

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

NIKOLLAS MOREIRA BENITES
Versão corrigida

O desenvolvimento das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal e os efeitos da privação auditiva precoce de longo prazo no gatilho sensorio motor acústico de camundongos

RIBEIRÃO PRETO
2022

NIKOLLAS MOREIRA BENITES

O desenvolvimento das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal e os efeitos da privação auditiva precoce de longo prazo no gatilho sensorio motor acústico de camundongos

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo M. X. Leão

RIBEIRÃO PRETO

2022

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 A FONTE.

Benites, Nikollas Moreira

O desenvolvimento das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal e os efeitos da privação auditiva precoce de longo prazo no gatilho sensorio motor acústico de camundongos

200 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Leão, Ricardo Maurício Xavier.

1. Eletrofisiologia. 2. Neurofisiologia. 3. Desenvolvimento.
4. Sistema auditivo. 5. Tinnitus. 6. Análise de componentes principais. 7. PPI. 8. Reflexo do sobressalto. 9. GPIAS

FICHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Nikollas Moreira Benites

Título: O desenvolvimento das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal e os efeitos da privação auditiva precoce de longo prazo no gatilho sensório motor acústico de camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo M. X. Leão

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof.

Instituição:

Assinatura:_____

Prof.

Instituição:

Assinatura:_____

Prof.

Instituição:

Assinatura:_____

“O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a partir do Programa em Excelência Acadêmica (PROEX) – Brasil.”

Dedico essa tese aos meus pais, a minha irmã e a todos que sempre estiveram ao meu lado, seja nos momentos bons, seja nos momentos ruins.

AGRADECIMENTOS

O doutoramento é uma jornada que não deve ser feita de maneira solitária. É de suma importância existirem pessoas próximas para trazer leveza, quando a rotina diária está pesada. Tenho imensa gratidão por todos, que de certa forma, me ajudaram a me tornar Doutor em Ciências. De 2018 a 2022, ocorreram alguns acontecimentos que mudaram o rumo do país e do mundo. Em 2018, a ofensiva da ultradireita na política mundial, e de 2020 em diante, a pandemia da COVID-2019. Se eu não tivesse apoio, não seria possível ter chegado aonde cheguei. Parafraseando Isaac Newton “se cheguei até aqui, foi porque me apoiei no ombro de gigantes”. Não apenas de gigantes cientistas, mas de pessoas gigantes, seja na amizade, na cumplicidade e no amor.

E ao falar de amor, não existe a possibilidade de não agradecer aos meus pais, Rosimary e Nicolau, e a minha irmã, Nikolli que nunca mediram esforços para me apoiarem. Meus maiores exemplos de vida. Que nunca me desampararam, e ensinaram tudo o que sei sobre como ser um humano.

Agradeço ao meu orientador, o Professor Doutor Ricardo Leão, por todos os ensinamentos científicos e pela amizade criada. Aceitou o desafio de ensinar a um farmacêutico o desafio da eletrofisiologia celular, lá em 2017. Obrigado chefe. Você é um exemplo de pessoa e cientista. Agradeço a minha grande amiga a Doutora Alexandra Cunha, minha mãe científica, que sempre esteve ao meu lado, seja para fazer patch-clamp, seja para tomar um café e conversar sobre a vida, seja para dar sermões. Você é uma mulher que admiro muito, minha amiga. Sempre levarei você comigo e lembrarei das nossas reuniões e ensaios dos saraus, regados a ótimas risadas, para sempre. Agradeço também ao Doutor Aldo, que sempre esteve disposto a ajudar e a compartilhar seus conhecimentos médicos. Um exemplo de profissional.

Agradeço aos meus grandes amigos, os Doutores Júnia e Mateus, pelas ótimas companhias, tanto no dia a dia laboratorial quanto nas horas de lazer. Vocês tornaram a minha jornada acadêmica muito melhor, sempre dando belos exemplos de como ser um bom cientista, sem deixar de lado as amizades. Agradeço também ao meu grande amigo, Doutor Procópio, que sempre foi um exemplo de ser humano bondoso, de paciência, mesmo sob as mais diversas atribulações. Aos doutores Nathanne, Edismauro e Ludmila, pela amizade e ótimas risadas. Vocês trouxeram muita alegria ao meu ser.

Agradeço aos meus grandes amigos, que estão sempre conectados comigo, tanto online quanto em sentimento. Vocês trouxeram a alegria que me faltava, principalmente durante o ano de 2020: Otávio, Sofia, Marga, Dy, Rombs, Poeta, Suco, Lalau, Matuta, Granola, DvD, Pão. A vida foi, e ainda é, muito mais leve com vocês.

Agradeço novamente, à minha grande amiga Sofia, pois foi meu braço direito muitas vezes (e meu esquerdo quando eu fracturei meu ombro). Passamos por poucas e boas. Um exemplo de ser humano. Muito obrigado. Em conjunto, agradeço a Silvia e ao Leo, pelo grande apoio e pelas ótimas conversas e risadas, enquanto apreciávamos bons jogos de tabuleiros.

Agradeço aos meus grandes amigos das repúblicas unidas da Grosca, que por um bom tempo dividi uma vida. Vocês foram muito importantes durante minha trajetória em Ribeirão Preto. Obrigado meus camaradas.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos de convivência diária. Aqueles que sempre estiveram ali do lado do *setup*, seja para contar uma piada ou para ouvir as reclamações quando os experimentos não saíam conforme o planejado, seja para dar conselhos científicos. Agradeço muito ao Fernandinho que me ensinou a arte dos recursos técnicos. O laboratório não seria o mesmo sem você. Aos doutores César, Cahuê, João, André Dagostin e Msc. Paulo e Patrik que sempre estiveram disponíveis para me ajudar. As minhas amigas Natália, Marina, Daniela e Elena, que dividiram muitos sucessos, mas também muitas frustrações e reclamações. Ao meu amigo Msc. Leonardo, pelas risadas, conversas e apoio científico e tecnológico e por me mostrar as maravilhas da programação no MatLab. Um agradecimento ao Professor Doutor Carlos, que abriu as portas para meu aprendizado em programação em R. Agradeço muito os alunos de iniciação científica Beatriz e Ricardo, pois sem eles o estudo do gatilho sensorio motor não teria sido concluído. Além disso, tiveram muita paciência e perseverança. Agradeço também a todos os funcionários do departamento de fisiologia, com imensa gratidão a Cláudia, e aos funcionários do Prédio Central da Medicina. Junto a isso, agradeço a todos os meus amigos do programa de pós-graduação em Fisiologia, que quando a luta estava difícil, sempre estavam para dar apoio. A caminhada não foi fácil, mas com vocês o riso e a felicidade sempre vinham fácil.

Agradeço a minha amada namorada Debora Akemi, que me inspira todos os dias pela sua força e determinação como cientista e mulher. Serei eternamente grato

por todos os momentos que passamos juntos durante o doutorado e desejo estar presente durante vários e vários anos, para escrevermos uma belíssima história juntos. Agradeço o teu apoio, teus abraços e teus sorrisos. Agradeço as conversas e as risadas. Agradeço a leveza e a cumplicidade, meu amor. A caminhada, principalmente na elaboração desta tese, não teria sido a mesma sem você. Se eu puder representar a você 10% do que você representa para mim, serei a pessoa mais grata desse mundo. Eu te amo, pequena. Agradeço também a Midori e o Hércio por estarem presentes numa etapa tão importante da minha vida.

E por último, mas não menos importante, eu gostaria de agradecer a mim. Por ter conseguido fazer ciência, no caos instaurado no Brasil desde 2018, com um agravamento em 2020. Por não ter desistido do sonho de seguir uma carreira como cientista. Por conseguir sair da cama para elaborar experimentos, mesmo quando não existia vontade alguma. Pela persistência (e às vezes teimosia), em tentar entender um resultado quando tudo parecia não fazer sentido. Eu agradeço a mim, ao sorriso no rosto quando as coisas não davam certo. Enfim, aprendi com as adversidades e intempéries e tentei dar o meu melhor, todos os dias. Muito obrigado.

“Os neurônios são as misteriosas borboletas da alma, cujo bater de asas poderá algum dia – quem sabe? - esclarecer os segredos da vida mental!” – Santiago Ramon y Cajal.

RESUMO

BENITES, Nikollas Moreira. O desenvolvimento das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal e os efeitos da privação auditiva precoce de longo prazo no gatilho sensorio motor acústico de camundongos. 2022. 200f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Com o passar dos anos, o mundo tornou-se um lugar onde os seres humanos são expostos a sons de alta intensidade. Os problemas mais comuns associados à exposição a altos níveis de ruído são a perda auditiva, o tinnitus (zumbido) e a hiperacusia. A ausência da experiência sensorial auditiva também pode ocasionar danos ao sistema, como déficits na neurotransmissão das células ciliciadas, e isso pode levar a alterações na percepção sonora. Os primeiros núcleos da via auditiva no tronco cerebral são os núcleos cocleares. Cada núcleo se divide morfológicamente em núcleo coclear dorsal, anteroventral e posteroventral. O núcleo coclear dorsal tem se mostrado crucial para o progresso do tinnitus, pois, os neurônios principais desse núcleo, os neurônios fusiformes, estão hiperativos nessa condição. Uma característica desse neurônio são os dois modos de disparo, o constitutivamente ativo e o silencioso. Esses modos são definidos pela expressão heterogênea de canais iônicos que promovem condutâncias subliminares. Tendo em vista essa heterogeneidade e a importância dela nos modos de disparo, é relevante compreender a expressão dos canais iônicos e como as propriedades biofísicas desse neurônio modulam os fenótipos neuronais. Não se sabe qual o significado dessa heterogeneidade de modos de disparo nem se essa variedade é inata ou se desenvolve antes do início da audição ou resultado da atividade sensorial auditiva. Desta forma, o presente estudo buscou determinar o papel da variação das diferentes correntes iônicas e das propriedades biofísicas no disparo espontâneo das células fusiformes durante o desenvolvimento e estabelecer a influência da estimulação sensorial auditiva no desenvolvimento dessas correntes. Além disso, a privação auditiva de longo prazo afetou os limiares auditivos e a resposta desses animais nos testes do gatilho sensorio motor acústico.

Palavras-chave: Eletrofisiologia. Neurofisiologia. Desenvolvimento. Sistema auditivo. Tinnitus. Análise de componentes principais. PPI. GPIAS. Reflexo do sobressalto.

ABSTRACT

BENITES, Nikollas Moreira. **The development of electrophysiological properties of dorsal cochlear nucleus fusiform neurons and the effects of long-term early auditory deprivation on acoustic sensorimotor gating in mice.** 2022. 200p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Over the years, the world has become a place where humans are exposed to high-intensity sounds. The most common problems associated with the exposure to high intensity sounds are hearing loss, tinnitus and hyperacusis. The absence of auditory sensory stimulation may also cause injuries to auditory system as neurotransmission deficits of hair cells and consequently alterations in sound perception. The first station of auditory system is cochlear nuclei. Each nucleus morphologically divided into dorsal, anteroventral and posteroventral. The dorsal cochlear nucleus a region that has been crucial for the development of tinnitus, which begins with a hyperactivity of the fusiform neurons, the principal neuron of this nucleus. Fusiform cells exist in two intrinsic states in a qualitative way: a non-trigger state and a spontaneous trigger state. These states are determined by the heterogeneous expression of subthreshold ionic currents. In view of this heterogeneity and the importance on the firing mode, it is relevant to understand the expression of the ionic channels of the fusiform neurons and how their biophysical properties determine the neuronal phenotypes. What it is not the meaning of the heterogeneity of shooting modes nor of a thing that is before the beginning of the hearing or the result of the sensory activity. In this way, the study fetched to determine the role of the variations of the different ionic currents and the biophysical properties of the fusiform cells during development and establishment of an auditory stimulation influence in relation to the currents. Furthermore, long-term early deprivation affected the auditory threshold and the sensorimotor gating.

Keywords: Electrophysiology. Neurophysiology. Development. Auditory system. Tinnitus. Principal Component Analysis. Prepulse Inhibition. Gap detection. Startle reflex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O ouvido externo, médio e interno. **A** - A membrana timpânica, presente no final do pavilhão auditivo, vibra em resposta as ondas sonoras captadas pela orelha. Em conjunto, os três ossículos, martelo, bigorna e estribo, conduzem essa vibração até a janela oval, onde a vibração presente no ar é transferida para um meio líquido, no interior da cóclea. **B** - A cóclea é um órgão oco, composto por três câmaras chamadas de escalas. **C** - Da base do estribo na janela oval, até o helicotrema, preenchida com perilinfa, tem-se a escala vestibular. Na parte interior dessa escala encontra-se a membrana de Reissner. Seguindo o helicotrema, tem-se a escala timpânica, que termina na janela redonda. Entre essas duas câmaras, encontra-se a escala média, onde está presente o Órgão de Corti. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.....29

Figura 2 – A membrana basilar. **A** – A partir da vibração do tímpano e dos ossículos, a perilinfa no interior da escala vestibular se movimenta até a escala timpânica. Esse movimento é interrompido pela janela redonda (**C**). **B** – A membrana basilar, presente na escala média é rígida e estreita na porção inicial e vai se tornando frouxa e larga conforme se aproxima do helicotrema. **D** - Essa diferença, torna possível a vibração da membrana basilar em regiões específicas para cada frequência: na porção final, são percebidas frequências baixas ou graves; na medial, frequências médias; e na porção inicial, frequências altas ou agudas. Ou seja, a tonotopia do sistema auditivo inicia-se desde o ouvido interno. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.....31

Figura 3 – O órgão de Corti. **A** - Responsável por traduzir a informação mecânica do som em impulsos elétricos, o órgão de Corti é composto pelas membranas tectórica e basilar, pelas células ciliadas internas e externas, pela membrana e por outros tipos celulares como as células pilares e células de Deiters. A membrana tectórica encosta levemente nas células ciliadas externas, enquanto fica apenas próxima o suficiente das células ciliadas internas, para movimentar a endolinfa ali presente. **B** – Em um experimento, com células ciliadas de sapo, ao forçar os cílios das células ciliadas para os lados, ocorreram alterações no potencial de repouso dessas células. Posteriormente evidenciou-se que a extremidade dos cílios é ligada por uma estrutura proteica em formato de mola (tip link) que abre e fecha canais de

potássio (C), despolarizando e hiperpolarizando as células, respectivamente. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.....32

Figura 4 – A célula ciliada possui uma sinapse em forma de fita. As células ciliadas precisam transmitir a informação acústica de uma maneira rápida e para isso, as vesículas sinápticas se apresentam em regiões de alta densidade eletrônica (A). A informação é transmitida aos neurônios do gânglio espiral, que inervam as células ciliadas de maneiras distintas. Uma célula ciliada interna estabelece sinapses com vários neurônios do gânglio espiral, enquanto várias células ciliadas externas se comunicam com um neurônio bipolar do gânglio. Entretanto, eferências do complexo olivar superior inervam preferencialmente as células ciliadas externas. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.33

Figura 5 – O complexo caminho da informação acústica no sistema nervoso central humano. Há diversos núcleos auditivos, cada um responsável por interpretar características específicas da informação sonora. O estímulo sonoro traduzido na cóclea em informação elétrica, é conduzido até a primeira estação da via auditiva, os núcleos coleares, através do nervo coclear. A segunda estação encontra-se no núcleo olivar superior seguido do núcleo do lemnisco lateral. A próxima sinapse é no colículo inferior e posteriormente no núcleo medial geniculado do tálamo e, finalmente, no córtex auditivo primário. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.35

Figura 6 - Os núcleos auditivos do tronco cerebral inferior bem como os circuitos envolvidos e exemplos de registros eletrofisiológicos dos principais neurônios. Em **A** é sinalizado em vermelho o núcleo coclear anteroventral (aVCN). Em **B**, em amarelo, é sinalizado o núcleo coclear dorsal (DCN) e em verde o núcleo coclear posteroventral (pVCN). Esses núcleos recebem a informação trazida pela porção coclear do VIII nervo craniano, essa formada pelos axônios dos neurônios bipolares presentes no gânglio espiral. Os neurônios do aVCN estabelecem sinapses nos núcleos olivares superior medial ipsilateral (MSO), superior lateral ipsi e contralaterais (LSO) e no núcleo medial do corpo trapezoide contralateral (MNTB), via estria acústica ventral. Além disso, estabelecem sinapse diretamente no lemnisco lateral. As sinapses entre o MNTB e o LSO são glicinérgicas. Todas as outras sinapses representadas são glutamatérgicas. Os principais neurônios do DCN, os neurônios fusiformes, enviam seus axônios via estria acústica dorsal, diretamente ao colículo inferior (IC) contralateral, enquanto a informação do pVCN vai para o lemnisco lateral

e para os núcleos paraolivares superior (SPON), contralaterais. Imagem adaptada de Leão (2019).....37

Figura 7 – O circuito-reflexo primário sobressalto acústico. **A** – Regiões avaliadas no tronco cerebral de ratos. **B** – Quando um estímulo sonoro alto ativa as células ciliadas presentes na cóclea, é deflagrado um forte potencial de ação que consequentemente é transmitido aos neurônios da raiz do nervo coclear (CRNs) rapidamente (~2.2 ms). Esses neurônios estabelecem sinapses em neurônios gigantes do núcleo pontino caudal (PnC) que respondem ~5.2 ms após o estímulo acústico. Esses neurônios enviam seus axônios até neurônios motores inferiores na coluna espinhal e em 6-10 ms após o estímulo, é registrado o potencial eletromiográfico. Adaptado de Gomez-Nieto et al. (2014).41

Figura 8 – Esquema experimental dos testes comportamentais e exemplo de como é inserido o tampão no meato acústico dos animais. Nenhum dos grupos avaliados apresentaram diferenças no peso ao longo dos experimentos.52

Figura 9 – Núcleos auditivos e suas representações nos registros de potencial evocado acústico de tronco encefálico. Em **A**, na parte superior, é mostrado um esquema ilustrativo do ABR. Na parte inferior, são mostradas as ondas do EEG do tronco auditivo após o estímulo acústico de clique e como as ondas foram medidas. Em **B**, os núcleos auditivos e suas representações no ABR. (adaptado de TDT ABR and DPOAE e Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.....53

Figura 10 – Corte de tronco cerebral de camundongo com o cerebelo. A esquerda, é mostrado o tronco cerebral e o cerebelo de um camundongo adulto visto no sentido dorsoventral. A direita, é visualizado no sentido caudal-rostral, a localização do DCN, um pouco abaixo do cerebelo. As imagens foram feitas pelo próprio autor.54

Figura 11 – Exemplo de fatia do tronco cerebral de camundongos contendo núcleo coclear dorsal (DCN). A esquerda, uma imagem representativa retirada do Allen Reference Atlas (<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>), onde é sinalizado em vermelho o DCN e em azul uma parte do VCN, de um camundongo adulto. A direita, uma fatia confeccionada pelo próprio autor, oriunda de um camundongo (21 dias). CB – cerebelo; m – camada molecular; p – camada principal ou fusiforme; d – camada profunda; N.VIII – oitavo par de nervos craniano.55

Figura 12 – Micrografia de um neurônio fusiforme do DCN em uma fatia do tronco cerebral. A esquerda um neurônio fusiforme (Fus) no tecido cerebral. Ao centro,

uma ampliação da primeira imagem (2x) da primeira imagem. Na porção inferior dessa imagem é destacado um capilar sanguíneo com algumas hemácias alinhadas (He). A direita o mesmo neurônio fusiforme pouco tempo antes de da formação do gigaselo com o microeletrodo de vidro. Fotomicrografias capturadas pelo próprio autor.....56

Figura 13 – Parâmetros analisados nos registros de current-clamp nos neurônios fusiformes. HW: halfwidth; Rin_{input ss}: resistência de entrada no estado estacionário; Rin_{input imediata}: resistência de entrada medida no pico da hiperpolarização; t_{membrana}: constante de tempo da membrana; Sag: amplitude da despolarização pós hiperpolarização.58

Figura 14 – Averiguação do canal auditivo dos animais após a retirada do tampão. Na parte superior, fotos tiradas com ajuda de um otoscópio, mostram o canal acústico do animal com um excesso de cera. Na parte inferior, esse mesmo animal, após 24 horas, apresentava o canal auditivo praticamente sem cera em excesso...60

Figura 15 – Esquema do experimento de PPI. **A** – Representação da aclimação seguida da habituação dos animais ao estímulo de maior intensidade. **B** – Representação dos estímulos de PPI e No PPI.....61

Figura 16 – Esquema dos experimentos de GPIAS. **A** – Representação da aclimação seguida da habituação dos animais ao estímulo de maior intensidade nas diferentes frequências. **B** – Representação dos estímulos de GAP e No GAP.....62

Figura 17 – A proporção de neurônios ativos aumenta após a abertura do meato acústico e o início da audição **A** - Respostas auditivas do tronco cerebral de um camundongo P12, P13 e P14. A seta mostra o limiar auditivo. **B** - Limiares auditivos em diferentes idades **C** - A proporção de neurônios ativos aumenta conforme a idade do animal. A caixa cinza representa a fase pré-audição **D**. Potencial de repouso da membrana na presença de TTX. Os círculos azuis claros são dados de neurônios pré-auditivos e círculos escuros de neurônios pós-audição. p <0,05 *, p<0,01 **, p<0.001 ***, p<0.0001 *****.66

