GABAergic neurotransmission is reduced in the dorsal hippocampus of WARs. We observed a decrease in the frequency of IPSCs and mIPSCs. Moreover, mIPSCs of WARs had faster rise times, indicating that they probably arise from more proximal synapses. Finally, intrinsic membrane properties, firing and excitatory neurotransmission mediated by both NMDA and non-NMDA receptors are similar to the parental strain. Since GABAergic inhibition towards CA1 pyramidal neurons is reduced in WARs, the inhibitory network could be ineffective to prevent the seizure-dependent spread of hyperexcitation. These functional changes could make these animals more susceptible to the limbic seizures observed during the audiogenic kindling.

Epilepsy is a set of neurological disorders that has as a common symptom the appearance of sudden events of hypersynchronization and hyperactivity of neurons<sup>1</sup>. Despite the great amount of scientific literature on epilepsy, the basic mechanisms of seizures onset and spread still remain unclear. Thus, animal models offer ways to test hypothesis on those mechanisms, and can help to identify novel targets and consequently more efficient tools<sup>2</sup>.

Acute audiogenic seizures are generalized reflex tonic-clonic seizures induced by a high intensity sound (e.g. 120 dB), regardless of its frequency. Although they are rare in humans, audiogenic seizures are very well characterized in several strains of rodents, with stereotyped behaviors and epileptiform electroencephalographic activity initially restricted to the auditory brainstem<sup>3–5</sup>. Nonetheless, upon repetition of the sound, the animals start to exhibit behavioral patterns typical of limbic seizures, with epileptiform discharges spreading through amygdala, hippocampus and auditory cortex, a phenomenon known as limbic recruitment<sup>5–8</sup>.

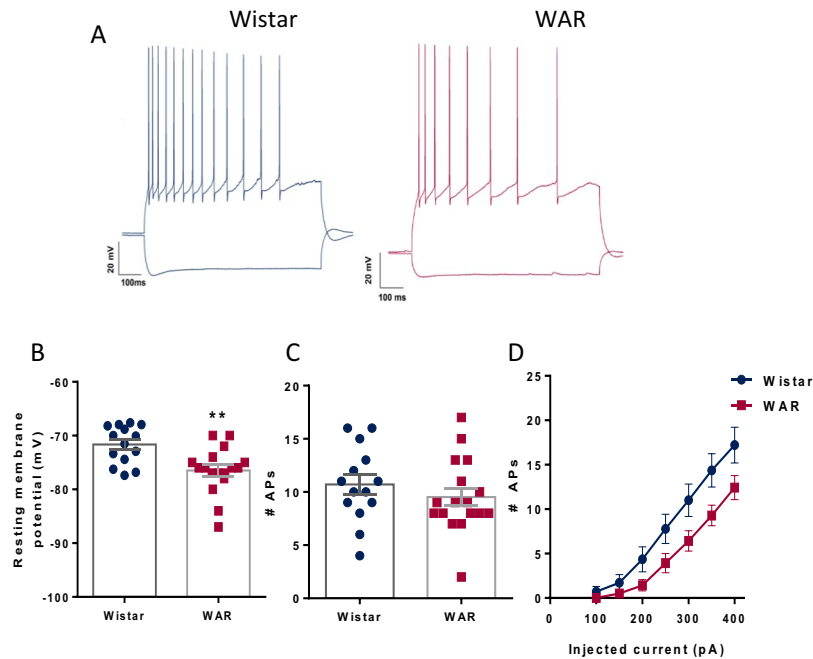
Auditory stimulation impacts the hippocampus in complex ways. There are evidences, for example, that hippocampal place cells respond to an auditory dimension task<sup>9</sup>. Also, we showed that repeated high intensity sound stimulation inhibits hippocampal long-term potentiation (LTP)<sup>10,11</sup>.

According to our previous findings, naïve Wistar Audiogenic Rats (WARs) showed memory impairments in spatial performance in the Morris Water Maze and a slower development of LTP<sup>10</sup>. Additionally, a decreased

<sup>1</sup>Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Physics, School of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.O.S.C. (email: [alecunha@usp.br](mailto:alecunha@usp.br))





**Figure 1.** Electrical properties and firing in pyramidal neurons. (A) Voltage changes in response to current injections for Wistar (blue) and WAR (fuchsia). (B) Resting membrane potential. (C) Number of action potentials 100 pA over rheobase and (D). FI curves. N = 14 cells from 6 Wistars and N = 17 cells from 8 WARs \*\*P < 0.01.

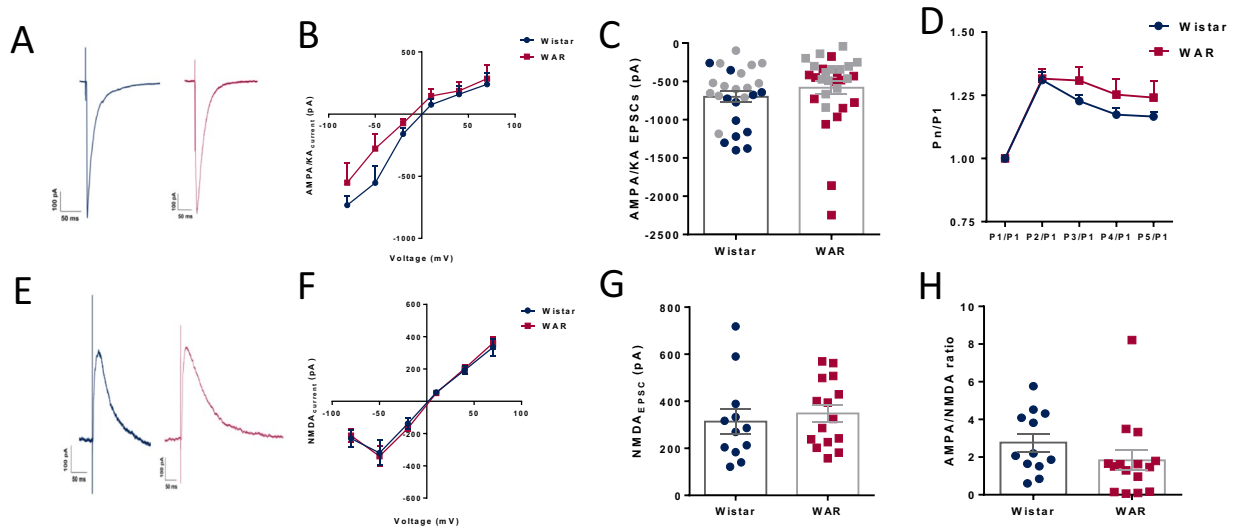
Intrinsic Membrane Properties and Action Potential Parameters			
	Wistar	WAR	p
$R_{input}$ (M $\Omega$ )	69 $\pm$ 3	64 $\pm$ 3	0.27
$\tau$ (ms)	16.8 $\pm$ 1.2	13.7 $\pm$ 1	0.06
Sag (mV)	3.1 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.3	0.99
AP <sub>amplitude</sub> (mV)	104.5 $\pm$ 1.6	105.6 $\pm$ 1.3	0.61
Half width (ms)	0.97 $\pm$ 0.02	0.9 $\pm$ 0.1	0.91
Fast <sub>AHP</sub> (mV)	-69.4 $\pm$ 0.9	-70.6 $\pm$ 1.5	0.52
AP <sub>threshold</sub> (mV)	-61.9 $\pm$ 0.7	-60.4 $\pm$ 0.9	0.24

**Table 1.** Intrinsic Membrane properties and action potential kinetic parameters of CA1 pyramidal neurons of WAR and Wistar animals. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test with p < 0.05 considered as significant.

GABAergic inhibition was observed in dissociated neurons from the hippocampus of newborn WARs<sup>12</sup> as well as field potentials<sup>13</sup> recorded in hippocampal slices of adult WARs. Finally, a recent study showed, in addition to other morphological alterations, marked decrease in the volume in the CA3 of adult WARs<sup>14</sup>. In the current study we characterized membrane electrical properties of CA1 pyramidal neurons from the dorsal hippocampus of naive WARs, as well as synaptic neurotransmission, to verify possible alterations that could be relevant for the seizure-dependent spread of hyperexcitation when challenged by acute or chronic audiogenic seizures.

## Results

**CA1 pyramidal cells of WARs are more hyperpolarized than those from Wistar cells.** CA1 pyramidal neurons from WARs (n = 17) and Wistar rats (n = 14) had similar firing patterns (Fig. 1A) typical of what has been previously reported for CA1 pyramidal neurons (Wheeler *et al.*, 2015). The resting membrane potential of WAR neurons are more hyperpolarized than Wistar neurons (Wistar = -72  $\pm$  0.9 mV; WAR = -77  $\pm$  1.04 mV; P = 0.0008; Fig. 1B), but we did not observe statistical differences in input resistance, membrane time constant or depolarization sag (Table 1) between neurons from WAR and Wistar rats. The analysis of FI curves showed that WAR cells fire less action potentials than Wistar cells [F (1,26) = 4.39, p = 0.046, for main effect], although at a fixed value of 100 pA over rheobase, we did not see statistical differences between the two groups (Wistar = 10.7  $\pm$  0.95 Hz; WAR = 9.14  $\pm$  0.89 Hz; P = 0.23; Fig. 1C,D), suggesting that this difference was caused by the more hyperpolarized resting membrane potential of WAR neurons. Also, action potential parameters did not differ between groups (Table 1).



**Figure 2.** Glutamatergic neurotransmission. (A) Representative traces of evoked EPSCs in cells from Wistar (blue) and WAR (fuchsia) at  $-70$  mV. (B) AMPA/KA peak currents at different voltages. (C) Mean peak currents at  $-70$  mV recorded with CsCl (grey symbols) and KClu as main ion in the internal solution. (D) Trains of 5 evoked pulses at  $-70$  mV show facilitation. (E) Representative traces of NMDA peak currents evoked at  $+80$  mV in the presence of DNQX ( $10\ \mu\text{M}$ ). (F) NMDA peak currents at different voltages. (G) Mean peak currents at  $+80$  mV. (H) NMDA/AMPA ratio obtained by dividing the peak current at  $+80$  mV (with DNQX  $10\ \mu\text{M}$ ) by the peak current at  $-70$  mV.  $N = 12$  cells from 9 Wistars and  $N = 15$  from 7 WARs. In C,  $N = 26$  cells from 18 Wistars and  $N = 30$  cells from 14 WARs.

### Glutamatergic excitatory neurotransmission is similar in WAR and Wistar pyramidal neurons.

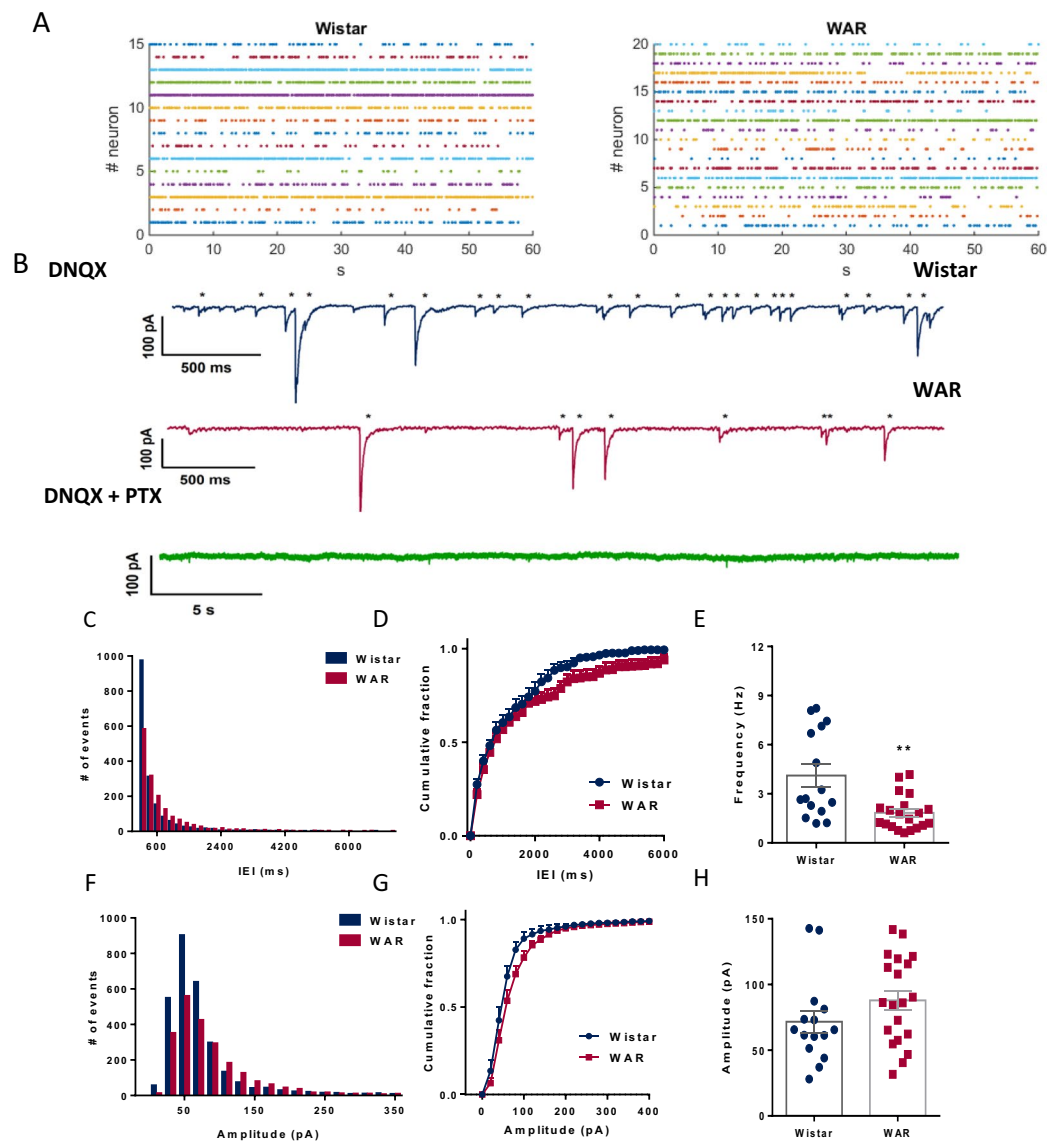
In Fig. 2 we show EPSCs mediated by AMPA/KA and NMDA receptors. Our data show that AMPA/KA-mediated EPSCs from both strains were similar in all tested voltages (Fig. 2B,  $n = 12$  for Wistar and  $n = 15$  for WARs). The amplitudes of EPSCs at  $-70$  mV are similar in cells from Wistar ( $n = 14$ ) and WARs ( $n = 15$ ) (Wistar =  $-523.8 \pm 71.07$  pA; WAR =  $-388.3 \pm 56.6$  pA;  $P = 0.13$ ; Fig. 2C), as well as the rise times (Wistar =  $5.54 \pm 0.6$  ms; WAR =  $5.36 \pm 0.24$  ms;  $P = 0.77$ ), decay times (Wistar =  $44.4 \pm 4.13$  ms; WAR =  $46.7 \pm 3.7$  ms;  $P = 0.68$ ) and half-widths (Wistar =  $14.39 \pm 1.3$  ms; WAR =  $12.9 \pm 0.72$  ms;  $P = 0.32$ ). The AMPA/KA conductances were similar between the two groups (Wistar =  $14.39 \pm 1.3$  ms,  $n = 12$ ; WAR =  $12.9 \pm 0.72$  ms,  $n = 15$ ;  $P = 0.32$ ). We also found that synapses from both animals presented similar short-term facilitation of AMPA/KA currents [ $F(1, 29) = 1.063$ ;  $P = 0.3112$ , for main effect,  $n = 14$  for Wistar and  $n = 15$  for WARs] (Fig. 2D).

NMDA EPSCs had similar amplitudes in all tested voltage steps in the two groups of neurons (Fig. 2E,  $n = 12$  for Wistar and  $n = 15$  for WARs). NMDA at  $+80$  mV EPSCs from CA1 neurons from Wistar and WARs had similar amplitudes ( $I_{\text{NMDA}@+80\text{mV}}$ : Wistar =  $313.9 \pm 51.8$  pA,  $n = 14$ ; WAR =  $348.3 \pm 36.6$  pA,  $n = 15$ ;  $P = 0.58$ , Fig. 2G; rise times (Wistar =  $3.3 \pm 0.5$  ms; WAR =  $3.4 \pm 0.34$  ms;  $P = 0.86$ ), decay times (Wistar =  $305.3 \pm 21.5$  ms; WAR =  $344 \pm 22.6$  ms;  $P = 0.23$ ) and half-widths (Wistar =  $14.39 \pm 1.3$  ms; WAR =  $12.9 \pm 0.72$  ms;  $P = 0.32$ ). We did not observe any differences in NMDA conductances in depolarized potentials (Wistar =  $4.68 \pm 0.8$  nS; WAR =  $5.29 \pm 0.48$  nS;  $P = 0.5$ ) The ratio between AMPA/KA and NMDA EPSCs was not significantly different (Wistar =  $0.398 \pm 0.075$ ; WAR =  $0.67 \pm 0.11$ ;  $P = 0.2$ ; Fig. 2H).

**Neurons from WAR animals receive less GABAergic spontaneous IPSCs.** Spontaneous GABAergic IPSCs recorded in CA1 pyramidal cells, reflect the activity of the interneuron network over principal excitatory cells. To determine whether genetic selection of the audiogenic phenotype had impacted GABAergic neurotransmission, we analyzed spontaneous IPSCs. Figure 3A shows raster plots of the sIPSCs over a 1-minute window. In Fig. 3B, in turn, we show typical IPSCs from Wistar and WAR neurons, and below (in green) the effect of applying the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin (20 and  $100\ \mu\text{M}$ ), confirming the GABAergic nature of the currents.

We counted more events in total from Wistar neurons than from WAR neurons (Fig. 3C) suggesting a more active inhibitory network onto the CA1 pyramidal cell from Wistar animals. Accordingly, the analysis of IEI distributions showed significant differences between the two groups (KS test,  $p = 0.002$ . Fig. 3D) with a distribution of IEIs shifted to the right in WARs. The mean frequency of IPSCs was significantly smaller in cells from WARs as compared with Wistar cells (Wistar =  $4.11 \pm 0.68$  Hz; WAR =  $1.8 \pm 0.23$  Hz;  $P = 0.0014$ ; Fig. 3E). The analysis of the coefficient of variation (CVs) of the IEI was similar in both groups indicating the same irregular pattern of activity in time in the two groups (Wistar =  $99.35 \pm 5.24\%$ ; WAR =  $107.1 \pm 7.07\%$ ;  $P = 0.4$ ; Fig. 3F).

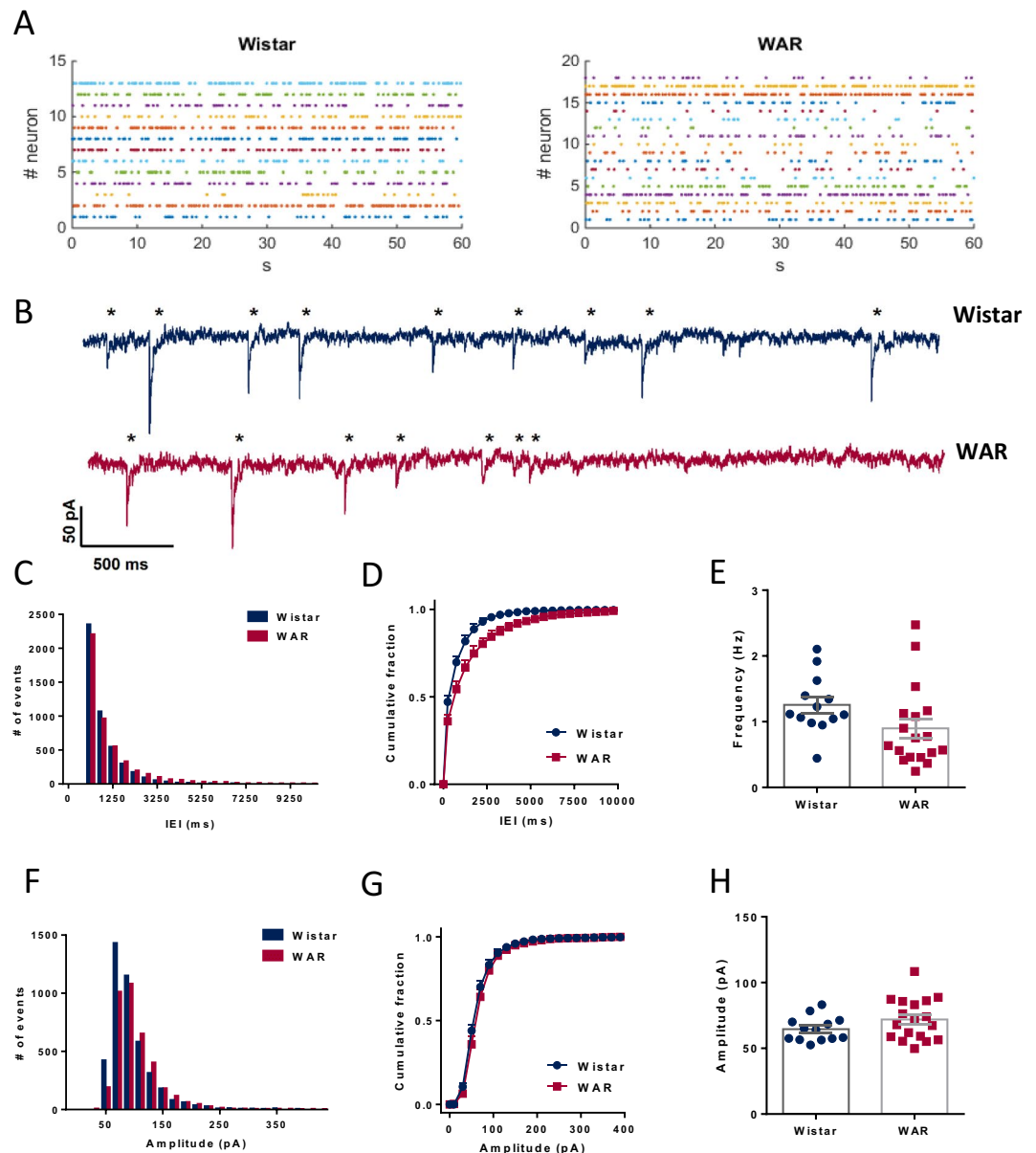
The amplitudes distributions followed a skewed Gaussian pattern and were similar between the groups (Fig. 3F). We did not observe differences in amplitude cumulative distribution (KS test,  $p = 0.95$ ), and in mean amplitudes (Wistar =  $71.6 \pm 8.4$  pA; WAR =  $87.9 \pm 7.4$  pA;  $p = 0.15$ , Fig. 3H) and the amplitude CVs were similar between the two groups, showing similar variabilities among them (Wistar =  $63.29 \pm 6.3\%$ ; WAR =  $63.38 \pm 4.3\%$ ;



**Figure 3.** GABAergic spontaneous IPSCs. (A) Raster plots displaying all events in 1 min of recording from all patched cells. (B) Representative traces of spontaneous IPSCs with detected events marked (\*) for Wistar (blue) and WAR (fuchsia) cells. All events disappeared after addition of picrotoxin ( $20\ \mu\text{M}$ ) in the bath. (C) Histograms with the sum of all inter-event intervals (IEI; Bin width = 200 ms). (D) Cumulative fraction of events of IEIs. (E) Mean global frequency of IPSCs for each group of animals. (F) Histogram showing distribution of events by amplitude recorded during 1 min (Bin width = 20 pA). (G) Cumulative fraction of amplitudes per group. (H) Mean amplitude of all detected IPSCs per group. \*\* $P < 0.01$ .  $N = 15$  cells from 7 Wistars and  $N = 20$  from 7 WARs.

$p = 0.99$ ). IPSCs from both groups of animals presented similar rise times (Wistar =  $1.15 \pm 0.08$  ms; WAR =  $1.1 \pm 0.05$  ms;  $p = 0.6$ ), decay times ( $\tau_{\text{fast}}$ , Wistar =  $3.52 \pm 0.47$  ms; WAR =  $2.7 \pm 0.23$  ms;  $p = 0.11$  and  $\tau_{\text{slow}}$ , Wistar =  $38.65 \pm 5.7$  ms; WAR =  $28.78 \pm 3$  ms;  $p = 0.1$ ) and half-widths (Wistar =  $3.15 \pm 0.3$  ms; WAR =  $2.5 \pm 0.2$  ms;  $p = 0.12$ ).