Figura 18 – Excitabilidade dos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós-silenciosos são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçados representativos de um neurônio quieto de um camundongo em P10, um neurônio quieto de um camundongo em P20 (azul) e um neurônio ativo (vermelho) de um camundongo da mesma idade. **B** - Número de potenciais de ação disparados a 250 pA. **B'** - Número

de potenciais de ação disparados em resposta a cada injeção de corrente. **C** - Rheobase de neurônios pré e pós auditivos e correlação com a idade (**C'**). **D** - O limiar de atividade e a correlação entre a idade (**D'**). **E** - Diferença entre RMP e limiar de atividade. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.68

Figura 19 - Parâmetros dos potenciais de ação. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçados representativos do potencial de ação dos diferentes estados neuronais. **B** - Amplitude do potencial de ação e correlação com a idade (**B'**). **C** - Halfwidth e correlação com a idade (**C'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.69

Figura 20 - Outros parâmetros do potencial de ação. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - fAHP e correlação com a idade (**A'**). **B** - Latência do potencial de ação e correlação com a idade (**B'**). **C** - Taxa máxima de subida (Max. Rate of Rise) e correlação com a idade (**C'**). **D** - Limiar do potencial de ação e correlação com a idade (**D'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.70

Figura 21 - Propriedades passivas de membrana dos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçados representativos de respostas de neurônios fusiformes a estímulos hiperpolarizantes de camundongos P4 (cinza), P17 (azul) e P20 (vermelho). **B** - Curva VI medida no estado estacionário e no pico da hiperpolarização (**B'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.71

Figura 22 - Outras propriedades passivas de membrana dos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Resistência de membrana ($R_{Input\ ss}$) no estado estacionário e no pico da hiperpolarização ($R_{Input\ instant}$) (**B**) e as respectivas correlações com as idades em **A'** e **B'**. **C** - Constante de tempo da membrana e a correlação com a idade do animal (**C'**). **D** - Sag de despolarização e a correlação com a idade (**D'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0,0001$ ****.72

Figura 23 - I_{NaP} nos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e

neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçado representativo em resposta à despolarização progressiva de -85 mV para -55 mV de um neurônio fusiforme ativo. **B** - Corrente sensível ao TTX subtraída de **A**. **C** - Perfil I-V de -85 mV a -55 mV dos neurônios fusiformes. **D**. Corrente total em -55 mV. **E**. Perfil I-V da corrente sensível ao TTX. **F** - Corrente sensível ao TTX em -55 mV. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****73

Figura 24 – I_H nos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** – Corrente sensível ao ZD7288. **B** – Condutância calculada como o coeficiente angular entre os potenciais -105 e -65 mV. **C** – Valor máximo da corrente sensível medido em -105 mV. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****75

Figura 25 – Perfil I-V da corrente sensível ao Ba^{+2} . Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** – Corrente sensível ao Ba^{+2} 200 μ M em diferentes etapas do desenvolvimento. **B** - Condutância da corrente Ba^{+2} sensível. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****76

Figura 26 - Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** – Perfil I-V da corrente de vazamento resultante após a administração de TTX, ZD e Ba^{+2} . **B** – Condutância da corrente de vazamento. **C** – Corrente medida em -55 mV. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****77

Figura 27 – O perfil V-I dos neurônios fusiformes de animais acusticamente privados, bem como a taxa de disparo neuronal. **A** e **B** – Perfis V-I medidos no estado estacionário e no pico da hiperpolarização. **C** e **D** - Taxa de disparo dos neurônios fusiformes a cada corrente injetada e número de potenciais de ação em 200 pA, respectivamente. $n=4$ para os animais tampão e $n=5$ para os animais controle.82

Figura 28 – Perfis I-V de neurônios fusiformes de animais acusticamente privados. **A** e **B** – I-Vs no estado estacionário e logo após o pulso de voltagem. **C** e **D** – corrente total em -105 mV. $n=6$ para animais do grupo Tampão e Controle.83

Figura 29 – Propriedades de membrana bem como o limiar de atividade não estão alterados nos animais acusticamente privados. **A** e **D** – R_{Input} no estado estacionário e imediata, respectivamente. **B** – Constante de tempo da membrana. **C** – Limiar de atividade. **E** – sag. **F** – Rheobase.84

Figura 30 – Propriedades do potencial de ação apresentam alterações nos animais privados acusticamente. **A** – Amplitude do potencial de ação. **B** – Max. rate of rise. **C** – Limiar do potencial de ação. **D** – Latência do primeiro potencial medido da rheobase. **E** – Halfwidth do potencial de ação. **F** – Hiperpolarização pós potencial de ação. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ *****.85

Figura 31 – Gráfico Scree e participação de cada parâmetro em cada um dos componentes principais. **A** – Gráfico scree mostrando quanto cada componente principal (PC) explica as variações encontradas nos dados. **B** – Contribuição de cada parâmetro nos 13 componentes analisados pela PCA. Cores próximas ao vermelho sugerem maiores contribuições.....86

Figura 32 – O gráfico de PC1 vs. PC2 segrega dois grupos de neurônios: pré e pós audição. **A** - Gráfico de PC1 vs. PC2. Em lilás são representados neurônios pré audição e em vermelho neurônios pós audição. **B** – Gráfico da idade variando ao longo do PC1. Na representação de calor, as células em vermelho são de animais mais jovens, em amarelo idades próximas ao início da audição e em azuis animais mais velhos. **C** – A idade dos animais varia ao longo do PC1. O gráfico acima mostra cada célula identificada com a respectiva idade do animal. Cores próximas ao vermelho indicam animais mais jovens e cores próximas ao azul, animais mais velhos. As idades intermediárias estão próximas da cor amarela.....87

Figura 33 – Resumo das variações ao longo do PC1, primeira parte.....88

Figura 34 - Resumo das variações ao longo do PC1, segunda parte.....88

Figura 35 – Os diferentes grupos segregados na PCA apresentam diferentes idades. **A** – Gráfico PC1 vs. PC2 e os grupos encontrados. **B** – Gráfico em violino evidenciando a diferença entre os diferentes grupos: em vermelho o grupo sinalizado em **A**, presente majoritariamente ao lado direito do gráfico com Max. rate of rise e Amplitude AP sendo os principais vetores; em azul, o grupo sinalizado em **A** contendo Halfwidth, sag, R_{input} no estado estacionário e instantânea; em verde o grupo com os vetores Limiar de atividade, Rheobase, Limiar AP e Latência AP.....89

Figura 36 – Análise de componentes principais de animais pré e pós audição. **A** – PCA de animais pré audição. Em lilás são representados neurônios silentes e em vermelho, ativos. **B** – PCA de animais pós audição. Em lilás são representados neurônios silentes e em vermelho, ativos. Nota-se uma maior proporção de neurônios ativos. **C-D** – Correlograma dos parâmetros avaliados nos animais pré audição e pós

audição respectivamente. Cores próximas ao azul indicam correlações negativas, enquanto cores próximas ao vermelho, correlações positivas.90

Figura 37 – Resumo de todas as informações extraídas pela análise de componentes principais. Em azul são representados neurônios de animais pré audição e em rosa neurônios de animais pós audição.....91

Figura 38 – Limiares auditivos em resposta ao estímulo de click em diferentes idades. **A** – Limiares auditivos antes inserção do tampão, em 14 dias, logo após a inserção do tampão (**B**) e após uma semana do procedimento (limiar medido com a presença do tampão) (**C**). **D** – Limiar após a retirada do tampão, 30 dias após sua inserção. **E** – Limiar auditivo 5 dias após a retirada do tampão. **F** – Variação dos limiares auditivos das diferentes etapas. Nos gráficos de barras: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.....92

Figura 39 – Limiares auditivos em diferentes frequências logo após a retirada do tampão. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.....94

Figura 40 – Amplitude das ondas do ABR em resposta ao estímulo click após uma semana da inserção do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.....95

Figura 41 - Amplitude das ondas do ABR em resposta ao estímulo click logo após a retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.95

Figura 42 - Amplitude das ondas do ABR em resposta ao estímulo click após 5 dias da retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.97

Figura 43 - Latência das ondas do ABR em resposta ao estímulo click em diferentes amplitudes 5 após a retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III,

IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

.....97

Figura 44 – Amplitude e latência das ondas I e II em diferentes frequências, logo após a retirada do tampão. **A** – Amplitude da onda I evidenciando diferenças entre o grupo tampão e os grupos sham e controle em 16 e 24kHz. **B** – A onda II só difere em 8 kHz. Não houve diferenças nas latências tanto para onda I quanto para onda II (**A'**, **B'**).99

Figura 45 – Latência das ondas do ABR em resposta ao estímulo click em diferentes amplitudes uma semana após a inserção do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores..... 100

Figura 46 - Latência das ondas do ABR em resposta ao estímulo click em diferentes amplitudes logo após a retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores. 100

Figura 47 – Traçados de respostas motoras de um animal no teste de PPI. A esquerda, respostas ao estímulo No PPI. A direita, a resposta do reflexo do sobressalto inibida ~80%. 105

Figura 48 - Traçados de respostas motoras de um animal no teste de GPIAS. Respostas do mesmo animal representado na **Figura 43**. Todos os blocos No GAP e GAP estão representados na figura acima, de maneira contínua. A esquerda, respostas ao estímulo No GAP. A direita, a resposta do reflexo do sobressalto inibida nas diferentes frequências. 105

Figura 49 – O reflexo do sobressalto é menor e a latência maior nos animais que foram privados acusticamente. **A** – Média das respostas do reflexo do sobressalto dos 5 estímulos, após a aclimação e o primeiro reflexo do sobressalto, com suas respectivas latências (**A'**), nos testes de PPI e GPIAS. **B** – Média das respostas do reflexo do sobressalto do blocos No PPI e No GAP_{WN} e suas respectivas latências (**B'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os triângulos representam animais fêmeas. 107

Figura 50 – O reflexo do sobressalto pode ser afetado pela frequência do som de fundo, parte 1. **A** – Todos os 6 estímulos dos animais do grupo tampão após a aclimação são diferentes dos outros grupos, quando o som de fundo é WN, incluindo a latência do primeiro estímulo (**D**). **B** – Já em 4 kHz de som de fundo, não ocorrem tantas diferenças, com exceção do primeiro estímulo, e a latência no primeiro estímulo não apresentou diferenças significativas (**E**). **C, F** – Nenhuma diferença foi encontrada tanto nos pulsos quanto na latência em 10kHz. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores. Os triângulos representam animais fêmeas..... 107

Figura 51 - O reflexo do sobressalto pode ser afetado pela frequência do som de fundo, parte 2. **A** – Em 16kHz, os dois primeiros estímulos são diferentes nos animais tampão, mas com nenhuma diferença nas latências do primeiro reflexo do sobressalto (**C**). **B** – Em 20kHz não há diferenças significativas, tanto para o reflexo do sobressalto quanto para a latência do primeiro reflexo (**D**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores. Os triângulos representam animais fêmeas..... 109

Figura 52 – Os animais que foram privados acusticamente apresentam o gatilho sensorio motor acústico, avaliado pelos testes de PPI e GPIAS, alterado. **A** – Os animais do grupo tampão apresentam um menor PPI quando comparados entre os grupos sham e controle. Em **B** e **F** os animais do grupo tampão apresentaram diferenças no teste de GPIAS apenas em comparação com os animais controles nos estímulos em WN e 20kHz. Em **C** e **E** os animais do grupo tampão apresentaram diferenças significativas em comparação aos grupos controle e sham em estímulos de 4 e 16 kHz. **D** – O teste GPIAS em 10kHz não apresentou nenhuma diferença estatística. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os triângulos representam animais fêmeas. 111

Figura 53 – As latências no reflexo do sobressalto são mais lentas em animais privados acusticamente. Em todas as frequências avaliadas, a latência foi maior nos animais do grupo tampão em comparação aos controles e aos animais sham. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os triângulos representam animais fêmeas. 113

Figura 54 – As latências do reflexo do sobressalto não apresentam diferenças quando o estímulo apresenta um pré-pulso, seja ele de som ou de silêncio, com exceção do GAP_{WN} (**B**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os triângulos representam animais fêmeas. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pós testes LSD de Fisher ANOVA.	78
Tabela 2 - Dados estatísticos das correlações.....	80
Tabela 3 – Resumo estatística da amplitude Onda I do ABR nos testes com clicks, após a retirada do tampão.....	96
Tabela 4 – Resumo estatístico da amplitude da Onda IV do ABR do teste com clicks, após a retirada do tampão.....	96
Tabela 5 – Resumo estatístico da amplitude das Ondas I e II do ABR com tons puros, após a retirada do tampão, em 70dB..	98
Tabela 6 - Resumo estatístico da latência das Ondas I e II do ABR em resposta aos clicks, uma semana após a inserção do tampão.	101
Tabela 7 – Resumo estatístico da latência das Ondas III e IV do ABR em resposta aos clicks, uma semana após a inserção do tampão..	102
Tabela 8 – Resumo estatístico da latência das Ondas I e II do ABR em resposta aos clicks, após a retirada do tampão.....	103
Tabela 9 – Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das amplitudes e latências do reflexo do sobressalto.	106
Tabela 10 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das amplitudes na habituação em 4kHz	108
Tabela 11 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das amplitudes na habituação em 16kHz	110
Tabela 12 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das latências dos testes NoGAP em 4, 10, 16 e 29 kHz.....	114
Tabela 13 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das latências dos testes PPI e GAP em WN, 4, 10, 16 e 29 kHz.....	115

SÚMARIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	24
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 <i>O processamento auditivo pela cóclea</i>	28
1.2 <i>Os núcleos auditivos do sistema nervoso central e a divisão dos núcleos cocleares... ..</i>	34
1.3 <i>Desenvolvimento neuronal dos canais iônicos</i>	38
1.4 <i>O desenvolvimento dos neurônios do troco cerebral auditivo e os efeitos da privação acústica</i>	39
1.5 <i>O circuito do reflexo acústico do sobressalto</i>	40
1.6 <i>O gatilho sensorio acústico e a modulação do ASR por pré-pulso de som e ausência de som</i>	42
1.7 <i>A privação auditiva precoce reversível e seu papel no ASG</i>	44
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 <i>Animais.....</i>	51
3.2 <i>Potencial evocado acústico do tronco encefálico</i>	52
3.3 <i>Obtenção das fatias contendo o núcleo coclear dorsal (DCN).....</i>	54
3.4 <i>Eletrofisiologia.....</i>	55
3.5 <i>Análise dos dados eletrofisiológicos</i>	57
3.6 <i>Avaliação do reflexo do sobressalto e sua inibição por pré-pulso de som e por ausência de som (PPI e GPIAS)</i>	59
3.7 <i>Análise dos dados da privação auditiva.....</i>	62
4. RESULTADOS	65
4.1 <i>A proporção de neurônios ativos aumenta após a abertura do meato acústico e o início da audição.....</i>	66

4.2 Neurônios pós audição são mais excitáveis em comparação a neurônios silentes pré audição.....	68
4.3 Os potenciais de ação são mais rápidos e maiores conforme a idade do animal.....	69
4.4 Propriedades passivas e subliminares da membrana de neurônios fusiformes mudam durante o desenvolvimento.....	71
4.5 A corrente de sódio persistente (I_{NaP}) se desenvolve durante o período pós-audição e cria os estados ativo e silente.....	73
4.6 A condutância da corrente H é maior em neurônios fusiformes imaturos em comparação aos neurônios ativos.....	75
4.7 O perfil I/V das correntes de potássio retificadoras de entrada (KIR).....	76
4.8 As correntes de vazamento sugerem um componente de potássio maior nos neurônios fusiformes de animais mais jovens.....	77
4.9 A privação auditiva de curto prazo pode alterar propriedades eletrofisiológicas do neurônio fusiforme do DCN.....	82
4.10 A análise de componentes principais sugere que os parâmetros eletrofisiológicos sejam diferentes entre as fases pré e pós-auditiva.....	85
4.11 O tampão aumenta os limiares auditivos dos animais em resposta aos clicks.....	92
4.12 A amplitude e a latência das ondas do ABR são diferentes nos animais acusticamente privados.....	94
4.13 O reflexo do sobressalto acústico dos animais é afetado pela privação auditiva.....	104
4.14 Animais acusticamente privados apresentam um PPI menor e um GPIAS menor em diferentes frequências.....	111
4.15 As latências do sobressalto apresentam comportamentos diferentes quando os animais são pré estimulados.....	112
5. DISCUSSÃO	117
5.1 As propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes de camundongos se desenvolvem ao longo dos dias pós-natais.....	118
5.2 Os potenciais de ação dos neurônios fusiformes são afetados pela privação precoce acústica de curto prazo.....	123
5.3 A privação acústica de longo prazo altera o funcionamento do gatilho sensorio motor acústico dos camundongos.....	125
6. CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

ANEXO A – ARTIGO RELACIONADO À TESE	146
Abstract	148
Introduction.....	149
Materials and Methods.....	151
Results.....	154
Discussion.....	160
Conclusion	164
REFERENCES	166
ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS NÃO RELACIONADOS À TESE	181

1. INTRODUÇÃO

1.1 O processamento auditivo pela cóclea

O som é a propagação de uma onda mecânica que promove compressões e rarefações alternadas em um meio elástico, em uma velocidade de aproximadamente 340 m/s, no ar. As três divisões do ouvido, externo, médio e interno, são responsáveis por decodificar a informação presente nesse complexo ondulatório, e promover o sentido da audição. A detecção sonora se inicia no ouvido externo. Nos mamíferos e em grande parte dos vertebrados, é possível visualizar uma estrutura de pele e cartilagem, geralmente lateralizada, no alto da cabeça, onde nos humanos é chamada de orelha ou aurícula (Kandel et al., 2021; Robles & Ruggero, 2001). A orelha capta e conduz a onda sonora até a membrana timpânica, situada no final no canal auditivo. A conexão entre o ouvido externo e o interno é dada por uma câmara preenchida por ar onde situam-se os três ossículos do ouvido médio: martelo, bigorna e estribo. O ouvido médio é conectado a faringe pela trompa de Eustáquio. Essa conexão é essencial para uma transmissão adequada do som, pois, devido a ela, é possível equalizar as pressões no ouvido externo e médio. Ao vibrar em resposta ao estímulo acústico, a membrana timpânica movimentada a base do martelo, que por sua vez, transmite a informação a bigorna e ao estribo, nessa ordem. A base do estribo é conectada ao ouvido interno pela janela oval, uma abertura presente na cóclea (figura 1A) (Robles & Ruggero, 2001).