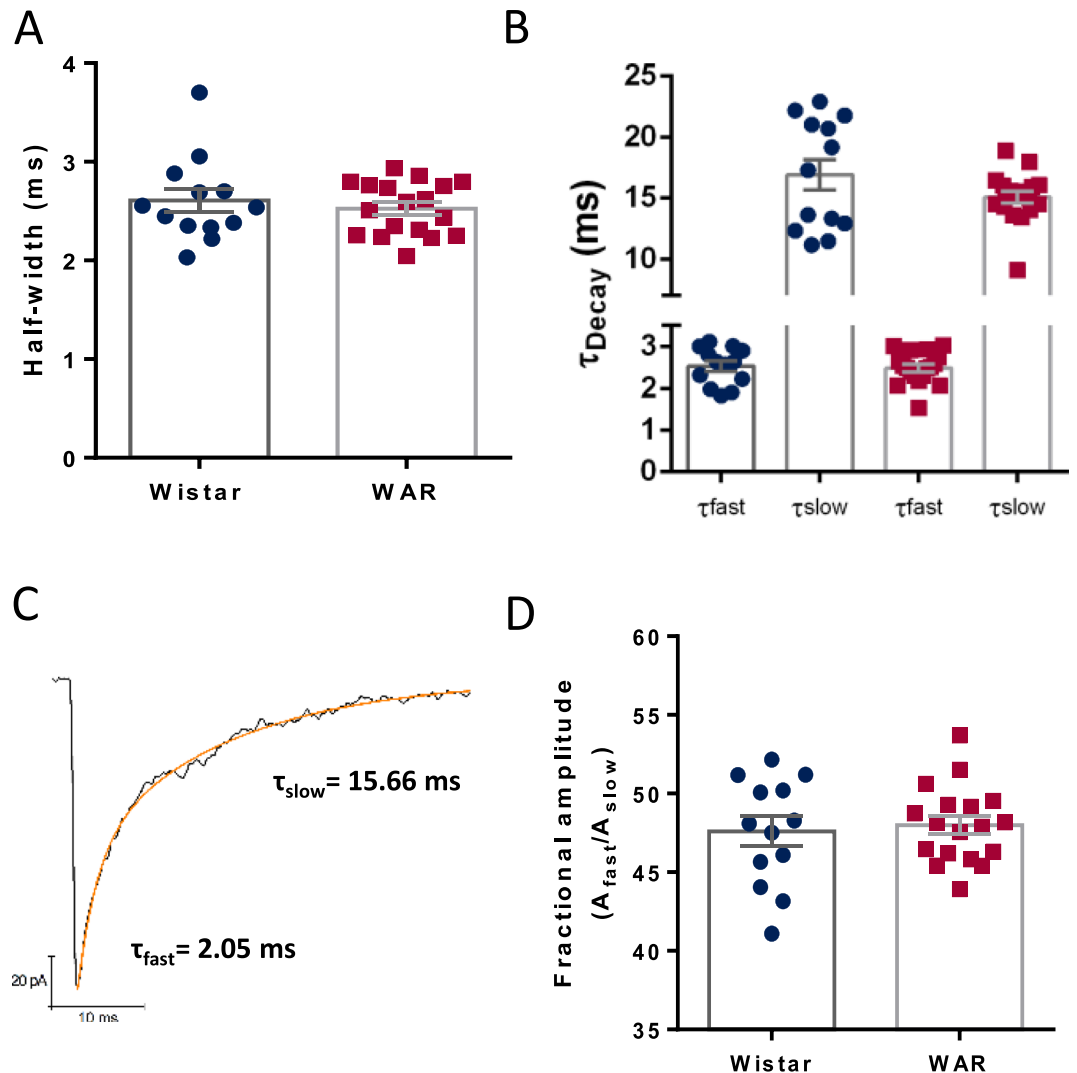
**Miniature GABAergic currents are faster and less frequent in WARs.** GABAergic currents were recorded in the presence of TTX. Application of TTX inhibited more the frequency of the IPSCs in neurons from Wistar rats than from cells of WAR rats (Wistar = 49% and WAR = 30.5%). In Fig. 4 we show raster plots of mIPSCs in 1-minute windows for each cell together with typical mIPSCs (A-B). After TTX, the cumulative distributions of the IEIs from WARs were again shifted to the right, with more events separated by longer IEIs ( $> 1$  second; KS test,  $p < 0.0001$ ; Fig. 4C,D) and the mean frequency of WAR mIPSCs was lower than that of Wistar mIPSCs, although this difference did not reach significance (Wistar =  $1.25 \pm 0.12$  Hz; WAR =  $0.89 \pm 0.14$  Hz;  $P = 0.084$ ; Fig. 4E). The CVs were similar indicating the same irregular pattern of mIPSCs appearance for both groups of animals (Wistar =  $114.7 \pm 11.7\%$ ; WAR =  $106 \pm 2.7\%$ ;  $p = 0.4$ ).



**Figure 4.** Frequency and IEI of quantal GABAergic mIPSCs. **(A)** Raster plots displaying all events in 1 min from all patched cells. **(B)** Representative traces of spontaneous mIPSCs with detected events marked (\*) for Wistar (blue) and WAR (fuchsia) cells. **(C)** Histogram showing distribution of events by IEI recorded for 5 minutes (Bins of 200 ms). **(D)** Cumulative fraction of IEI per group. (Bins of 50 ms). **(E)** Mean global frequency of mIPSCs. **(F)** Histogram showing distribution of events by amplitude recorded for 5 minutes (Bins of 20 pA). **(G)** Cumulative fraction of amplitudes per group. **(H)** Mean amplitudes.  $N = 13$  cells from 7 Wistars and  $N = 18$  from 7 WARs.

Interestingly, amplitudes of the IPSCs were not affected by TTX. The amplitude distributions were similar in both groups (Fig. 4F,G, KS test,  $p = 0.9621$ ) and the mean amplitudes of mIPSCs were not different between groups (Wistar =  $74.46 \pm 3.74$  pA; WAR =  $81.68 \pm 4.4$  pA;  $p = 0.32$ ; Fig. 4H). Also, the CVs of the amplitudes were similar (Wistar =  $59.7 \pm 5.56\%$ ; WAR =  $57.93 \pm 4.83\%$ ;  $p = 0.81$ ). We did not find differences in the half-widths (Wistar =  $2.6 \pm 0.12$  ms; WAR =  $2.5 \pm 0.06$  ms;  $p = 0.5$ ; Fig. 5A) of the mIPSCs.

The decay phase of the mIPSCs could be well fitted with double exponentials and characterized by a fast and a slow time constant both similar between groups ( $\tau_{fast}$ : Wistar =  $2.53 \pm 0.1$  ms; WAR =  $2.48 \pm 0.09$  ms;  $p = 0.7$  and  $\tau_{slow}$ : Wistar =  $16.9 \pm 1.2$  ms; WAR =  $15.08 \pm 0.48$  ms;  $P = 0.13$ ; Fig. 5B–D). Interestingly, we observed significant differences in the mean rise times (Wistar =  $0.95 \pm 0.04$  ms; WAR =  $0.84 \pm 0.017$  ms;  $p = 0.0078$ ; Fig. 6A), indicating that mIPSCs in WAR cells were faster. In fact, the distribution of the rise times of both group of cells exhibited two peaks: a large peak at small values and a smaller peak for bigger values, indicating the existence of fast-rising mIPSCs (<1 ms) and slow-rising mIPSCs (>1 ms) (Fig. 6B–D). These distributions were statistically different between groups (KS test,  $p = 0.0027$ ). We thus, separated the rise times in two groups (cutoff = 1 ms) and tested

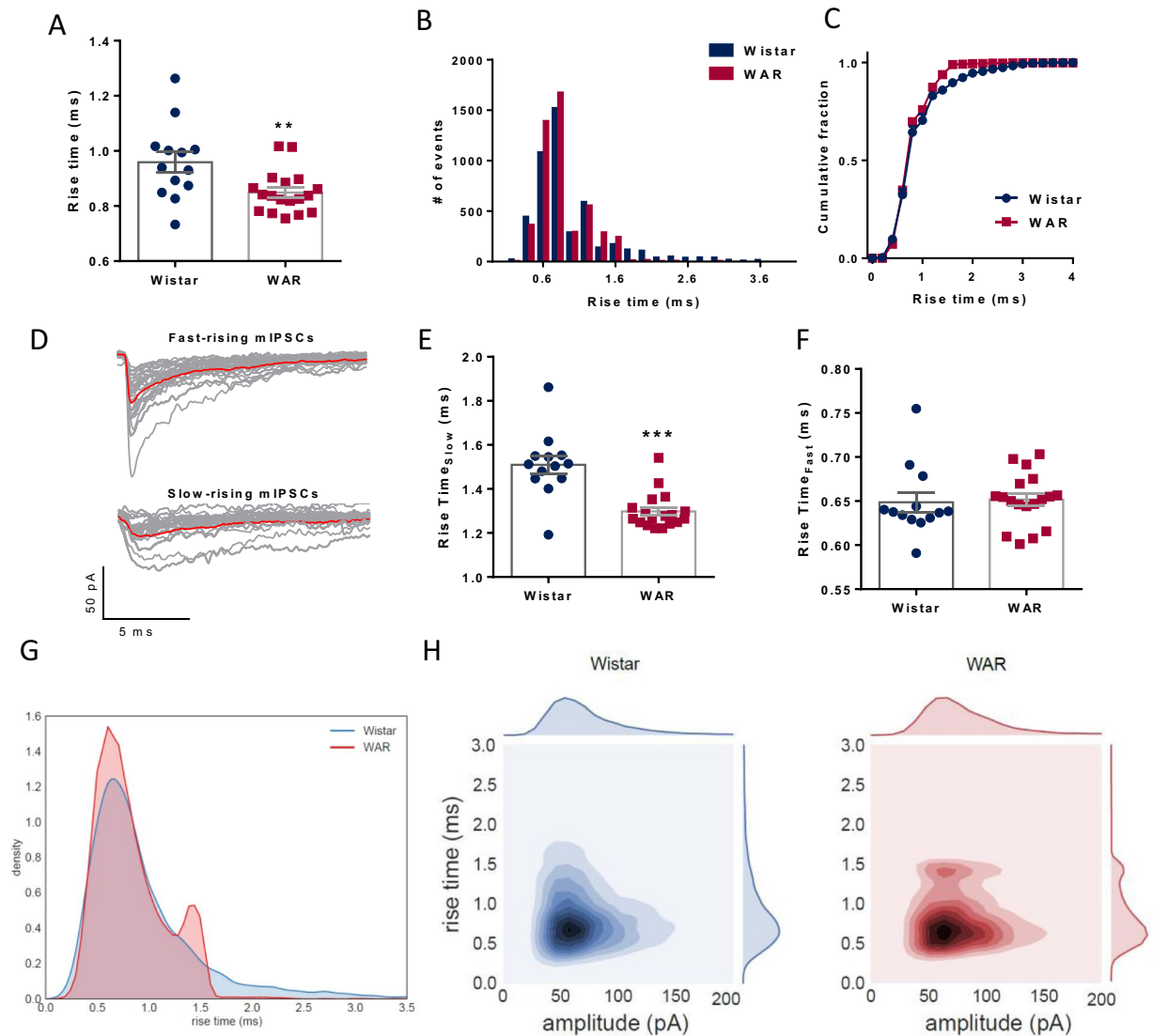


**Figure 5.** Kinetics of GABAergic mIPSCs. (A) Mean half-widths. (B) Mean fast and slow decay time constants obtained by the fittings of double exponentials. (C) Frequency distribution of fast and slow time constants. (D) The ratio between  $A_{fast}$  and  $A_{slow}$  shown as fast %.  $N = 13$  cells from 7 Wistars and  $N = 18$  from 7 WARs.  $N = 13$  cells from 7 Wistars and  $N = 18$  from 7 WARs.

if the two populations of mIPSCs presented a similar pattern. We found that slow mIPSCs in cells from WARs had shorter rise times than from Wistars (Wistar =  $1.5 \pm 0.04$  ms; WAR =  $1.29 \pm 0.019$  ms;  $p < 0.0001$ , Fig. 6E), whereas both groups had similar fast mIPSCs (Wistar =  $0.648 \pm 0.01$  ms; WAR =  $0.65 \pm 0.006$  ms;  $P = 0.79$ , Fig. 6F). The fast and slow mIPSCs were similarly distributed among both strains, being 70.8% fast and 29.2% slow in cells from WARs and 65.4% fast and 34.6% slow in cells from Wistars. This result points to a particular change in the kinetics of mIPSPs. Whereas fast rise times are kept, longer rise times are altered. We propose that one subpopulation is kept (the fast), one subpopulation is lost (the slower) and one subpopulation is enhanced (peak close to 1.4 ms) (Fig. 6G). Markedly, if we combine the statistics from both groups (Fig. 6) the behavior is preserved. Amplitude is the same in both Wistar and WAR but we can still observe a second subgroup only in the WAR's rise times as a darker region in the joint plot (Fig. 6H). Finally, no correlations were observed between rise times and amplitudes or half-widths (data not shown).

## Discussion

Although acute audiogenic seizures involve mainly the activation of primary brainstem auditory areas, chronic acoustic stimuli or audiogenic kindling often lead to the spread of epileptic activity to limbic areas, such as cortex, hippocampus and amygdala, resulting in a change in behavior and electrical activity<sup>5-8,15,16</sup>. At some point of audiogenic kindling, brainstem seizures and limbic seizures start to co-exist and this phenomenon can be easily observed with all audiogenic strains<sup>4,16</sup>. Interestingly, although, a few non-susceptible animals sometimes exhibit low score brainstem seizures, limbic seizures are rare, no matter how many stimulations the animals experience<sup>17</sup>, which leads to the hypothesis that in the audiogenic strains, the auditory-limbic pathways are altered. In fact, previous findings indicated that in the WAR strain, auditory-limbic circuitry is facilitated, even in the absence of seizures<sup>18</sup>. In this respect, audiogenic kindling, firstly described by Marescaux *et al.*<sup>6</sup> and its electrophysiological



**Figure 6.** Rise times of quantal GABAergic mIPSCs. **(A)** Mean values for rise times. **(B)** Histogram showing distribution of events by rise times (Bins of 0.2 ms). Note the shape of two Gaussian distributions. **(C)** Frequency distribution of rise times. **(D)** Representative traces of mIPSCs divided in two groups; fast and slow rise time events. **(E)** Mean rise times for the group of fast rise times. **(F)** Mean rise times for the group of slow rise times. **(G)** KDE of the rise time distributions from the different groups where the Wistar KDE is plotted in blue and the WAR in red. **(H)** Bivariate KDE applied to rise time and amplitude distributions where darker colors represent higher densities. Each of the variables have its univariate KDE attached to the plot. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

counterparts subsequently reproduced in Genetically Epilepsy-Prone Rats (GEPRs) by Naritoku *et al.*<sup>7</sup> and in WARs by Dutra Moraes *et al.*<sup>8</sup> could be considered as a model of limbic recruitment or TLE<sup>4,8</sup>, the most common epilepsy syndrome in human adults<sup>19</sup>, in which a massive activation of limbic structures can be observed during seizures.

We have previously reported that, endogenously, dorsal hippocampi of WARs exhibited delayed LTP in Schaffer-CA1 synapses, which was accompanied by spatial memory impairments in the Morris Water Maze, suggestive of strain specific changes in hippocampal circuits<sup>10</sup>. In the current study, we investigated intrinsic and synaptic properties of CA1 pyramidal cells of WARs to verify the differences in the excitation/inhibition balance in the hippocampus of these animals that could underlie limbic recruitment. We found that CA1 pyramidal neurons have similar electrophysiological properties in WAR and Wistar control strains, except for a more hyperpolarized resting membrane potential in neurons from WARs.

To begin with, since it is well established that glutamatergic neurotransmission mediated by either AMPA/KA or NMDA receptors play an important role in seizure susceptibility in many animal models<sup>2</sup>, we first investigated possible alterations in excitatory synapses in the CA1 field of WAR. Our results show no differences in the excitatory glutamatergic AMPA/kainate and NMDA currents in both Wistar and WAR strains, suggesting that the fast-excitatory synapses in the CA1 are similar and could not be the substrate for the seizure susceptibility.

Similar to other cortical structures, most hippocampal cells are excitatory, and in CA1, only 11% of cells are GABAergic interneurons<sup>20</sup>. Despite that, inhibitory interneurons control the activity of principal cells and the loss of inhibition targeting excitatory neurons in the CA1, might have a profound impact not only in the hippocampus, but in areas that receive its connections<sup>20</sup>. In our study, we observed a decrease in spontaneous GABAergic currents whether the network was active or not. Since the spontaneous GABAergic inhibition strongly regulates pyramidal neuron firing<sup>21</sup>, the observed reduction in the frequency of sIPSCs in WARs could potentially impact the excitatory-inhibitory balance in these neurons, and potentiate their firing, when the Schaffer pathway is stimulated. In that context, a decreased GABAergic inhibition could favor the susceptibility to limbic seizures, as observed in audiogenically kindled WARs<sup>4,8,16,22</sup>. In fact, the impairment in the excitation/inhibition balance is thought as a possible trigger for seizures in many animal models of epilepsy and in clinical disorders<sup>2</sup>.

A decrease in the frequency of GABAergic currents could be consequence to a reduction in the number of interneurons or the number of synapses<sup>23,24</sup>. Many models of acquired and genetic epilepsy report alterations in GABAergic neurotransmission in the hippocampus. Knopp *et al.*<sup>24</sup> observed a decrease in the frequency of mIPSCs in the subiculum of rats two weeks after *Status Epilepticus* (SE) induced by pilocarpine (PILO). These authors observed a marked decrease in the number of fast spiking parvalbumin<sup>+</sup> interneurons in the CA1 pyramidal layer and subiculum. Although we did not see a decrease in mIPSC frequency, our data showed that mIPSCs in WAR were separated by longer inter-event intervals, what could also reflect a change in the number of active synapses or release probability. According to Wierenga and Wadman<sup>25</sup>, hippocampal kindling induces a reduction in the frequency of mIPSCs in CA1 pyramidal cells. It is important to remember that in the PILO model, intense death of interneurons is always reported<sup>26</sup>, in contrast to what happens in hippocampal kindling<sup>27</sup>, where a modest cell loss can be observed. In both models, a re-organization of synaptic inputs take place in the hippocampus preceding the appearance of seizures and continuing as seizures occur. In our model, WAR animals do not present Fluorojade<sup>+</sup> (Schmued *et al.*, 1997) neurodegenerated cell counts or mossy fiber sprouting, such as the one presented after, for example, PILO-induced SE (Leite *et al.*, 2001) different from Wistar controls after audiogenic kindling in the hippocampus<sup>22</sup> with a subtle but significant reduction of cell counts in perirhinal cortex and amygdala<sup>10</sup> after audiogenic kindling. However, in order to have a precise evaluation of the impact of these alterations in WARs limbic (hippocampal-amygdala, perirhinal) networks, an estimation of the number of GABAergic interneurons and their subtypes compared to Wistar parental strain is eagerly needed. We found a fast-rising and a slow-rising mIPSCs, as previously described in animals exposed to hippocampal kindling<sup>25</sup>. However, in contrast to those findings, we observed a change in mIPSC kinetics, with a decrease in the mean rise times of mIPSCs. We found that “slow” rise time population of WARs is faster, which could be explained by changes in GABA<sub>A</sub> receptor subunit composition. Furthermore, this effect could also be a result of the presence of more proximal synapses (to be proven by microscopy studies) in WARs, resulting in decreased dendritic filtering, even in the absence of correlation between rise time amplitude or decay time constants of recorded mIPSCs<sup>28–30</sup>. In fact, Labrakakis *et al.*<sup>31</sup> showed that events with slower rise times originating from dendritic synapses are not always smaller in amplitude, as if they were a result of electrotonic filtering. We thus believe that this change in mIPSC kinetics may result from a combination of subunit composition of the GABA<sub>A</sub> receptors and synapse location. Llano *et al.*<sup>28</sup> found also in Purkinje cells two populations of mIPSCs regarding their rise times. A fast population that originate from synapses located on the soma or proximal dendrites and slow rise times population that originate at distal dendrites. Therefore, the finding that WARs mIPSCs rise times are faster would indicate that most events come from somatic origin and consequently, neurons from these animals have less synapses coming from dendrites, which might impair the ability for dendritic inhibitory inputs to efficiently hamper the excitatory signals, contributing to the susceptibility to seizures. We are currently investigating if this is the case using electronic microscopy.

We finally report that WAR hippocampal pyramidal CA1 neurons are more hyperpolarized and fire less action potentials than Wistar hippocampal cells. Since the action potential threshold was not different in WARs, we consider that the decrease in firing is a consequence of lower resting membrane potential. In our interpretation, this alteration in resting membrane potential, could be a result of intrinsic homeostatic plasticity that counterbalances the deficient inhibition, protecting the cell from hyperexcitation. Indeed, it has been demonstrated that after chronic increases in network excitability, cellular changes will often reduce intrinsic excitability<sup>32</sup>.

We conclude that due to specific changes in fast GABAergic synapses, WAR, a genetically developed strain susceptible to epilepsy, can be a good model to understand how deficient GABAergic neurotransmission behaves when challenged, with potential impact in the control of excitability, such as the one associated to epilepsy. Although the animals studied in the present study are seizure naïve, we can speculate that if further audiogenic kindling is imposed to them, the presence of hyperexcitability would be facilitated and this is the aim of ongoing and future investigations. We therefore propose that the interaction of WAR genetic background with the chronic seizure experience, in this case, driven by high intensity sound stimulation, could mimic processes that underlie some types of human epileptic disorders.

## Methods

All experiments were performed according to rules for animal research from the National Council for Animal Experimentation Control in Brazil (CONCEA). All experiments in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) at the University of São Paulo in Ribeirão Preto, protocol # 015/2013.

**Animals.** Wistar Audiogenic Rats (WARs) were inbred and raised at the Central Animal Housing Facility at the University of São Paulo as previously described<sup>33</sup>. For both strains, we used male rats (60–80 days, 5–8, per group), kept in Plexiglas cages (2–3 animals per cage), food and water ad libitum and 12-h dark/light cycle (lights on at 7:00 a. m.) and controlled temperature (22 °C). We used naïve animals to avoid seizure-related effects.

**Hippocampal Slices.** Animals were anesthetized with isoflurane and quickly decapitated. Brains were carefully removed and placed in an ice-cold solution containing (mM): 87 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 Sucrose, 25 Glucose, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Brains were glued with cyanoacrylate glue to a support, placed inside the cutting chamber of a vibratome (1000 plus, Vibratome, USA) and cut in 200 μm transversal slices containing the dorsal hippocampus. The slices were placed in aCSF solution containing (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> for one hour at 34–35 °C and thereafter for at least one hour at room temperature before recordings. Only sections 3.6 to 4.5-mm anterior-posterior with respect to bregma were used<sup>34</sup>.

**Whole Cell Patch Clamp Recordings.** CA1 pyramidal neurons were visualized with an Olympus BX51WI Microscope (Olympus, Japan) with infrared differential interference contrast (IR-DIC). Neurons were chosen based on the morphology (pyramidal shape) and position in the pyramidal layer. We chose neurons located in the middle of the layer to avoid electrophysiological differences between superficial and deep pyramidal cells<sup>35</sup>.

Patch clamp recordings were performed using a Heka EPC10 (HEKA Elektronik, Germany) amplifier with 50 kHz sampling rate and low pass filtered at 3 kHz (Bessel). The slices were placed in the recording chamber filled with aCSF and controlled temperature at 34 °C (Scientifica, UK). To record intrinsic properties of neurons, we used an internal solution consisting of (mM): 138 K-gluconate, 8 KCl, 10 Hepes, 0.5 EGTA, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP adjusted to pH 7.3 with KOH and ≈290 mOsm/kgH<sub>2</sub>O. To record glutamatergic excitatory post-synaptic currents (EPSCs) we stimulated Schaffer collaterals with a concentric bipolar microelectrode (FHC – Bowdoin, ME, USA), always placed in a visually-controlled distance from the recorded cell, connected to a SD9 Grass voltage stimulator (Natus Medical Incorporated, Warwick, RI, USA). To record AMPA and NMDA-EPSCs, we used an internal solution consisting mM): 130 CsCl, 10 Hepes, 5 EGTA, 5 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 10 TEA, 5 QX 314 adjusted to pH 7.3 with CsOH and ≈290 mOsm/kgH<sub>2</sub>O. We used the minimum voltage necessary to evoke the maximum current and recorded the EPSCs at holding potentials from –70 mV to +80 mV, increments of +30 mV. We applied DNQX to block AMPA/KA currents and isolate NMDA currents. AMPA/KA IVs were obtained by subtracting the currents before and after DNQX and the NMDA-AMPA ratio was obtained in the same cell by dividing the current evoked at +80 by the current evoked at –70 mV. We confirmed that currents were mediated by NMDA receptors using the NMDA antagonist, D-AP5 (10 μM). In some experiments, we recorded AMPA-mediated glutamatergic evoked currents with K<sub>Glu</sub> based internal solution. EPSCs recorded with K<sub>Glu</sub> and CsCl were not significantly different, so we decided to group them together. Glutamatergic currents were recorded in the presence of picrotoxin (20 μM). All evoked and spontaneous synaptic currents were blocked by a combination of PTX (20 μM), DNQX (10 μM) and D-AP5 (10 μM).

Spontaneous GABAergic currents were recorded in the presence of 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) with an internal solution consisting of (mM): 145 KCl, 10 Hepes, 0.5 EGTA, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, adjusted to pH 7.3 with KOH and ≈290 mOsm/kgH<sub>2</sub>O. In order to test if we could improve the detection of dendritic synaptic currents we recorded some cells (n = 6) with CsCl-based internal solution, which could improve space-clamp control in the dendrites by reducing leak potassium conductances and compared the IPSCs with the ones recorded in KCl. We found that IPSCs recorded in CsCl had similar parameters than IPSCs recorded in KCl, except by a small increase in the decay time (Data not shown). We conclude that the CsCl internal solution does not improve the detection of distal IPSCs, as suggested by a previous work<sup>36</sup>.

Electrodes were fabricated from borosilicate glass (BF150-86-10, Sutter Instruments, Novato CA) with tip resistances of 3–5 MΩ. Series resistance (<20 MΩ) was compensated in 60%. Any neuron with series resistance increased over 20% during experiments, as well as resting membrane potential higher than –60 mV, was discarded. Voltages were corrected off-line for a liquid junction potential for each internal solution calculated with Clampex software (Molecular Devices).

**Drugs.** The following drugs were used: picrotoxin (Sigma, 20 and 100 μM), 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX - Sigma, 10 μM), D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5 - Tocris, 10 μM) and tetrodotoxin (TTX - Cayman Chemical, 0.5 μM). DNQX was dissolved in DMSO and then added to bath from fresh stock solutions. The final concentration of DMSO in the experiments was 0.1% and since we did not find differences between DMSO and aCSF, we used only aCSF as control vehicle. All salts were of reagent grade.

**Data Analysis.** Data was analyzed using Mini Analysis (Synaptosoft 6.0.3, Fort Lee, NJ, USA) and custom written routines in IgorPro (Wavemetrics, Portland, OR, USA) and Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA). Voltage-current relations (VI) were built measuring the steady-state voltage change in response to hyperpolarizations and we measured membrane input resistance, membrane time constants and the depolarization sag. Step depolarizations were used to produce the firing frequency-intensity curves (FI). We used the first action potential fired to obtain from phase-plane plots (dV/V): threshold, rate of rise (ROR), half-width and fast afterhyperpolarization (AHP).

The peaks of the EPSCs were used to build IV relationships, to calculate the reversal potential and to estimate the chord conductances. We measured rise times from baseline to peak and decay times from peak to baseline.

GABAergic currents were recorded at –70 mV. Spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) were recorded for 10 minutes. We next applied TTX to block action potentials and record miniature IPSCs (mIPSCs). IPSCs and mIPSCs were selected manually, and only currents with good signal to noise ration were chosen. For each recording file, we tested the RMS noise and compared among groups. Since the electrical noise was similar among recordings, we chose not to use any type of offline filter to avoid distortions in the kinetics of events. Histograms for interevent intervals, amplitudes and rise times were built with same fixed bins for different groups of cells and cumulative frequency distributions were tested for significance with Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Analysis of decay kinetics for inhibitory currents was performed by Mini Analysis group analysis with individual



currents fitted with double exponential functions. Fast and slow time constants were presented as average and compared between groups. Further analysis of the mIPSC amplitude and rise time distributions was made using kernel density estimation (KDE). KDE was estimated using Seaborn library for the Python programming language (Python Software Foundation, <https://www.python.org/>).

Data from other experiments are reported as mean  $\pm$  SEM and were tested with unpaired t-test, considering  $p < 0.05$ . Also, we used two-way ANOVA to test for significance in FI curves and train stimulation of Schaffer collaterals.

**Ethical Publication Statement.** We confirm that we have read the Journals position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## References

1. Fisher, R. S. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475–482 (2014).
2. Löscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* **20**, 359–368 (2011).
3. Ross, K. C. & Coleman, J. R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 639–653 (2000).
4. Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E. H. L. & Cortes de Oliveira, J. A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy Behav.* **71**(Part B), 250–273 (2017).
5. Vinogradova, L. V. Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *Epilepsy Behav.* **71**, 142–153 (2017).
6. Marescaux, C. *et al.* Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: An EEG study. *Exp. Neurol.* **97**, 160–168 (1987).
7. Naritoku, D. K., Mecozzi, L. B., Aiello, M. T. & Faingold, C. L. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp. Neurol.* **115**, 317–324 (1992).
8. Dutra Moraes, M. F., Galvis-Alonso, O. Y. & Garcia-Cairasco, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res.* **39**, 251–259 (2000).
9. Aronov, D., Nevers, R. & Tank, D. W. Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal-entorhinal circuit. *Nature* **543**, 719–722 (2017).
10. Cunha, A. O. S., de Oliveira, J. A. C., Almeida, S. S., Garcia-Cairasco, N. & Leão, R. M. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. *Neuroscience* **310**, 114–127, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.040> (2015).
11. de Deus, J. L. *et al.* A single episode of high intensity sound inhibits long-term potentiation in the hippocampus of rats. *Sci. Rep.* **7**, 14094 (2017).
12. Mesquita, F. *et al.* Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats. *Brain Res. Bull.* **65**, 177–183 (2005).
13. Drumond, L. E. *et al.* Reduced hippocampal GABAergic function in Wistar audiogenic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica A1* **44**, 1054–1059 (2011).
14. Lee, Y. *et al.* Divergent brain changes in two audiogenic rat strains: A voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging comparison of the genetically epilepsy prone rat (GEPR-3) and the Wistar Audiogenic Rat (WAR). *Neurobiol. Dis.* **111**, 80–90 (2017).
15. Garcia-Cairasco, N. *et al.* Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res.* **26**, 177–192 (1996).
16. Garcia-Cairasco, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.* **168**, 208–222 (2002).
17. Galvis-Alonso, O. Y., Cortes De Oliveira, J. A. & Garcia-Cairasco, N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* **125**, 787–802 (2004).
18. Magalhães, L. H. M., Garcia-Cairasco, N., Massensini, A. R., Doretto, M. C. & Moraes, M. F. D. Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizures in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock. *Neurosci. Lett.* **369**, 19–23 (2004).
19. Cascino, G. D. Temporal lobe epilepsy: more than hippocampal pathology. *Epilepsy Curr.* **5**, 187–189 (2005).
20. Hu, H., Gan, J. & Jonas, P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin<sup>+</sup> GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* **345**, 1255263 (2014).
21. Cohen, I. & Miles, R. Contributions of intrinsic and synaptic activities to the generation of neuronal discharges in *in vitro* hippocampus. *J. Physiol.* **524**(Pt 2), 485–502 (2000).
22. Romcy-Pereira, R. N. & Garcia-Cairasco, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience* **119**, 533–546 (2003).
23. Edwards, F. A., Konnerth, A. & Sakmann, B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol.* **430**, 213–249 (1990).
24. Knopp, A., Frahm, C., Fidzinski, P., Witte, O. W. & Behr, J. Loss of GABAergic neurons in the subiculum and its functional implications in temporal lobe epilepsy. *Brain J. Neurol.* **131**, 1516–1527 (2008).
25. Wierenga, C. J. & Wadman, W. J. Miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurons after kindling epileptogenesis. *J. Neurophysiol.* **82**, 1352–1362 (1999).
26. Dinocourt, C., Petanjek, Z., Freund, T. F., Ben-Ari, Y. & Esclapez, M. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J. Comp. Neurol.* **459**, 407–425 (2003).
27. Sutula, T., He, X. X., Cavazos, J. & Scott, G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* **239**, 1147–1150 (1988).
28. Llano, I. *et al.* Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci.* **3**, 1256–1265 (2000).
29. Cossart, R. *et al.* Distribution of spontaneous currents along the somato-dendritic axis of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience* **99**, 593–603 (2000).
30. Cossart, R. *et al.* Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat. Neurosci.* **4**, 52–62 (2001).
31. Labrakakis, C., Rudolph, U. & De Koninck, Y. The heterogeneity in GABAA receptor-mediated IPSC kinetics reflects heterogeneity of subunit composition among inhibitory and excitatory interneurons in spinal lamina II. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 424 (2014).
32. Beck, H. & Yaari, Y. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 357–369 (2008).
33. Doretto, M. C. *et al.* Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav. Genet.* **33**, 33–42 (2003).
34. Paxinos, G. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* (Academic Press, 1998).

35. Maroso, M. *et al.* Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron* **89**, 1059–1073 (2016).  
36. Williams, S. R. & Mitchell, S. J. Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons. *Nature neuroscience* **11**(7), 790 (2008).

### Acknowledgements

Authors thank José Fernando Aguiar and André Luiz Andreotti Dagostin for excellent technical assistance. Funding from FAPESP: grant # 2015/22327-7 (A.O.S.C.); grant # 2007/50261-4 (N.G.C.); grant # 2016/01607-4 (R.M.L.); grant # 2015/50122-0 and DFG-IRTG 1740/2 (A.C.R. and R.F.O.P.). R.F.O.P. and A.C.R. are also part of the Research, Innovation and Dissemination Center for Neuromathematics (FAPESP grant # 2013/07699-0). C.C.C., J.L.D. and R.F.O.P. are Capes, CNPq and Fapesp PhD student fellows, respectively. R.M.L., N.G.C. and A.C.R. hold CNPq Research Fellowships.

### Author Contributions

A.O.S.C., J.L.D., C.C.C. performed experiments. A.O.S.C., J.L.D., C.C.C. and R.F.O.P. analyzed the data. A.O.S.C., J.L.D., C.C.C., N.G.C. and R.M.L. conceived and designed the study. J.A.C.O. and N.G.C. made the genetic selection of WAR strain. A.O.S.C., J.L.D., C.C.C., R.F.O.P., A.C.R., N.G.C. and R.M.L. planned the experiments, wrote, reviewed and contributed to the final manuscript.

### Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

The hippocampal function is affected by different patterns of sound stimulation or sound deprivation. Chronic moderate sound exposure (80 dB, 2 hours/ day for 3–6 weeks) impairs spatial memory in mice and increases oxidative damage and tau phosphorylation in the hippocampus<sup>19,20</sup>. Acute traumatic noise (106 dB, 30 minutes) alters place cell activity in the hippocampus<sup>21</sup>. On the other hand, daily exposure to music (60 dB, 6 hours per day for 21 days) enhanced learning performance and increased BDNF expression in the hippocampus,<sup>22</sup> a neurotrophin implicated in LTP generation and memory formation<sup>23</sup>. Sound deprivation by reversible conductive hearing loss reversibly impairs learning and memory in old rats and decreases the levels of cholinergic markers in the hippocampus<sup>24</sup>. Additionally, noise-induced hearing loss induces deficits in spatial memory and hippocampal neurogenesis in mice<sup>25</sup>. Even pre-natal exposition to loud noises can have deleterious effects on the hippocampal offspring<sup>26,27</sup>. These evidences show that the acoustic environment can impact the function of the hippocampal network affecting the animal's behavior.

High intensity sounds can be considered stressors, and exposure to single periods of high intense noise (105 dB–30 minutes) activates corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus, and stimulate the secretion of plasmatic corticosterone<sup>28–30</sup>. These effects were intensity-dependent and were abolished by lesions of the medial geniculate body, the auditory thalamic nucleus<sup>28,30</sup>. Corticosteroids are known to strongly affect hippocampal LTP, which is depressed by high levels of this hormone<sup>31,32</sup>. So, it is plausible that at least some of the effects of high intensity sound seen on the hippocampus are mediated by the secretion of corticosterone in response to sound stress.

Recently we reported that long-term exposure to short episodes of high intensity sound stimulation (120 dB, one minute twice a day for 10 days) inhibits the LTP in the Schaffer-CA1 pathway in the hippocampus of rats, but did not affect spatial learning and memory in the Morris Water Maze (MWM)<sup>33</sup>. These results showed that short episodes of traumatic sound for a long period affects the generation of long-term synaptic plasticity in the hippocampus, but curiously did not affect spatial learning. In the present work we studied the effects of a single episode of high-intensity sound stimulation on the hippocampal Schaffer-CA1 LTP and its dependency on the secretion of corticosterone. We found that a single episode of high-intensity sound stimulation is able to decrease LTP in a 24-hour time window, without affecting spatial learning and memory in the MWM. Additionally, we did not find correlation with the effect of high-intensity sound and corticosterone secretion, strongly suggesting that high-intensity sound itself, but not stress, is affecting LTP.

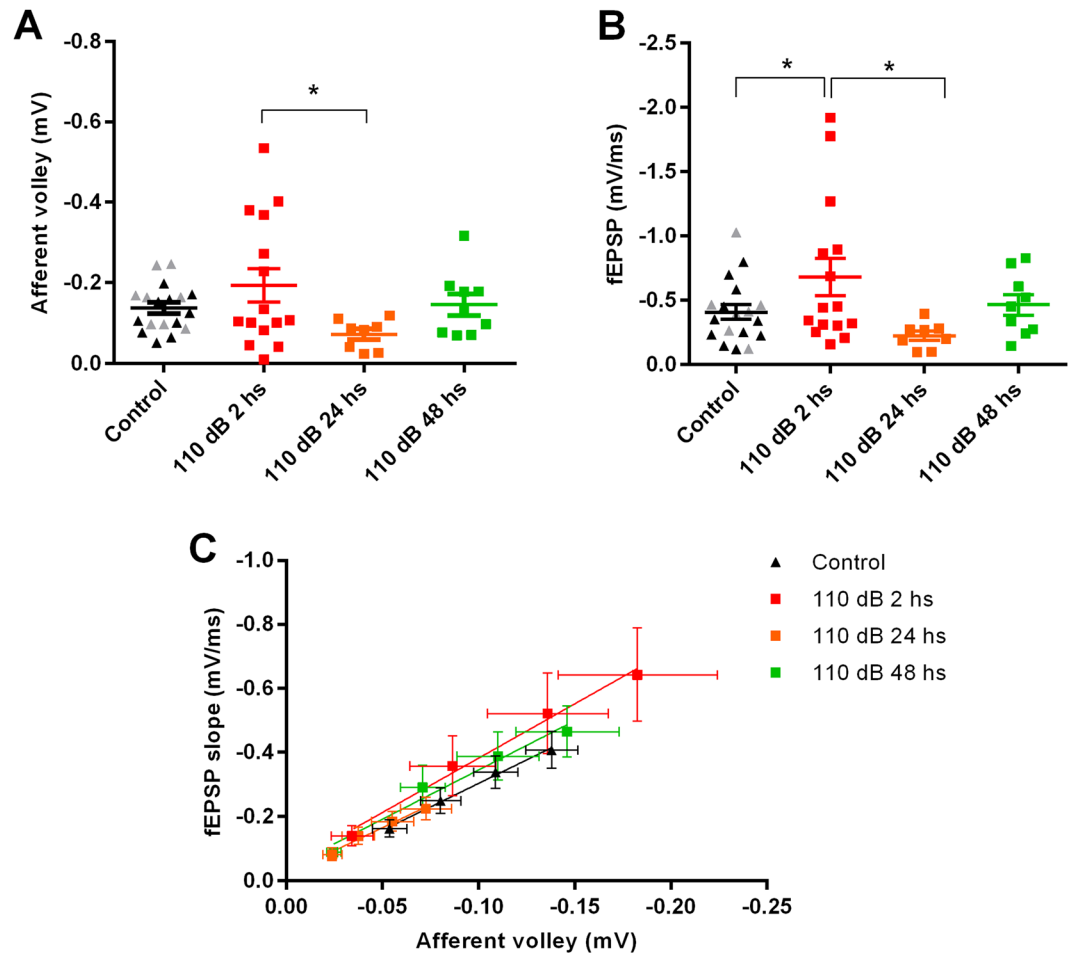
## Results

**A single sound stimulus of 110 dB is sufficient to inhibit LTP and PTP in the Schaffer-CA1 pathway.** Our previous observation was that long-term exposure (10 days) to short (1 minute) episodes of high intensity sound (120 dB, 1 minute, twice a day) inhibits LTP in the Schaffer-CA1 synapse after 1 week of the end of the protocol<sup>33</sup>. Our goal in this work is to investigate if a single episode of high intensity noise exposure is able to alter LTP.

We compared neurotransmission and LTP in the hippocampus of rats exposed to 110 dB noise 2, 24 and 48 hours after the acoustic stimulation. Stimulation of the Schaffer-CA1 produce fEPSPs with similar maximum slopes ( $P = 0.5813$ ) and afferent volleys ( $P = 0.6309$ ) in naïve and sham animals ( $P > 0.05$ , unpaired t-test), so we pooled the data together. Comparing all groups, we found that both the afferent volleys and the fEPSP slopes were significantly different (compared at the maximum stimulation;  $p < 0.05$ , one-way ANOVA). The fEPSP slope from the 2 hour animals was significantly bigger than the fEPSP slope from the control and 24 hours group ( $F(3, 46) = 3.086$ ;  $P = 0.0363$ ) and the afferent volley ( $F(3, 46) = 4.52$ ;  $P = 0.0242$ ; Fischer's LSD; Fig. 1A,B). We constructed an input-output curve plotting the fEPSP slopes versus the afferent volleys (Fig. 1C) in response to crescent stimulation intensities and found no differences among the slopes of the relationships ( $F = 0.609$ ,  $P = 0.6272$ ).

We then tested if LTP was affected by high intensity sound exposure. In these experiments, 100 Hz stimulation of the Schaffer-collateral fibers induced a strong post-tetanic potentiation similar in both sham and naïve animals (naïve:  $2.0 \pm 0.13$ ; sham:  $2.56 \pm 0.46$ ;  $n = 11$  and  $9$ , respectively.  $P = 0.224$ , unpaired t-test) followed by a long-term potentiation (that lasted at least 80 minutes after the protocol) which was not different between the naïve and sham groups (control:  $1.34 \pm 0.09$ ; Sham:  $1.29 \pm 0.7$ ;  $n = 11$  and  $9$ , respectively.  $P = 0.68$ , unpaired t-test). These data were then pooled together as a control group. On the other hand, both PTP and LTP from animals submitted to 110 dB of sound stimulation were strongly inhibited, comparing to control, after 2 hours of the stimulus (Fig. 2; PTP:  $1.28 \pm 0.11$ ,  $F(3, 43) = 5.47$ ,  $P = 0.0027$ ; one-way ANOVA.  $P < 0.001$ , Fischer LSD test; LTP:  $1.09 \pm 0.04$ ,  $F(3, 43) = 3.572$ ,  $P = 0.0215$ ; one-way ANOVA;  $P < 0.05$  Fischer LSD test). In slices obtained from animals after 24 hours the sound stimulation PTP returned to values similar to control (Fig. 2;  $2.2 \pm 0.13$ ;  $n = 8$ ;  $P > 0.05$  Fischer's LSD test) but LTP was still significantly smaller than control ( $1.09 \pm 0.08$ ;  $n = 8$ ;  $P < 0.05$ , Fischer's LSD test). However, after 48 hours both PTP and LTP returned to values similar to control levels (PTP:  $2.35 \pm 0.19$ ; LTP:  $1.35 \pm 0.1$ ;  $n = 9$ .  $P > 0.05$ . Fischer's LSD test). We conclude that 1 minute of 110 dB sound stimulation is sufficient to reversibly inhibit LTP and PTP in the Schaffer/CA1 pathway.

**A single episode of 110 dB sound stimulation does not affect paired-pulse facilitation.** LTP and PTP were reduced by a single episode of 1 minute of 110 dB sound stimulation. We found that fEPSP slope was also bigger 2 hours after sound stimulation, along with the afferent volley. Although LTP in the Schaffer-CA1 is mainly post-synaptic<sup>34</sup>, PTP is a pre-synaptic form of short-term plasticity that lasts several seconds and is dependent on a rise in the residual calcium which can increase release probability, vesicle pool size and quantal size<sup>35–40</sup>. On the other hand, paired-pulse facilitation (PPF) lasts milliseconds and is dependent on residual calcium accumulation in the terminal generating an increase in release probability<sup>40</sup>. Alterations in pre-synaptic parameters, like release probability or vesicle pool size, would affect the ratio of the second to the first EPSP in the PPF. In order to know if the changes in PTP were caused by changes in the basic pre-synaptic parameters, or



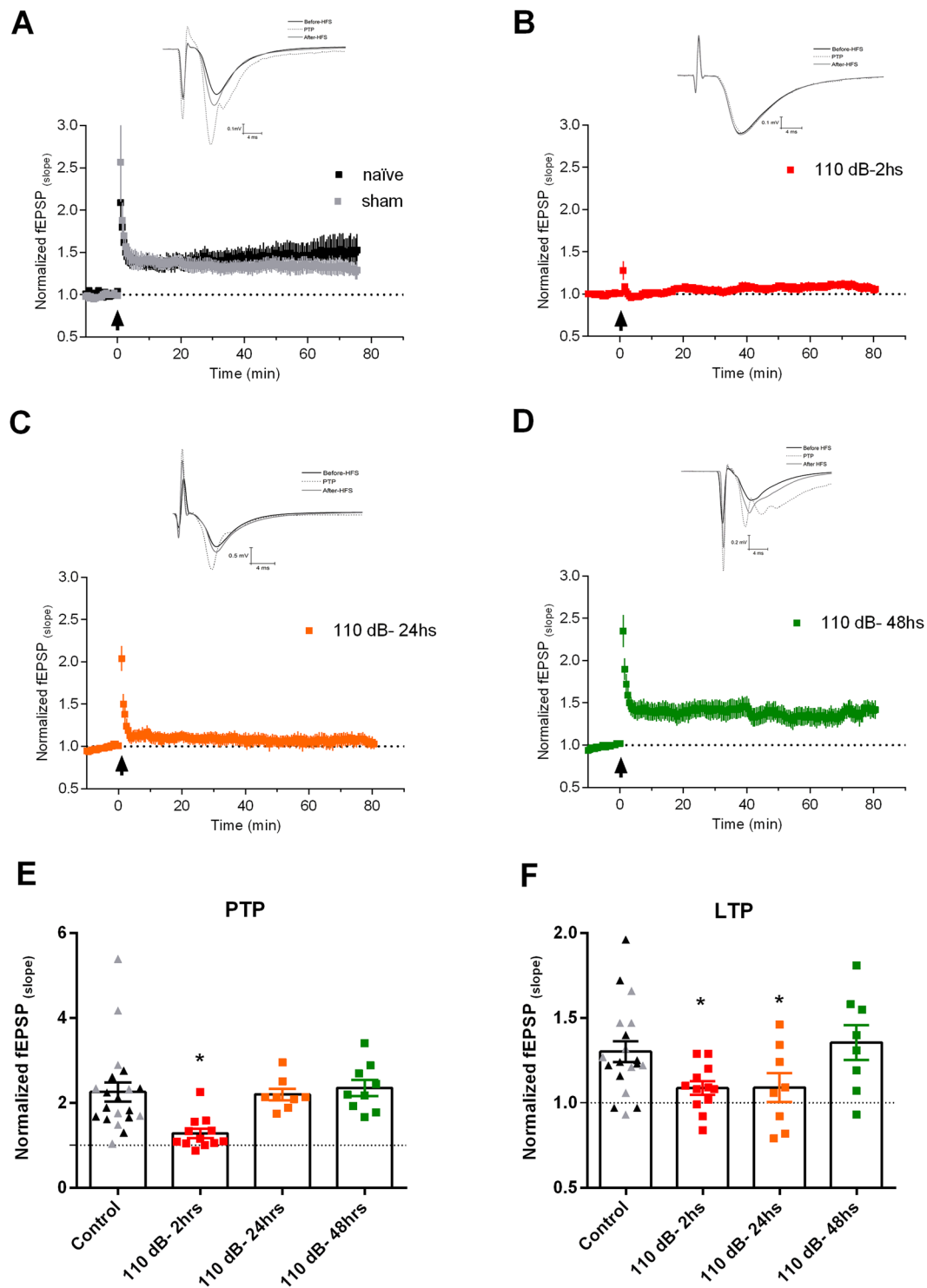
**Figure 1.** Effects of high-intensity sound stimulation on the neurotransmission on the Schaffer-CA1 synapses. (A) Maximum afferent volley amplitudes from control animals, and animals sacrificed 2, 24 and 48 hours after 110 dB sound stimulation. (B) fEPSPs slopes from control animals, and animals sacrificed 2, 24 and 48 hours after 110 dB sound stimulation. In the control groups, the dark symbols represent naïve animals, and the grey symbols, sham animals. (C) Correlation of fEPSP slope with afferent volley amplitude. Lines represent the fitting of linear functions. \* $p < 0.05$ .

by specific mechanisms of PTP, we measured PPF evoked by 2 stimuli delivered at short intervals (50, 150, 250, 350, 450 and 550 ms).

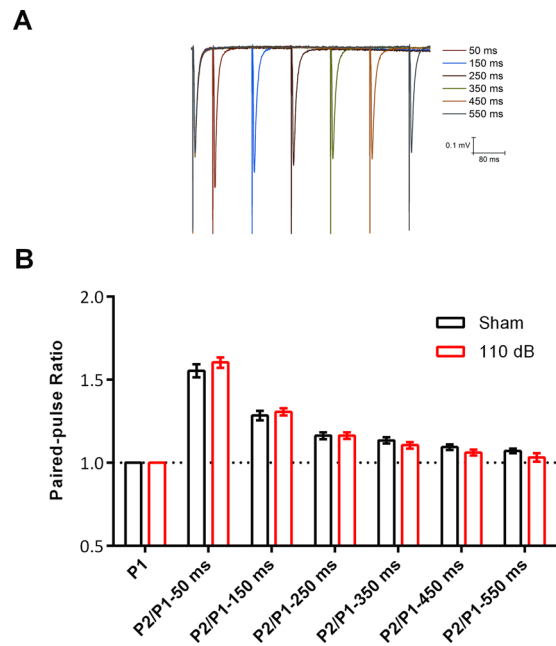
We found no changes in PPF in all inter-stimulus intervals of the Schaffer-CA1 synapses in slices from animals subjected to one minute 110 dB stimulation (Fig. 3: 50 ms: sham:  $1.554 \pm 0.03$ ; 150 ms:  $1.284 \pm 0.02$ ; 250 ms:  $1.163 \pm 0.02$ ; 350 ms:  $1.134 \pm 0.01$ ; 450 ms:  $1.094 \pm 0.01$ ; 550 ms:  $1.071 \pm 0.01$ . 110 dB stimulation: 50 ms:  $1.604 \pm 0.03$ ; 150 ms:  $1.307 \pm 0.02$ ; 250 ms:  $1.163 \pm 0.01$ ; 350 ms:  $1.10 \pm 0.01$ ; 450 ms:  $1.061 \pm 0.01$ ; 550 ms:  $1.032 \pm 0.02$ ;  $p > 0.05$  for all intervals, multiple t- tests corrected for multiple comparison with the Holm-Šidák test). The decay of the PPF was assessed fitting a single decay exponential function to the data, and the time constants were not considered different ( $K = 0.008 \pm 0.001$ , sham and  $0.007 \pm 0.001$ , 110 db, resulting in taus of 124 and 143 ms respectively.  $P > 0.05$ ). Therefore, we conclude that the basic pre-synaptic mechanisms of vesicle exocytosis are not affected by our high intensity sound stimulation protocol, and that the changes in PTP probably reflects specific changes in the mechanisms of PTP.

**A sound stimulus of 80 dB does not inhibit LTP.** We then tested if the LTP inhibition was related to the sound intensity. We subjected the animals to a sound stimulation with a non-traumatic moderated sound level of 80 dB, and sacrificed the animals 2 hours later. We found no difference in the maximum fEPSP slope and afferent volley from control animals (afferent volley. Control:  $-0.14 \pm 0.013$  mV; 80 dB:  $-0.16 \pm 0.08$  mV;  $P = 0.513$ , unpaired t-test; fEPSP. Control:  $-0.41 \pm 0.06$  mV/ms; 80 dB:  $-0.62 \pm 0.09$  mV/ms;  $P = 0.07$ , unpaired t-test). After the 100 Hz stimulus, both LTP and PTP developed normally in the slices from these animals, with no different from the control group (PTP 80 dB:  $2.38 \pm 0.2$ ;  $P = 0.74$ ; LTP 80 dB:  $1.39 \pm 0.09$ ;  $P = 0.54$ ,  $n = 7$ ; Fig. 4). We conclude that the effects of sound stimulation on hippocampal LTP depends on sound intensity.