Após ser captada e transmitida ao ouvido médio, a informação acústica chega ao ouvido interno. Entra em cena a personagem principal do processamento auditivo: a cóclea. Com o formato que remete a concha de um caracol (do Grego *cochlos*, caracol), a cóclea é um órgão oco de aproximadamente 9 mm de diâmetro que repousa no interior do osso temporal (figura 1B). Seu interior é dividido em 3 câmaras chamadas de escalas preenchidas por líquido, a perilinfa ou a endolinfa (figura 1C) (Kandel et al., 2021; Robles & Ruggero, 2001). Essas escalas afunilam-se da base até o ápice. A escala que recebe a informação do ouvido médio, a partir da vibração da base do estribo na janela oval, é a escala vestibular. A vibração viaja pela perilinfa até o ápice da cóclea, o helicotrema (figura 1B, 2A). Nessa região, a escala vestibular une-se a outro compartimento, a escala timpânica, e o movimento ondulatório encerra-se na janela redonda (figura 1B, 2A). Entre as escalas vestibular e timpânica,

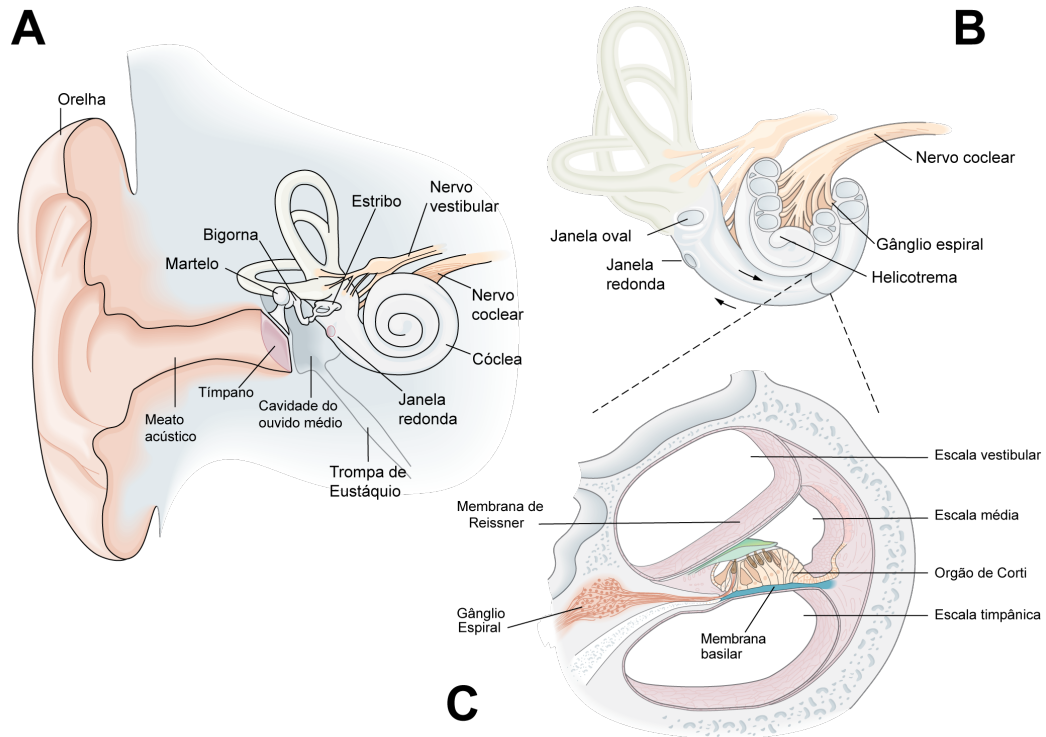


Figura 1 – O ouvido externo, médio e interno. **A** - A membrana timpânica, presente no final do pavilhão auditivo, vibra em resposta as ondas sonoras captadas pela orelha. Em conjunto, os três ossículos, martelo, bigorna e estribo, conduzem essa vibração até a janela oval, onde a vibração presente no ar é transferida para um meio líquido, no interior da cóclea. **B** - A cóclea é um órgão oco, composto por três câmaras chamadas de *escalas*. **C** - Da base do estribo na janela oval, até o helicotrema, preenchida com perilinfa, tem-se a escala vestibular. Na parte interior dessa escala encontra-se a membrana de Reissner. Seguindo o helicotrema, tem-se a escala timpânica, que termina na janela redonda. Entre essas duas câmaras, encontra-se a escala média, onde está presente o Órgão de Corti. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.

separadas pelas membranas de Reissner e a membrana basilar, respectivamente, há um terceiro compartimento, a escala média (figura 1C). Essa câmara é preenchida com endolinfa, um meio líquido rico em íons potássio. Na escala média, sobre a membrana basilar, situa-se o órgão de Corti, responsável por converter a informação mecânica ondulatória em informação elétrica ao gânglio espiral (figura 1B, C, 3). A partir deste ponto, os impulsos elétricos são conduzidos pela porção coclear do oitavo par de nervos cranianos, o nervo vestibulococlear, para então ser processada pelo sistema nervoso auditivo central (Kandel et al., 2021; Robles & Ruggero, 2001).

Para transduzir o som, a cóclea atua como uma espécie de “piano invertido”. As notas musicais possuem frequências específicas. No teclado do piano, por exemplo, as notas graves, com uma frequência mais baixa, estão situadas ao lado esquerdo. A cada tecla tocada à direita, a frequência aumenta e o som percebido é

cada vez mais agudo. A membrana basilar funciona como o teclado de um piano: responde a frequências específicas em diferentes regiões anatômicas ordenadamente, ao longo de todo o seu comprimento, de aproximadamente 33 mm em humanos (figura 2B, C). O ouvido interno humano é capaz de perceber frequências entre 20 Hz e 20 kHz, e essa divisão separada por frequências chama-se tonotopia e é mantida até o processamento auditivo pelo córtex cerebral. Diferentemente do piano, se fosse possível desenrolar a cóclea, as frequências altas seriam “tocadas” a esquerda e as baixas a direita na membrana basilar (figura 2D). Isso é possível, pois as propriedades mecânicas e elásticas da membrana basilar se diferem da base ao ápice da cóclea: na base a membrana é rígida e estreita e no ápice, frouxa e larga (figura 2B). Ao tocar pelo menos 3 notas específicas harmonicamente no piano, forma-se um som complexo chamado acorde. A membrana basilar desconstrói essa complexidade e vibra especificamente em cada uma das notas que formam o determinado acorde (figura 2D). O fisiologista alemão Hermann von Helmholtz foi o primeiro a comparar a cóclea a um piano invertido, em 1885. Entre 1940 e 1960, químico alemão, Georg von Békésy, fez uma série de experimentos que evidenciaram o funcionamento do ouvido interno e como a membrana basilar se comportava. Em 1961, Békésy foi laureado com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina “pelas suas descobertas sobre o mecanismo físico da estimulação dentro da cóclea”(Kandel et al., 2021; Robles & Ruggero, 2001).

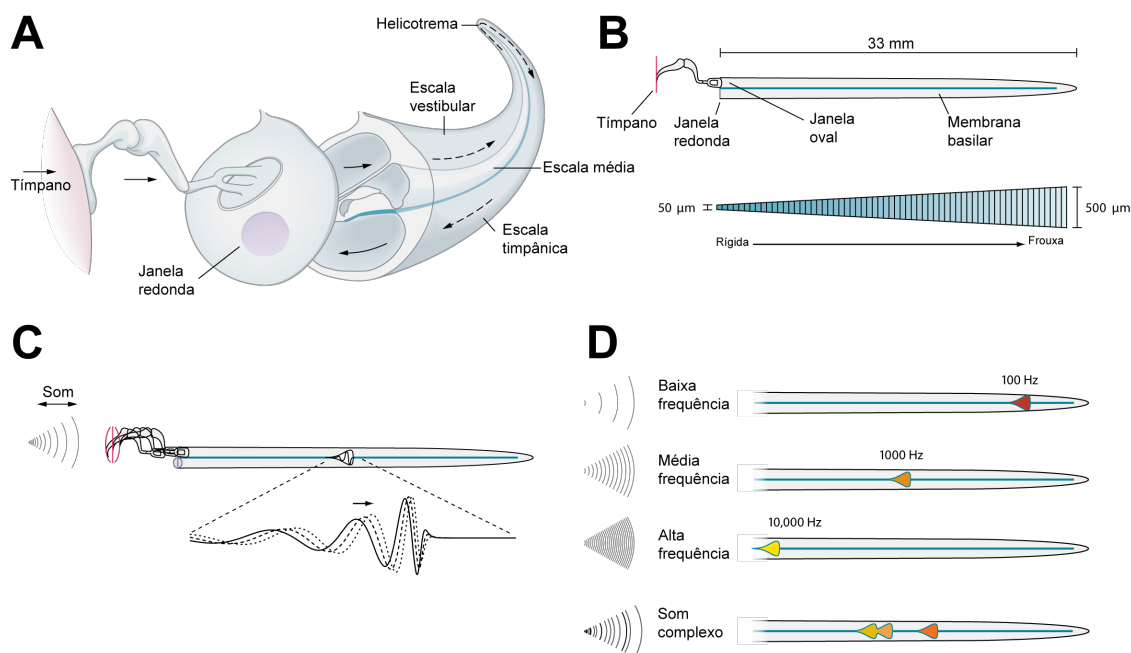


Figura 2 – A membrana basilar. **A** – A partir da vibração do tímpano e dos ossículos, a perilinfa no interior da escala vestibular se movimentada até a escala timpânica. Esse movimento é interrompido pela janela redonda (**C**). **B** – A membrana basilar, presente na escala média é rígida e estreita na porção inicial e vai se tornando frouxa e larga conforme se aproxima do helicotrema. **D** - Essa diferença torna possível a vibração da membrana basilar em regiões específicas para cada frequência: na porção final, são percebidas frequências baixas ou graves; na medial, frequências médias; e na porção inicial, frequências altas ou agudas. Ou seja, a tonotopia do sistema auditivo inicia-se desde o ouvido interno. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.

Ao longo de toda a membrana basilar situa-se o órgão de Corti (figura 3A). Os constituintes dessa estrutura são: as células ciliadas internas e externas e células de suporte como as de Deiters e as pilares. Em cada órgão de Corti existem cerca de 3500 células ciliadas internas e 12000 células ciliadas externas, organizadas de maneira distinta. As células ciliadas internas situam-se próximas ao eixo central da cóclea distribuídas em linha enquanto as células ciliadas externas ficam um pouco afastadas do eixo central e são distribuídas em três camadas (figura 3A). Conectada ao eixo central da cóclea, acima dos cílios das células, cobrindo todo o órgão de Corti, encontra-se a membrana tectórica. Essa estrutura conecta-se levemente aos cílios das células ciliadas externas e se mantém intimamente próxima as células ciliadas internas. Ao vibrar em áreas específicas, a membrana basilar movimentada o órgão de Corti, também em regiões específicas (Robles & Ruggero, 2001). Esse movimento faz com que os cílios das células externas, que tocam a membrana tectórica, se locomovam. Os cílios das células ciliadas internas não encostam na membrana

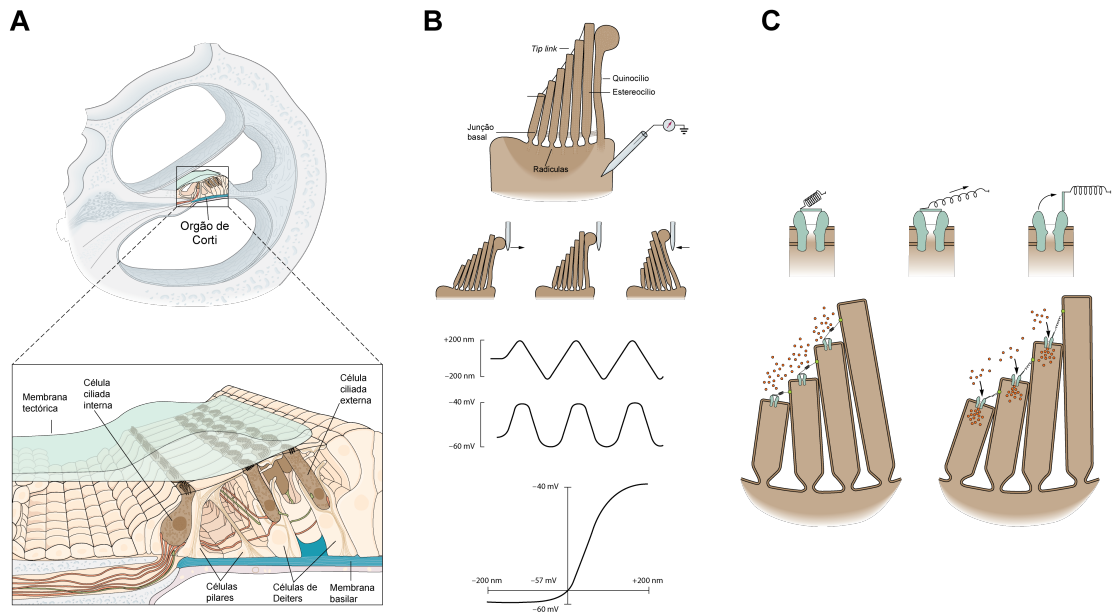


Figura 3 – O órgão de Corti. **A** - Responsável por traduzir a informação mecânica do som em impulsos elétricos, o órgão de Corti é composto pelas membranas tectórica e basilar, pelas células ciliadas internas e externas, pela membrana e por outros tipos celulares como as células pilares e células de Deiters. A membrana tectórica encosta levemente nas células ciliadas externas, enquanto fica apenas próxima o suficiente das células ciliadas internas, para movimentar a endolinfa ali presente. **B** – Em um experimento com células ciliadas de sapo, ao forçar os cílios das células ciliadas para os lados, ocorreram alterações no potencial de repouso da membrana dessas células. Posteriormente evidenciou-se que a extremidade dos cílios é ligada por uma estrutura proteica em formato de mola (*tip link*) que abre e fecha canais de potássio (**C**), despolarizando e hiperpolarizando as células, respectivamente. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.

tectórica. Entretanto, por estarem muito próximas, o movimento da endolinfa entorno da membrana tectórica, na região excitada pela onda sonora, movimenta os cílios dessas células. Ou seja, os cílios se comportam como uma espécie de antena, que capta o movimento mecânico da endolinfa, ou no caso das células ciliadas externas, do órgão de Corti encostando na membrana tectórica. Ancorado no topo de cada cílio e conectando uns aos outros, lateralmente, encontra-se uma espécie de fio proteico (*tip link*) (figura 3B, C)(Assad et al., 1991; Jacobs & Hudspeth, 1990). Em uma ponta do fio situa-se o gatilho de canais catiônicos. O movimento dos cílios estica ou encolhe mecanicamente esse fio que abre ou fecha esses canais. Ao abrir, o fluxo de cátions, principalmente os de potássio, para o interior das células promove uma despolarização e conseqüentemente o disparo de um potencial de ação. De maneira basal, entre 10 e 50% desses canais estão abertos. Devido a isso, em resposta ao estímulo acústico, o potencial de membrana das células ciliadas pode variar de -70 a -30 mV.

Na porção basolateral das células ciliadas ocorrem as sinapses com os axônios dos neurônios bipolares do gânglio espiral. Nessa região, as sinapses são em formato de fita (*ribbon synapse*), uma especialização para a transmissão rápida da informação (figura 4A). As fibras aferentes do gânglio espiral inervam as células ciliadas de maneira distinta. Aproximadamente 90% dessas fibras terminam nas células ciliadas internas, onde cada axônio inerva uma única célula ciliada interna. Contudo, cada célula ciliada estabelece sinapse com cerca de 10 neurônios. O principal fator dessa característica vem do fato de que praticamente toda a informação neural auditiva se origina nas células ciliadas internas. Essa inervação também facilita a continuação da tonotopia coclear. Além disso um único receptor transmite a informação por diversas vias em paralelo (figura 4B). Há poucas sinapses aferentes entre as células do gânglio espiral e as células ciliadas externas. No entanto, essas células recebem informações eferentes de diversas regiões cerebrais e atuam regulando o ganho da cóclea e estão estritamente relacionadas com as emissões otoacústicas.

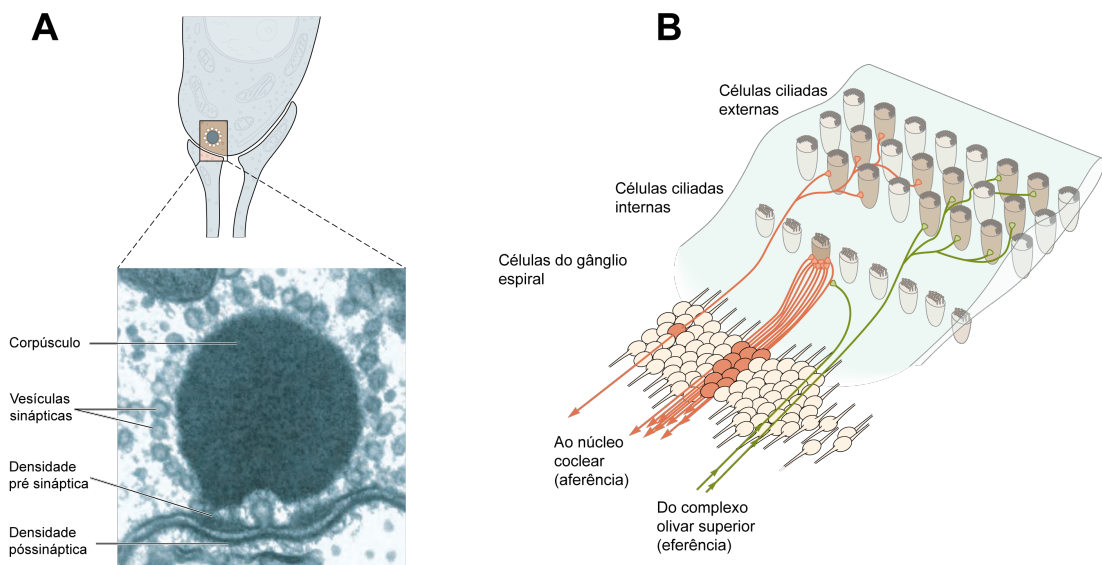


Figura 4 – A célula ciliada possui uma sinapse em forma de fita. As células ciliadas precisam transmitir a informação acústica de uma maneira rápida e para isso, as vesículas sinápticas se apresentam em regiões de alta densidade eletrônica (A). A informação é transmitida aos neurônios do gânglio espiral, que inervam as células ciliadas de maneiras distintas. Uma célula ciliada interna estabelece sinapses com vários neurônios do gânglio espiral, enquanto várias células ciliadas externas se comunicam com um neurônio bipolar do gânglio. Entretanto, eferências do complexo olivar superior inervam preferencialmente as células ciliadas externas. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.

1.2 Os núcleos auditivos do sistema nervoso central e a divisão dos núcleos cocleares

A informação auditiva sensorial processada na cóclea é transmitida aos núcleos auditivos superiores pela porção coclear do nervo vestibulococlear (figura 5). Os núcleos cocleares são divididos entre dorsal, anterovetral e posteroventral e é a primeira estação central do sistema auditivo (figura 6). O núcleo coclear dorsal (DCN) é responsável por integrar a informação acústica advinda da cóclea com informações sensoriais multimodais que chegam de diversas regiões cerebrais (Fujino & Oertel, 2003; Oertel & Young, 2004a; Pilati et al., 2012a). Em conjunto, as vias neurais dessa região estão envolvidas na detecção de dicas espectrais para auxiliar a localização da origem de sons do plano vertical e ainda filtrar os sons gerados pelo próprio organismo (May, 2000; Oertel & Young, 2004b; S. E. Shore & Zhou, 2006; Singla et al., 2017; Young & Davis, 2002). O neurônio responsável por integrar as aferências ao DCN e conduzir a informação acústica até o colículo inferior é o neurônio fusiforme (Cant & Benson, 2003). Algumas vezes chamados de piramidais, os neurônios fusiformes possuem um

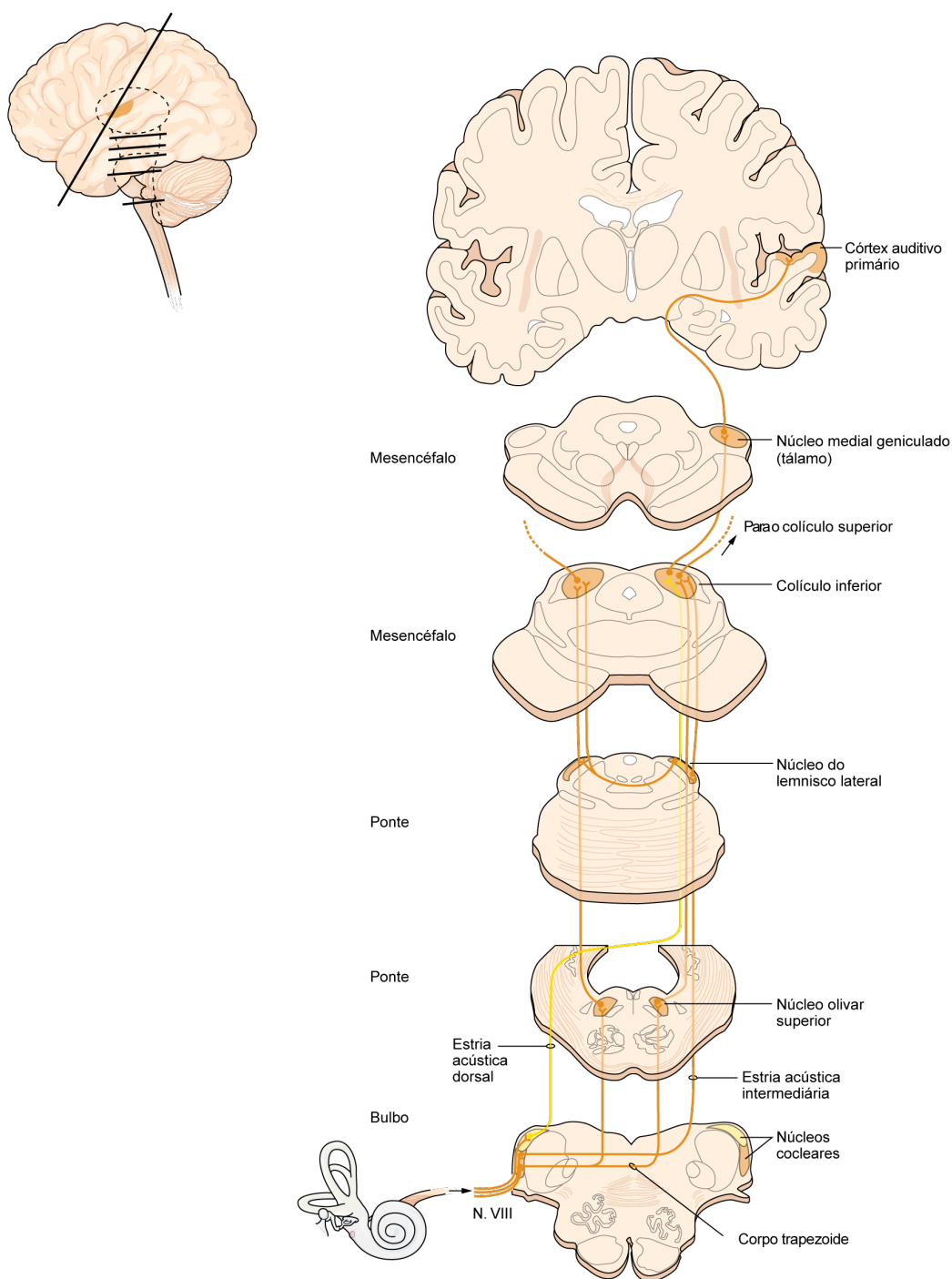


Figura 5 – O complexo caminho da informação acústica no sistema nervoso central humano. Há diversos núcleos auditivos, cada um responsável por interpretar características específicas da informação sonora. O estímulo sonoro traduzido na cóclea em informação elétrica, é conduzido até a primeira estação da via auditiva, os núcleos cocleares, através do nervo coclear. A segunda estação encontra-se no núcleo olivar superior seguido do núcleo do lemnisco lateral. A próxima sinapse é no colículo inferior e posteriormente no núcleo medial geniculado do tálamo e, finalmente, no córtex auditivo primário. Adaptado de Princípios de Neurociências, Kandel, 6ed. 2021.

padrão de disparo regular quando estimulados por correntes despolarizantes constantes (figura 6). Essa característica os diferencia de outros tipos neuronais do DCN (Pilati et al., 2012b). Outra característica dos neurônios fusiformes é o disparo de potenciais de ação de maneira espontânea, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Hancock & Voigt, 2002; Manis, 1990; Parham & Kim, 1992). Em estudos prévios, foi demonstrado que esses neurônios com disparo espontâneo de potenciais de ação, chamados de ativos, estavam em praticamente iguais proporções com neurônios que não apresentavam esse comportamento, os neurônios silentes (Ceballos et al., 2016; R. Leão et al., 2012; Zugaib et al., 2016).