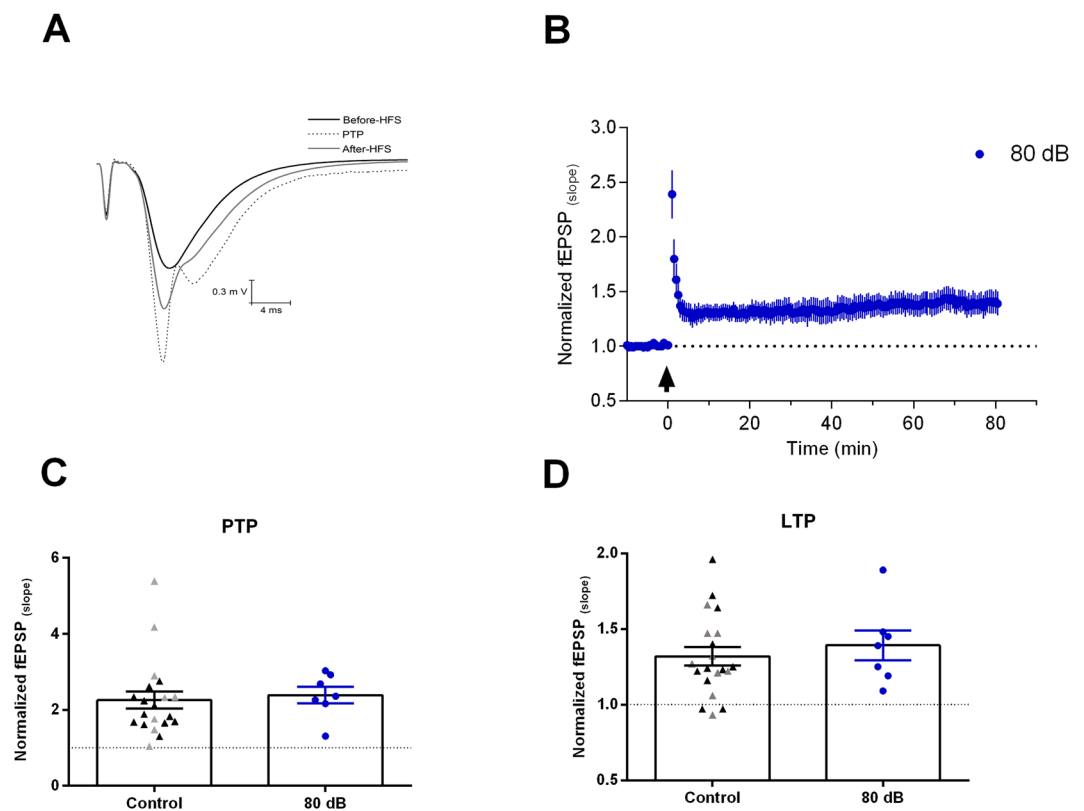
**High-intensity sound stimulation inhibits the LTP in the perforant pathway-dentate gyrus synapses.** Was the effect of high intensity sound specific for the Schaffer-CA1 synapse? In order to answer



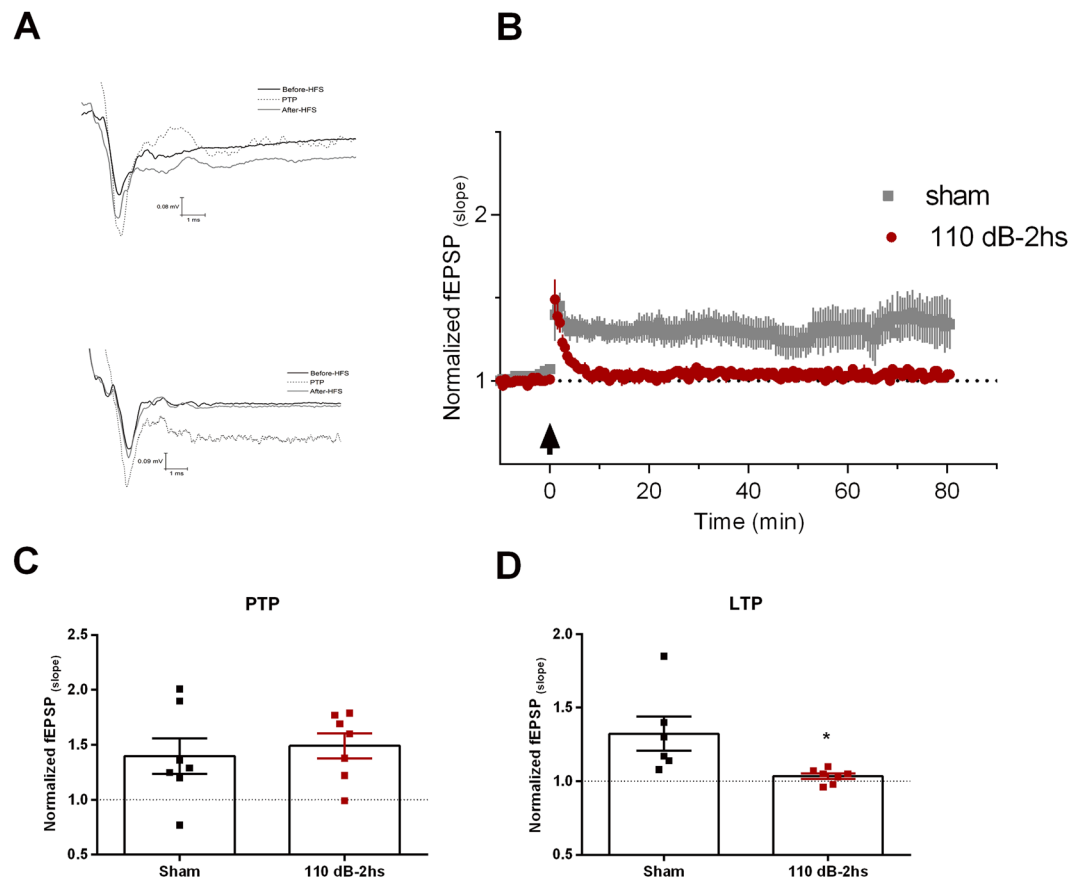
**Figure 2.** LTP inhibition by high-intensity sound stimulation. (A) Normalized fEPSP slopes before and after HFS (arrow) from the Schaffer-CA1 synapse of naïve and sham animals. Representative examples are shown in the inset. (B) Normalized fEPSP slopes before and after HFS (arrow) from the Schaffer-CA1 synapse of animals sacrificed 2 hours after 110 dB sound exposure. Representative examples are shown in the inset. (C) Normalized fEPSP slopes before and after HFS (arrow) from the Schaffer-CA1 synapse of animals sacrificed 24 hours after 110 dB sound exposure. Representative examples are shown in the inset. (D) Normalized fEPSP slopes before and after HFS (arrow) from the Schaffer-CA1 synapse of animals sacrificed 48 hours after 110 dB sound exposure. Representative examples are shown in the inset. (E) Summary of the PTP. (F) Summary of the LTP. \* $p < 0.05$ .



**Figure 3.** Effect of 110 dB sound exposure on short-term plasticity. **(A)** Pairs of fEPSPs delivered 50, 150, 250, 350, 450, and 550 ms apart. **(B)** Paired Pulse Ratios (PPR) of the fEPSPs delivered at the different intervals.  $N = 7$ , each group. Data represent mean  $\pm$  SEM.



**Figure 4.** Sound stimulus of 80 dB does not inhibit LTP. **(A)** Representative examples of fEPSPs before and after HFS (PTP and LTP) from an animal exposed to 80 dB sound stimulation. **(B)** Normalized fEPSP slopes before and after HFS (arrow), in the Schaffer-CA1 synapse of animals sacrificed 2 hours after 80 dB sound exposure. **(C)** Summary of PTP. **(D)** Summary of LTP. Controls as in Fig. 2. Data represent mean  $\pm$  SEM.

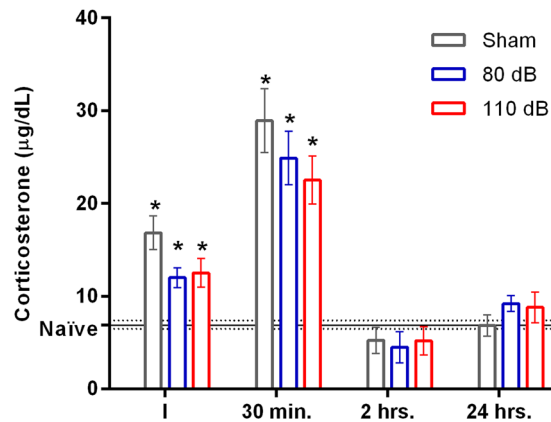


**Figure 5.** High intensity sound inhibits LTP in the PF-DG pathway. (A) Representative examples of fEPSPs before and after HFS (PTP and LTP) from an animal exposed to sham stimulation and an animal exposed to 110 dB sound stimulation. (B) Normalized fEPSP slopes before and after HFS (arrow), in the PF-DG synapses of animals sacrificed 2 hours after 110 dB sound exposure. (C) Summary of PTP. (D) Summary of LTP. \* $p < 0.05$ .

this question, we recorded LTP from the first synapse in the hippocampal tri-synaptic circuit, the perforant fiber-dentate gyrus (PF-DG) synapses. Stimulation of the medial PF generated fEPSPs in the external molecular layer DG, which were similar in both sham and stimulated group (fEPSP slope: Sham,  $-0.31 \pm 0.05$  mV/ms. Stimulated,  $-0.32 \pm 0.03$  mV/ms.  $P > 0.05$ , unpaired t-test;  $n = 7$  for both groups). We also did not find differences in the afferent volleys of both groups (Sham,  $-0.05 \pm 0.010$  mV. Stimulated,  $-0.05 \pm 0.007$  mV.  $P > 0.05$ , t-test;  $n = 7$  for both groups). Similarly, to what was observed in the Schaffer-CA1 synapse, we found a significant smaller LTP in the slices from animals subjected to 110 dB sound stimulation (Sham:  $1.3 \pm 0.11$ ; Stimulated:  $1.03 \pm 0.01$ ;  $P = 0.022$ ; unpaired t-test;  $n = 6$  and  $7$ , respectively), but no effect on the PTP (Sham:  $1.39 \pm 0.16$ , Stimulated:  $1.49 \pm 0.11$ ;  $P = 0.64$ ; unpaired t-test.  $n = 7$  for both groups) (Fig. 5). These findings show that high intensity sound stimulation effects are not restricted to the Schaffer-CA1 pathway.

**High intensity sound stimulation does not increase the plasmatic corticosterone levels.** Because increased plasmatic corticosterone induced by stress affects the hippocampal LTP<sup>31,32</sup> and high intensity noise increases plasmatic corticosterone<sup>28,30</sup>, we decided to investigate if the effects of high-intensity sound stimulation could be correlated to the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA), by measuring the secretion of corticosterone after sound stimulation. We compared the plasmatic corticosterone in animals subjected to sham, 110 and 80 dB sound stimulation, and compared to control animals ( $6.9 \pm 0.55$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), in different periods after stimulation. Surprisingly, we found that plasmatic corticosterone increased in all 3 groups immediately (sham:  $16.8 \pm 1.8$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; 110 dB:  $12.5$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; 80 dB:  $12.0 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,  $F(3, 16) = 9.38$ ,  $P = 0.0008$ , One-way ANOVA) and 30 minutes after stimulation (sham:  $28.9 \pm 0.5$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; 110 dB:  $22.5 \pm 2.6$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; 80 dB:  $24.9 \pm 2.9$   $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,  $F(3, 16) = 3.71$ ,  $P = 0.0001$ , One-way-ANOVA) and but returned to normal (control) levels 2 and 24 hours after stimulation (Fig. 6). Because the plasmatic levels of corticosterone were similar in all groups  $F(2, 12) = 1.35$ ,  $P = 0.29$ , (Two-way ANOVA), but the effect on LTP was restricted on the animals subjected to high intensity sound stimulation, we concluded that its effect on LTP is related to the intensity of the sound and not to an increase of plasmatic corticosterone. In this analysis, the interaction of sound stimulus versus time was not statistically significant.

**High-intensity sound stimulation does not affect spatial memory and learning.** Hippocampal LTP has been demonstrated to be relevant for spatial learning and memory<sup>41,42</sup>, and the MWM is a test that



**Figure 6.** Plasmatic corticosterone. Plasmatic corticosterone levels in naïve, sham, 80 dB and 100 dB animal groups, sacrificed immediately (~30 seconds; I), 30 minutes, 2 and 24 hours after sham or sound stimulation. The horizontal lines are the mean (solid line)  $\pm$  SEM (dashed lines) of the corticosterone levels of the naïve group. \* $p < 0.05$  compared with the naïve group.

evaluates spatial learning and memory which has been widely used to evaluate the effects of hippocampal synaptic plasticity<sup>43</sup>. Therefore, we tested the performance in the MWM of animals subjected to 110 dB of noise and compared with animals from the naïve, sham stimulated and noise stimulated with 80 dB noise groups.

As expected, latencies to find the hidden platform decreased with trials  $F(23, 23) = 14.19$ ;  $P < 0.001$ ; 2-way ANOVA, but all groups had learned to find the platform with similar escape latencies, with no difference between the experimental groups and the control group with  $F(3, 23) = 1.1$ ;  $P = 0.54$ , two-way ANOVA. We did not observe differences in the stimulus versus trial interaction ( $p > 0.05$ ). Similarly, the distance travelled to find the target quadrant did not differ among groups,  $F(3, 23) = 1.27$ ;  $P = 0.30$  (Fig. 7B). However when we performed a transfer-test without the platform after the last trial, we found that all groups spent more time in target quadrant  $F(3, 69) = 12.90$ ;  $P < 0.001$ , but the 110 dB and 80 dB groups spent significantly more time in the target quadrant than the control and sham groups  $F(3, 23) = 44.24$ ;  $P < 0.001$  (Fischer's LSD test  $t$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 7C). When we analyzed the time spent in the target quadrant in blocks of 45 seconds we found that all groups had similar patterns of occupation of the target quadrant. Animals spent more time in the target in the first 45–90 seconds, and then spent significantly more time in the other quadrants;  $F(3, 72) = 18.03$   $P < 0.05$ , for quadrant occupation and  $F(3, 24) = 1.311$ ;  $P = 0.29$  for group of animals (Fischer's LSD test, not shown), so there is no detectable increase in perseverance in the sound exposed group.

When we performed re-tests 24 hours and 7 days after the last trial to identify any memory retention deficit, we found significant differences in the probe trials, with the animals taking more time to find the target quadrant, 1 and 7 days later  $F(2, 69) = 12.08$ ;  $P < 0.0001$ ; two-way ANOVA, but interestingly, the animals subjected to 80 or 110 dB sound presented significantly shorter latencies to find the target quadrant  $F(3, 69) = 4.95$ ;  $P = 0.0036$ ; two-way ANOVA ( $p < 0.05$ , Fischer's LSD as post-test; Fig. 7D). No differences were observed in the stimulus versus quadrants interaction ( $p > 0.05$ ). We conclude that the inhibition of hippocampal LTP by acute 110 dB sound exposure, did not affect spatial learning and memory in rats, similarly to what we found in response to long term sound stimulation<sup>33</sup>. Curiously, sound presentation seemed to improve memory retention.

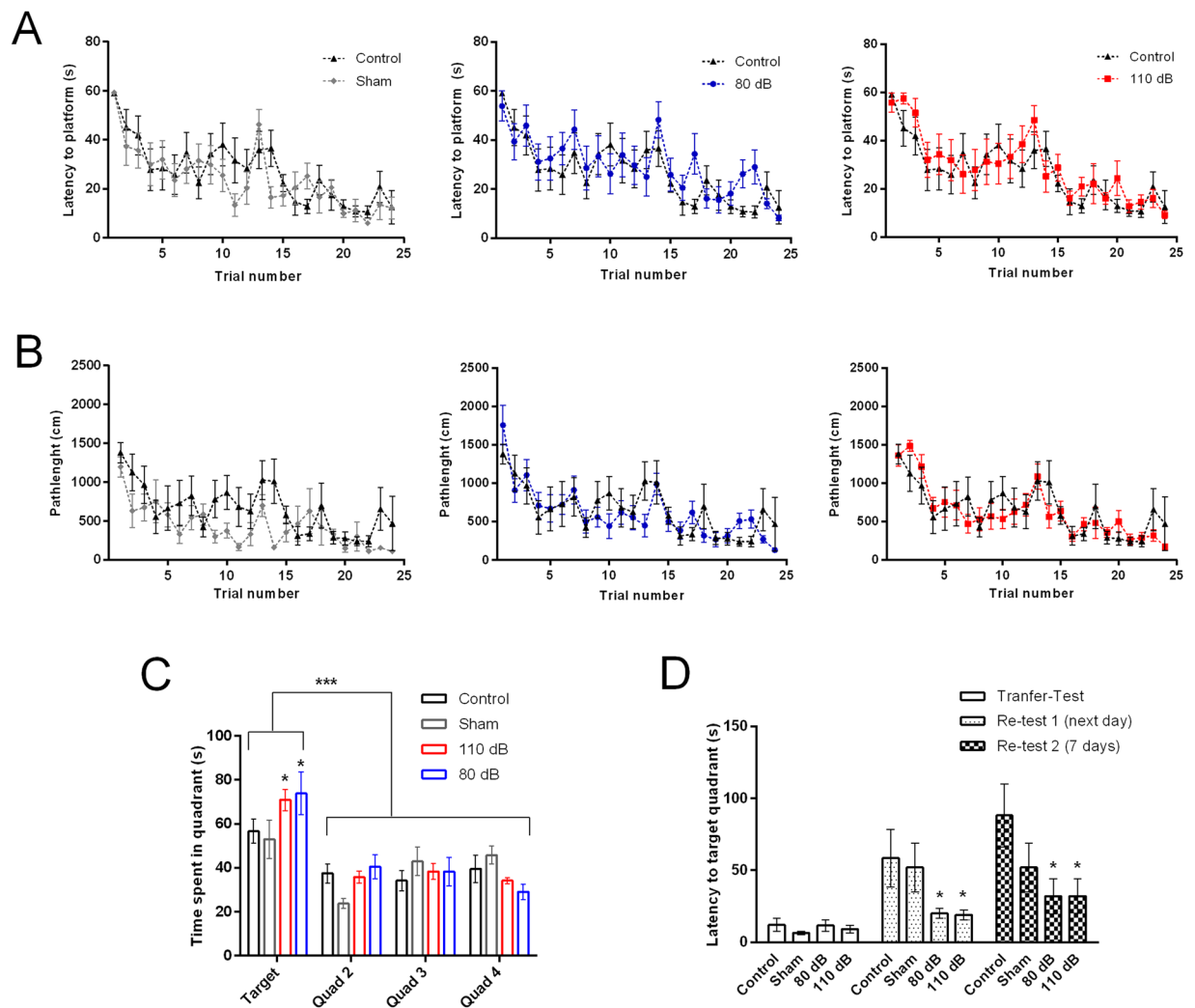
**High-intensity sound stimulation does not affect cued fear conditioning.** In order to know if the inhibited LTP after high intensity sound was able to affect other types of hippocampal-dependent memory we tested the rats for the cued fear conditioning protocol, a type of associative memory which has a hippocampal component<sup>44</sup>. During the cued fear conditioning protocol, all groups (naïve, sham and 110 dB) showed similar freezing levels during conditioning (Time:  $F(3, 39) = 1.07$ ,  $P = 0.39$ ; Treatment  $F(2, 13) = 3.67$ ,  $P = 0.054$ ), extinction training (Time:  $F(6, 78) = 40.5$ ,  $P < 0.001$ ; Treatment:  $F(2, 13) = 0.44$ ,  $P = 0.65$ ; = 1.97,  $P = 0.04$ ) and in the test of extinction. (Time:  $F(2, 26) = 30.44$ ,  $P < 0.001$ ; Treatment:  $F(2, 13) = 0.35$ ,  $P < 0.70$ ) (Fig. 8). During all three phases, all groups showed significant differences in freezing behavior within each session, but no overall difference was observed between groups.

## Discussion

In this work we investigated the LTP-stress-memory triad in rats subjected to high-intensity noise stimulation. We showed that a single episode of high intensity sound (110 dB) is able to inhibit LTP in the Schaffer-CA1 synapse in the hippocampus, from 2 to 24 hours after sound exposure. This effect depends on sound level, is not correlated with corticosterone secretion, could be observed in other hippocampal glutamatergic synapse, the perforant pathway-dentate gyrus, and does not affect spatial learning and memory assessed in the MWM and cued fear conditioning.

Although it has been demonstrated that exposition to loud noises can alter hippocampal function<sup>21,45</sup>, its effect on hippocampal synaptic plasticity was reported only for long-term (7–10 days) sound exposure<sup>27,33</sup>. Interestingly, Barzegar and colleagues<sup>27</sup> had shown that pre-natal exposure to sound (1 to 4 hours to 95 dB broadband noise for 7 days) compromised hippocampal LTP and performance on the MWM, but they found a concomitant increase



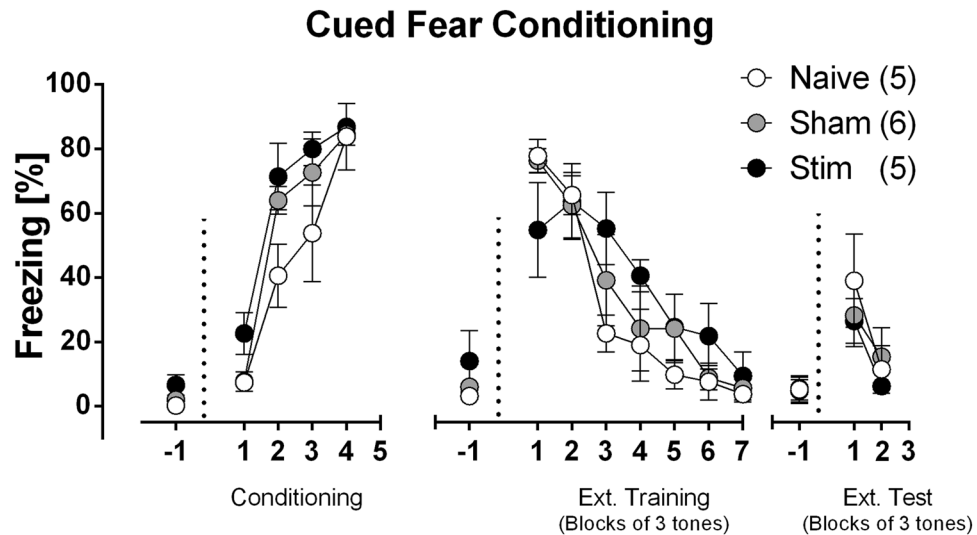


**Figure 7.** Spatial learning and memory in the MWM. **(A)** Latency to find the platform of animals from the Sham, 80 dB and 110 dB groups in comparison with naive animals. **(B)** Mean pathlengths of animals during training trials. **(C)** Time spent in each quadrant during the probe trial without platform. **(D)** Mean escape latencies to platform during probe trial and re-tests. During probe trial, with removed platform, escape latencies refer to the first time the tracer identified the animal in the location where the platform was previously placed. \* $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.005$ .  $n = 5-8$  per group.

in plasma corticosterone levels both in the mother and offspring. On the other hand, the LTP inhibition observed by us was not correlated with corticosterone secretion. We also found that LTP was inhibited even 10 days after the end of the long-term sound exposure protocol<sup>33</sup> while the LTP inhibition by the acute exposure to sound reverted in 48 hours after the single protocol of sound exposure. Altogether these data show that both long-term and single high-intensity sound exposure can alter hippocampal function and synaptic plasticity, although differences exist in the chronic and acute effects.

We also found that, different from the observed with the long-term protocol, the fEPSP slope and afferent volleys were altered after sound stimulation. We found significantly bigger fEPSP slopes and afferent volleys in the 110 dB/2-hour group when compared to the other groups. On the other hand, the input-output relationship when normalized by the afferent volley was not different in all groups. These data suggest that the excitability of the afferent axons can be increased by loud sound exposure, resulting in more recruited afferent fibers generating larger fEPSPs. The glutamatergic release probability is not affected because the relationship afferent volley and fEPSP is similar in control and 110 dB and because there was no difference in the paired-pulse ratio after loud sound exposure. Additionally, because the relationship afferent-volley and fEPSP was similar in all groups, we do not believe that the LTP inhibition is caused by a saturation of the LTP by already potentiated synapses after sound exposure.

We also found a significant inhibition of PTP 2 hours after sound stimulation which reverted to control values 24 hours after sound stimulation. In the long-term protocol we observed a decrease in the PTP, which lasted 10 days after the end of the protocol. PTP is a short-term plasticity process which is attributed to increase in pre-synaptic residual calcium after the tetanic train, causing an increase in the neurotransmitter release



**Figure 8.** Cued fear conditioning test. Effects of 110 dB acoustic stimulation on cued fear conditioning. On Conditioning phase, the sound cue was paired with 4-shock exposure. During Extinction phase (Ext. Training; 24 h after Conditioning), 21 tones were presented and are graphically expressed in blocks of 3-tones. After additional 24 h, test for extinction learning (Ext. Test) was performed. Ten tones were presented and are graphically expressed in blocks of 3-tones. Basal freezing was scores for 2 minutes, before tone presentation. Data is expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses performed: Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

probability ( $P_r$ ), quantal size ( $q$ ) and in the readily releasable pool (RRP) of vesicles<sup>35–39</sup>. Because we did not see differences in the PPR, the fast calcium buffering system of these synapses are probably not affected by the sound stimulation, but the high-capacity buffering system, which is relevant for PTP could be altered. Additionally, the effects on PTP could be linked to the processes triggered by calcium influx, or on a reduced size of the vesicle pool, which might not be detected by the PPR protocol. Because LTP was inhibited 24 hours after sound stimulation, but PTP was back to control values, we believe that the mechanisms producing the inhibition of LTP and PTP are probably distinct.

In our previous work<sup>33</sup> we hypothesized that the inhibition of LTP by the long term high-intensity noise exposure could be a response to a potentiated neurotransmission and/or LTP in the first synapses in the tri-synaptic hippocampal circuit. To test this hypothesis in the acute paradigm we studied the LTP in the perforant pathway-dentate gyrus synapse. We found similar maximum fEPSPs slopes and afferent volley amplitudes in the sham and 110 dB groups, and like in the Schaffer-CA1 synapse, an inhibition of the LTP in the animals subjected to 110 dB sound. We conclude that the inhibition of the LTP in the Schaffer-CA1 is not a response to an increased neurotransmission or enhanced LTP at upstream synapses. Additionally, we can conclude that the effect of high intensity sound stimulation on LTP is not restricted to the Schaffer-CA1 synapse.