O estado ativo do neurônio fusiforme é comandado pela expressão de uma corrente de sódio persistente (I_{NaP}) e de condutâncias de potássio retificadoras de entrada (I_{KIR}), que aproximam o potencial de membrana do limiar do potencial de ação (Ceballos et al., 2016; R. Leão et al., 2012). Ao inibir a I_{NaP} com riluzol, os disparos espontâneos dos neurônios fusiformes foram abolidos, e isso demonstra a dependência dessa corrente para a existência do estado ativo do neurônio fusiforme, mesmo que seja a I_{KIR} que determina esses dois tipos neuronais (R. Leão et al., 2012). A importância do estado ativo está no chamado alcance dinâmico, que permite que neurônios possam diminuir a taxa de disparo em resposta à estimulação acústica (Young & Davis, 2002). A diminuição da taxa de disparo está relacionada com as sinapses inibitórias entre neurônios fusiformes e neurônios *cartwheel* bem como neurônios tubérculoventrais.

Contudo, a origem desses dois estados e como eles se desenvolvem não é compreendida.

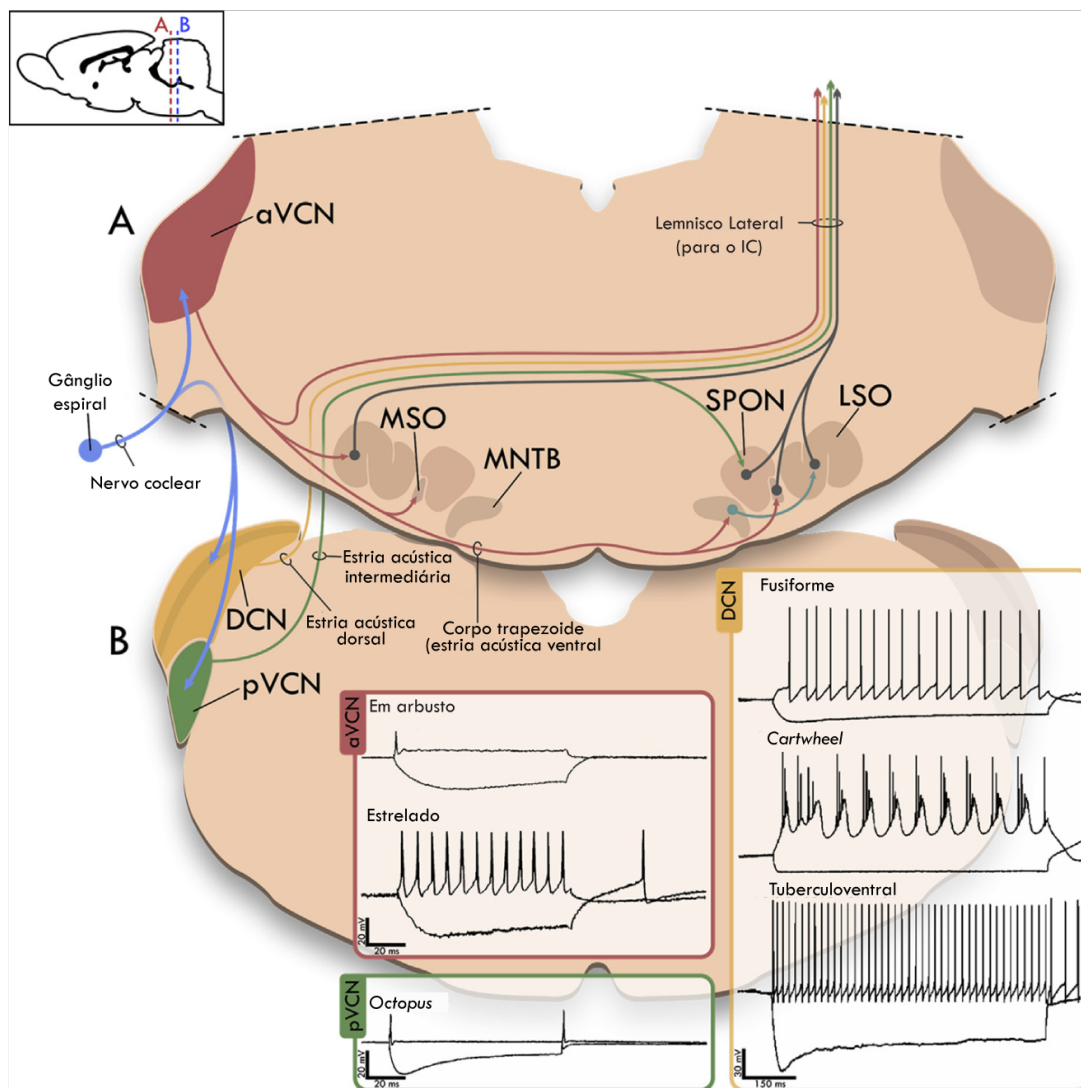


Figura 6 - Os núcleos auditivos do tronco cerebral inferior bem como os circuitos envolvidos e exemplos de registros eletrofisiológicos dos principais neurônios. Em **A** é sinalizado em vermelho o núcleo coclear anteroventral (aVCN). Em **B**, em amarelo, é sinalizado o núcleo coclear dorsal (DCN) e em verde o núcleo coclear posteroventral (pVCN). Esses núcleos recebem a informação trazida pela porção coclear do VIII nervo craniano, essa formada pelos axônios dos neurônios bipolares presentes no gânglio espiral. Os neurônios do aVCN estabelecem sinapses nos núcleos olivares superior medial ipsilateral (MSO), superior lateral ipsi e contralaterais (LSO) e no núcleo medial do corpo trapezoide contralateral (MNTB), via estria acústica ventral. Além disso, estabelecem sinapse diretamente no lemnisco lateral. As sinapses entre o MNTB e o LSO são glicinérgicas. Todas as outras sinapses representadas são glutamatérgicas. Os principais neurônios do DCN, os neurônios fusiformes, enviam seus axônios via estria acústica dorsal, diretamente ao colículo inferior (IC) contralateral, enquanto a informação do pVCN vai para o lemnisco lateral e para os núcleos paraolivares superior (SPON), contralaterais. Imagem adaptada de Leão (2019).

1.3 Desenvolvimento neuronal dos canais iônicos

Os neurônios maduros do sistema nervoso central apresentam uma atividade eletrofisiológica diferente daquela apresentada durante o desenvolvimento neuronal, pois algumas propriedades biofísicas, como dependência de voltagem e cinética de alguns canais iônicos, bem como a expressão de certas subunidades auxiliares (Moody & Bosma, 2005), permanecem em constante mudança durante o desenvolvimento. Conseqüentemente, o comportamento, seja intrínseco do neurônio ou da rede neuronal da qual ele faz parte, é divergente em muitos casos. Entretanto, ainda é pouco compreendido como condutâncias subliminares estabelecem diferentes estados e/ou tipos neuronais. Por exemplo, diversos tipos de neurônios disparam potenciais de ação espontaneamente durante o período embrionário e nos primeiros dias de vida do animal, mas essa atividade cessa na fase adulta. Somado a isso, em regiões como a retina e os núcleos cocleares, algumas condutâncias de sódio e potássio presentes em neurônios imaturos desaparecem na vida adulta (Marcotti et al., 1999; Moody & Bosma, 2005; Zhou & Fain, 1996).

Um dos principais fatores que determinam as mudanças na expressão de canais iônicos é o nível intracelular de íons Ca^{+2} , o qual é dependente da atividade neuronal (O'Leary et al., 2014). A elevação da taxa de disparo dos neurônios leva ao aumento do cálcio intracelular, pois, canais permeáveis a cálcio são abertos durante o potencial de ação. Desse modo, o acúmulo de cálcio intracelular durante o desenvolvimento pode ser modulado pelas propriedades biofísicas intrínsecas do neurônio e pela atividade sináptica. Alguns receptores ionotrópicos podem aumentar o cálcio intracelular, da mesma forma que receptores metabotrópicos ao liberarem o cálcio contido nos estoques intracelulares (Brager & Johnston, 2007).

Há algumas questões referentes a aspectos do desenvolvimento da atividade elétrica de neurônios. Uma delas está relacionada com os mecanismos que controlam a expressão dos canais iônicos em neurônios e que levam ao estabelecimento dos fenótipos neuronais (Dufour et al., 2014). Algumas características determinantes dos fenótipos neuronais como o padrão de disparo, resistência de membrana, constante de tempo da membrana, forma do potencial de ação, são estritamente dependentes da expressão desses canais. Sabe-se que a expressão de vários canais é correlacionada, de modo que o aumento da expressão de um canal pode levar ao

aumento ou diminuição simultânea de outro canal, o que exige o registro simultâneo das correntes na mesma célula (Ceballos et al., 2016; Milstein et al., 2012). Essa expressão é modulada apenas pelo conteúdo genético ou a experiência sensorial pode atuar como determinante nessa expressão?

1.4 O desenvolvimento dos neurônios do tronco cerebral auditivo e os efeitos da privação acústica

Os neurônios do tronco cerebral auditivo apresentam várias mudanças fisiológicas e morfológicas no período pós-natal, culminando entorno de 12 a 14 dias de vida, coincidindo com a abertura do meato acústico e o início da audição. Uma região que foi extensivamente estudada nos últimos 20 anos foi o núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB) e seu terminal pré sináptico, o cálice de Held, de ratos e camundongos. Experimentos nessa região mostram que os neurônios do MNTB e o cálice de Held apresentam mudanças profundas em suas propriedades biofísicas. Por exemplo uma cinética mais rápida da ativação e inativação de correntes de sódio pré-sinápticas, nos dias que precedem a audição, o que leva a potenciais de ação pré-sinápticos mais rápidos (R. M. Leão et al., 2005; Taschenberger & von Gersdorff, 2000). Além disso, os terminais caliceais progressivamente melhoram sua habilidade em disparar potenciais de ação em alta frequência, sem apresentar falhas, uma consequência da rápida recuperação da inativação desses canais (R. M. Leão et al., 2005; Taschenberger & von Gersdorff, 2000). Há também mudanças na estrutura dos terminais do Cálice de Held. As vesículas sinápticas apresentam-se mais próximas aos canais de cálcio dependentes de voltagem e isso possibilita uma maior probabilidade de excitação em resposta a abertura desses canais após a chegada de potenciais de ação pré-sinápticos (R. M. Leão & von Gersdorff, 2009a; Taschenberger et al., 2002).

Como mencionado essas alterações ocorrem antes da abertura do meato auditivo e sugerem uma pré programação celular não mediada pela experiência sensorial. Entretanto, a privação acústica é conhecida por causar mudanças sutis, mas essenciais, na excitabilidade e na neurotransmissão entre os neurônios *bushy* globulares, localizados no núcleo coclear anteroventral (aVCN) e no MNTB (Clarkson et al., 2016; Grande et al., 2014; R. M. Leão et al., 2005; Leao et al., 2004; Zhuang et

al., 2017a). Sendo assim, mudanças provocadas pela experiência sensorial são relevantes na sintonia fina do processamento auditivo.

1.5 O circuito do reflexo acústico do sobressalto

O conhecimento de quais são as regiões envolvidas no circuito do reflexo acústico do sobressalto (*acoustic startle reflex* ASR) foi se desdobrando ao longo dos anos. Esse reflexo atua como um mecanismo de defesa e alerta contra possíveis agressores ou eventos inesperados, e pode recrutar até mesmo os sistemas cardiovascular e respiratório (Keay et al., 1988). Suspeita-se que o circuito do ASR esteja presente em praticamente todos os mamíferos. Isso permite comparar o comportamento nas mais variadas espécies (Davis, 1984; Dodge & Loutit, 1926; Fleming, 1939; Lemvigh et al., 2020; Rosing et al., 2016).

Trabalhos iniciais propuseram um circuito primário para o ASR após lesionarem e estimularem diferentes regiões cerebrais (Davis et al., 1982; Kandler & Herbert, 1991; Lingenhöhl & Friauf, 1994; Pellet, 1990; Prosser & Hunter, 1936; Yeomans & Frankland, 1995). A primeira estação sugerida do circuito seria o núcleo coclear, com foco no posteroventral (pVCN), pois, ao lesionarem a região bilateralmente, o sobressalto em resposta ao estímulo acústico foi abolido (Davis et al., 1982). A região dorsal e ventral do núcleo do lemnisco lateral foi sugerida como a segunda sinapse devido à ausência de reflexo após a lesão bilateral (Davis et al., 1982). No entanto, alguns autores não associavam isoladamente o núcleo do lemnisco e sim a região da ponte ventrolateral (Yeomans & Frankland, 1995). A próxima sinapse proposta ocorreria na formação reticular da ponte, na região do núcleo reticular pontino caudal (PnC), onde os corpos celulares de neurônios gigantes projetam axônios e formam o trato reticuloespinal. Esse trato atravessa o fascículo medial longitudinal e se bifurca para então formar o funículo ventral e estabelecer a última sinapse nos neurônios motores inferiores na medula espinhal (Davis et al., 1982). Suspeitava-se que ocorresse uma sinapse direta dos núcleos cocleares para o núcleo reticular pontino caudal e deste para motoneurônios espinhais (Yeomans & Frankland, 1995). Com base em todos esses estudos iniciais, e pelos mesmos terem algumas limitações, como áreas de lesões maiores que o necessário, foi proposto um modelo de circuito que envolve principalmente três regiões e seus respectivos neurônios: os neurônios

da raiz do nervo coclear, os neurônios gigantes no PnC e por fim, os motoneurônios localizados na medula espinhal (Gómez-Nieto et al., 2014; Y. Lee et al., 1996) (figura 7). No entanto, o núcleo reticulotegmental, na formação reticular da ponte, exerce um

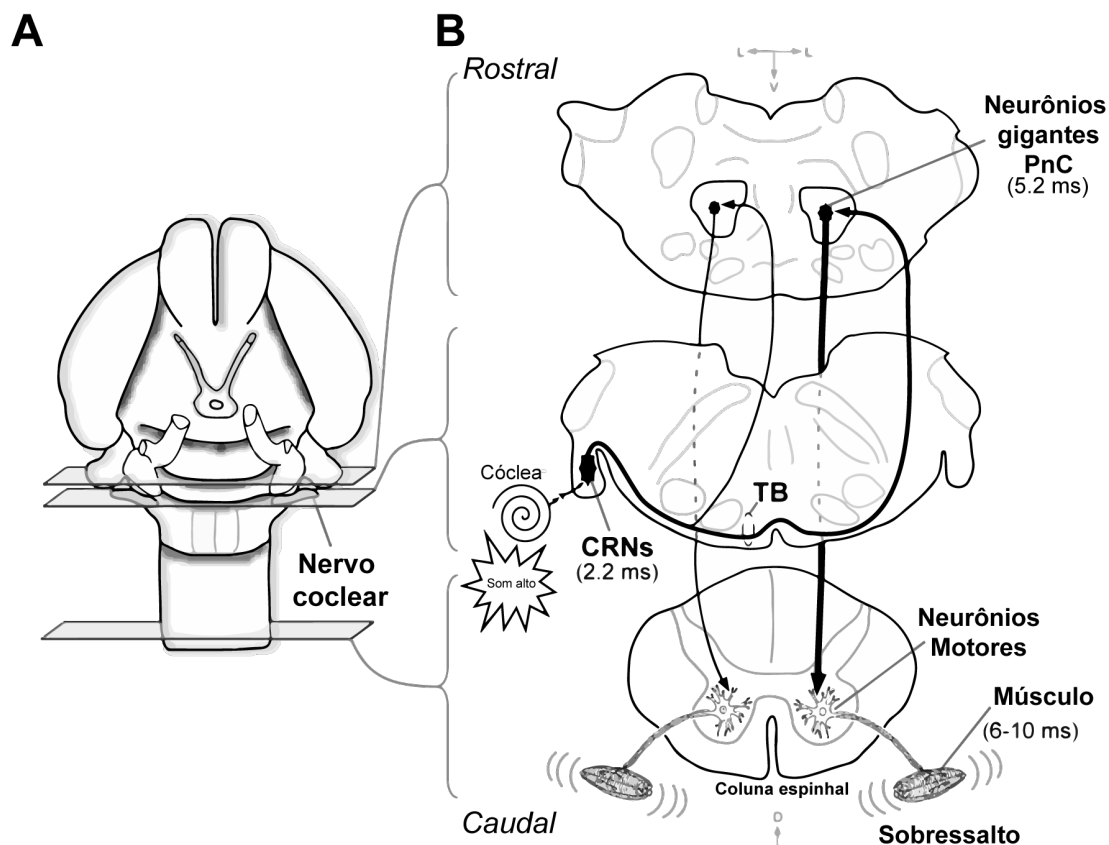


Figura 7 – O circuito-reflexo primário sobressalto acústico. **A** – Regiões avaliadas no tronco cerebral de ratos. **B** – Quando um estímulo sonoro alto ativa as células ciliadas presentes na cóclea, é deflagrado um forte potencial de ação que consequentemente é transmitido aos neurônios da raiz do nervo coclear (CRNs) rapidamente (~2.2 ms). Esses neurônios estabelecem sinapses em neurônios gigantes do núcleo pontino caudal (PnC) que respondem ~5.2 ms após o estímulo acústico. Esses neurônios enviam seus axônios até neurônios motores inferiores na coluna espinhal e em 6-10 ms após o estímulo, é registrado o potencial eletromiográfico. Adaptado de Gomez-Nieto et al. (2014).

papel primordial no reflexo acústico do sobressalto, recebendo informações advindas do núcleo coclear e as transmitindo a motoneurônios na medula espinhal (Guo et al., 2021).

Essas estruturas recebem sinais das mais diversas áreas cerebrais bem como projetam sua informação para diferentes regiões. Devido a isso, sofrem algumas modulações que serão tratadas na sessão seguinte.

1.6 O gatilho sensório acústico e a modulação do ASR por pré-pulso de som e ausência de som

O nosso ambiente é rodeado de informação acústica e o cérebro as recebe a todo instante. Mas, como processar essa imensa quantidade de informação? Muitas vezes, não é necessário computar tudo e há mecanismos que filtram as aferências sensoriais (Davis, 1984; Khani et al., 2019; Qi et al., 2015). Um deles é o gatilho sensório acústico (*auditory sensory gating* ASG). Quando dois estímulos acústicos semelhantes se repetem em um curto intervalo de tempo, a resposta ao segundo estímulo diminui consideravelmente. Seria uma maneira do cérebro poupar energia ou prever a chegada de um novo estímulo (Davis, 1984; Friston, 2018; Giraud & Arnal, 2018; Niven & Laughlin, 2008; Rao & Ballard, 1999). Os mecanismos envolvidos nessa filtragem ainda são incertos, mas sabe-se que os núcleos do tronco cerebral envolvidos no ASR são modulados por diversas regiões superiores (Davis, 1984; Davis et al., 1982; Gómez-Nieto et al., 2014; Khani et al., 2019; le Duc et al., 2016).

Uma das formas mais tradicionais de aferir a eficiência do ASG são os testes de inibição por pré pulso de som (*prepulse inhibition* PPI) e a inibição do reflexo do sobressalto pela ausência de som (*gap-prepulse inhibition of acoustic startle* GPIAS), onde ambos modulam a resposta do ASR. O PPI consiste em apresentar um som de menor intensidade, acima de um som de fundo, seguido de um som que deflagre o ASR, em um curtíssimo espaço de tempo (ms). O GPIAS funciona um pouco diferente. Ao invés de apresentar um estímulo acústico antes de um estímulo de maior intensidade, que deflagre o ASR, é apresentado um estímulo com ausência de som. Ou seja, há um som de fundo e por um breve período esse som é cessado. Então volta-se a apresentar o som de fundo brevemente antes do estímulo acústico de maior intensidade. Em ambos os testes, o reflexo ASR é avaliado por meio de acelerômetros e é normal que o pré-pulso de som iniba o ASR (Swerdlow, 2009). Sabe-se que em humanos, a diminuição ou a ausência do PPI sugere transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia (Swerdlow, 2009) e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Lemvigh et al., 2020). O teste de GPIAS é utilizado tanto em animais quanto em humanos, principalmente para detecção do tinnitus e disfunções no desenvolvimento do processamento temporal auditivo (Anderson & Linden, 2016; Fitch et al., 2008; Ku et al., 2020; Lu et al., 2008) e alterações na

detecção da ausência de som já foram descritas em indivíduos com o transtorno do espectro autista (Bhatara et al., 2013) e em condições neurodegenerativas e neurodesenvolvimentais como na velhice, na doença de Alzheimer e em disfunções de linguagem e leitura (Gordon-Salant & Fitzgibbons, 1993; Iliadou et al., 2017; McArthur & Bishop, 2001; Snell, 1997; Strouse et al., 1998).

O intervalo entre os estímulos (ISI) é uma variável de suma importância no ASG e pode ser alterado tanto no PPI quanto no GPIAS. Entretanto, a maioria dos estudos de PPI mantém um intervalo único e algumas análises de EEG são feitas em regiões muito específicas do cérebro (Khani et al., 2019). Uma maneira de averiguar quais as regiões envolvidas com o ASG foi analisar o cérebro como um todo, desde regiões presentes no tronco cerebral, como o núcleo coclear ventral (VCN) e o colículo inferior (IC), bem como regiões superiores, como os córtices cingulado anterior (ACC) e o auditivo primário (Au1), em diferentes ISIs de som (Khani et al., 2019). Aparentemente, o ASG envolve o cérebro como um todo, com a sua primeira estação no VCN e no IC e é hierarquicamente amplificado de regiões inferiores para as regiões superiores, atingindo o Au1 e o ACC, em registros eletrofisiológicos epicraniais e intracraniais (Khani et al., 2019). O teste de GPIAS há alguns anos também é utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos no processamento temporal acústico bem como a participação do córtex auditivo e áreas envolvidas com as emoções (Anderson & Linden, 2016; Weible et al., 2014, 2020) e assim como no PPI, o intervalo entre os estímulos é relevante no GPIAS. Intervalos curtos parecem recrutar regiões corticais enquanto intervalos longos não procedem da mesma forma (Weible et al., 2020). Sabe-se que lesões no córtex auditivo podem atrapalhar a detecção de ausência de som (Ison et al., 1991) e ao inibir o córtex de camundongos, a partir de experimentos optogenéticos, não houve a detecção da ausência do som (Weible et al., 2020). Supõe-se, portanto, que regiões do processamento superior auditivo, como o córtex auditivo primário, e regiões de alocação da atenção, como o córtex cingulado anterior, estão envolvidas no gatilho sensorio acústico e são recrutadas tanto no teste de PPI quanto no GPIAS.

1.7 A privação auditiva precoce reversível e seu papel no ASG

O sentido da audição é essencial para animais obterem informações ao seu redor, seja para detectar uma presa ou um predador, e até mesmo parceiros aptos para o acasalamento (Forlano et al., 2015; Miranda & Wilczynski, 2009; Sisneros & Bass, 2003). Nos humanos, o sentido da audição é usado para além do reconhecimento do ambiente ao redor: na linguagem, comunicação e no aprendizado e uma diminuição na acuidade desse sentido afeta o comportamento social e o reconhecimento da linguagem (Chen & Yuan, 2015). Durante os primeiros estágios do desenvolvimento, o sistema auditivo conta com uma alta plasticidade, o que o torna suscetível a possíveis interferências externas como estímulos acústicos de alta intensidade, intervenções médicas e até lesões no órgão auditivo (Chen & Yuan, 2015).

Esse período inicial do desenvolvimento, onde o cérebro está propício a grandes alterações no seu funcionamento e em sua estrutura, é chamado de período crítico. Ele recebe esse nome, pois algumas mudanças cerebrais anormais podem ocorrer e não serem revertidas ou compensadas ao longo da vida (Chen & Yuan, 2015; Hensch, 2004). Contudo, há vários períodos durante o desenvolvimento dos quais a organização cerebral pode ser afetada pelos estímulos sensoriais. Por exemplo, a representação acústica no córtex auditivo primário pode ser alterada, a partir de treinamento, em animais adultos (Polley et al., 2006); ratos entre P9 e P28 expostos a um ruído branco constante mostraram alterações na tonotopia e neurônios corticais não foram capazes de responder seletivamente frequências específicas (L. I. Zhang et al., 2002). Todavia, parece que a partir de 30 dias a exposição a este tipo de ruído não mostra danos ao córtex auditivo, o que sugere que as alterações no ambiente acústico sejam importantes para o desenvolvimento cerebral desses animais até o primeiro mês de vida (Chen & Yuan, 2015; L. I. Zhang et al., 2002).

Os primeiros dias pós-natais são cruciais, e experiências sensoriais anormais podem afetar permanentemente o processamento acústico, pois sabe-se que a experiência sensorial é essencial para a maturação dos núcleos auditivos (Chen & Yuan, 2015). Neurônios piramidais do córtex auditivo primário, registrados em *whole cell patch-clamp*, podem apresentar um citoesqueleto diferente, potenciais de ação e correntes inibitórias pós-sinápticas anormais, após a privação acústica reversível, feita

durante o período crítico. Essa privação, de cerca de 30 dB, foi feita com um tampão colocado no meato acústico dos animais (Mowery et al., 2014). Se o bloqueio for mantido ao longo de todo o período, alterações na *halfwidth*, sag, repolarização em resposta a correntes positivas e na taxa de disparo se mantêm na vida adulta. Se o tampão for retirado antes do fim do período crítico, praticamente todas as alterações são revertidas, com exceção da taxa de disparos evocados (Mowery et al., 2014). Ou seja, segundo esses resultados, animais que perdem a capacidade auditiva plena nos estágios iniciais do desenvolvimento, podem ter sérias modificações no processamento acústico se essa privação não for resolvida em tempo adequado.

Como visto anteriormente, o córtex auditivo pode modular o reflexo acústico do sobressalto quando avaliado com os protocolos de PPI ou GPIAS e sugere-se que a privação acústica nos primeiros dias de vida altere o funcionamento de neurônios piramidais no córtex auditivo. Kim et al. (2018) encontrou uma menor inibição do ASR pelo protocolo de GPIAS e maiores limiares de detecção da ausência do som, após a privação auditiva temporária, em ratos. Os registros de ABR também são alterados nos animais acusticamente privados, onde os limiares nas frequências 4, 8, 12, 16 e 32 kHz estão significativamente maiores e retornam a valores semelhantes aos controles após 4 dias (Kim et al., 2018). Essas alterações ocorreram em animais acusticamente privados nos primeiros dias de vida pós-natais e a privação tardia não evidenciou nenhuma alteração no processamento temporal e no gatilho sensorio motor acústico quando o teste GPIAS foi utilizado. A computação em núcleos do sistema auditivo, incluindo o córtex também pode sofrer mudanças após a privação acústica e áreas envolvidas com outros processamentos não relacionados a audição, como núcleo visuais e táteis, podem ser recrutados em casos de privação sensorial acústica (Finney et al., 2001; Li et al., 2019; Merabet & Pascual-Leone, 2010).

Há diversos trabalhos na literatura evidenciando alguns problemas ocasionados pela privação auditiva precoce. A grande maioria deles, inclusive os citados nesta seção, relacionam a privação auditiva durante períodos críticos, como um fator limitante no desenvolvimento pleno do sistema auditivo. Essa mesma privação pode levar a alterações celulares nos neurônios das vias auditivas e conseqüentemente alterar o processamento de todo o sistema auditivo central. No presente trabalho, os animais foram privados acusticamente a partir de P14 até P44 (30 dias), onde, na linhagem estudada, ocorre a abertura do meato acústico. A privação foi feita de tal forma que fosse possível a reversão. Nas próximas sessões

serão explicados os objetivos, os métodos utilizados bem como os resultados coletados.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais foram divididos em duas etapas. Na primeira, consistem em investigar como os neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal (DCN) de camundongos desenvolvem suas propriedades intrínsecas e algumas correntes subliminares, desde o início da vida pós-natal (P4) até o desmame (P21). Na segunda foi testar se o gatilho sensorio motor acústico e o processamento auditivo, medido a partir de PPI, GPIAS e ABR, seria afetado pela privação auditiva de longo prazo (30 dias), durante o período crítico da audição. Além disso, como a privação auditiva de curto prazo (5 dias) afeta o comportamento de neurônios fusiformes do DCN.

a) Determinar qual o dia pós-natal exato de início da audição plena, ou seja, a abertura do meato acústico, dos animais estudados.

b) Averiguar se a proporção entre os neurônios silentes e ativos era diferente antes e depois da abertura do meato acústico.

c) Analisar as propriedades de membrana dos neurônios fusiformes antes e depois do início da audição plena, bem como as propriedades dos potenciais de ação.

d) Quantificar as correntes de sódio persistente (I_{NaP}), de potássio retificadora de entrada (I_{KIR}), a corrente H (I_H) e de vazamento (I_{Leak}) nos neurônios fusiformes ao longo do desenvolvimento auditivo.

e) Identificar diferenças entre os neurônios e se essas disparidades seriam suficientes para a separação de grupos neuronais, a partir da análise de componentes principais (PCA).

f) Determinar quais os limiares auditivos nas diferentes idades dos animais.

g) Avaliar se a privação auditiva precoce de longo prazo alteraria os padrões do ABR.

h) Avaliar se havia uma reversão para valores semelhantes aos controles, caso fosse observado uma alteração no ABR, após a privação auditiva longo prazo.

i) Averiguar quais frequências os animais supostamente estariam com déficits no processamento auditivo no ABR e do GPIAS, após a privação acústica de longo prazo.

j) Avaliar o reflexo do sobressalto acústico e como ele poderia estar alterado após a privação acústica de longo prazo.

k) Avaliar as propriedades do potencial de ação de neurônios de fusiformes após a privação auditiva de curto prazo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Tanto nos experimentos eletrofisiológicos quanto nos experimentos da privação auditiva de longo prazo foram utilizados camundongos *Swiss*, sob o protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais 133/2018. Fêmeas prenhas de camundongos da *Swiss* foram adquiridas do Biotério Central da USP-RP e acompanhadas até o nascimento dos filhotes. A data do nascimento foi anotada. Os animais foram mantidos com a mãe até o 21º dia de nascimento e a mãe eutanasiada. Comida e água foram ofertadas *ad libitum* em um ciclo claro-escuro de 12 horas. Para os protocolos de *patch-clamp*, os animais tinham entre P4 e P21, de ambos os sexos. Os animais foram anestesiados com isoflurano e posteriormente decapitados para dissecação do tecido cerebral e obtenção das fatias do tronco cerebral. Alguns animais foram privados acusticamente por curto prazo (4 - 6 dias) para averiguação das propriedades eletrofisiológicas do neurônio fusiforme. Já para os protocolos da privação auditiva de longo prazo, aos 14 dias de idade, os animais, do grupo Tampão foram anestesiados (quetamina 60 mg/kg e xilasina 10mg/kg ou Isoflurano) e privados de som com auxílio de um silicone de secagem rápida Kwik Sil (WPI, Sarasota FL) aplicado diretamente no pavilhão auditivo. As orelhas desses animais foram suturadas ou cobertas com atadura para evitar a retirada do tampão. Os animais Sham passaram pelo protocolo de anestesia, o manuseio do pavilhão acústico e uma falsa sutura. Ambos os animais foram acompanhados para averiguação da permanência do tampão no meato acústico e, caso esse apresentasse uma frouxidão, o animal era anestesiado e o tampão reinsertado. Os Sham passaram pelo mesmo procedimento. O grupo controle foi anestesiado somente nos dias dos registros dos potenciais evocados auditivos de tronco encefálico. A figura 8 resume todo percurso dos experimentos.

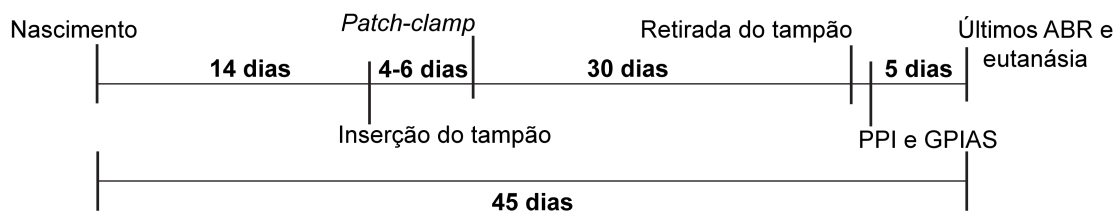


Figura 8 – Esquema experimental dos testes comportamentais e exemplo de como é inserido o tampão no meato acústico dos animais. Nenhum dos grupos avaliados apresentaram diferenças no peso ao longo dos experimentos.

3.2 Potencial evocado acústico do tronco encefálico

A averiguação do início da audição do animal foi feita medindo os potenciais evocados acústicos do tronco encefálico ou do inglês *auditory brainstem response* (ABR). Essa técnica mede os potenciais gerados pela ativação dos neurônios auditivos do tronco cerebral por sons de diferentes intensidades e frequências. ABRs foram realizados com uma estação de trabalho RZ6 (Tucker David Technologies), conectado a um alto falante magnético (Multi-Field Magnetic Speaker, Tucker Davis Technologies), previamente calibrado na configuração de campo aberto. A calibração ocorreu tanto para os estímulos com tons puros e os estímulos com clicks. Sob anestesia (cetamina 60 mg/kg e xilasina 10mg/kg), após uma breve sedação com isoflurano, animais entre P12 e P21 foram mantidos dentro de uma câmara isolada acusticamente, aquecidos em uma manta térmica não elétrica. Três eletrodos de platina foram colocados na cabeça do animal da seguinte maneira: um eletrodo de referência abaixo da orelha ipsilateral ao estímulo, um eletrodo de registro no vértex da cabeça do animal e um eletrodo terra abaixo da orelha contralateral ao estímulo sonoro. A impedância foi verificada e não ultrapassou 3 kΩ. Os eletrodos estavam conectados a um pré-amplificador RA4PA Medusa (Tucker Davis Technologies) e

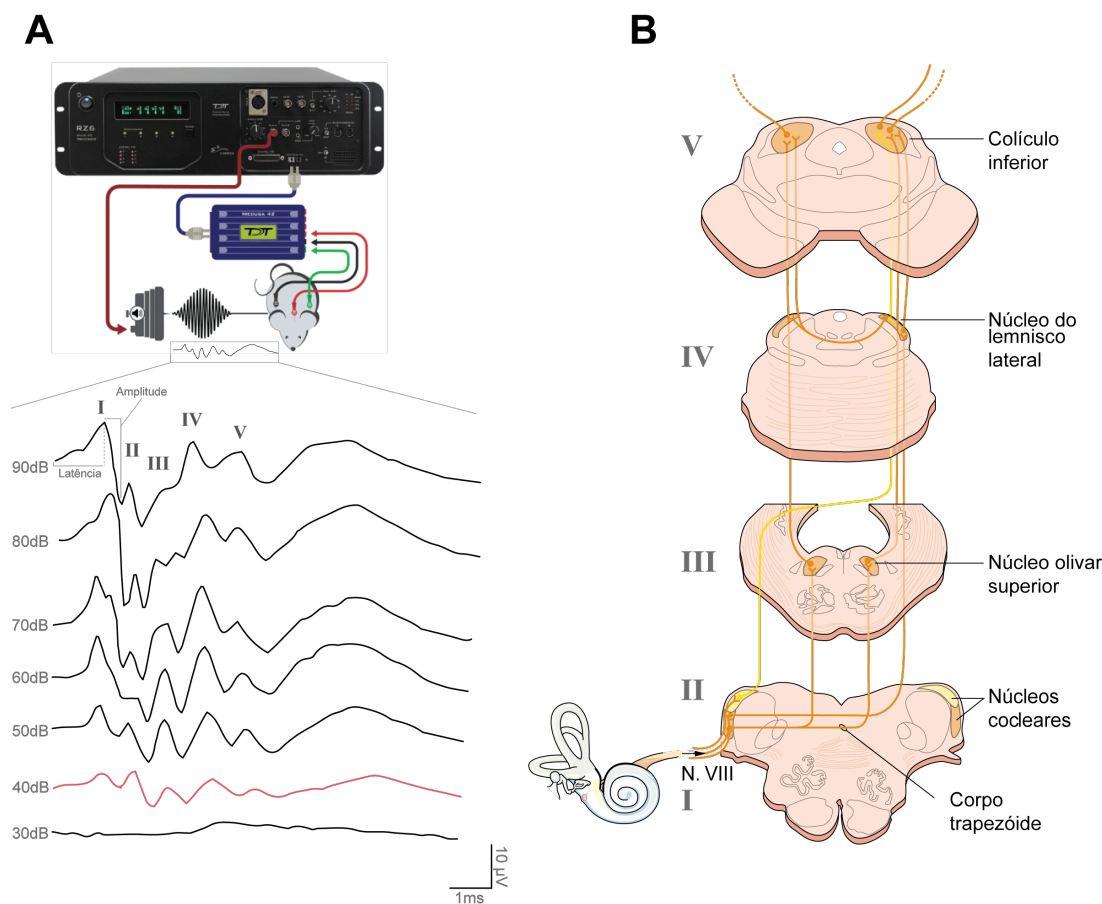


Figura 9 – Núcleos auditivos e suas representações nos registros de potencial evocado acústico de tronco encefálico. Em **A**, na parte superior, é mostrado um esquema ilustrativo do ABR. Na parte inferior, são mostradas as ondas do EEG do tronco auditivo após o estímulo acústico de clique e como as ondas foram medidas. Em **B**, os núcleos auditivos e suas representações no ABR. (adaptado de *TDT ABR and DPOAE* e *Princípios de Neurociências*, Kandel, 6ed. 2021).

esse à estação de trabalho via fibra-óptica. Tanto para os estímulos de click quanto para o de tons puros, o programa traçou a média de 512 registros de respostas neurais do tronco auditivo. Os limiares foram determinados como a amplitude capaz de gerar uma resposta evocada característica, com pelo menos duas ondas (Cunha et al., 2020). O ganho foi de 20dB e os sinais filtrados entre 0.3 e 3 kHz e registrado pelo software BioSigRZ (Tucker Davis Technologies) na taxa de aquisição de 25 kHz e armazenados para posterior análise.

O primeiro protocolo foi o de “click”, onde um som monofásico de 0.1 ms foi apresentado ao animal a uma taxa de 21Hz de 90 dB a 20 dB SQL, com progressão de 10 dB. O segundo protocolo foi o de tons puros, onde estímulos canal-único de cossenos quadrados (2 ms *rise/fall time*) de cinco milissegundos, foram apresentados a uma taxa de 21 Hz, com as seguintes frequências: 4, 8, 16, 24 e 32 kHz. Para cada

uma dessas frequências, a amplitude variou de 90 dB SPL a 30 dB SPL em passos de 10 dB. A resposta do tronco auditivo encefálico foi analisada conforme Alvarado et al., 2012, com auxílio de uma rotina semiautomática escrita no MatLab por Gabriel Servilha de Menezes. A amplitude das cinco ondas foi medida do pico ao vale e a latência calculada como o tempo do início do estímulo até o pico de cada onda (figura 9).

3.3 Obtenção das fatias contendo o núcleo coclear dorsal (DCN)

As fatias foram obtidas como em Zugaib et al., (2016) com algumas modificações. Cortes de 200 μm do tronco cerebral contendo o núcleo coclear dorsal foram feitos usando o Comprestome VF0300Z (Precisionary Instruments) em uma solução de corte gelada contendo (mM): 87 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 0,2 CaCl_2 , 7 MgCl_2 , 25 dextrose e 75 sacarose, 335 mOsm/kg H_2O , pH 7.4 quando borbulhada com 95% O_2 /5% CO_2 , e posteriormente foram incubados em uma solução artificial de líquido cérebro espinhal (aCSF) a uma temperatura de 34°C durante 35 min. Transcorrido o tempo, as fatias permaneceram submersas em temperatura ambiente (25°C) até o momento dos experimentos eletrofisiológicos.