It is well known that loud sounds are stressors and promote the activation of the HPA axis and release of corticosterone<sup>25,29</sup>, which is a suppressor of hippocampal LTP<sup>31,32</sup>. Thus, we tested the hypothesis that the sound-induced inhibition of LTP was related to corticosterone secretion during the exposure to the high-intensity sound protocol. In fact, we found an increase in corticosterone secretion immediately and at 30 minutes after high intensity sound exposure. However, we found similar increases in plasma corticosterone in both sham and 80 dB groups, which did not present an inhibition of LTP. Therefore, we concluded that the effect of the high-intensity sound on the LTP is related to the intensity of the sound and not a consequence of corticosterone secretion in response to acoustic stress. But, nevertheless we cannot rule out a complex participation of corticosterone in conjunction with other factor dependent on the sound intensity. We will investigate this in more detail further.

Because of the postulated relationship of LTP and spatial learning we tested the ability of the animals subjected to high intensity sound to perform in the MWM, a test traditionally used to evaluate the effects of hippocampal synaptic plasticity<sup>41–43</sup>. We previously found<sup>33</sup> that rats subjected with the chronic high-intensity sound protocol performed normally in the MWM, despite having an inhibited LTP. We hypothesized that in the long-term exposure, the brain adapted to the deficit in LTP resulting in normal spatial memory and learning. However, we found that even with a diminished LTP after a single episode of high intensity sound stimulation, the rats performed similarly in the MWM than the rats in the control, sham and 80 dB groups. In the retests we found similar times to find the platform across all groups. We concluded that even with an impaired LTP, animals subjected to a single episode of high-intensity sound stimulation presented normal spatial learning and memory assessed by the performance in the MWM. A dissociation of spatial memory and learning, assessed using the MWM, and hippocampal LTP was also seen in animals with specific hippocampal genetic deletions of NMDA receptors subunits<sup>46,47</sup> which presented reduced or absent LTP in the Schaffer-CA1 synapse, but presented normal performance in the MWM. However, it is likely as previously observed in hippocampal NMDA receptor-knock-out mice that other learning processes not tested are impaired by the decreased LTP<sup>46,47</sup>, or that the decrease in LTP we observe is not

sufficient to impact spatial learning. Differently to our results, Liu and colleagues<sup>25</sup> found that animals subjected to noise trauma performed worse in the MWM, 3 months after sound exposure. But their results might be more related to the subsequent hearing loss than the sound exposure itself. Similarly, Manikandan and colleagues<sup>48</sup> also found deficits in spatial memory measured with radial maze after a chronic exposure (30 days, 4 hours per day) of high-intensity noise (100 dB), which were correlated with an increased plasma corticosterone. However, the hearing status of these animals was not assessed. These data are in contrast with our present and previous results<sup>33</sup> which showed no visible deficits in spatial learning and memory.

Interestingly in the immediate re-test without the platform the rats exposed to noise (80 and 110 dB) spent more time in the target quadrant than sham and control animals, and presented shorter latencies to find the target quadrant in the later re-tests, suggesting an improvement of memory retention by sound stimulation, independent of the intensity.

Finally, we tested the effect of high intensity noise on cued fear conditioning. Due to the auditory stimulus characteristics, we decided to use tone as the CS, in order to observe if any alteration would be detected in this task after the stimulus. Similarly, to the MWM, we found that high-intensity stimulus does not alter aversive learning and memory, which are encoded by LTP in the hippocampus and other regions<sup>49,50</sup>. In cued fear conditioning, LTP processes are associated with amygdaloidal nuclei and projections from and to other regions including the hippocampal CA1 region<sup>44,51,52</sup>. Additionally, CS presentation alone is necessary and sufficient to trigger extinction of conditioned fear, which depends on hippocampus activity and NMDA receptor dependent LTP<sup>53,54</sup>. Our results showed that the impaired hippocampal LTP induced by high-intensity sound stimulation, is not sufficient to impact fear conditioning learning and extinction.

Because high intensity sound inhibited LTP *in vitro* but did not affect hippocampal dependent learning and memory, it is possible that *in vivo*, the hippocampal synapses are able to produce LTP or it can be compensated by LTP by other forebrain synapses<sup>46</sup>. It is interesting to note that the response to HFS was very variable, and although the average LTP in the slices from animals submitted to high intensity sound was very small, we could find slices which the neurotransmission was potentiated, while in other we found even depression after HFS, suggesting that not all synapses are equally affected by high-intensity sound. Another hypothesis for the inhibition of the LTP is a change in rules of LTP, an effect called metaplasticity<sup>55</sup>.

These changes in hippocampal synaptic plasticity induced by high-intensity sound might be important for homeostatic control of hippocampal excitability, while allowing normal function of the hippocampus. Interestingly, we found that in rats genetically susceptible to audiogenic seizures<sup>56</sup>, our long-term sound exposure protocol, which in these animals lead to limbic epileptic seizures, did not inhibit LTP<sup>33</sup> suggesting that this effect could be important for the prevention of hippocampal seizures. Further experiments will be done to understand the mechanisms of the inhibitory effect of high intensity sound on hippocampal LTP.

In conclusion we showed that a single episode of high intensity sounds has a fast effect on the hippocampus, inhibiting LTP for 24 hours, an effect not correlated with the activation of the HPA axis by stress. However, this effect was unable to affect spatial navigation learning and memory assessed in the MWM, as well cued fear conditioning. Nevertheless, our results show that even a brief exposure to a high-intensity sound can have a profound impact on hippocampal synaptic plasticity, and very likely on animal's hippocampal function.

## Methods

All experimental protocols involving animals were designed according to rules for animal research from the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA#006/2015) and approved by the Commission for Ethics in Animal Experimentation (CETEA) at the University of São Paulo in Ribeirão Preto.

**Animals.** Male Wistar rats (60–70 days old) were kept in Plexiglas cages (four animals per cage), with food and water ad libitum and 12-h dark/light cycle (lights on at 7:00 a.m.) and controlled temperature (22 °C) at the Animal Housing Facility of the Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. The rats were divided in four groups: naïve rats (taken directly from their cages), sham (rats manipulated equally as the rats submitted to the acoustic stimulus protocol, but with no sound stimulation), rats submitted to acoustic stimulus of 110 dB (high-intensity sound stimulation) and rats submitted to acoustic stimulus of 80 dB.

**Sound stimulation.** Rats were placed in an acrylic, acoustically isolated arena (height: 32 cm, diameter: 30 cm), located inside a sound proof chamber (45 × 45 × 40 cm), with 2 loudspeakers placed on the top of the arena, where, after one minute of acclimation, they were submitted to a 110 dB or an 80-dB noise stimulus (a digitally modified recording of a doorbell, spanning frequencies from 3 to 15 kHz<sup>57</sup>, with one minute duration. After stimulation the animals were kept in the cage for one more minute, and returned to their home cages. Sham animals were placed in the arena for 3 minutes. Ambient noise inside the acoustic chamber was around 55 dB. The sound intensity at the arena interior was checked and calibrated regularly with a decibelimeter. Some animals presented symptoms of mesencephalic seizures during the sound stimulation<sup>33</sup> and were not used in this study.

**Preparation of Hippocampal slices.** After 2, 24 and 48 hours of acoustic stimulation, animals were anesthetized with isoflurane and decapitated. Brains were rapidly removed and placed in an ice-cold solution containing (mM): 87 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 Sucrose, 25 Glucose, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The brain was glued with cyanoacrylate glue to a support, placed inside the cutting chamber of a vibratome and cut in 400 μm transversal slices containing the dorsal hippocampus in the same solution. Sections of the hippocampus were dissected out from the slices using ophthalmic scissors and micro-tweezers and placed in artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) solution containing (mM): 125 NaCl, 2.8 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>. Slices were left to rest for at least two hours before

use (one hour at 34–35 °C and at least one hour in room temperature) and continuously bubbled with carbogenic mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>).

**Field potential recordings and LTP induction.** Electrophysiological recordings were performed at controlled temperature of 32–34 °C using an inline heater (Warner Instruments, USA) with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, USA) connected to a Digidata 1440 A AC/DC interface (Molecular Devices, USA). Slices were placed in a recording chamber with continuous superfusion of aCSF (1 mL/min) bubbled with carbogenic mixture, and kept in place with a nylon thread in a platinum frame. A stainless steel bipolar concentric microelectrode (FHC - Bowdoin, Maine, USA), connected to a Master-9 voltage stimulator (A.M.P.I., Israel), was placed on the Schaffer-collaterals fibers or perforant pathway. Field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) were recorded at CA1 *stratum radiatum* and external molecular layer of dentate gyrus with borosilicate glass microelectrodes (G85150T, Warner Instruments, USA) filled with aCSF, with tip resistances of 1–2 MΩ and connected to the amplifier probe through a silver wire covered with AgCl. For recording of fEPSPs in the dentate gyrus, picrotoxin (100 μM) was added to the aCSF.

First, we performed input-output curves, where voltage was gradually increased by 10 V increments, until population spikes were observed in the fEPSP. In order to obtain a baseline response, we stimulated the Schaffer fibers and perforant pathway (set at 50% of the maximum response) at 0.03 Hz for 25 minutes. We considered for analysis fEPSPs with big amplitudes in relation to the afferent volley amplitudes. After a stable baseline, LTP was induced on the Schaffer-collaterals fibers with 3 trains of high frequency stimulation (HFS) at 100 Hz of 1 second duration (3 seconds of inter-train interval) and on the perforant pathway with 3 trains of HFS at 100 Hz of 1 second duration (20 seconds of inter-train interval). HFS trains of 100 Hz induced a short post-tetanic potentiation (PTP) followed by LTP of the fEPSPs that lasted at least 80 minutes.

Signals were acquired at 100 kHz and low pass filtered at 3 kHz (Bessel, 8-pole). All data were acquired with pClamp 10.2 software (Molecular Devices, USA).

**Hormone extraction and radioimmunoassay.** Plasmatic hormonal extractions and radioimmunoassay of corticosterone was performed from 25 μL of plasma extracted with 1 mL of ethanol as described previously<sup>58,59</sup>. Animals were killed by decapitation and blood collected at 4 distinct times: immediately (less than one minute), 30 minutes, 2 and 24 hours after sham or sound stimulation (110 dB or 80 dB). A control group (naïve) was used as a baseline for comparison. All blood samples were collected between 10–12 am.

**Spatial navigation memory test (Morris Water Maze).** The Morris Water Maze (MWM) consisted of a circular pool painted in black (1.40 m diameter × 50 cm, depth) filled with water at 23 °C, with a black platform (9 cm – diameter) placed in one of the virtual four quadrants. Visual clues were placed on the walls surrounding the pool. Two hours after sound stimulation, we started the training sessions of MWM test. The platform was always placed in the same quadrant (target quadrant), and the starting quadrant was chosen randomly by the software. Rats were placed at the border of starting quadrant (excluded the target quadrant). We used the same sequence of quadrants for all animals. They could explore the pool for 90 seconds or until they found the platform. Between trials, the animals could rest at the platform for 30 seconds and placed on another quadrant for the next trial. The platform remained at the same position during the entire training trials. The rats were subjected for 12 daily trials for 2 days. At the end of the second day of training trials the platform was removed from the pool for performing the probe trial (25<sup>th</sup> trial- transfer-test). In this case, with removed platform, escape latencies were estimated as the first time the program identified the animal in the location where the platform was previously placed. After 24 hours (P2) and one week (P3) of the last trial, the rats were released in the pool in the quadrant opposite to the target quadrant (with the platform present) in order to evaluate the memorization. The rat was allowed to explore the pool for 180 s.

Trials were recorded using a video camera (SA-3 Tracker, USA) placed on top of the pool and animals were tracked with the Ethovision tracking system (Noldus Information Technology, The Netherlands) which calculated the latencies to the hidden platform and distances travelled.

**Cued fear conditioning.** For cued fear condition we used two different boxes: context A (23 × 20 × 21 cm; white walls, except for a transparent plexiglass; one grid floor containing 23 stainless steel rods, 2 mm in diameter, spaced 1.0 cm apart, and wired to generate footshocks) and context B (23 × 20 × 21 cm, black and white striped walls, except for a transparent plexiglass one, and white floor) (Insight, Ribeirão Preto, Brazil).

Two hours after sound stimulation, the animals were placed in context A for 2 minutes before they received foot-shocks (4 shocks, 0.85 mA, 1 s; unconditioned stimulus; US) paired with an auditory cue (30 s, 1 kHz, 70 dB; conditioned stimulus; CS). Twenty-four hours later, during the Extinction training, animals were placed in context B, placed in a different room, while 21 tones were presented without foot-shock. On the following day, 10 tones were presented to test extinction learning, in context B. Freezing behavior was evaluated during all three phases, being characterized by total lack of movements except for those necessary to breathing<sup>60</sup>.

**Data analysis and statistics.** Data were analysed with Clampfit 10.2. For analysis, the recordings were low-pass filtered offline (500 Hz) and the slopes of the fEPSPs were fitted with a linear function. Data from each experiment were normalized relative to its baseline. LTP was quantified as the average of the fEPSP slopes in the last 35 minutes of the 80 minutes post-induction recording period. Input-output curves for fEPSPs and afferent volleys were fitted with a linear function and their slopes compared. Comparison across groups was done using unpaired t-tests, multiple t-tests corrected for multiple comparisons with the Holm-Šidák test or one-way ANOVA with a LSD Fischer's post-test.

Data from Morris Water Maze and cued fear conditioning were analysed using two way-ANOVAs with repeated and non-repeated measures with LSD Fischer's or Bonferroni post-test. Data are shown as mean  $\pm$  SEM and for analysis we used GraphPad Prism 5.0 and Origin Lab software. Significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

## References

- Zocoli, A. M., Morata, T. C., Marques, J. M. & Corteletti, L. J. Brazilian young adults and noise: attitudes, habits, and audiological characteristics. *Int. J. Audiol.* **48**, 692–9 (2009).
- Coelho, C. B., Sanchez, T. G. & Tyler, R. S. Hyperacusis, sound annoyance, and loudness hypersensitivity in children. *Prog Brain Res.* **166**, 169–78 (2007a).
- Shargorodsky, J., Curhan, G. C. & Farwell, W. R. Prevalence and characteristics of tinnitus among US adults. *Am J Med.* **123**, 711–8 (2010).
- Bhatt, J. M., Lin, H. W. & Bhattacharyya, N. Prevalence, Severity, Exposures, and Treatment Patterns of Tinnitus in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* **21** (2016).
- Ising, H. & Kruppa, B. Health effects caused by noise: Evidence in the literature from the past 25 years. *Noise Health.* **6**, 5–13 (2004).
- Basner, M. *et al.* Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet.* **383**, 1325–32 (2014).
- Skogstad, M. *et al.* Systematic review of the cardiovascular effects of occupational noise. *Occup Med (Lond).* **66**, 10–6 (2016).
- Stansfeld, S. A. *et al.* RANCH study team. Aircraft and road traffic noise and children's cognition and health: a cross-national study. *Lancet.* **365**, 1942–9 (2005).
- Lercher, P., Evans, G. W. & Meis, M. Ambient noise and cognitive processes among primary schoolchildren. *Environment and Behavior.* **35**, 725–735 (2003).
- Helfer, T. M. *et al.* Noise-induced hearing injury and comorbidities among post deployment US Army soldiers: April 2003–June 2009. *Am J Audiol.* **20**, 33–41 (2011).
- Rubovitch, V. *et al.* A mouse model of blast-induced mild traumatic brain injury. *Exp Neurol.* **232**, 280–9 (2011).
- Beamer, M. *et al.* Primary blast injury causes cognitive impairments and hippocampal circuit alterations. *Exp Neurol.* **283**, 16–28 (2016).
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A. & Kandel, E. R. Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**, a005751 (2012).
- Volianskis, A. *et al.* Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* **5–16**, 2015 (1621).
- Kraus, K. S. & Canlon, B. Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear Res.* **288**, 34–46 (2012).
- Squire, L. R., Schmolck, H. & Stark, S. M. Impaired auditory recognition memory in amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Learn Mem.* **8**, 252–6 (2001).
- Tamura, R., Ono, T., Fukuda, M. & Nakamura, K. Recognition of egocentric and allocentric visual and auditory space by neurons in the hippocampus of monkeys. *Neurosci. Lett.* **109**, 293–298 (1990).
- Aronov, D., Nevers, R. & Tank, D. W. Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal-entorhinal circuit. *Nature.* **543**, 719–722 (2017).
- Cheng, L., Wang, S. H., Chen, Q. C. & Liao, X. M. Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiol Behav.* **104**, 981–8 (2011).
- Cheng, L., Wang, S. H., Huang, Y. & Liao, X. M. The hippocampus may be more susceptible to environmental noise than the auditory cortex. *Hear Res.* **333**, 93–7 (2016).
- Goble, T. J., Møller, A. R. & Thompson, L. T. Acute high-intensity sound exposure alters responses of place cells in hippocampus. *Hear Res.* **253**, 52–9 (2009).
- Angelucci, F. *et al.* Investigating the neurobiology of music: brain-derived neurotrophic factor modulation in the hippocampus of young adult mice. *Behav Pharmacol.* **18**, 491–6 (2007).
- Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem.* **89**, 312–323 (2008).
- Drago, F. *et al.* Behavioral and neurochemical alterations induced by reversible conductive hearing loss in aged male rats. *Neurosci Lett.* **205**, 1–4 (1996).
- Liu, L. *et al.* Noise induced hearing loss impairs spatial learning/memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Sci Rep.* **6**, 20374 (2016).
- Kim, H. *et al.* Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev.* **28**, 109–14 (2006).
- Barzegar, M., Sajjadi, F. S., Talaie, S. A., Hamidi, G. & Salami, M. Prenatal exposure to noise stress: anxiety, impaired spatial memory, and deteriorated hippocampal plasticity in postnatal life. *Hippocampus.* **25**, 187–96 (2015).
- Campeau, S., Akil, H. & Watson, S. J. Lesions of the medial geniculate nuclei specifically block corticosterone release and induction of c-fos mRNA in the forebrain associated with audiogenic stress in rats. *J Neurosci.* **17**, 5979–92 (1997).
- Helfferich, F. & Palkovits, M. Acute audiogenic stress-induced activation of CRH neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and catecholaminergic neurons in the medulla oblongata. *Brain Res.* **975**, 1–9 (2003).
- Burrow, A., Day, H. & Campeau, S. A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation. *Brain Research.* **1062**, 63–73 (2005).
- Shors, T. J., Levine, S. & Thompson, R. F. Effect of adrenalectomy and demedullation on the stress-induced impairment of long-term potentiation. *Neuroendocrinology.* **51**, 70–5 (1990).
- Maggio, N. & Segal, M. Striking variations in corticosteroid modulation of long-term potentiation along the septotemporal axis of the hippocampus. *J Neurosci.* **27**, 5757–65 (2007).
- Cunha, A. O. S., Oliveira, J. A. C., Garcia-Cairasco, N. & Leão, R. M. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high intensity sound stimulation. *Neuroscience.* **310**, 114–127 (2015).
- Lüscher, C. & Malenka, R. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspectives Biology* **4**, a005710 (2012).
- Habets, R. L. & Borst, J. G. Post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse. *J Physiol* **564**, 173–187 (2005).
- Habets, R. L. & Borst, J. G. Dynamics of the readily releasable pool during post-tetanic potentiation in the rat calyx of Held synapse. *J Physiol.* **581**, 467–78 (2007).
- Korogod, N., Lou, X. & Schneggenburger, R. Posttetanic potentiation critically depends on an enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity of vesicle fusion mediated by presynaptic PKC. *Proc Natl Acad Sci* **104**, 15923–15928 (2007).
- Lee, J. S., Kim, M. H., Ho, W. K. & Lee, S. H. Presynaptic release probability and readily releasable pool size are regulated by two independent mechanisms during posttetanic potentiation at the calyx of Held synapse. *J Neurosci.* **28**, 7945–53 (2008).
- Xue, L. & Wu, L. G. Post-tetanic potentiation is caused by two signalling mechanisms affecting quantal size and quantal content. *J Physiol.* **588**, 4987–4994 (2010).
- Regehr, W. Short-Term Presynaptic Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, a005702 (2012).
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T. & Tonegawa, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* **87**, 1327–38 (1996).
- Tang, Y. P. *et al.* Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature.* **401**, 63–9 (1999).

43. Vorhees, C. V. & Williams, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* **1**, 848–858 (2006).
44. Maren, S. & Fanselow, M. S. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation *in vivo*. *J Neurosci.* **15**, 7548–7564 (1995).
45. Kraus, K. S. *et al.* Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience.* **167**, 1216–26 (2010).
46. von Engelhardt, J. *et al.* Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron.* **60**, 846–60 (2008).
47. Bannerman, D. M. *et al.* Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nat Neurosci.* **15**, 1153–9 (2012).
48. Manikandan, S. *et al.* Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration. *Neurosci Lett.* **399**, 17–22 (2006).
49. Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* **313**, 1093–1097 (2006).
50. Gruart, A., Muñoz, M. D. & Delgado-García, J. M. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci.* **26**, 1077–1087 (2006).
51. Maren, S., Phan, K. L. & Liberzon, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci.* **14**, 417–428 (2013).
52. Izquierdo, I., Furini, C. R. & Myskiw, J. C. Fear Memory. *Physiol Rev.* **96**, 695–750 (2016).
53. Fiorenza, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I. & Myskiw, J. C. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav Brain Res.* **232**, 210–216 (2012).
54. Orsini, C. A. & Maren, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev.* **36**, 1773–1802 (2012).
55. Abraham, W. C. & Bear, M. F. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **19**, 126–130 (1996).
56. Doretto, M. C. *et al.* Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav Genet.* **33**, 33–42 (2003).
57. Romcy-Pereira, R. N. & Garcia-Cairasco, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience.* **119**, 533–46 (2003).
58. Haack, D., Vecsei, P., Lichtwald, K. & Vielhauer, W. Corticosteroid and corticosteroid metabolite levels in animals immunized against corticosteroids. *J Steroid Biochem.* **11**, 971–980 (1979).
59. Coletti, R., Almeida-Pereira, G., Elias, L. L. & Antunes-Rodrigues, J. Effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on water intake and vasopressin and oxytocin secretion induced by fluid deprivation. *Horm Behav.* **67**, 12–20 (2015).
60. Milad, M. R. & Quirk, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu. Rev. Psychol.* **63**, 129–151 (2012).

## Acknowledgements

We thank Mr. J. Fernando Aguiar, Ms. Valci Silva and Mr. Rodrigo Mazzei for the technical support, Dr. Lézio Bueno Jr. for critically reviewing the manuscript and Drs. Norberto Garcia-Cairasco and Eliane Comoli for their commentaries and suggestions. Research supported by a FAPESP grant (2016/01607-4) to RML. J.L.D. is a CNPq PhD Studentship fellow.

## Author Contributions

J.L.D., A.O.S.C., A.L.T. performed experiments. J.L.D., A.O.S.C., A.L.T. analyzed the data. R.M.L., J.L.D. and A.O.S.C. conceived and designed the study. J.L.D., A.O.S.C., A.L.T., L.B.R., L.L.K.E., J.A.R., S.S.A. and R.M.L. planned the experiments, wrote, reviewed and contributed to the final manuscript.

## Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.


**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

# Long-term high-intensity sound stimulation inhibits $I_h$ current ( $I_h$ ) in CA1 pyramidal neurons

Alexandra Olimpio Siqueira Cunha<sup>1</sup> | Cesar Celis Ceballos<sup>1,2</sup> |  
Junia Lara de Deus<sup>1</sup> | Ricardo Maurício Leão<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Physiology, FMRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Physics, FFCLRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

## Correspondence

Ricardo Maurício Leão, Departamento de Fisiologia, FMRP, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.  
Email: leor@fmrp.usp.br

## Present address

Cesar Celis Ceballos, Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

## Funding information

This study was supported by FAPESP grants 2016/01607-4 to RML and 2015/22327-7 to AOSC. RML is a CNPq research fellow.

## Abstract

Afferent neurotransmission to hippocampal pyramidal cells can lead to long-term changes to their intrinsic membrane properties and affect many ion currents. One of the most plastic neuronal currents is the hyperpolarization-activated cationic current ( $I_h$ ), which changes in CA1 pyramidal cells in response to many types of physiological and pathological processes, including auditory stimulation. Recently, we demonstrated that long-term potentiation (LTP) in rat hippocampal Schaffer-CA1 synapses is depressed by high-intensity sound stimulation. Here, we investigated whether a long-term high-intensity sound stimulation could affect intrinsic membrane properties of rat CA1 pyramidal neurons. Our results showed that  $I_h$  is depressed by long-term high-intensity sound exposure (1 min of 110 dB sound, applied two times per day for 10 days). This resulted in a decreased resting membrane potential, increased membrane input resistance and time constant, and decreased action potential threshold. In addition, CA1 pyramidal neurons from sound-exposed animals fired more action potentials than neurons from control animals; however, this effect was not caused by a decreased  $I_h$ . On the other hand, a single episode (1 min) of 110 dB sound stimulation which also inhibits hippocampal LTP did not affect  $I_h$  and firing in pyramidal neurons, suggesting that effects on  $I_h$  are long-term responses to high-intensity sound exposure. Our results show that prolonged exposure to high-intensity sound affects intrinsic membrane properties of hippocampal pyramidal neurons, mainly by decreasing the amplitude of  $I_h$ .

## KEYWORDS

HCN channels, hearing, intrinsic plasticity, membrane potential, rat hippocampus

**Abbreviations:** DMSO, dimethyl sulfoxide; HCN, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel;  $I_h$ , hyperpolarization-activated cationic current; LTP, long-term potentiation; ZD7288, 4-(N-ethyl-N-phenylamino)-1,2-dimethyl-6-(methylamino) pyrimidinium chloride.

Edited by Masanobu Kano. Reviewed by Dominique Debanne, INSERM, France; and Darrin H Brager, University of Texas at Austin, USA

All peer review communications can be found with the online version of the article.

## 1 | INTRODUCTION

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) are widely expressed in several central neurons and produces a cationic current, called  $I_h$ , activated by hyperpolarization, which depolarizes the membrane resting membrane potential (RMP) and decreases membrane input resistance at rest (Wahl-Schott & Biel, 2009). In the soma, the typical activation range of  $I_h$  stabilizes RMP, counteracting the effect of

membrane potential changes by other subthreshold currents (Lupica, Bell, Hoffman, & Watson, 2001; Nolan, Dudman, Dodson, & Santoro, 2007). Because of these characteristics,  $I_h$  is also involved in membrane potential oscillations in several neuronal types (Atkinson et al., 2011; McCormick & Pape, 1990; Xu, Datta, Wu, & Alreja, 2004). In the dendrites,  $I_h$  decreases input resistance and shortens excitatory potentials, decreasing synaptic integration (Huang, Walker, & Shah, 2009; Magee, 1999; Williams & Stuart, 2000). In an interesting manner, regulation of  $I_h$  could homeostatically control neuronal excitability and synaptic integration. For instance, in hippocampal slice cultures, blocking excitation leads to a decrease in  $I_h$ , whereas blocking inhibition causes the opposite effect (Gassel, Inglebert, & Debanne, 2015). In dorsal cochlear nucleus neurons, variations of the expression of  $I_h$  compensate for opposite variations in the inward rectifying potassium current ( $I_{Kir}$ ), maintaining membrane resistance within a specific range (Ceballos, Li, Roque, Tzounopoulos, & Leão, 2016). In addition, dendritic  $I_h$  is up-regulated in hippocampal CA1 pyramidal neurons after long-term potentiation (LTP) induction (Fan et al., 2005) and down-regulated after long-term depression (LTD; Brager & Johnston, 2007). Moreover, cannabinoid receptor activation decreases dendritic integration of synaptic potentials, hippocampal LTP, and memory formation by increasing  $I_h$  in CA1 pyramidal neurons (Maroso et al., 2016).

The hippocampus is a region traditionally implicated in the formation of declarative and spatial memories and presents several forms of synaptic plasticity, including LTP. The most studied form of synaptic plasticity is the associative NMDA receptor-dependent LTP of the Schaffer–CA1 pathway (Volianskis et al., 2015). The hippocampus is connected to auditory areas (Kraus & Canlon, 2012) and is implicated in the formation of long-term auditory memories (Squire, Schmolck, & Stark, 2001), and hippocampal place cells can be activated by auditory cues (Aronov, Nevers, & Tank, 2017). Therefore, the hippocampal function is affected by sound exposure or deprivation (Angelucci et al., 2007; Cheng, Wang, Chen, & Liao, 2011; Cheng, Wang, Huang, & Liao, 2016; Drago et al., 1996; Goble, Møller, & Thompson, 2009; Liu et al., 2016). The hippocampus is also a region implicated in the development of limbic seizures, which can be triggered by repetitive high-intensity sound in susceptible animals (Garcia-Cairasco, Umeoka, & Cortes de Oliveira, 2017). It is interesting that alterations in the currents produced by HCN channels are found in some types of epilepsies (Dyhrfeld-Johnsen, Morgan, & Soltesz, 2009).

As of late, we showed that LTP is inhibited in the hippocampus from rats exposed to 1-min episodes of high-intensity sound (110–120 dB) for 10 days (Cunha, de Oliveira, Almeida, Garcia-Cairasco, & Leão, 2015) or even by a single episode (de Deus et al., 2017). Despite the inhibition of LTP, these animals present normal spatial learning and memory assessed in the

Water Morris Maze (Cunha et al., 2015; de Deus et al., 2017), suggesting the presence of compensatory mechanisms that maintain normal hippocampal function. Because  $I_h$  expression has been shown to be correlated with LTP and LTD (Brager & Johnston, 2007; Fan et al., 2005) and that an increased  $I_h$  is implicated to the deleterious cognitive effects of cannabinoid receptor activation on hippocampal function and LTP (Maroso et al., 2016), we investigated the effect of high-intensity sound exposure on  $I_h$  in rat CA1 neurons.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Animals

All experimental procedures involving animals were carried out according to rules for animal research from the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and approved Commission for Ethics in Animal Experimentation (CEUA) at the University of São Paulo at Ribeirão Preto (protocols 015/2013 and 006/2-2015).

Male Wistar rats (60–80 days) were obtained from the central animal facility of the University of São Paulo-Ribeirão Preto Campus and kept in the local animal facility until the day of use. The animals were kept in Plexiglas cages (2–3 animals per cage), with food and water available ad libitum and 12-hr dark/light cycle (lights on at 7:00 a.m.) and controlled temperature (22°C).

### 2.2 | Sound stimulation protocol

Our protocols were previously described by Cunha et al. (2015) and de Deus et al. (2017). In brief, animals were placed in an acrylic arena (height: 32 cm, diameter: 30 cm) located inside an acoustically isolated chamber (45 × 45 × 40 cm, 55 dB ambient noise) where, after 1 min of acclimation, they were submitted to a 1-min episode of 110-dB sound stimulus (a digitally modified recording of a doorbell, spanning frequencies from 3 to 15 kHz; Romcy-Pereira & Garcia-Cairasco, 2003). The animals were kept in the stimulation chamber for one more minute and returned to their home cages. During the sessions, animal behavior was observed. Any animals that presented seizures (Cunha et al., 2015) were excluded from the study. For the long-term protocol, we repeated this procedure for 10 days, twice a day (8–9 a.m. and 4–5 p.m.). The animals then rested for 10–14 days after the last session (Cunha et al., 2015). The animals of the acute group were killed 2 hr after a single stimulation. The control (naïve) group was placed in the arena, but not subjected to sound stimulation.

### 2.3 | Hippocampal slices

The animals were anesthetized with isoflurane, decapitated, and the brains were rapidly removed and placed in an ice-cold



solution containing (mM): 87 NaCl, 2.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 Sucrose, 25 Glucose, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The brain hemispheres were separated and glued with cyanoacrylate glue to a support, placed inside the cutting chamber of a vibratome (1000 plus, Vibratome, USA) filled with the same solution and cut in 200- $\mu$ m transverse slices containing the dorsal hippocampus. Only sections 3.6- to 4.5-mm anterior–posterior with respect to bregma were used (Paxinos & Watson, 1997). Next, transversal sections of the hippocampus were placed in aCSF solution containing (mM): 120 NaCl, 2.8 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 20 Glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> at 34–35°C for 45 min. Slices were then left at room temperature until use, for no more than 4 hr.

## 2.4 | Whole-cell patch-clamp recordings

CA1 pyramidal neurons were visualized with an Olympus BX51WI upright microscope with a 40 $\times$  water immersion objective and differential interference contrast (DIC) optics. Neurons were chosen based on the morphology (pyramidal shape) and position in the pyramidal layer. We chose neurons located in the middle of the layer to avoid electrophysiological differences between superficial and deep pyramidal cells (Maroso et al., 2016).

The slices were placed in the recording chamber filled with aCSF with the addition of picrotoxin (20  $\mu$ M) and controlled temperature at 34°C with an in line heater (Scientifica). The internal solution consisted of (in mM) 138 K-gluconate, 8 KCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP adjusted to pH 7.3 with KOH and  $\approx$ 290 mOsm/kgH<sub>2</sub>O. Electrodes were fabricated from borosilicate glass (BF150-86-10, Sutter Instruments) with tip resistances of 4–5 M $\Omega$  when filled with internal solution.

## 2.5 | Data acquisition and analysis

Patch-clamp recordings were performed using a Heka EPC10 amplifier using a 50 kHz sampling rate, and low pass filtered at 3 kHz (Bessel). Membrane potential responses to depolarization and hyperpolarization were recorded from resting membrane potential ( $I = 0$ ). Voltage–current ( $V$ – $I$ ) relationships were constructed measuring the voltage changes at the steady state. The membrane depolarization sag was measured as the difference between the peak and the steady-state hyperpolarization produced by a current of  $-200$  pA. Membrane input resistance was calculated as the slope of the  $V$ – $I$  curves in response to hyperpolarizing current steps from  $-50$  to  $-300$  pA and to depolarizing current steps ( $+50$  pA) from  $0$  pA to the maximum current without firing. Membrane time constants were obtained by fitting a single exponential function to the voltage responses to hyperpolarizing current steps of  $-50$  pA from the start of the RC decay of the voltage (after

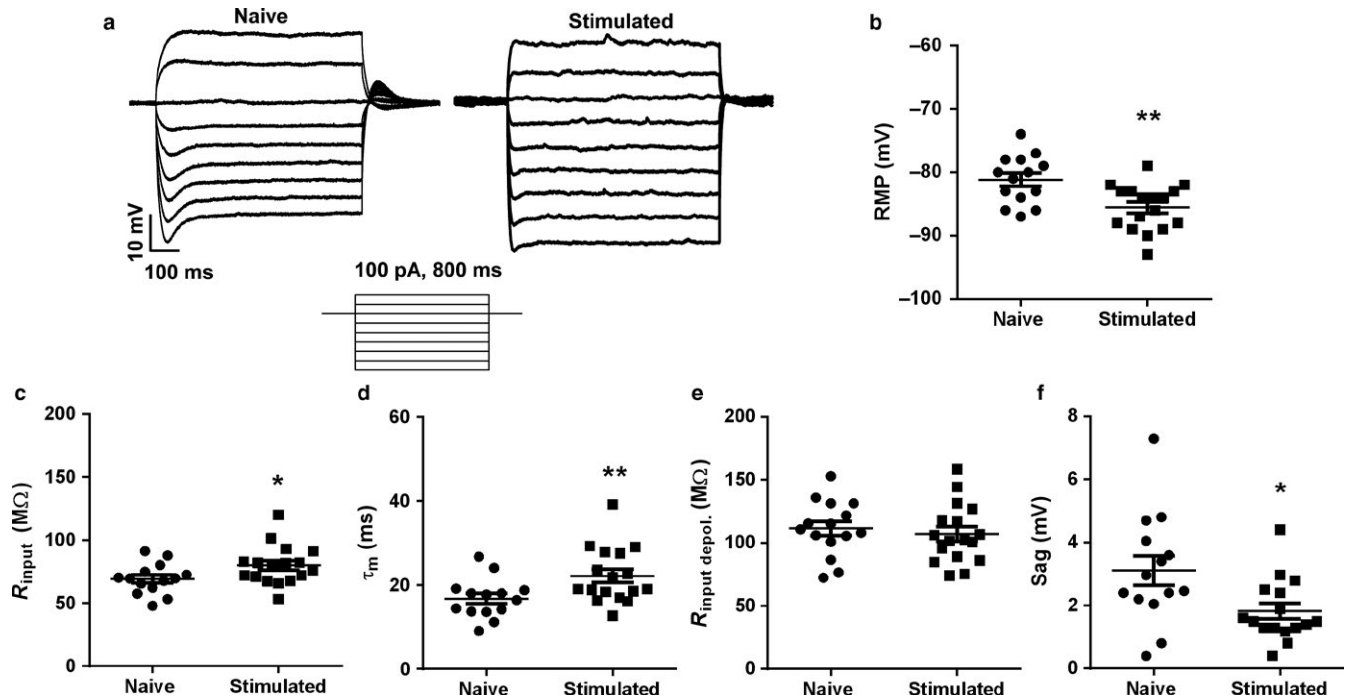
the linear jump due to series resistance) to the peak of the hyperpolarization, before the sag. We analyzed the first action potential elicited at current threshold (rheobase) to measure voltage threshold, rate of rise, half-width, and fast after hyperpolarization. We measured these parameters using phase-plane plots of the action potentials. Threshold was measured as the value of voltage when  $dV/dt = 10$  V/s. The peak was estimated as the maximum voltage when  $dV/dt = 0$  ( $V_{max}$ ), and the amplitude was the difference between the peak and the RMP. The half-width was time interval between depolarization and repolarization at 50% of the amplitude. The maximum rate of rise (ROR) corresponds to maximum  $dV/dt$  value, and the fast after hyperpolarization was the minimum voltage when  $dV/dt = 0$ .

Currents were recorded in voltage clamp from a holding potential of  $-70$  mV with hyperpolarizing voltage steps (from  $-70$  mV to  $-120$  mV, steps of  $-10$  mV) of 2 s of duration (Figure 1a).  $I_h$  was obtained by subtracting the currents before and after application of ZD7288, and measured at the steady state. We used a previously reported value of the reversal potential ( $E_h = -33$  mV; Zemankovics, Káli, Paulsen, Freund, & Hájos, 2010) to obtain the chord conductance. The voltage dependence was calculated using the peak amplitude of the tail currents elicited after a repolarization to  $-70$  mV and fitted with a Boltzmann function. The fast and slow activation and deactivation time constants were measured by fitting a double exponential function to the current activation and tail current deactivation according to the following equation:  $I(t) = A_{fast} e^{-t/\tau_{fast}} + A_{slow} e^{-t/\tau_{slow}}$ , where  $\tau_{fast}$  and  $\tau_{slow}$  are fast and slow time constants and  $A_{fast}$  and  $A_{slow}$  are their respective amplitude. Application of BaCl<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) was used to inhibit the inwardly rectifying potassium current,  $I_{Kir}$ , which was defined as the barium-sensitive current elicited by potentials below  $-70$  mV. The remaining current was considered to be a leak current.

Series resistance was compensated by 60%. Voltages were corrected offline for a measured liquid junction potential of  $-10$  mV. Data were analyzed using custom-written routines in IgorPro and Matlab and expressed as mean  $\pm$  SEM. Paired and unpaired  $t$  tests and two-way ANOVA were used for statistical comparison. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 2.6 | Drugs

The  $I_h$  blocker 4-(N-ethyl-N-phenylamino)-1,2-dimethyl-6-(methylamino) pyrimidinium chloride (ZD7288; 20  $\mu$ M) and the  $I_{Kir}$  blocker barium chloride (BaCl<sub>2</sub> 200  $\mu$ M) were added to aCSF from stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO) and water, respectively. The final concentration of DMSO in the experiments was 0.1%. This concentration of DMSO did not affect the membrane potential and currents. ZD7288, picrotoxin, and BaCl<sub>2</sub> were from Sigma-Aldrich. All salts were of reagent grade.



**FIGURE 1** Subthreshold membrane properties of CA1 pyramidal neurons after chronic sound stimulation compared to controls (naive). (a) Representative traces of subthreshold voltage responses to depolarizing and hyperpolarizing currents (protocol below). Summary (mean  $\pm$  SEM) of the (b) membrane resting potential (RMP), (c) input resistance, (d) membrane time constant, (e) membrane input resistance in response to depolarizations, and (f) depolarization sag. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Long-term high-intensity sound exposure changes intrinsic membrane properties of CA1 pyramidal neurons

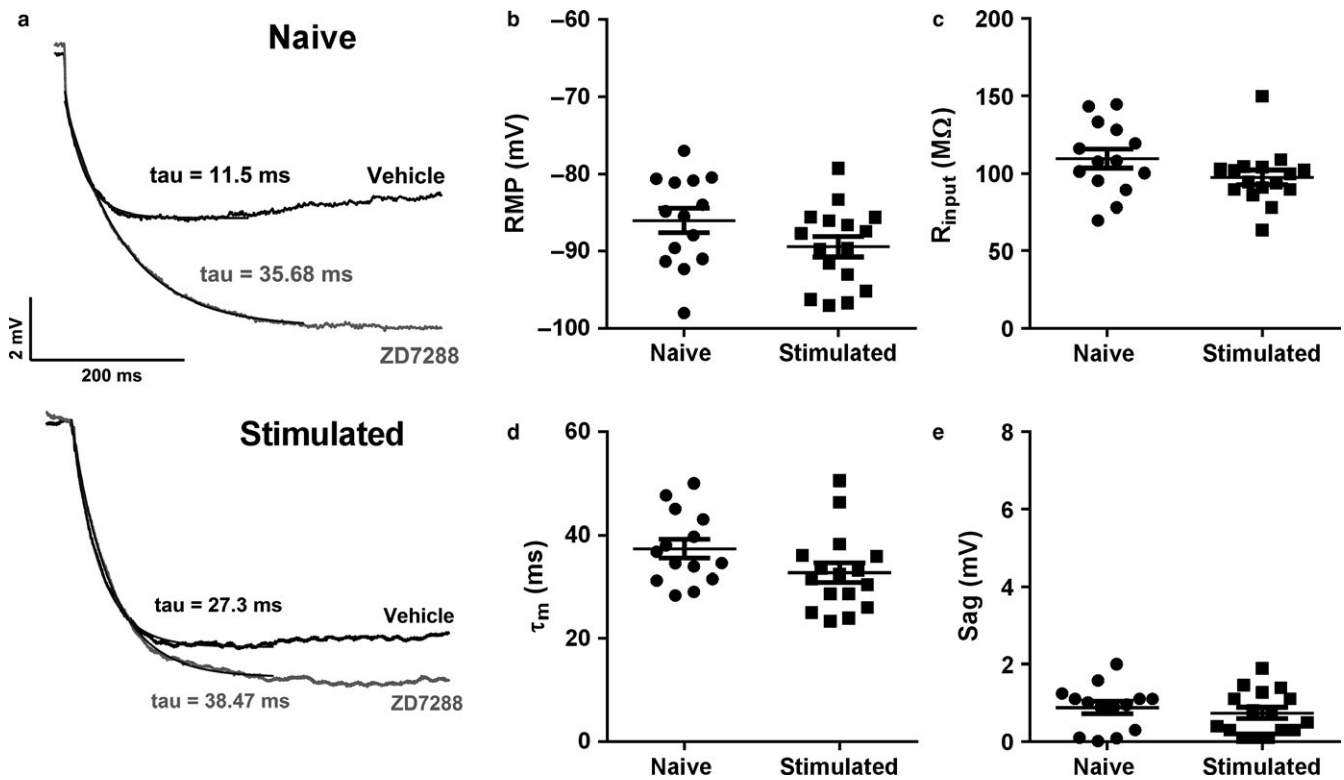
We recorded 15 neurons from eight control (naive) animals and 17 neurons from 10 long-term stimulated animals. Resting membrane potential (RMP) in neurons from stimulated animals was hyperpolarized compared to neurons from control animals (naive:  $-81 \pm 1$  mV; stimulated:  $-85.5 \pm 0.9$  mV,  $p = 0.0028$ , unpaired  $t$  test; Figure 1b), higher input resistance to hyperpolarizing current (naive:  $69.3 \pm 3.2$  M $\Omega$ ; stimulated:  $80 \pm 3.7$  M $\Omega$ ;  $p = 0.044$ , unpaired  $t$  test), and slower membrane time constants ( $16.2 \pm 1.2$  ms for naive,  $22.2 \pm 1.6$  ms for stimulated,  $p = 0.009$ , unpaired  $t$  test; Figure 1d). On the other hand, membrane input resistance to depolarizing currents was not different (naive:  $111.4 \pm 5.69$  M $\Omega$ , stimulated:  $107 \pm 5.68$  M $\Omega$ , unpaired  $t$  test,  $p = 0.588$ ; Figure 1e), suggesting that these differences in input resistance were caused by changes in a conductance activated by hyperpolarization, and not by depolarization-activated subthreshold currents, such as the persistent sodium current (Ceballos, Roque, & Leão, 2017). We also found that the depolarization sag of the membrane potential was smaller in the neurons from the stimulated animals (naive:  $3.0 \pm 0.5$  mV;

stimulated:  $1.8 \pm 0.2$  mV,  $p = 0.016$ , unpaired  $t$  test; Figure 1f).

#### 3.2 | The $I_h$ blocker ZD7288 abolishes the differences in membrane passive properties in CA1 pyramidal neurons from control and sound-exposed animals

The smaller depolarization sag of the membrane of neurons from stimulated animals suggested that these animals express less  $I_h$  which could account for the decreased RMP, increased input resistance in response to hyperpolarization and slower membrane time constant. To test this hypothesis, we blocked  $I_h$  in neurons from control and stimulated animals using the  $I_h$  antagonist ZD7288 (20  $\mu$ M).

Application of ZD7288 largely abolished the differences between groups: RMP (naive:  $-86.02 \pm 1.54$  mV, stimulated:  $-89.4 \pm 1.3$  mV,  $p = 0.1$ ; unpaired  $t$  test; Figure 2a), input resistance to hyperpolarizing current (naive:  $110 \pm 6$  M $\Omega$ , stimulated:  $97.5 \pm 4.5$  M $\Omega$ ,  $p = 0.12$ ; unpaired  $t$  test; Figure 2b), membrane time constant (naive:  $36.4 \pm 1.7$  ms, stimulated:  $32.75 \pm 1.9$  ms,  $p = 0.17$ ; unpaired  $t$  test; Figure 2c), and depolarization sag (naive:  $0.88 \pm 0.15$  mV, stimulated:  $0.74 \pm 0.14$  mV,  $p = 0.507$ ; unpaired  $t$  test; Figure 2d). These results indicate that the observed changes in membrane RMP,  $R_{in}$ , and  $\tau_m$  in the



**FIGURE 2** ZD7288 abolishes differences in membrane properties observed in CA1 neurons from control (naïve) and sound-stimulated animals. (a) Representative traces of the time course of voltage changes in neurons from control and stimulated animals during application of a hyperpolarizing current before and after perfusion of ZD7288. Single exponential functions were fitted to the first 200 ms of the traces. Summary (mean  $\pm$  SEM) of the (b) membrane resting potential (RMP) (c) input resistance (d) membrane time constants and (e) depolarization sag in the presence of ZD7288.  $p > 0.05$  in all cases

neurons from sound-exposed animals are caused by a decrease of  $I_h$ .

### 3.3 | High-intensity sound decreases $I_h$ in CA1 pyramidal neurons

Our data suggested that changes in  $I_h$  are underlying the changes in subthreshold membrane properties of CA1 pyramidal neurons after sound stimulation. Thus, we compared the ZD7288-sensitive current in both group of neurons. In fact, pyramidal neurons from sound-stimulated animals presented smaller  $I_h$  than naïve controls (naïve:  $-271.8 \pm 27$  pA; stimulated:  $-195 \pm 32.5$  pA at  $-120$  mV; naïve:  $-326.7 \pm 31.3$  pA; stimulated:  $-243 \pm 38.6$  pA at  $-130$  mV;  $p = 0.038$  and  $p = 0.02$ , respectively; unpaired  $t$  test; Figure 3b). Tail currents amplitudes were also significantly smaller in neurons from stimulated animals ( $I_{tail}$  after  $-130$  mV hyperpolarization: naïve:  $-69.2 \pm 14$  pA; stimulated:  $-33.8 \pm 7$  pA;  $p < 0.001$ ; unpaired  $t$  test; Figure 3c). Therefore, the conductance estimated for  $I_h$  was smaller in the cells of stimulated animals (naïve:  $3.63 \pm 0.21$  nS; stimulated:  $2.5 \pm 0.39$  nS;  $p = 0.034$ , unpaired  $t$  test; Figure 3d).

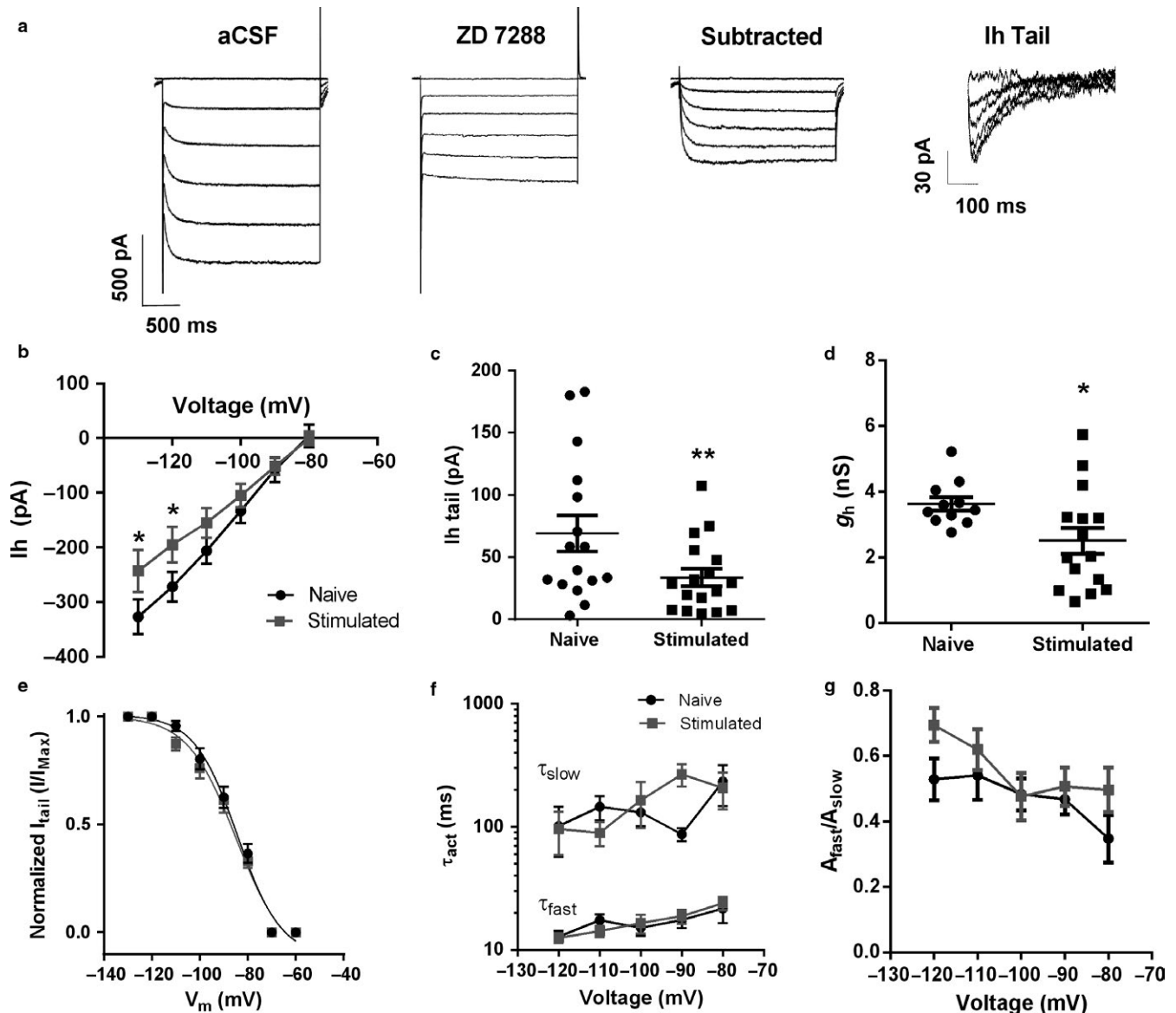
To analyze whether sound stimulation changes  $I_h$  voltage dependency of activation, we calculated the activation curve

of  $I_h$  and fitted with a Boltzmann function. We found that the activation of  $I_h$  were similar, with close  $V_{50}$  values, in control and stimulated animals ( $V_{50}$ : naïve:  $-82.4 \pm 3.7$  mV; stimulated:  $-79.5 \pm 0.79$  mV,  $p = 0.57$ ; unpaired  $t$  test; Figure 3e).