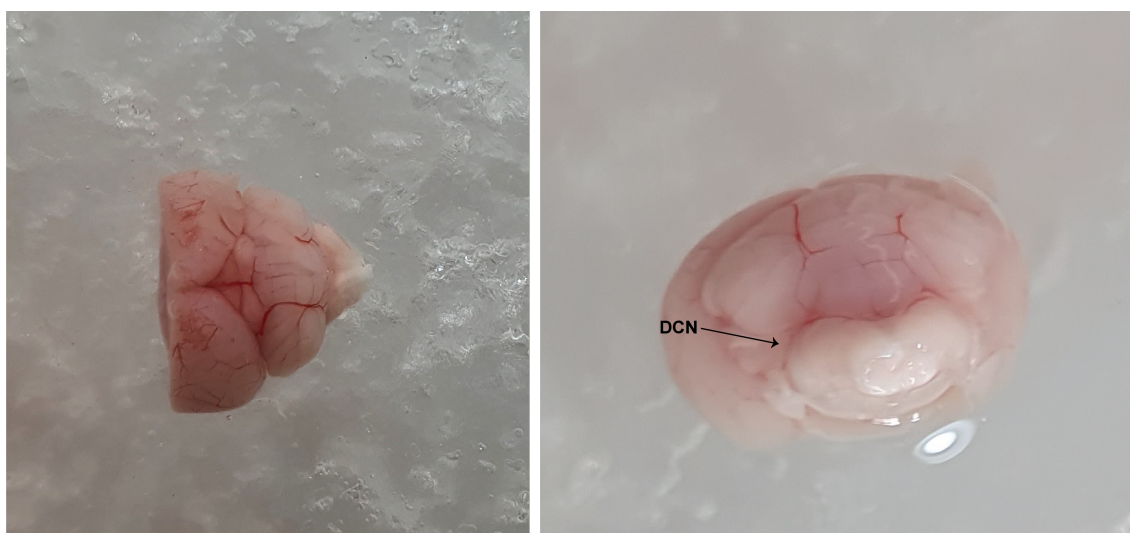


Figura 10 – Corte de tronco cerebral de camundongo com o cerebelo. A esquerda, é mostrado o tronco cerebral e o cerebelo de um camundongo adulto visto no sentido dorsoventral. A direita, é visualizado no sentido caudal-rostral, a localização do DCN, um pouco abaixo do cerebelo. As imagens foram feitas pelo próprio autor.

3.4 Eletrofisiologia

Os registros em *whole-cell patch clamp* foram realizados em neurônios fusiformes identificados pela morfologia, localização na fatia e o padrão de disparo regular (Tzounopoulos et al., 2004; Zugaib et al., 2016). As fatias foram perfundidas com aCSF contendo (mM): 120 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ e 10 dextrose e pH 7.4 quando borbulhada com 95% O₂/5% CO₂ (osmolalidade de ~310 mOsmol/kg H₂O). A solução interna foi composta de (mM): 130 K-gluconato, 20 KCl, 5 fosfocreatina, 10 HEPES, 0,1 EGTA, 2 Mg-ATP, 0,2 Na-GTP, pH 7,3 corrigido com KOH e osmolalidade de 300 mOsmol/kgH₂O. Os microeletrodos de borossilicato de (1,5 mm diametro externo, 0,86 mm diametro interno; SUTTER Instruments) foram confeccionados em um estirador Sutter P-87, de modo que a resistência permanecesse entre 3 e 5 MΩ após o preenchimento com a solução interna. Ao identificar a célula visualmente, com o auxílio do microscópio Olympus BX52WI sob iluminação oblíqua, o microeletrodo foi posto no centro do soma do neurônio e, sob pressão negativa, obteve-se o gigaselo (>1GΩ) seguido da estabilização do mesmo por ~5 minutos. Transcorrido o tempo, a membrana dentro do eletrodo foi rompida, aplicando-se mais pressão negativa entrando então no modo *whole-cell*.

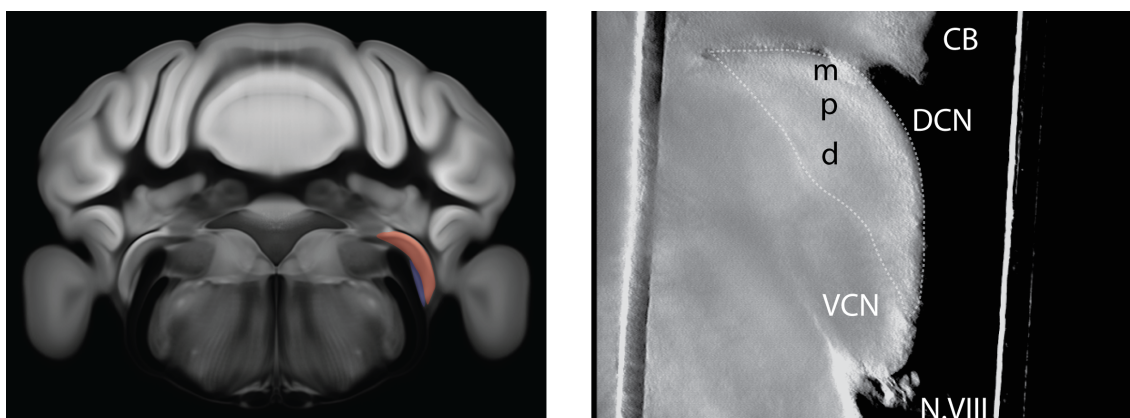


Figura 11 – Exemplo de fatia do tronco cerebral de camundongos contendo núcleo coclear dorsal (DCN). A esquerda, uma imagem representativa retirada do Allen Reference Atlas (<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>), onde é sinalizado em vermelho o DCN e em azul uma parte do VCN, de um camundongo adulto. A direita, uma fatia confeccionada pelo próprio autor, oriunda de um camundongo (21 dias). CB – cerebelo; m – camada molecular; p – camada principal ou fusiforme; d – camada profunda; N.VIII – oitavo par de nervos craniano.

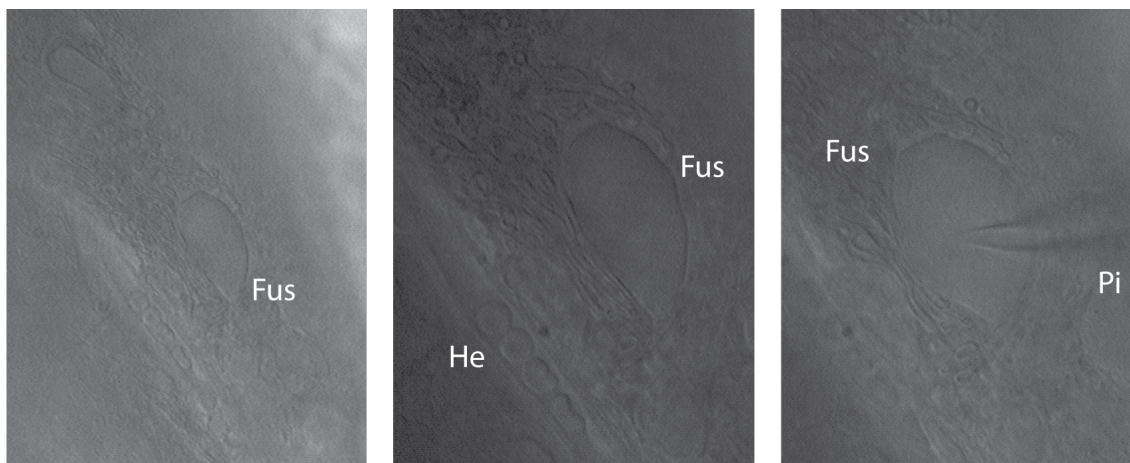


Figura 12 – Micrografia de um neurônio fusiforme do DCN em uma fatia do tronco cerebral. A esquerda um neurônio fusiforme (Fus) no tecido cerebral. Ao centro, uma ampliação da primeira imagem (2x) da primeira imagem. Na porção inferior dessa imagem é destacado um capilar sanguíneo com algumas hemácias alinhadas (He). A direita o mesmo neurônio fusiforme pouco tempo antes de da formação do gigaseal com o microeletrodo de vidro. Fotomicrografias capturadas pelo próprio autor.

Os registros no modo *current-clamp* foram realizados seguindo dois protocolos: para verificar a presença de disparo espontâneo e o potencial de repouso da membrana (RMP), utilizou-se o protocolo “I-0”, que consiste em apenas registrar o neurônio em seu potencial de repouso sem aplicar nenhuma corrente durante 52 segundos; para aferir as seguintes propriedades: resistência de entrada (medida no estado estacionário ($R_{input\ ss}$) no pico da hiperpolarização ($R_{input\ immediate}$), constante de tempo da membrana (τ), amplitude da despolarização pós-hiperpolarização (*sag*), rheobase, limiar de atividade, limiar do potencial de ação, largura do potencial de ação na metade da amplitude (*halfwidth*), taxa máxima de subida do potencial de ação (Max_{ROR}) e a rápida hiperpolarização pós potencial (*fAHP*) (figura 13), um protocolo de pulsos de corrente despolarizantes (V-I) em passos de 25 e 50 pA, a partir de -200 pA, foram injetados na célula durante um segundo, em intervalos de 5 segundos. Quando o neurônio apresentava disparo espontâneo, aplicava-se uma corrente entre -20 e -200 pA, para cessar os disparos e, a partir de então, seguir com o protocolo.

Registros em *voltage-clamp* foram realizados para medir as correntes iônicas subliminares: I_H , I_{NaP} , I_{KIR} e I_{Leak} . Os seguintes bloqueadores foram utilizados: tetrodotoxina (TTX; 0.5 μ M) para bloqueio da I_{NaP} , ZD7288 (20 μ M) para bloqueio da I_H e $BaCl_2$ (200 μ M) para bloqueio da I_{KIR} , aplicadas nessa ordem. O protocolo, chamado I-V, foi: sob um potencial fixo de -65 mV, modificou-se o potencial da célula

de -105 mV a -55 mV, em passos de 10 mV, durante 4 segundos. O intervalo entre as alterações de potencial foi de 30 segundos.

Os experimentos foram realizados na faixa de temperatura entre 31 e 34°C usando um sistema de aquecimento em linha (Warner Instruments). Todos os registros de propriedades intrínsecas serão feitos na presença de antagonistas dos receptores de GABA_A, glicina e AMPA: picrotoxina (PTX, 20 µM), estriquinina (STR, 1µM) e DNQX (10 µM). Os dados do protocolo I-0 e V-I foram obtidos com uma taxa de aquisição de 50 kHz, enquanto o protocolo I-V com uma taxa de 40 kHz, filtrados com um filtro passa-baixa (Bessel) a 3kHz usando o amplificador EPC 10 e o software Patchmaster (Heka Elektronik).

3.5 Análise dos dados eletrofisiológicos

Todos os registros tiveram o potencial de junção líquido de -10 mV (Dagostin et al., 2012) subtraídos *offline*. A análise dos dados foi feita em rotinas escritas no software Igor Pro (Wavemetrics) pelo Dr. André Dagostin. O RMP foi calculado como a voltagem modal determinada pelo histograma de todos os pontos adquiridos no protocolo I-0 na presença de TTX. A resistência em série foi compensada de 50 a 80%, e monitorada constantemente, com registros acima de 20 MΩ descartados. Os neurônios silentes foram definidos como neurônios que disparam potenciais de ação abaixo de 1Hz (R. Leão et al., 2012). As 12 propriedades eletrofisiológicas dos neurônios avaliados são resumidas na figura 13 A resistência de entrada foi medida como a inclinação da reta do perfil corrente voltagem (protocolo V-I), no estado estacionário, nos últimos 100ms do protocolo, e no pico da hiperpolarização. A constante de tempo da membrana (τ) foi obtida ajustando o decaimento de voltagem em resposta a um pulso de -50 com uma equação exponencial simples. A amplitude da despolarização pós hiperpolarização foi calculada como a diferença entre o pico e o estado estacionário da hiperpolarização em -200 pA. A rheobase, definida como a corrente mínima necessária para deflagrar um potencial de ação, foi calculada a partir do potencial de repouso da membrana em neurônios silentes e em neurônios ativos, a partir de um potencial próximo a -70 mV. O limiar de atividade dos neurônios foi calculado como em Leão et al., 2012, sendo a média do potencial de membrana no passo de corrente logo antes da rheobase. Os parâmetros do potencial de ação foram

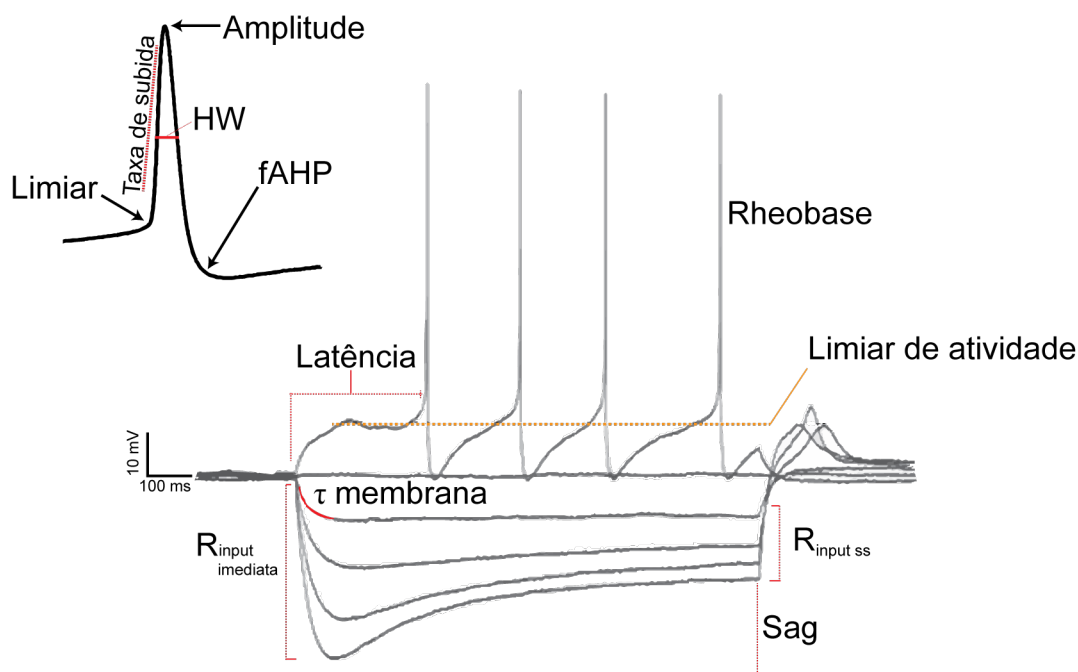


Figura 13 – Parâmetros analisados nos registros de *current-clamp* nos neurônios fusiformes. HW: *halfwidth*; $R_{input\ ss}$: resistência de entrada no estado estacionário; $R_{input\ imediata}$: resistência de entrada medida no pico da hiperpolarização; τ membrana: constante de tempo da membrana; Sag: amplitude da despolarização pós hiperpolarização.

medidos a partir do gráfico do plano de fase dV_m/dt vs. V_m do primeiro potencial de ação evocado pelo protocolo de VI. O limiar do potencial de ação foi considerado como aquele onde a variação da dV_m/dt atingiu $10\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (R. Leão et al., 2012). A amplitude do potencial de ação foi calculada como a diferença entre o limiar e o pico do potencial de ação. A taxa máxima de subida do potencial de ação foi calculada como o valor máximo positivo do plano de fase. A largura do potencial de ação (*halfwidth*) foi tida como a duração do potencial de ação, em milissegundos, na metade da amplitude e a latência foi calculada como o tempo entre o início do estímulo e o limiar do primeiro potencial de ação na rheobase. A rápida hiperpolarização pós potencial foi calculada como a diferença entre o limiar do potencial de ação e o pico da hiperpolarização após a repolarização do potencial de ação.

A análise de componentes principais foi feita usando a biblioteca FactoMineR da linguagem de programação R (versão 4.2.0). O código teve auxílio do Professor Carlos Henrique da Silveira (Universidade Federal de Itajubá) e pode ser encontrado no Apêndice A, do trabalho. A base de dados que alimentou a análise foi composta de uma matriz 84×12 , centralizada na média zero e dimensionada à variância unitária (padronização por z-score).

Os dados foram apresentados como a média \pm EPM. Os dados foram comparados usando os testes paramétricos: teste t de Student, ANOVA de fator único com pós teste de Fisher e correlação de Pearson. Os parâmetros eletrofisiológicos em relação à idade foram submetidos a regressão linear, com auxílio do programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software), com nível de significância de $p < 0.05$. No texto, não foram mostrados todos os valores de p. Os valores de pós testes da ANOVA, R^2 e r de Pearson são mostrados nas tabelas 1 e 2.

3.6 Avaliação do reflexo do sobressalto e sua inibição por pré-pulso de som e por ausência de som (PPI e GPIAS)

O reflexo do sobressalto e sua inibição pelo pré-pulso foram aferidos seguindo o protocolo proposto em Cunha et al., (2020) e Miller et al. (2021) com algumas alterações. Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico, acoplado a um acelerômetro, dentro de uma câmara ventilada e isolada acusticamente (SR-Lab, Startle-Reflex System; San Diego Instruments). Esse acelerômetro converte o movimento do animal como um sinal elétrico, expresso em milivolts, e foi registrado pelo software próprio do sistema. Antes do início de cada experimento o sistema foi calibrado utilizando uma unidade de padronização que gera vibrações padronizadas, acoplada ao cilindro. Essa calibração foi necessária para garantir que o movimento de todos os animais fosse registrado de maneira equivalente. Os estímulos acústicos foram produzidos com auxílio do software Audacity 3.1.3, gerados pelo amplificador Tapaze AM10 (Cambridge Audio) e apresentados aos animais por um alto-falante, acoplado ao equipamento, a uma distância de 20 cm acima do cilindro que continha o animal. A intensidade do som em decibéis foi aferida e calibrada com auxílio de um decibelímetro (Extech instrument), com o microfone posicionado na altura da cabeça do animal.

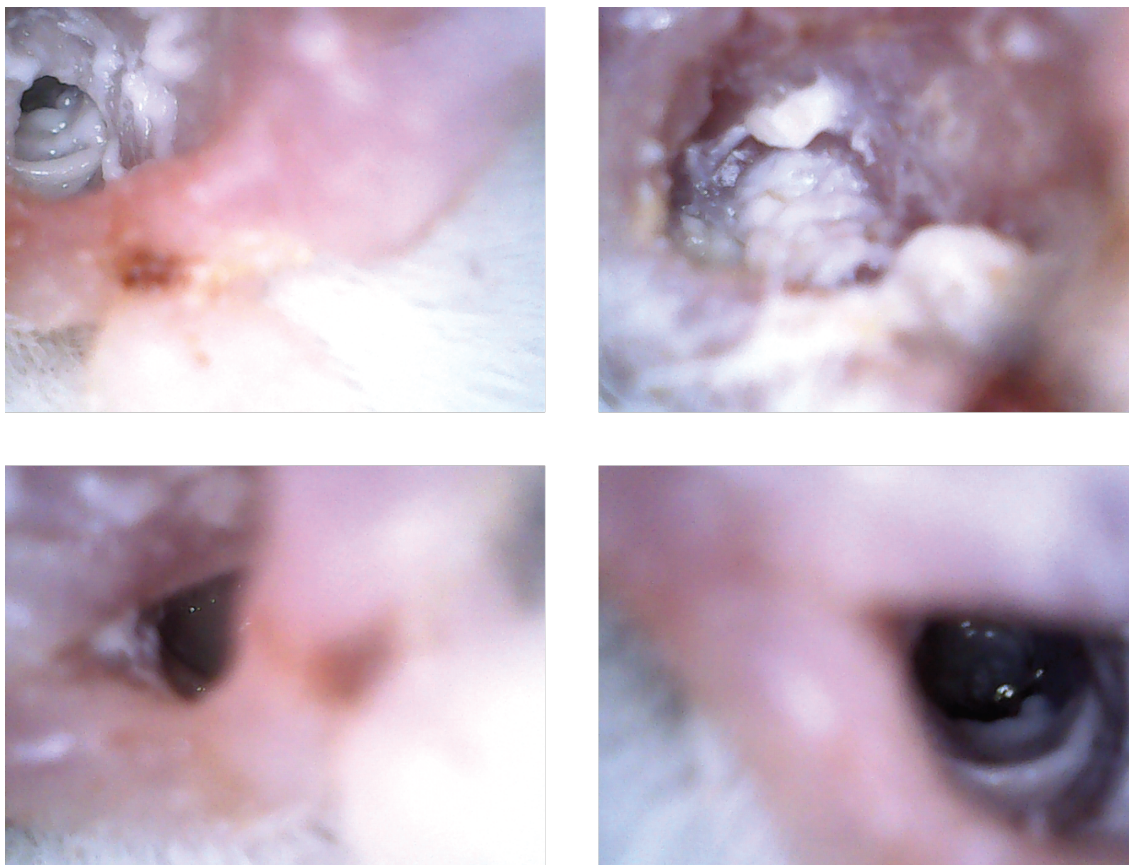


Figura 14 – Averiguação do canal auditivo dos animais após a retirada do tampão. Na parte superior, fotos tiradas com ajuda de um otoscópio, mostram o canal acústico do animal com um excesso de cera. Na parte inferior, esse mesmo animal, após 24 horas, apresentava o canal auditivo praticamente sem cera em excesso.

Iniciou-se o protocolo experimental um dia após a retirada do tampão de silicone do meato acústico dos animais. Esse tempo é necessário para evitar a interferência dos anestésicos e da cera presente no pavilhão auditivo dos animais (figura 14). No primeiro dia, os animais foram habituados ao aparato experimental da seguinte maneira: inseriu-se cada animal no cilindro acrílico dentro da câmara e, posteriormente, um som de fundo de ruído branco de 65 dB SPL, foi apresentado durante 20 minutos. No dia seguinte, os animais foram levados ao local de experimentação e foram deixados na sala por pelo menos 40 minutos para aclimação, antes do início dos experimentos. O primeiro experimento comportamental foi o de inibição do sobressalto por pré-pulso acústico (PPI), que consistiu em:

1) cinco minutos do som de fundo para aclimação a 65 dB SPL, seguidos de seis estímulos de ruído branco a 120 dB SPL, com duração de 40 milissegundos, para

deflagrar o sobressalto dos animais (SR), separados por 10 segundos de intervalo, cada. Esse bloco é necessário para verificar uma possível habituação dos animais. O primeiro estímulo foi analisado separadamente;

2) sete testes com um estímulo pré-pulso de ruído branco por 20 milissegundos a 80 dB SPL (PPI), apresentado 50 milissegundos antes do estímulo do sobressalto, e oito testes sem o pré pulso (No PPI), com intervalos variando de 8 a 15 segundos, com uma média de ~11 segundos entre os testes. Ambos os testes foram distribuídos de maneira pseudoaleatória de forma que testes iguais não se repetiram mais que duas vezes. O experimento foi resumido na figura 15.

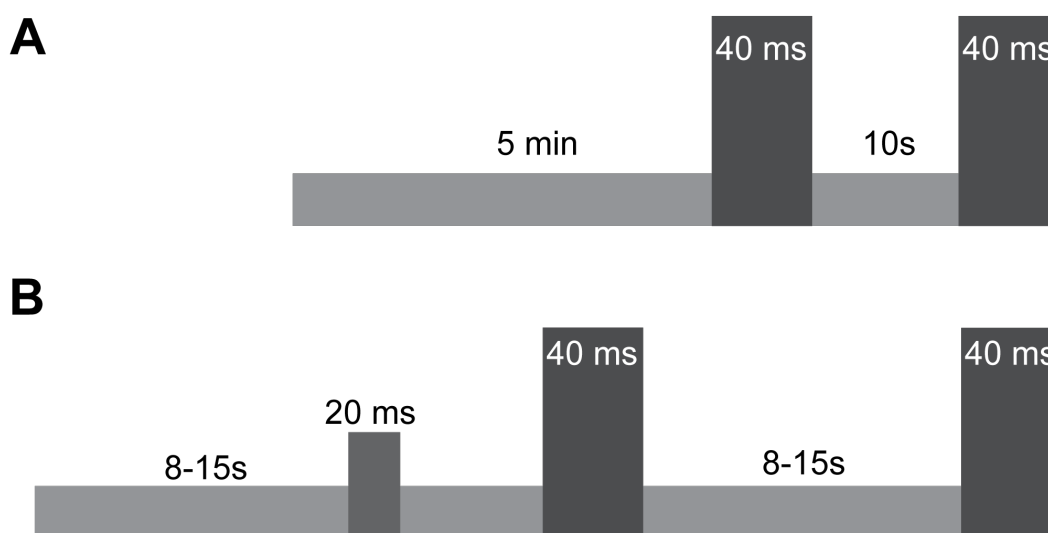


Figura 15 – Esquema do experimento de PPI. **A** – Representação da acclimação seguida da habituação dos animais ao estímulo de maior intensidade. **B** – Representação dos estímulos de PPI e No PPI.

Ao final deste protocolo, iniciou-se o protocolo de inibição do reflexo de sobressalto por pré-pulso com ausência de som (GPIAS). Para esse ensaio, os sons de fundo apresentados aos animais foram: o ruído branco (WN) e ruídos centralizados em 4, 10, 16 e 20 kHz, com uma largura de banda de 1 kHz, na intensidade de 65 dB SPL, nessa mesma ordem.

O protocolo foi desenhado da seguinte maneira:

1) por 5 minutos foi apresentado o som de fundo aos animais, em cada uma das frequências, para acclimação. Após esse período iniciou-se o protocolo para

verificar a habituação em cada uma das frequências: seis estímulos de ruído branco a 120 dB SPL por 40 milissegundos (SR) para deflagrar o sobressalto nos animais, separados cada um por 10 segundos de intervalo. O primeiro estímulo, em cada frequência, foi analisado separadamente;

2) 20 testes, sendo 10 contendo um pré-pulso de 50 milissegundos de ausência de som (GAP), 50 milissegundos antes do estímulo do sobressalto, e outros 10 sem o pré pulso (No GAP). O tempo entre os testes variou de 8 a 15 segundos com uma média de ~11 segundos entre eles. Ambos os testes foram distribuídos de maneira pseudoaleatória de forma que testes iguais não se repetiram mais que duas vezes. O experimento foi resumido na figura 16.

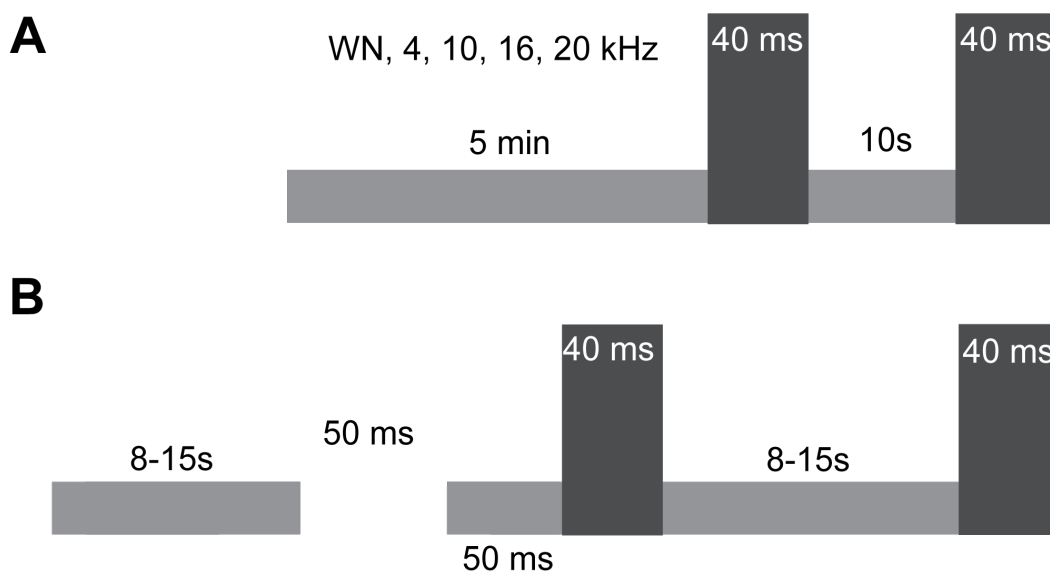


Figura 16 – Esquema dos experimentos de GPIAS. **A** – Representação da aclimatação seguida da habituação dos animais ao estímulo de maior intensidade nas diferentes frequências. **B** – Representação dos estímulos de GAP e No GAP.

3.7 Análise dos dados da privação auditiva

Os traçados do movimento dos animais, tanto do PPI quanto do GPIAS, foram exportados com auxílio do software SR Analysis (San Diego Instruments) para arquivos .txt e posteriormente analisados em rotinas próprias, escritas no software MatLab R2021b. Cada traçado foi registrado por 500 ms, com o início do registro 100 ms antes do primeiro estímulo, seja nos testes PPIs ou GAPs, seja nos No PPI ou No GAPs. O ensaio do PPI consistiu ao todo 21 testes, sendo os 6 primeiros de estímulos sobressalto (SR), 7 testes PPI e 8 testes sem PPI (No PPI). A amplitude da resposta

ao estímulo, dada em milivolt, foi extraída a partir do início do estímulo acústico de 120 dB SPL como o ponto máximo numa janela de 200 milissegundos, tanto para “PPI” quanto para “No PPI”. O tempo necessário para atingir esse ponto máximo foi analisado como a latência necessária para atingir a máxima resposta.

Os 6 primeiros testes foram utilizados para averiguar a habituação ao estímulo SR. O primeiro desses estímulos SR foi analisado separadamente em cada animal e foi feita uma média dos cinco estímulos SR subsequentes. Essa média é referida nas figuras como “Habituação” ou “Hab”. A porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto foi dada como:

$$PPI\% = 100 \times \left[\frac{(No\ PPI - PPI)}{No\ PPI} \right]$$

onde “No PPI” é a amplitude do movimento do animal após o estímulo sem pré pulso e “PPI” a amplitude do movimento em resposta ao estímulo com pré pulso, ambas dadas em milivolts.

O ensaio de GPIAS teve ao todo 130 testes, apresentados aos animais em cinco diferentes frequências: ruído-branco e ruídos centralizados em 4, 10, 16 e 20 kHz, com uma largura de banda de 1 kHz. Cada frequência contou com 26 testes. A ordem dos testes foi a mesma apresentada no ensaio PPI. A amplitude da resposta ao estímulo, dada em milivolt, foi extraída a partir do início do estímulo acústico de 120 dB SPL como o ponto máximo numa janela de 200 milissegundos, tanto para “GAP” quanto para “No GAP”. O tempo necessário para atingir esse ponto máximo foi analisado como a latência necessária para atingir a máxima resposta. A porcentagem de inibição da amplitude do sobressalto pela ausência do som foi dada pela fórmula:

$$GPIAS\% = 100 \times \left[\frac{(No\ GAP - GAP)}{No\ GAP} \right]$$

onde “No GAP” é a amplitude do movimento do animal após o estímulo sem o pré pulso e “GAP” a amplitude do movimento do animal em resposta ao estímulo com o pré pulso, em milivolt.

O *software* utilizado nas análises estatísticas foi GraphPad Prism 9.0. Os valores foram comparados estatisticamente por ANOVA de fator único com pós teste de Fisher ou teste t de Student, quando comparados apenas dois grupos. A ANOVA de dois fatores foi utilizada quando duas variáveis estavam sendo analisadas comparando os grupos Tampão, Sham e controle. Quando houve ausência de valores nas tabelas da ANOVA, foi feito o teste de efeitos mistos (*Mixed-effects analysis*). Os

outliers foram detectados pelo teste ROUT (Motulsky & Brown, 2006) com o $Q=1\%$. Todos os testes tiveram o nível de significância $p=0.05$ e foram apresentados \pm o erro padrão da média (EPM). Os resultados da ANOVA de dois fatores, são mostrados nas comparações múltiplas \pm o intervalo de confiança de 95% da diferença entre as médias.

4. RESULTADOS

4.1 A proporção de neurônios ativos aumenta após a abertura do meato acústico e o início da audição

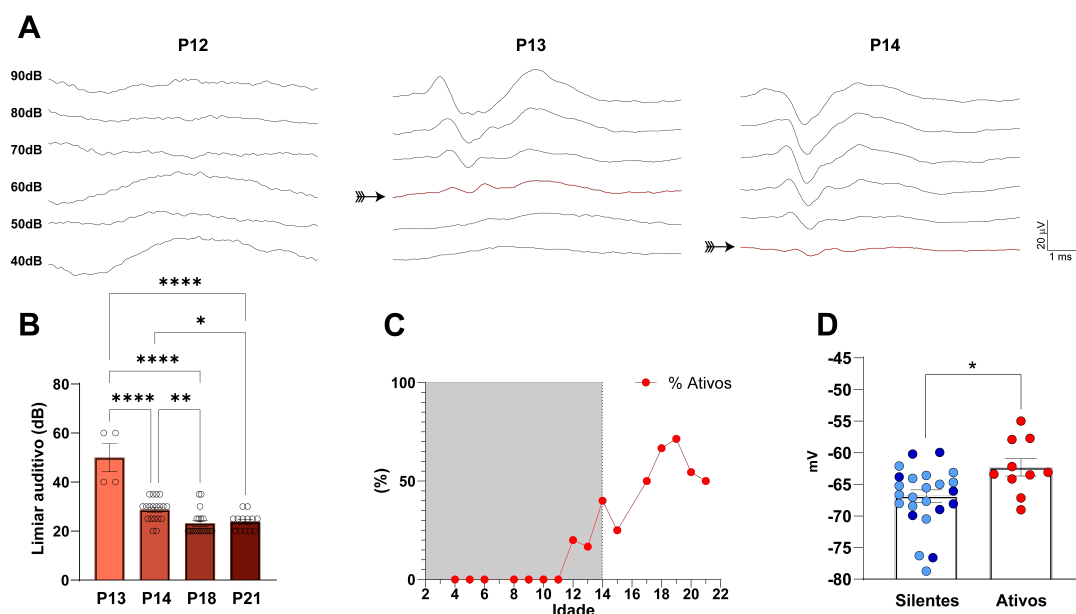


Figura 17 – A proporção de neurônios ativos aumenta após a abertura do meato acústico e o início da audição **A** - Respostas auditivas do tronco cerebral de um camundongo P12, P13 e P14. A seta mostra o limiar auditivo. **B** - Limiares auditivos em diferentes idades **C** - A proporção de neurônios ativos aumenta conforme a idade do animal. A caixa cinza representa a fase pré-audição **D**. Potencial de repouso da membrana na presença de TTX. Os círculos azuis claros são dados de neurônios pré-auditivos e círculos escuros de neurônios pós-audição. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

Roedores em geral começam a ouvir entre P9 e P14, quando o canal auditivo se abre (Alford & Ruben, 1963; Ehret, 1976; Hack, 1968; Sonntag et al., 2009). Antes disso, os estímulos acústicos de alta intensidade podem ser detectados por condução óssea (Makarov et al., 2021). Foi observado que antes de P14 os animais não apresentavam respostas acústicas a estalos ou palmas, bem como o meato acústico apresentava-se fechado, sugerindo que a audição plena se iniciaria a partir de P14. Registros de ABR em animais P12 evidenciaram a ausência de resposta ao estímulo de clique em 90dB SPL (figura 17A). Em P13, foram detectadas respostas com o limiar de 50 dB ($50 \pm 18,37$ dB; $n=4$), (figura 17B) entretanto, o meato acústico permanecia fechado. Em P14 verificou-se o pavilhão acústico desses animais e constatou-se a sua abertura. Com isso, foi possível determinar o início da audição plena dos animais, uma vez que o limiar auditivo foi menor em comparação com animais P13 ($p < 0,0001$). Como o sistema continua se desenvolvendo, os limiares ainda diminuem até P21, idade em que a audição dos animais se encontra em pleno funcionamento (P14: 28.7 ± 1.1 dB;

P18: 23.2 ± 1.2 dB; P21 23.8 ± 1 dB; $n = 19, 19$ e 13 , respectivamente. $p < 0,001$) (figura 17B). Além disso, os traçados de ABR em P14 ainda não apresentam todas as ondas definidas, o que ocorre alguns dias depois (P17), sugerindo que mesmo logo após a abertura do meato acústico a resposta dos neurônios do tronco auditivo ainda é deficiente, ocorrendo uma maturação das vias nos dias seguintes. Mesmo assim usaremos o dia 14 pós-natal como um limiar entre a fase pré-audição e pós-audição, já que representa um evento crucial para o início da audição plena, a abertura do meato acústico e o início da detecção de sons de baixa intensidade.

Os registros de *whole-cell patch clamp* foram feitos em neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal de animais entre P4 e P21. Os neurônios dos animais de P4 até P13 foram classificados como pré-audição e a partir de P14 como pós-audição. Verificou-se que os neurônios silentes eram predominantes nos animais pré audição (96%, 48 das 50 células), enquanto pós audição essa proporção assume valores próximos (silentes 47.37% e ativos 52.63%, 18 e 20 neurônios, respectivamente), corroborando com trabalhos anteriores (R. Leão et al., 2012; Zugaib et al., 2016). Os neurônios ativos começaram a aparecer em torno de P12 e P13, com um neurônio encontrado em cada uma dessas idades (figura 17C). Após P14, a proporção dos neurônios ativos aumentou gradualmente e atingiu o máximo em P19. Dessa forma, conclui-se que o período onde os neurônios ativos emergem acontece simultaneamente com o início da audição desses animais.

Uma diferença fundamental entre os dois tipos neuronais é o potencial de repouso da membrana (RMP). Neurônios ativos apresentam o potencial mais despolarizado em comparação aos neurônios silentes. Esse é o principal fator responsável pela existência dos modos de disparo dos neurônios fusiformes (Leao et al., 2012). Os neurônios fusiformes registrados para esse trabalho apresentaram essa mesma característica (figura 17C). Ao aferir o RMP, na presença de TTX, o potencial de neurônios silentes foi de -66.8 ± 0.9 mV ($n=25$) enquanto os ativos exibiram um potencial de -62.3 ± 1.3 mV ($n=10$) ($p<0.01$). O RMP de neurônios silentes pré e pós audição não foi estatisticamente diferente (pré-audição: $-67,3 \pm 1,1$ mV; pós-audição: $-66,0 \pm 1,8$ mV; $n = 16$ e 9 , respectivamente; $p > 0.05$, figura 17C).

4.2 Neurônios pós audição são mais excitáveis em comparação a neurônios silentes pré audição

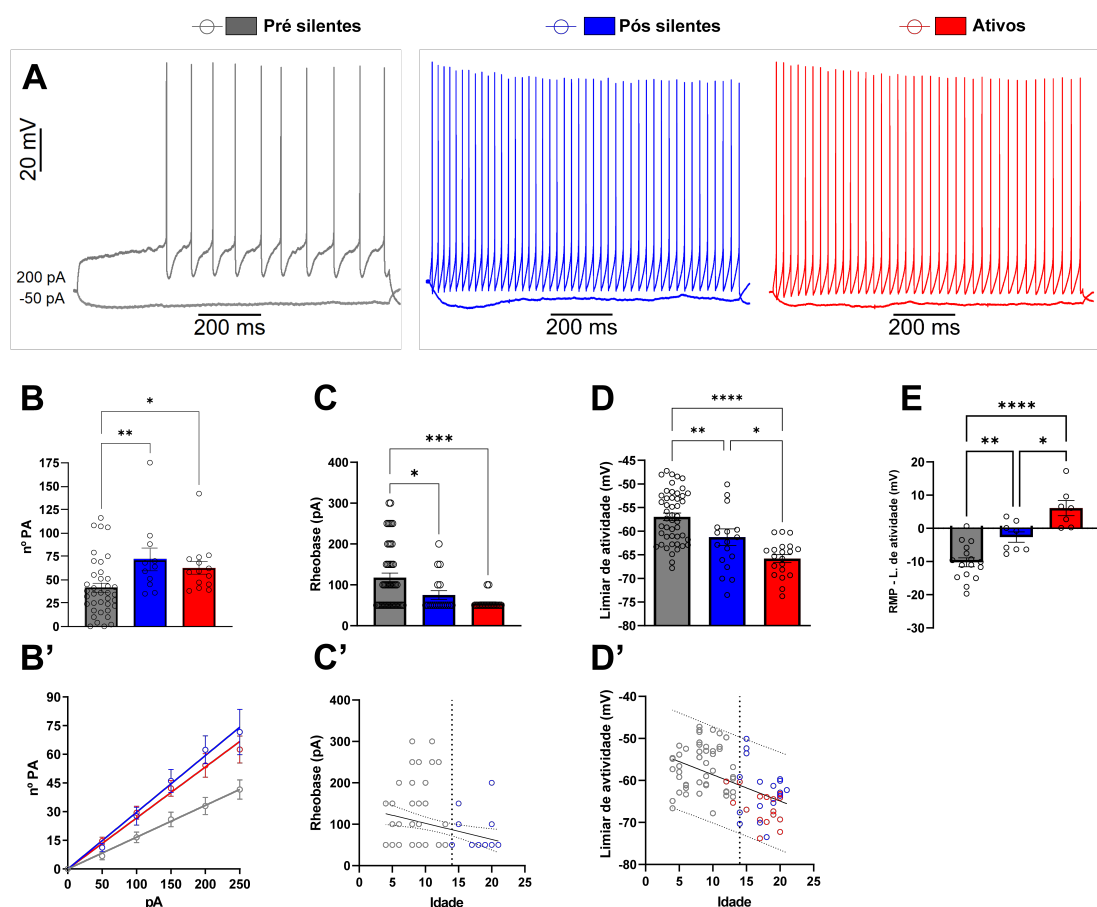


Figura 18 – Excitabilidade dos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós-silenciosos são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçados representativos de um neurônio quieto de um camundongo em P10, um neurônio quieto de um camundongo em P20 (azul) e um neurônio ativo (vermelho) de um camundongo da mesma idade. **B** - Número de potenciais de ação disparados a 250 pA. **B'** - Número de potenciais de ação disparados em resposta a cada injeção de corrente. **C** - Rheobase de neurônios pré e pós auditivos e correlação com a idade (**C'**). **D** - O limiar de atividade e a correlação entre a idade (**D'**). **E** - Diferença entre RMP e limiar de atividade. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

Ao comparar a taxa de disparo dos neurônios pré e pós audição, percebe-se uma maior excitabilidade dos neurônios de animais mais velhos. Neurônios silentes de animais entre P4 e P14 dispararam menos potenciais de ação em resposta a injeção de corrente despolarizante quando comparados a neurônios pós audição silentes e ativos (41 ± 5 ; 71 ± 12 e 62 ± 7 , respectivamente, $p < 0,01$). Quando se comparou a rheobase, neurônios pré audição apresentaram um valor maior (pré silentes $117 \pm 11,19$ pA; pós silentes $67,6 \pm 10,88$ pA; ativos $55 \pm 3,44$ pA; figura 18C).