At last, we analyzed the activation constants of  $I_h$  in neurons from controls and stimulated animals at different potentials and did not find any differences in fast ( $F_{1,30} = 1.2$ ;  $p = 0.27$ ) or slow activation constants ( $F_{1,30} = 0.68$ ;  $p = 0.4$ ) between naïve and stimulated groups, or in their proportions (Figure 3f,g; two-way ANOVA; Figure 3f–h). Deactivation of the h current analyzed by fitting a double exponential to the decay time of the tail current (after a  $-120$  mV hyperpolarization) was also similar ( $\tau_{fast}$ : naïve:  $11.9 \pm 1.8$  ms, stimulated:  $15.2 \pm 2$  ms;  $p = 0.22$ ;  $\tau_{slow}$ : naïve:  $102.4 \pm 23$  ms; stimulated:  $194.2 \pm 68$  ms;  $p = 0.17$ , unpaired  $t$  test).

### 3.4 | $K_{ir}$ and leak currents are not changed after sound stimulation

It has been described that  $I_h$  can vary with other subthreshold and synaptic conductances, producing a homeostatic compensation (Ceballos et al., 2016; Gasselín et al., 2015).



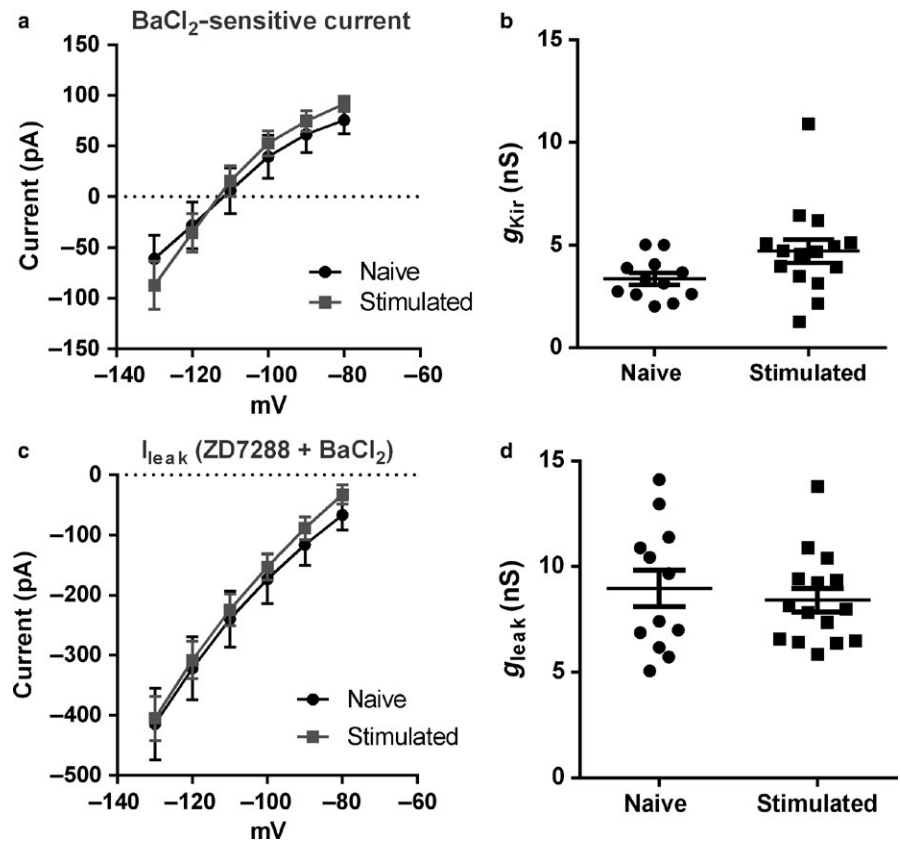
**FIGURE 3**  $I_h$  in CA1 pyramidal neurons of control (naïve) and sound-stimulated animals. (a) left, hyperpolarization-activated currents recorded in voltage clamp mode; middle, currents after bath application of  $20 \mu\text{M}$  ZD7288; right,  $I_h$  was isolated by subtracting current traces before and after addition of ZD7288. Far right, detail of the tail currents (b)  $I$ - $V$  relationship of ZD-sensitive currents ( $I_h$ ) (c). Tail currents recorded at  $-70 \text{ mV}$  after a  $-120 \text{ mV}$  pulse. (d)  $G_h$  conductance. (e) Activation curve of  $I_h$  fitted with a Boltzmann function. (f) Fast and slow activation time constants. (g) Ratio between the amplitudes of the activation constants (Fast/Slow). \*\* $p < 0.01$

To verify whether other subthreshold conductances were altered after sound stimulation, we applied blocked the nonselective blocker of inwardly rectifying potassium ( $K_{\text{ir}}$ ) channels with  $\text{BaCl}_2$  ( $200 \mu\text{M}$ ) after application of ZD7288. Under these conditions, neither  $K_{\text{ir}}$  currents nor the remaining leak currents were different between naïve and stimulated animals at any potential tested ( $F_{1,25} = 0.016$ ;  $p = 0.89$ ; for  $K_{\text{ir}}$ ) and ( $F_{1,25} = 0.19$ ;  $p = 0.66$  for  $K_{\text{leak}}$ ; two-way ANOVA; Figure 4). We also did not observe significant differences in the maximum conductance of  $K_{\text{ir}}$  (naïve:  $3.4 \pm 0.3 \text{ nS}$ ; stimulated:  $4.7 \pm 0.6 \text{ nS}$ ,  $p = 0.06$ ; unpaired  $t$  test) or in the conductance of the leak currents (naïve:  $8.9 \pm 0.9 \text{ nS}$ ; stimulated:  $8.4 \pm 0.5 \text{ nS}$ ,  $p = 0.57$ ; unpaired  $t$  test; Figure 4). We

conclude that long-term high-intensity sound stimulation specifically affects  $I_h$ .

### 3.5 | Neurons from animals subjected to high-intensity sound fired more action potentials

Previous reports showed that a decrease in  $I_h$  increased the excitability of CA1 pyramidal cells (Gasselin et al., 2015). It is interesting that we found that neurons from stimulated animals fired more action potentials in response to depolarizing current injections ( $F_{1,25} = 5.09$ ;  $p < 0.0001$ ; for sound stimulus effect; two-way ANOVA; Figure 5b). Firing  $100 \text{ pA}$  over



**FIGURE 4**  $K_{ir}$  and Leak currents do not change after sound stimulation. (a)  $I_{Kir}$  IVs. (b) Slope conductances of  $I_{Kir}$ . (c) IV relationship of  $I_{leak}$ . (d)  $I_{leak}$  slope conductances.  $p > 0.05$  in all cases

rheobase was statistically significant (unpaired  $t$  test  $p = 0.004$ , Figure 5c). To test whether this increased firing was caused by the decrease in  $I_h$  in stimulated animals, we applied ZD7288 and compared the action potential firing in neurons from both groups of animals (Figure 5d,e). We found that application of ZD7288 did not affect the firing of pyramidal neurons and did not alter the difference in firing from neurons from control and stimulated animals. We therefore conclude that this difference is not caused by the decreased  $I_h$  in neurons from stimulated animals.

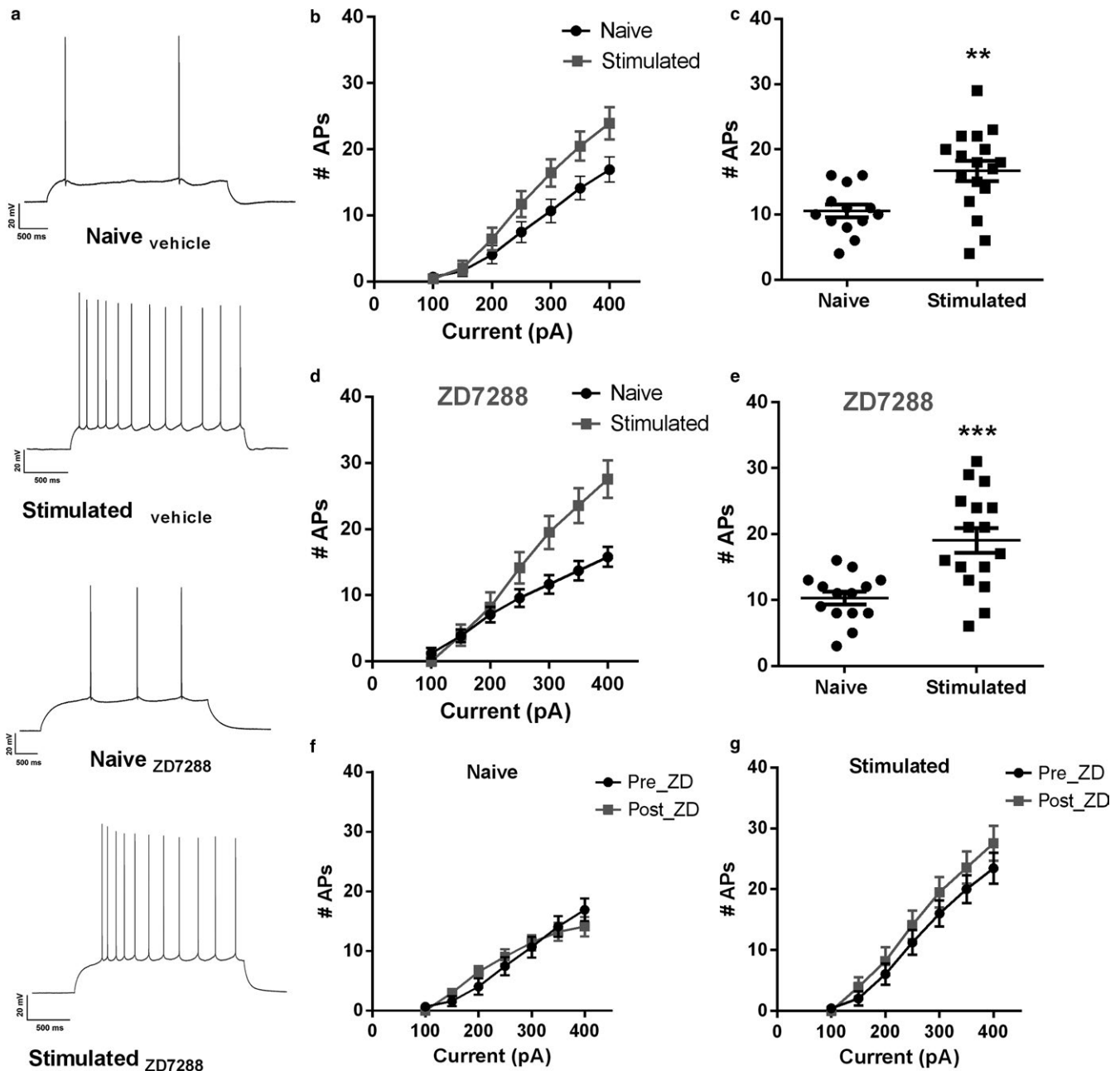
We also compared the action potentials of the CA1 pyramidal neurons from control and sound-stimulated animals (Table 1). We found that the action potentials from stimulated animals had a faster maximum rate of rise than action potentials in neurons from control animals, and a shorter half-width and lower threshold. On the other hand, we did not observe any differences in action potential amplitude or fast after hyperpolarization.

Application of ZD728 decreased the action potential threshold in control neurons, abolishing the differences in this parameter (Table 1). ZD7288 did not affect the other action potential parameters (Table 1). We conclude that  $I_h$  increases action potential threshold in CA1 neurons and that the difference in action potential threshold in naïve and stimulated animals is caused by the differential expression of this current. On the other hand, the other differences must be caused by changes in other conductances.

### 3.6 | A single episode of high-intensity sound does not affect $I_h$ , resting membrane potential, input resistance, and firing of hippocampal CA1 neurons

Recently, we showed that a single episode of 1 min of high-intensity sound can depress hippocampal LTP (de Deus et al., 2017). We therefore tested the effects of a single episode of high-intensity sound stimulation on membrane properties and action potential firing. In slices from animals killed 2 hr after being submitted ( $n = 10$  slices from six rats) or not ( $n = 17$  slices from 10 rats) to a 1 min of 110 dB sound exposure, we did not find differences in RMP (naive:  $-79.3 \pm 0.6$  mV; single-stimulated:  $-79.6 \pm 1.3$  mV;  $p = 0.85$ ), membrane input resistance (naive:  $64.2 \pm 3.6$  M $\Omega$ ; single-stimulated:  $60.8 \pm 5.6$  M $\Omega$ ;  $p = 0.54$ ), or membrane time constant (naive:  $10.5 \pm 0.6$  ms; single-stimulated:  $8.7 \pm 0.6$  ms;  $p = 0.38$ ; Figure 6a–c). Application of ZD7288 had similar effects in cells for both group of animals: a decrease in RMP (naive:  $-89.7 \pm 1$  mV; single-stimulated:  $-86.6 \pm 2.4$  mV;  $p = 0.09$ ), an increased in membrane input resistance (naive:  $84.5 \pm 3.5$  M $\Omega$ ; single-stimulated:  $92.6 \pm 5.1$  M $\Omega$ ;  $p = 0.16$ ), and a lengthening of the membrane time constant (naive:  $32.98 \pm 1.6$  ms; single-stimulated:  $32.92 \pm 2.3$  ms;  $p = 0.97$ ; Figure 6a–c).

Because the differences on RMP and membrane resistance observed after the long-term sound stimulation were



**FIGURE 5** Neurons from stimulated animals fire more action potentials. (a) AP firing in response to depolarizing current injections for both groups, before and after application of ZD7288. (b) Frequency vs. current (FI) curves for neurons from both naive and stimulated animals. (c) Mean number of action potentials at 100 pA over the rheobase. (d) Frequency vs. current (FI) curves for neurons from both naive and stimulated animals in the presence of ZD7288. (e) Mean number of action potentials at 100 pA over the rheobase in the presence of ZD7288. (f and g) FI curves before and after ZD7288 for naive and stimulated animals, respectively. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$

caused by a decrease in the expression of  $I_h$ , we analyze the  $I_h$  current from neurons from the animals submitted to a single high-intensity sound episode. We found no difference in  $I_h$  amplitude between control and single-stimulated animals (current at  $-120$  mV: naive:  $-478.6 \pm 44.7$  pA; single-stimulated:  $-455.9 \pm 53$  pA,  $p = 0.75$ ; current at  $-130$  mV: naive:  $-551.8 \pm 51$  pA; single-stimulated:  $-500.6 \pm 69.7$  pA,  $p = 0.55$ ; Figure 6d). Therefore, we found no difference in the tail current amplitudes ( $I_{tail}$  after  $-130$  mV hyperpolarization:

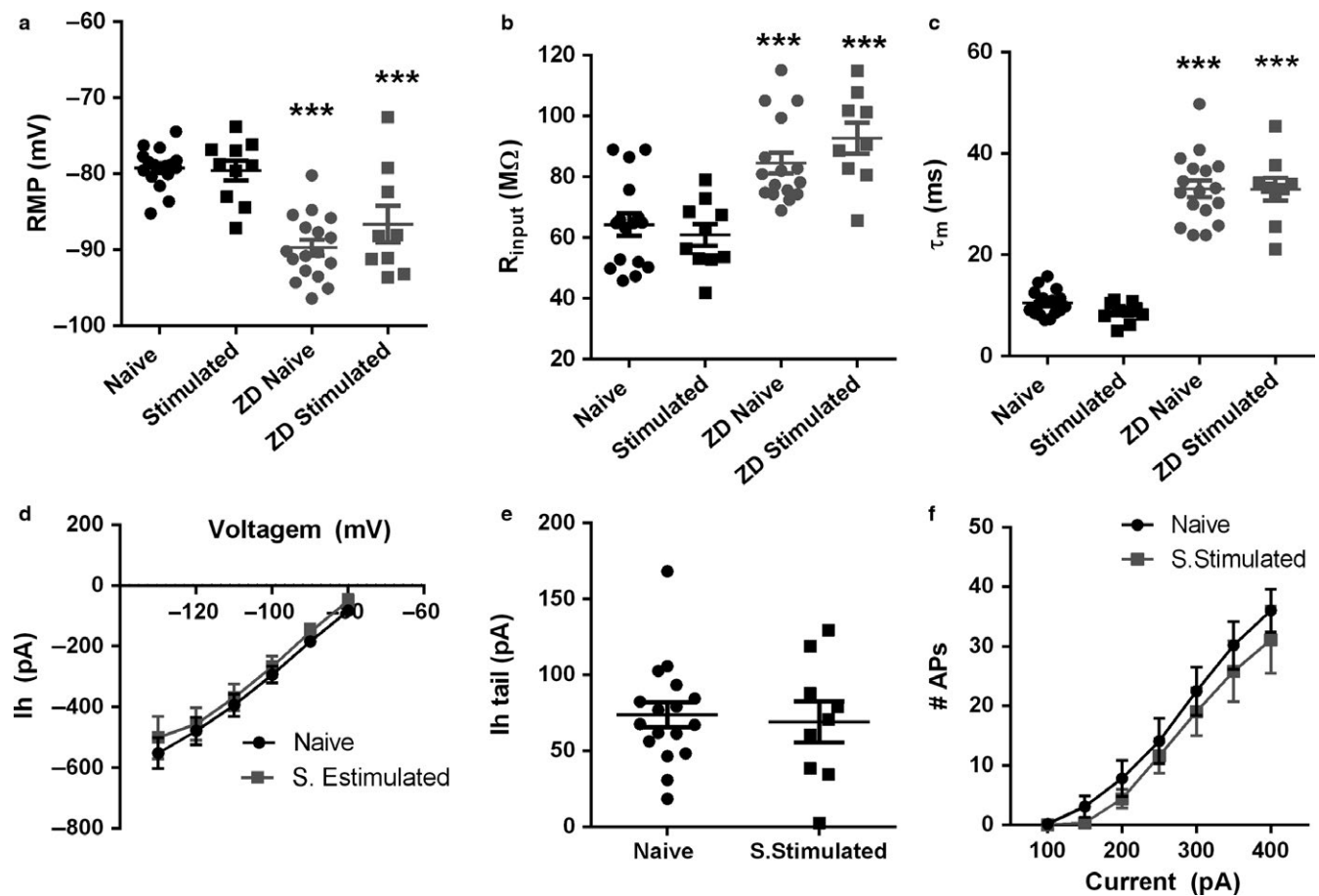
naive:  $-73.6 \pm 8$  pA; single-stimulated:  $-69 \pm 13$  pA,  $p = 0.76$ ; Figure 6e) and in the  $V_{50}$  of the activation of  $I_h$  (naive:  $-81.4 \pm 1.6$  mV; stimulated:  $-84.6$  mV  $\pm 6$  mV;  $p = 0.58$ ). Also, we did not find differences in the firing of neurons from naive and single-stimulated animals ( $F_{1,25} = 0.53$ ;  $p = 0.47$ ; two-way ANOVA; Figure 6f) and action potential properties (not shown). We conclude that the effects of high-intensity sound on membrane properties, differently to the effect on LTP, depend on a prolonged exposure to high-intensity sound.

**TABLE 1** Analysis of action potentials upon injection of depolarizing currents before and after the application of ZD7288 in slices from long-term stimulated animals compared to naïve controls

Parameter	Control			ZD 7288		
	Naïve	Stimulated	<i>p</i>	Naïve	Stimulated	<i>p</i>
Amplitude (mV)	104.5 ± 1.6	105 ± 1.4	0.82	103 ± 1.02	99.7 ± 1.2	0.049
HW (ms)	0.97 ± 0.02	0.73 ± 0.02	<0.0001	0.94 ± 0.02	0.7 ± 0.03	<0.0001
Fast AHP (mV)	-69.4 ± 0.9	-71.7 ± 1.2	0.1	-68.2 ± 1.5	-72.7 ± 1.01	0.02
ROR (V/s)	698.9 ± 30.7	825.2 ± 29.8	0.006	639 ± 30.4	742 ± 29.8	0.02
AP <sub>threshold</sub> (mV)	-61.9 ± 0.7	-66 ± 0.7	0.0007	-63.8 ± 0.6	-65.9 ± 0.8	0.5

Notes. HW: Half width; AHP: after hyperpolarization; ROR: rate of rise; AP: action potential.

Data are represented as mean ± SEM tested for significance with unpaired *t* test.



**FIGURE 6** A single episode of high-intensity sound does not affect  $I_h$  or the intrinsic properties of pyramidal neurons. (a) Resting membrane potential (RMP) in control (naïve) and single-stimulated (S.Stimulated) animals in the absence (dark symbols) and presence (gray symbols) of ZD7288. (b) Membrane input resistance in naïve and single-stimulated animals in the absence (dark symbols) and presence (gray symbols) of ZD7288. (c) Membrane time constant in naïve and single-stimulated animals in the absence (dark symbols) and presence (gray symbols) of ZD7288. (d) IV relationships of  $I_h$  in neurons from naïve and single-stimulated animals (e) Tail currents after a hyperpolarization of  $-120$  mV in neurons from naïve and single-stimulated animals. (f) FI curves from naïve and single-stimulated animals. \*\*\* $p < 0.0005$  with paired *t* tests (before and after ZD)

## 4 | DISCUSSION

Exposure to loud sounds from occupational and recreational sources is an increasing common feature of our daily lives. Chronic exposure to loud sounds can lead to hearing

deficits, tinnitus and hyperacusia, which are increasingly frequent maladies (Bhatt, Lin, & Bhattacharyya, 2016; Coelho, Sanchez, & Tyler, 2007; Shargorodsky, Curhan, & Farwell, 2010). In addition, intense noise exposure is related to deleterious mental and systemic effects (Basner et al., 2014; Ising

& Kruppa, 2004; Lercher, Evans, & Meis, 2003; Skogstad et al., 2016; Stansfeld et al., 2005). The hippocampus responds to sound and is affected by exposure to traumatic sound levels. For instance, acute traumatic noise alters place cell activity in the hippocampus (Goble et al., 2009). Even moderate chronic noise exposure can cause cognitive impairment and expression of degenerative markers in the hippocampus from mice (Cheng et al., 2011, 2016). Hearing loss also affects hippocampal neurogenesis and function (Drago et al., 1996; Liu et al., 2016). Our previous reports showed that the hippocampal LTP was severely impaired by high-intensity noise exposure, but without affecting spatial learning and memory (Cunha et al., 2015; de Deus et al., 2017). Considering all these evidences, we conclude that the hippocampal formation can be deleteriously affected by acoustic insults, with unknown consequences.

In this work, we aimed to test whether the intrinsic membrane properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons could be affected by a long-term protocol of high-intensity sound exposure (20 episodes of 1 min of 110 dB sound stimulation, for 10 days, 2 episodes per day), the same protocol which produced an inhibition of hippocampal LTP (Cunha et al., 2015). We were particularly interested in knowing the effect on the  $I_h$  current, which is mediated by the HCN channels (He, Chen, Li, & Hu, 2014) and is known to be modulated in diverse situations, including hippocampal synaptic plasticity (Brager & Johnston, 2007; Fan et al., 2005). We found an inhibition of  $I_h$  in the CA1 pyramidal neurons from animals subjected to our long-term protocol of high-intensity sound exposure, resulting in hyperpolarization of RMP, increase in membrane input resistance and time constant, and decrease in action potential threshold. All these changes can have a profound impact on neuronal membrane excitability and synaptic integration. Furthermore, the higher membrane input resistance and longer membrane time constant will promote synaptic summation and integration, facilitating excitatory synaptic inputs to reach action potential threshold. On the other hand, the more hyperpolarized RMP and the smaller depolarization sag of the membrane potential tend to counteract these effects. It is interesting that these effects were not observed after a single episode of 1 min of 110 dB sound, which also inhibits LTP (de Deus et al., 2017), showing that the effect on the LTP precedes the effect on  $I_h$ .

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels have distinct characteristics which allow them to stabilize RMP to values close to firing threshold. Their opening probability is increased by hyperpolarizations below  $-50$  mV, and because of its mixed cationic permeability, reversal potential is generally above RMP. So, membrane hyperpolarization increases the opening of HCN channels, generating inward current that tends to depolarize the membrane back toward its original value. Because HCN channels also deactivate near or slightly above RMP, they tend to shut down by its own

effect depolarizing the membrane, thus avoiding further depolarization (Wahl-Schott & Biel, 2009). A small fraction of HCN channels are active at rest producing a tonic inward current that depolarizes the membrane (Yamada-Hanff & Bean, 2015). Therefore, we found that inhibition of HCN channels by ZD7288 hyperpolarized the RMP in neurons from both groups. In an interesting manner, although the RMP in the presence of ZD 7288 was not significantly different from neurons from both groups, ZD7288 hyperpolarized RMP only slightly more in neurons from control animals (around  $-4$  mV in cells from control vs.  $-3$  mV in cells from stimulated animals), while the effects on membrane input resistance were much more pronounced ( $41$  M $\Omega$  in neurons from control animals vs.  $17$  M $\Omega$  in neurons from stimulated animals). This is in accordance with the smaller impact of  $I_h$  on RMP compared with its strong influence on membrane resistance (Ceballos et al., 2016). Thus, neurons expressing different levels of  $I_h$  may present only small differences in RMP large differences in membrane resistance (Ceballos et al., 2016). Therefore, with an effect of high-intensity sound exposure in inhibiting  $I_h$ , we found that the differences in membrane resistance and time constant in neurons from sound-exposed animals were abolished by ZD7288, strongly suggesting that a reduced  $I_h$  was responsible for these bigger input resistance in neurons from stimulated animals. Other subthreshold conductances were not different in both groups of animals. This also shows that the reduction of  $I_h$  is not a homeostatic response to changes in another intrinsic conductance (Ceballos et al., 2016).

ZD 7288 also hyperpolarized the AP threshold of CA1 pyramidal neurons, accordingly to its effectiveness in potentials below or around threshold. AP threshold is reduced probably by the decreased steady-state inactivation of sodium channels at more hyperpolarized potentials (Leão et al., 2005; Platkiewicz & Brette, 2011). In an interesting manner, it has been shown that  $I_h$  is present in the axon initial segment (Ko, Rasband, Meseguer, Kramer, & Golding, 2016) where it can tightly control AP threshold.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels are present in hippocampal pyramidal cell dendrites where their dynamic properties decrease membrane input resistance and membrane time constant, resulting in decreased EPSP duration and amplitude (Magee, 1998, 1999). This effect reduces dendritic temporal integration of EPSPs during bursts of stimuli (Magee, 1998). Besides its effects on membrane potential, the reduction of  $I_h$  after sound exposure can potentially increase dendritic integration and summation. Because  $I_h$  expression is reduced with LTD (Brager & Johnston, 2007), the reduced  $I_h$  in sound-exposed animals, which also have a reduced capacity for LTP (Cunha et al., 2015), could reflect a homeostatic response to the deficiency to induce LTP in slices from sound-exposed animals, helping with LTP induction



by more physiological protocols. In an interesting manner, we did not observe the same reduction in  $I_h$  in animals submitted to a single episode of high-intensity sound, which inhibits LTP (de Deus et al., 2017), suggesting that the negative effect on  $I_h$  is triggered by a long-term deficit in LTP, suggestive of an adaptive mechanism to increase the dendritic synaptic integration of CA1 pyramidal neurons.

We did not observe effects of  $I_h$  inhibition on action potential firing in either group. On the other hand, others have found changes in AP firing after  $I_h$  inhibition, either increasing (Gasselín et al., 2015) or decreasing firing (Gu, Vervaeke, Hu, & Storm, 2005). In our case, it is possible that the increase in the input resistance and decrease in AP threshold were offset by the hyperpolarization of the resting membrane potential resulting in no detectable net effect of ZD7288 on AP firing. In an interesting manner, CA1 neurons from sound-exposed animals fired more action potentials than CA1 pyramidal neurons from control animals, even in the presence of ZD7288, suggesting that high-intensity sound exposure affects other conductances, possibly voltage-dependent potassium currents that regulate action potential firing. Again, this effect was not observed after a single episode of high-intensity sound, showing that as seen with  $I_h$ , the effect of high-intensity sound on neuronal firing was dependent on a long-term sound exposure.

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels also are modulated by cAMP which shifts their activation curve to more depolarized potentials (DiFrancesco & Tortora, 1991). G protein-coupled receptors (GPCRs) coupled to  $G\alpha_i$  subunits, such as muscarinic acetylcholine receptors, can reduce cAMP levels and reduce  $I_h$  activation at rest, without affecting current amplitude (DiFrancesco & Tromba, 1987). We found, however, that sound stimulation only affected current amplitude, but not the voltage dependence of current activation, suggesting that this effect is not mediated by inhibition of cAMP production by activation of  $G_i$  by neurotransmitters linked to GPCRs. On the other hand, metabotropic glutamate receptors (mGluRs) can reduce expression of specific HCN subunits, via activation of  $Ca^{++}$ -calmodulin kinase II, and expression of Neuronal Restrictive Silencing Factor (NRSF), a transcription factor that binds to the HCN1 gene promoter, and reduced the transcription of the HCN1 gene (Bender & Baram, 2008; Richichi et al., 2008), which could be a possible mechanism for the decrease in  $I_h$  in sound-stimulated animals.

The subunit composition of the HCN channels determines the activation/deactivation kinetics of  $I_h$ . Channels containing only the HCN1 subunit present the fastest activation rate, while channels expressing only the HCN4 subunit have the slowest activation rate (Wahl-Schott & Biel, 2009). In CA1 pyramidal cells, HCN1 and HCN2 are highly expressed (Dougherty et al., 2013) and determine the activation kinetics of  $I_h$ . As we did not observe changes in the fast and slow components of the activation time constants, neither a change

in its proportion ( $A_{fast}/A_{slow}$ ), our results suggest that subunit composition was kept similar between control and high-intensity sound-stimulated rats.

We conclude that prolonged exposure to high-intensity sounds alters  $I_h$  expression in hippocampal pyramidal neurons, an effect not observed after a single short episode of high-intensity sound. Because LTP is affected by both long-term and short-term protocols, it is possible that the inhibition of  $I_h$  might be a process of homeostatic plasticity in response to the inhibition in LTP (Brager & Johnston, 2007), possibly to increase synaptic integration in these neurons. More investigations are needed to know the impact of the high-intensity sound reduction in  $I_h$  on the hippocampal function and dysfunction.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the technical assistance of Mr. J. Fernando Aguiar and Dr. C. Kushmerick for reviewing the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

## DATA ACCESSIBILITY

Data are available from the corresponding author on request.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AOSC, CCC, and JLD performed experiments and analyzed data. RML, AOSC, and CCC designed the experiments. All authors wrote and approved the manuscript.

## ORCID

Ricardo Maurício Leão  <http://orcid.org/0000-0002-3829-3342>

## REFERENCES


- Angelucci, F., Fiore, M., Ricci, E., Padua, L., Sabino, A., & Tonali, P. A. (2007). Investigating the neurobiology of music: Brain-derived neurotrophic factor modulation in the hippocampus of young adult mice. *Behavioural Pharmacology*, 18, 491–496. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282d28f50>
- Aronov, D., Nevers, R., & Tank, D. W. (2017). Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal-entorhinal circuit. *Nature*, 543, 719–722. <https://doi.org/10.1038/nature21692>
- Atkinson, S. E., Maywood, E. S., Chesham, J. E., Wozny, C., Colwell, C. S., Hastings, M. H., & Williams, S. R. (2011). Cyclic AMP signaling control of action potential firing rate and molecular circadian pacemaking in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 26, 210–220. <https://doi.org/10.1177/0748730411402810>

- Basner, M., Babisch, W., Davis, A., Brink, M., Clark, C., Janssen, S., & Stansfeld, S. (2014). Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet*, *383*, 1325–1332. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61613-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61613-X)
- Bender, R. A., & Baram, T. Z. (2008). Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Progress in Neurobiology*, *86*, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.007>
- Bhatt, J. M., Lin, H. W., & Bhattacharyya, N. (2016). Prevalence, severity, exposures, and treatment patterns of tinnitus in the United States. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, *142*, 959–965. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2016.1700>
- Brager, D. H., & Johnston, D. (2007). Plasticity of intrinsic excitability during long-term depression is mediated through mGluR-dependent changes in  $I_h$  in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, *27*, 13926–13937. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3520-07.2007>
- Ceballos, C. C., Li, S., Roque, A. C., Tzounopoulos, T., & Leão, R. M. (2016).  $I_h$  equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*, 249. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00249>
- Ceballos, C. C., Roque, A. C., & Leão, R. M. (2017). A negative slope conductance of the persistent sodium current prolongs subthreshold depolarizations. *Biophysical Journal*, *113*, 2207–2217. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.047>
- Cheng, L., Wang, S. H., Chen, Q. C., & Liao, X. M. (2011). Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiology & Behavior*, *104*, 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.018>
- Cheng, L., Wang, S. H., Huang, Y., & Liao, X. M. (2016). The hippocampus may be more susceptible to environmental noise than the auditory cortex. *Hearing Research*, *333*, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.01.001>
- Coelho, C. B., Sanchez, T. G., & Tyler, R. S. (2007). Hyperacusis, sound annoyance, and loudness hypersensitivity in children. *Progress in Brain Research*, *166*, 169–178. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)66015-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)66015-4)
- Cunha, A. O., de Oliveira, J. A., Almeida, S. S., Garcia-Cairasco, N., & Leão, R. M. (2015). Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. *Neuroscience*, *310*, 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.040>
- de Deus, J. L., Cunha, A. O. S., Terzian, A. L., Resstel, L. B., Elias, L. L. K., Antunes-Rodrigues, J., ... Leão, R. M. (2017). A single episode of high intensity sound inhibits long-term potentiation in the hippocampus of rats. *Scientific Reports*, *7*, 14094. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14624-1>
- DiFrancesco, D., & Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, *351*, 145. <https://doi.org/10.1038/351145a0>
- DiFrancesco, D., & Tromba, C. (1987). Acetylcholine inhibits activation of the cardiac hyperpolarizing-activated current,  $i_f$ . *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*, *410*, 139–142. <https://doi.org/10.1007/BF00581906>
- Dougherty, K. A., Nicholson, D. A., Diaz, L., Buss, E. W., Neuman, K. M., Chetkovich, D. M., & Johnston, D. (2013). Differential expression of HCN subunits alters voltage-dependent gating of h-channels in CA1 pyramidal neurons from dorsal and ventral hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, *109*, 1940–1953. <https://doi.org/10.1152/jn.00010.2013>
- Drago, F., Musco, S., Nardo, L., Valerio, C., Grassi, M., & Rampello, L. (1996). Behavioral and neurochemical alterations induced by reversible conductive hearing loss in aged male rats. *Neuroscience Letters*, *205*, 1–4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12369-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12369-7)
- Dyhrfeld-Johnsen, J., Morgan, R. J., & Soltesz, I. (2009). Double trouble? Potential for hyperexcitability following both channelopathic up-and downregulation of  $I_h$  in epilepsy. *Frontiers in Neuroscience*, *3*, 25–33.
- Fan, Y., Fricker, D., Brager, D. H., Chen, X., Hui-Chen, L., Chitwood, R. A., & Johnston, D. (2005). Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in  $I_h$ . *Nature Neuroscience*, *8*, 1542. <https://doi.org/10.1038/nn1568>
- Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E. H. L., & Cortes de Oliveira, J. A. (2017). The Wistar Audiogenic Strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy & Behavior*, *71*, 250–273. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.001>
- Gasselin, C., Inglebert, Y., & Debanne, D. (2015). Homeostatic regulation of h-conductance controls intrinsic excitability and stabilizes the threshold for synaptic modification in CA1 neurons. *Journal of Physiology*, *593*, 4855–4869. <https://doi.org/10.1113/JP271369>
- Goble, T. J., Møller, A. R., & Thompson, L. T. (2009). Acute high-intensity sound exposure alters responses of place cells in hippocampus. *Hearing Research*, *253*, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2009.03.002>
- Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., & Storm, J. F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology*, *566*, 689–715. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086835>
- He, C., Chen, F., Li, B., & Hu, Z. (2014). Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology*, *112*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.001>
- Huang, Z., Walker, M. C., & Shah, M. M. (2009). Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *The Journal of Neuroscience*, *29*, 10979–10988.
- Ising, H., & Kruppa, B. (2004). Health effects caused by noise: Evidence in the literature from the past 25 years. *Noise & Health*, *6*, 5–13.
- Ko, K. W., Rasband, M. N., Meseguer, V., Kramer, R. H., & Golding, N. L. (2016). Serotonin modulates spike probability in the axon initial segment through HCN channels. *Nature Neuroscience*, *19*, 826–834. <https://doi.org/10.1038/nn.4293>
- Kraus, K. S., & Canlon, B. (2012). Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hearing Research*, *288*, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.02.009>
- Leão, R. M., Kushmerick, C., Pinaud, R., Renden, R., Li, G. L., Taschenberger, H., ... von Gersdorff, H. (2005). Presynaptic Na<sup>+</sup> channels: Locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *Journal of Neuroscience*, *25*, 3724–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3983-04.2005>
- Lercher, P., Evans, G. W., & Meis, M. (2003). Ambient noise and cognitive processes among primary schoolchildren. *Environment and Behavior*, *35*, 725–735. <https://doi.org/10.1177/0013916503256260>
- Liu, L., Shen, P., He, T., Chang, Y., Shi, L., Tao, S., ... Wang, J. (2016). Noise induced hearing loss impairs spatial learning/memory and

- hippocampal neurogenesis in mice. *Scientific Reports*, 6, 20374. <https://doi.org/10.1038/srep20374>
- Lupica, C. R., Bell, J. A., Hoffman, A. F., & Watson, P. L. (2001). Contribution of the hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 86, 261–268. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.261>
- Magee, J. C. (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 18, 7613–7624. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-19-07613.1998>
- Magee, J. C. (1999). Dendritic  $I_h$  normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nature Neuroscience*, 2, 508–514. <https://doi.org/10.1038/9158>
- Maroso, M., Szabo, G. G., Kim, H. K., Alexander, A., Bui, A. D., Lee, S. H., ... Soltesz, I. (2016). Cannabinoid control of learning and memory through HCN channels. *Neuron*, 89, 1059–1073. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.023>
- McCormick, D. A., & Pape, H. C. (1990). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *Journal of Physiology*, 431, 319–342. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018332>
- Nolan, M. F., Dudman, J. T., Dodson, P. D., & Santoro, B. (2007). HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, 27, 12440–12451. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2358-07.2007>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (3rd ed.). San Diego, CA: Academic Press.
- Platkiewicz, J., & Brette, R. (2011). Impact of fast sodium channel inactivation on spike threshold dynamics and synaptic integration. *PLoS Computational Biology*, 7, e1001129. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001129>
- Richichi, C., Brewster, A. L., Bender, R. A., Simeone, T. A., Zha, Q., Yin, H. Z., ... Baram, T. Z. (2008). Mechanisms of seizure-induced ‘transcriptional channelopathy’ of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels. *Neurobiology of Disease*, 29, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.09.003>
- Romcy-Pereira, R. N., & Garcia-Cairasco, N. (2003). Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience*, 119, 533–546. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00191-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00191-X)
- Shargorodsky, J., Curhan, G. C., & Farwell, W. R. (2010). Prevalence and characteristics of tinnitus among US adults. *American Journal of Medicine*, 123, 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.015>
- Skogstad, M., Johannessen, H. A., Tynes, T., Mehlum, I. S., Nordby, K. C., & Lie, A. (2016). Systematic review of the cardiovascular effects of occupational noise. *Occupational Medicine*, 66, 10–16. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqv148>
- Squire, L. R., Schmolck, H., & Stark, S. M. (2001). Impaired auditory recognition memory in amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Learning & Memory*, 8, 252–256. <https://doi.org/10.1101/lm.42001>
- Stansfeld, S. A., Berglund, B., Clark, C., Lopez-Barrio, I., Fischer, P., Ohrström, E., ... Berry, B. F. (2005). Aircraft and road traffic noise and children’s cognition and health: A cross-national study. *Lancet*, 365, 1942–1949. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66660-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66660-3)
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., & Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, 1621, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.016>
- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 470–494. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8525-0>
- Williams, S. R., & Stuart, G. J. (2000). Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic  $I_h$  in neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 83, 3177–3182. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.5.3177>
- Xu, C., Datta, S., Wu, M., & Alreja, M. (2004). Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 19, 2299–2309. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03316.x>
- Yamada-Hanff, J., & Bean, B. P. (2015). Activation of  $I_h$  and TTX-sensitive sodium current at subthreshold voltages during CA1 pyramidal neuron firing. *Journal of Neurophysiology*, 114, 2376–2389. <https://doi.org/10.1152/jn.00489.2015>
- Zemankovics, R., Káli, S., Paulsen, O., Freund, T. F., & Hájos, N. (2010). Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: The role of h-current and passive membrane characteristics. *Journal of Physiology*, 588, 2109–2132. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.185975>

**How to cite this article:** Cunha AOS, Ceballos CC, de Deus JL, Leão RM. Long-term high-intensity sound stimulation inhibits h current ( $I_h$ ) in CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*. 2018;47:1401–1413. <https://doi.org/10.1111/ejn.13954>

## JOURNAL CLUB

**Purinergic signalling and TRPV1 receptors are associated with the carotid body plasticity induced by an apnoea-like stimulus**Mateus Ramos Amorim<sup>1</sup>  and Júnia Lara de Deus<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Morphology, Physiology, and Basic Pathology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>2</sup>Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Email: amorimr@hotmail.com

Edited by: Kim Barrett &amp; Harold Schultz

Aerobic organisms rely on oxygen (O<sub>2</sub>) as the final acceptor of the electrons from oxidative metabolism, which is essential to keep electron flow through the respiratory chain, adenosine triphosphate (ATP) synthesis, and therefore cell function. Consequently, a lack of O<sub>2</sub> is a life-threatening condition to aerobic species. To lessen hypoxic cell damage, organisms increase O<sub>2</sub> uptake by means of hyperventilation triggered by the peripheral chemoreceptors. For instance, hypoxia, observed during longer apnoea, i.e. the interruption of breath, is an extremely deleterious situation that is mitigated by stimulation of peripheral chemoreceptors to re-engage breathing (Costa *et al.* 2014).

Moreover, reduction in atmospheric O<sub>2</sub> partial pressure experienced, for example, in high altitudes leads to an acute and sustained reduction of the arterial partial pressure of O<sub>2</sub> (P<sub>aO<sub>2</sub></sub>) leading to respiratory, cardiovascular and behavioural physiological reflex responses to maintain homeostasis (Costa *et al.* 2014). In contrast, in pathophysiological conditions, such as obstructive sleep apnoea in which humans have recurrent occlusion of the upper airways throughout sleep, a chronic and recurrent decrease in P<sub>aO<sub>2</sub></sub> is observed producing a critical impact in cardiorespiratory regulation (Caples *et al.* 2005). Given that the chronic reduction in P<sub>aO<sub>2</sub></sub> produced by intermittent sleep apnoea is associated with cardiorespiratory diseases, including neurogenic hypertension, it is important to search for new targets to

treat apnoea and its harmful consequences. However, to better understand how apnoea may affect the progression of cardiovascular diseases it is necessary to discuss the physiological mechanisms involved in the detection of hypoxia.

The physiological mechanisms involved in the sensitivity to P<sub>aO<sub>2</sub></sub> reduction were initially investigated in dogs by Corneille Heymans in the early 20th century. Since then, several publications have evaluated the possible cellular and molecular mechanisms involved in the O<sub>2</sub> sensitivity. The peripheral chemoreceptors are cells highly specialized in sensing O<sub>2</sub> and are located in the carotid artery bifurcation in a chemosensitive organ called the carotid body. Carotid bodies have two distinct cell types: (a) the glomus cells or type I cells, i.e. the sentinel cells detecting the reduction in P<sub>aO<sub>2</sub></sub> in mammals, whose function is related to peripheral chemosensitivity, and (b) type II cells, whose role remains unclear. Peripheral chemoreceptors clusters are perfused by arterial blood through small blood vessels that originate in most species from the branches of the internal and external carotid, the occipital and the pharyngeal arteries (Kumar & Prabhakar, 2012). The sensory chemosensitivity of carotid bodies in response to a fall in P<sub>aO<sub>2</sub></sub> is related with the closure of K<sup>+</sup> channels of glomus cells, leading to a Ca<sup>+2</sup>-dependent release of acetylcholine, dopamine, adenosine, ATP, and other neurotransmitters on carotid sinus nerve (CSN) terminals. The CSN afferents establish contacts with brainstem regions involved in cardiorespiratory regulation (Kumar & Prabhakar, 2012).

A significant reduction in the arterial blood O<sub>2</sub> stimulates the carotid bodies and a series of the neural pathways are activated within the nucleus tractus solitarius (NTS), which in turn leads to an enhancement of respiratory and sympathetic activities. In brief, the NTS neurons send excitatory projections to the respiratory and pre-sympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla and the nucleus ambiguus. Conscious rats exhibited tachypnoea, bradycardia and a significant increase in arterial pressure during acute peripheral chemoreceptor activation and these haemodynamic responses are abolished by carotid body removal (Costa *et al.* 2014).

In addition to acute stimulation of carotid bodies, chronic intermittent hypoxia (CIH) is largely used in studies on conscious animals, mimicking the periodic and repetitive reduction in the fraction of inspired O<sub>2</sub> observed in patients with obstructive sleep apnoea. Several studies showed the consequences of recurrent hypoxia in the cardiovascular system in rats, in particular the development of sympathetic overactivity and neurogenic hypertension. An interesting feature observed in *ex vivo* carotid body activity of rats previously exposed to 10 days of CIH (i.e. CIH preconditioning) is a sensory long-term facilitation (sLTF), defined as a tonic enhancement of baseline activity of CSN, and an increase in its response to a hypoxic challenge (Peng *et al.* 2003). Regarding the functional consequence of this activity-dependent plasticity in the carotid bodies of CIH-preconditioned rats, these findings of Peng *et al.* (2003) may indicate the mechanism causing the persistent reflex activation of sympathetic nerve activity and hypertension observed in patients with periodic apnoea. For these reasons, mechanistic insights into the induction and maintenance phases of carotid body sLTF deserve investigation.

In a recent study published in this issue of *The Journal of Physiology*, Roy *et al.* (2018) documented a new mechanism from acute carotid body sLTF, which was not associated with CIH preconditioning. The authors hypothesized that sLTF can be induced in carotid bodies from naive rats, i.e. without CIH preconditioning. Furthermore, in this paper, it was postulated that ATP released by glomus cells during hypoxia and hypercapnia activate P2X<sub>2/3</sub> purinergic receptors and that the activation of P2X receptors leads to TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) phosphorylation increasing the ionic currents in the carotid sinus nerve (CSN). They also evaluated whether or not the purinergic and TRPV1 receptors are involved in the induction and maintenance phases of carotid body sLTF in the apnoea-like stimuli (acute intermittent hypoxia with concurrent hypercapnia (AIH-Hc)). Roy *et al.* (2018) used the well-accepted *ex-vivo* carotid body – CSN preparation, which keeps the perfusion pressure, temperature and pH in the carotid bifurcation comparable with that in

whole animals. They also used an *in-vivo* anaesthetized rat preparation to evaluate the role of TRPV1 receptors in sympathetic sLTF. Using these elegant approaches, the innovation of this study was to show that AIH-Hc leads to a robust carotid body sLTF and increases the carotid body sensitivity to hypoxia and temperature in naive rats.

Taking into consideration that this activity-dependent plasticity in the carotid bodies during and after the apnoea-like stimuli was observed in the absence of CIH preconditioning, Roy *et al.* (2018) suggested key mechanisms involved in this phenomenon. In the following experimental protocol, they reported that both non-selective P2X receptor antagonist PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid) and the selective P2X2/3 inhibitor TNP-ATP (2,4,6, trinitrophenol-ATP) abolished sLTF. These findings indicate that ATP activation of P2X2/3 receptors is important in the maintenance of sLTF induced by apnoea-like stimuli. In addition, using hyperoxia to silence glomus cells, the activation of postsynaptic purinergic receptors (from CSN terminals) stimulated carotid body activity. These data allowed the authors to suggest that sLTF induced by apnoea-like stimuli depends on the participation of postsynaptic P2X receptor activation. This hypothesis was confirmed by the exogenous application of ATP which produced sLTF. To determine if TRPV1 receptors are also involved in the AIH-Hc-evoked sLTF, the authors used a TRPV1 antagonist (AMG9810) which halved the carotid body sLTF. Interestingly, Roy *et al.* (2018) evaluated the role of TRPV1 receptors using *in vivo* approaches in response to hyperoxia and hypoxia. This set of experiments showed that in their anaesthetized rat preparations the maintenance of carotid body sLTF is dependent on TRPV1 receptors only under normoxic conditions. The authors suggested that these findings may

contribute to understanding of the link between the obstructive sleep apnoea, sympathetic overactivity and neurogenic hypertension.

Besides the mechanisms involved in the maintenance of sLTF (P2X2/3 and TRPV1 receptors), another relevant contribution of the study by Roy *et al.* (2018) is related to the mechanisms involved in the induction of this carotid body plasticity during apnoea-like stimuli. It is known that 5-hydroxytryptamine (5-HT) and angiotensin type 1 (AT-1) receptors evoke carotid body sLTF (Prabhakar *et al.* 2015). The application of the anti-hypertensive drugs ketanserin (a 5-HT receptor antagonist) and losartan (an AT-1 receptor blocker) demonstrated that 5-HT2 and AT-1 receptors are involved in the induction, but not in the maintenance of sLTF (Roy *et al.* 2018). On the other hand, inhibition of protein kinase C (PKC) showed that the phosphorylation mediated by this protein is a key factor in both induction and maintenance of sLTF (Roy *et al.* 2018).

In conclusion, the set of results obtained by Roy *et al.* (2018) has advanced our knowledge of the plasticity induced by apnoea-like stimuli due to activation of P2X and TRPV1 receptors in the CSN terminals from naive rats. Given that upregulation of the carotid body activity may lead to cardiovascular dysfunction, the pharmacological control of purinergic signalling and TRPV1 receptors may be a potential therapeutic target in the control of neurogenic hypertension associated with intermittent apnoea.

## References

- Caples SM, Gami AS & Somers VK (2005). Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* **142**, 187–197.
- Costa KM, Accorsi-Mendonça D, Moraes DJA & Machado BH (2014). Evolution and physiology of neural oxygen sensing. *Front Physiol* **5**, 302.
- Kumar P & Prabhakar NR (2012). Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol* **2**, 141–219.
- Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK & Prabhakar NR (2003). Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: Implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 10073–10078.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Kumar GK & Nanduri J (2015). Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Compr Physiol* **5**, 561–577.
- Roy A, Farnham MMJ, Derakhshan F, Pilowsky PM & Wilson RJA (2018). Acute intermittent hypoxia with concurrent hypercapnia evokes P2X and TRPV1 receptor-dependent sensory long-term facilitation in naive carotid bodies. *J Physiol* **596**, 3149–3169.

## Additional information

### Competing interests

None declared.

### Author contributions

Both authors wrote and approved the final version of the manuscript. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

### Funding

The authors are supported by scholarships from Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento do Estado de São Paulo (FAPESP; grant no. 2017/09878-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### Acknowledgements

The authors thank Professor Luiz Guilherme S. Branco and Professor Ricardo M. Leão for their helpful discussion and revision of this paper.