Ou seja, foi necessário injetar mais corrente para deflagrar um potencial de ação. Além disso, uma rheobase maior pode estar relacionada com as diferenças no limiar de atividade dos diferentes estados neuronais (R. Leão et al., 2012). De fato, o limiar de atividade dos neurônios pré audição silentes foi mais despolarizado em comparação aos neurônios pós audição, silentes ou ativos (-57 ± 1 mV; -61.3 ± 1.8 mV e -66 ± 1 mV, respectivamente. $p < 0.0001$. figura 18D). A diferença do potencial de membrana e do limiar de atividade foi maior nos neurônios pré audição, tanto em comparação com neurônios silentes pós audição (-10.2 ± 1.3 mV e -2.62 , $p < 0.01$, respectivamente) quanto com os neurônios ativos (6.1 ± 2.3 mV, $p < 0.0001$). Portanto, os neurônios pré audição apresentaram um potencial de repouso da membrana mais hiperpolarizado além de um limiar de atividade mais despolarizado.

4.3 Os potenciais de ação são mais rápidos e maiores conforme a idade do animal

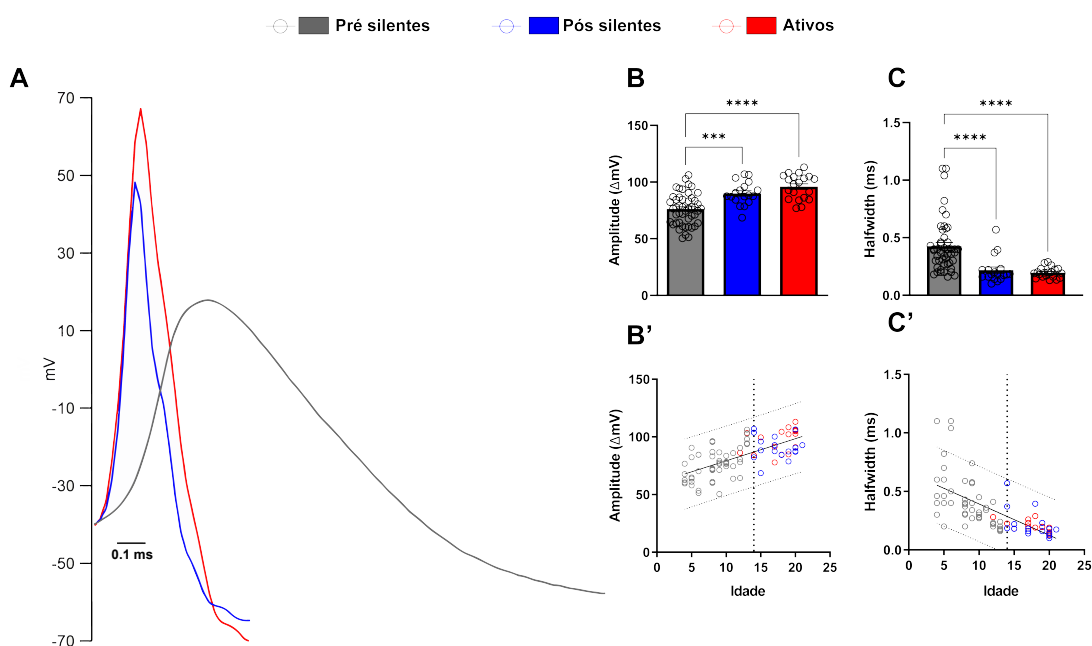


Figura 19 - Parâmetros dos potenciais de ação. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçados representativos do potencial de ação dos diferentes estados neuronais. **B** - Amplitude do potencial de ação e correlação com a idade (**B'**). **C** - Halfwidth e correlação com a idade (**C'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

Como os neurônios fusiformes de animais mais velhos são mais excitáveis, foi investigado se parâmetros principais do potencial de ação poderiam ser diferentes. Sendo assim, constatou-se que os potenciais de ação dos neurônios pré audição têm

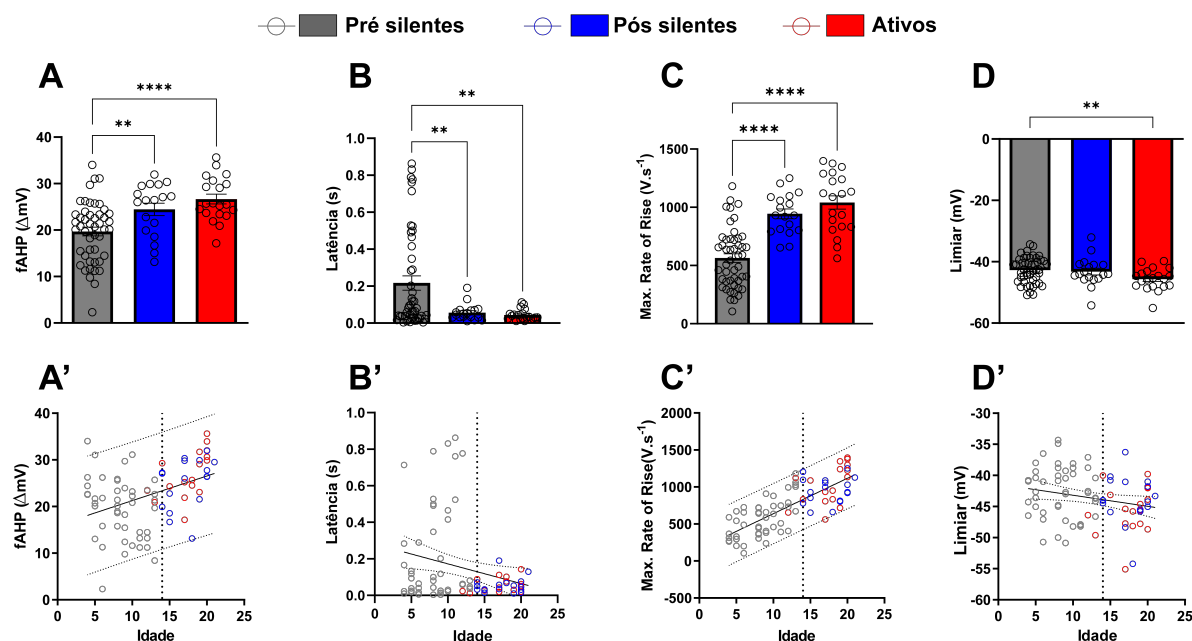


Figura 20 – Outros parâmetros do potencial de ação. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - fAHP e correlação com a idade (**A'**). **B** - Latência do potencial de ação e correlação com a idade (**B'**). **C** - Taxa máxima de subida (Max. Rate of Rise) e correlação com a idade (**C'**). **D** - Limiar do potencial de ação e correlação com a idade (**D'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

amplitudes menores em comparação com potenciais de ação de neurônios pós audição (pré quieto 76.14 ± 1.9 mV; pós quieto 89.96 ± 2.38 mV; ativo 96.00 ± 2.42 mV; ANOVA: $p < 0.0001$; figura 19B.) A *halfwidth* foi maior em neurônios pré audição (pré silentes 0.42 ± 0.03 ms; pós silentes 0.21 ± 0.02 ms; ativos 0.2 ± 0.01 ms; ANOVA: $p < 0.0001$; figura 19C) e a taxa máxima de subida (*max. rate of rise*, Max_{ROR}) de $dV/m/dt$ foi mais lenta (pré silentes 564.1 ± 36.98 $V.s^{-1}$; pós silentes 943.8 ± 41.40 $V.s^{-1}$; ativo 1041 ± 56.73 $V.s^{-1}$; ANOVA: $p < 0.0001$; figura 20C). Somado a isso, tanto a amplitude quanto o Max_{ROR} se correlacionam positivamente com a idade, enquanto a *halfwidth* correlaciona-se inversamente (figura 19B', 20C', respectivamente).

A latência do primeiro potencial de ação é maior em neurônios silentes pré-auditivos (pré silentes 0.22 ± 0.04 s; pós silentes 0.05 ± 0.01 s; ativos 0.04 ± 0.01 s; ANOVA: $p = 0.002$ figura 20B) e não houve correlação significativa com a idade (figura 20B', $p = 0.23$). Descobriu-se que o limiar do potencial de ação é ligeiramente mais hiperpolarizado em neurônios ativos em comparação com neurônios pré silentes (pré silentes -42.73 ± 0.60 mV; pós silentes -43.22 ± 1.10 mV; ativos -45.65 ± 0.79 mV; ANOVA: $p = 0.02$, Figura 20D'), mas sem correlação com a idade (figura 20D'; $p = 0.10$).

Também se encontrou um fAHP menor em neurônios pré audição silentes (pré silentes 19.68 ± 0.94 mV; pós silentes 24.45 ± 1.34 mV; ativo 26.66 ± 1.05 mV; ANOVA: $p < 0.0001$, figura 20A) e uma correlação positiva deste parâmetro com a idade (figura 20A', $p = 0.02$). Conclui-se que há um refinamento dos potenciais de ação durante o desenvolvimento, esse tornando-se maiores mais curtos e mais rápidos.

4.4 Propriedades passivas e subliminares da membrana de neurônios fusiformes mudam durante o desenvolvimento

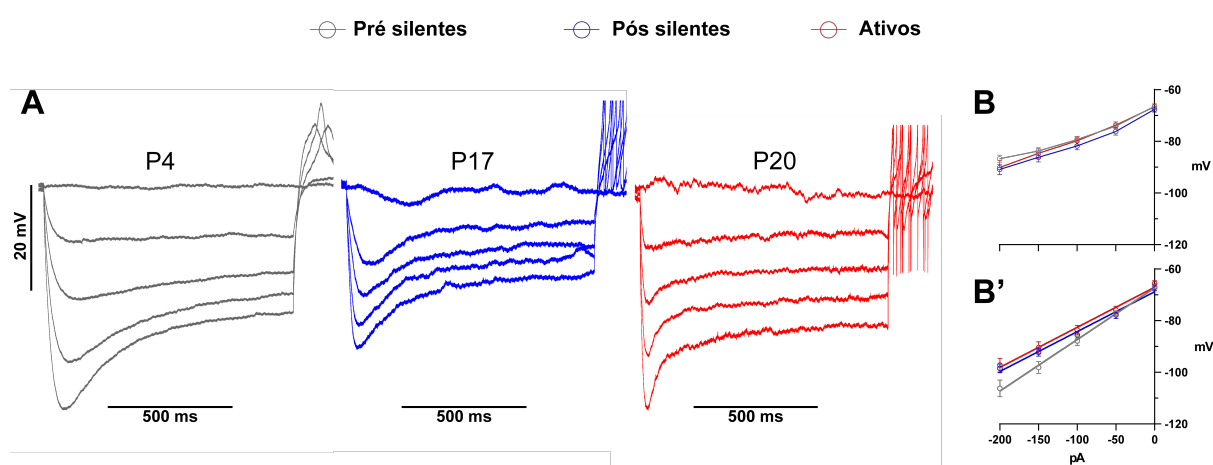


Figura 21 - Propriedades passivas de membrana dos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçados representativos de respostas de neurônios fusiformes a estímulos hiperpolarizantes de camundongos P4 (cinza), P17 (azul) e P20 (vermelho). **B** - Curva VI medida no estado estacionário e no pico da hiperpolarização (**B'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ *****.

Propriedades passivas e subliminares, em repouso, dos neurônios fusiformes afetam como eles respondem às correntes sinápticas e são determinadas por uma série de condutâncias (Ceballos et al., 2017b; R. Leão et al., 2012). Analisou-se a resistência de entrada no estado estacionário ($R_{input\ ss}$) e instantânea ($R_{input\ instant}$), e comparamos as relações de V-I de neurônios fusiformes pré audição e pós audição (figura 21B, B'). As médias da $R_{input\ ss}$ foram semelhantes em todos os grupos (pré silentes 94.73 ± 6.21 M Ω ; pós silentes 93.62 ± 6.11 M Ω ; ativo 100.2 ± 13.99 M Ω ; ANOVA: $p = 0.87$; figura 22A) e não foi observada uma correlação significativa com a idade (figura 22A', $p = 0.63$). No entanto, as relações V-I medidas no pico da hiperpolarização, mostraram que os neurônios pré audição não apresentam uma retificação da resposta em potenciais mais hiperpolarizados (figura 22B') e têm uma maior $R_{input\ instant}$ (pré silentes 204.5 ± 14.31 M Ω ; pós silentes 137.7 ± 11.60 M Ω ; ativo

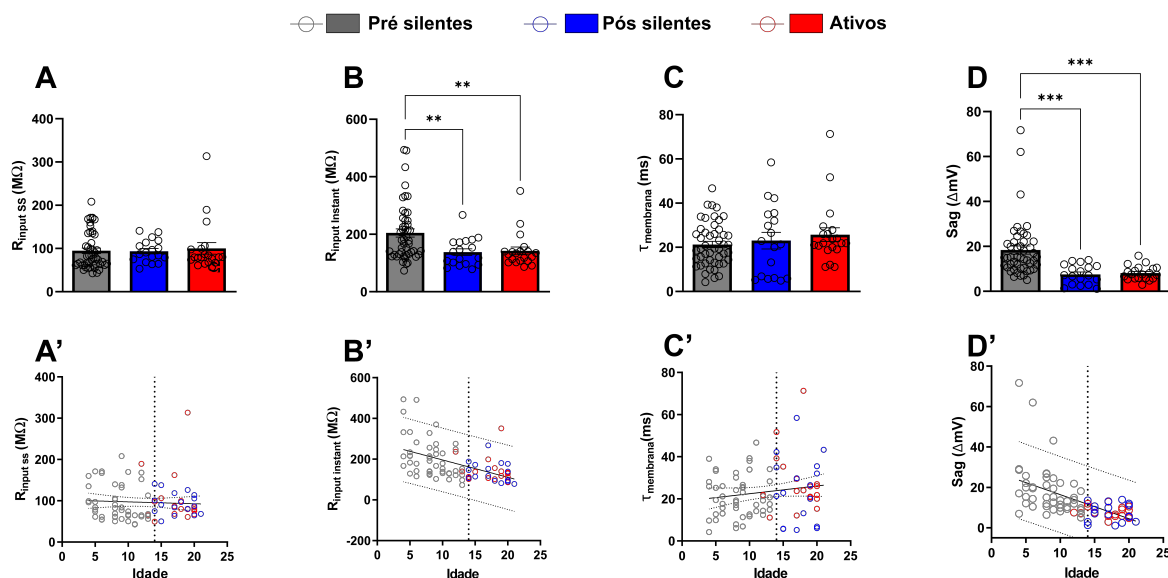


Figura 22 - Outras propriedades passivas de membrana dos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Resistência de membrana ($R_{input\ ss}$) no estado estacionário e no pico da hiperpolarização ($R_{input\ instant}$) (**B**) e as respectivas correlações com as idades em **A'** e **B'**. **C** - Constante de tempo da membrana e a correlação com a idade do animal (**C'**). **D** - Sag de despolarização e a correlação com a idade (**D'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

142.3 ± 13.53 ; ANOVA: $p=0.003$; figura 22B). Os valores de $R_{input\ instant}$ correlacionaram negativamente com a idade ($p < 0.001$, figura 22B'). Curiosamente, a constante de tempo de membrana medida perto de -70 mV não mostrou diferença entre os grupos (pré silentes 21.2 ± 1.4 ms; pós silentes 23.0 ± 3.8 ms; ativo 25.7 ± 3.1 ms, figura C), possivelmente porque nesse potencial, a resistência da membrana de todos os grupos é semelhante. Por outro lado, isso pode sugerir uma mudança na capacitância (refletindo uma mudança no tamanho celular) dos neurônios durante o desenvolvimento. Contudo, os valores de capacitância da membrana medidas pelos valores do amplificador, não se diferiram entre os estados neuronais (ANOVA, $p=0.38$)

A diferença entre as medidas de resistência da membrana sugere que os neurônios pré audição têm um sag de despolarização mais proeminente, mediado pela ativação de canais HCN (Ceballos et al., 2016). Esses canais despolarizam o potencial de membrana após a injeção de uma corrente hiperpolarizante. Os neurônios pré audição apresentaram um sag de despolarização maior quando comparados com neurônios pós audição (pré- silentes 18.35 ± 1.83 mV; pós silentes 7.52 ± 1.06 mV; ativo 8.1 ± 0.7 mV; ANOVA: $p < 0.0001$; figura 22D) além de

correlacionar negativamente com a idade ($p < 0,0001$; figura 22D'). Constatou-se então que, embora a resistência da membrana seja semelhante entre as fases de desenvolvimento, as mudanças na $R_{input\ instant}$ e no *sag* sugere que as condutâncias que afetam esses parâmetros mudam durante o desenvolvimento e podem contribuir para o estabelecimento de neurônios maduros silentes e ativos após a audição.

4.5 A corrente de sódio persistente (I_{NaP}) se desenvolve durante o período pós-audição e cria os estados ativo e silente

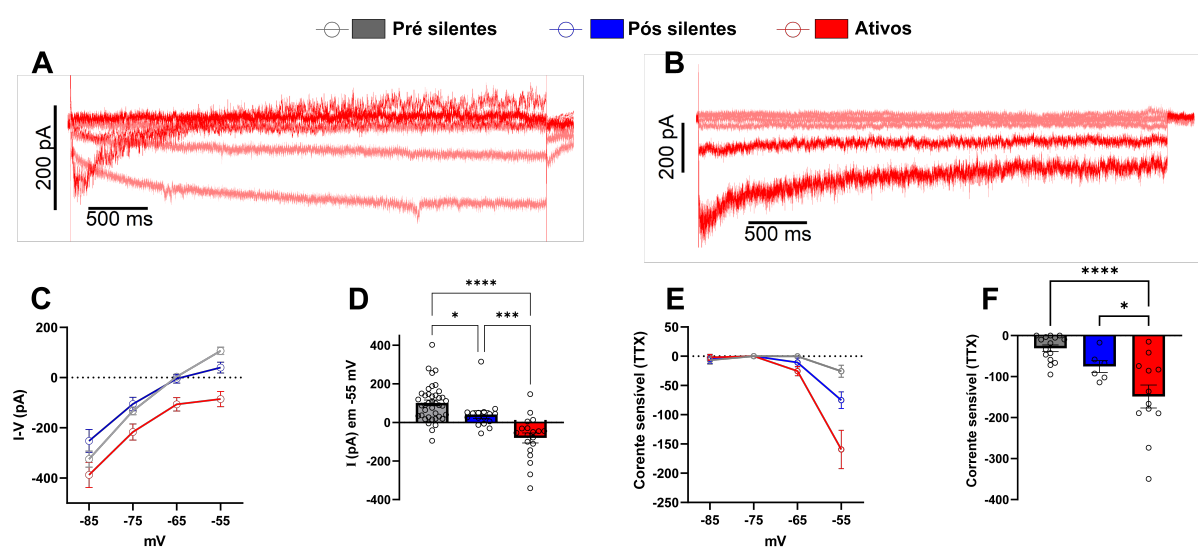


Figura 23 - I_{NaP} nos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** - Traçado representativo em resposta à despolarização progressiva de -85 mV para -55 mV de um neurônio fusiforme ativo. **B** - Corrente sensível ao TTX subtraída de **A**. **C** - Perfil I-V de -85 mV a -55 mV dos neurônios fusiformes. **D**. Corrente total em -55 mV. **E**. Perfil I-V da corrente sensível ao TTX. **F** - Corrente sensível ao TTX em -55 mV. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

O primeiro resultado encontrado foi que os neurônios ativos emergem após o início da audição. Trabalhos anteriores evidenciaram que o estado ativo requer a expressão da I_{NaP} (Ceballos et al., 2016; R. Leão et al., 2012). A I_{NaP} é responsável por criar o limiar de atividade espontânea. Se esse limiar estiver mais hiperpolarizado em comparação ao potencial de repouso, o neurônio apresenta disparos espontâneos de potencial de ação (R. Leão et al., 2012). Os dados encontrados no presente trabalho sugerem que a I_{NaP} esteja mais abundante nos animais mais velhos, pois o limiar de atividade se correlaciona significativamente com a faixa de idade estudada. Somado a isso, o limiar de atividade a partir de P14 apresentou-se mais hiperpolarizado (figura 18D). As relações I-V de neurônios pré-audição silentes

mostraram que acima de -60 mV não houve uma deflexão produzida pelo desenvolvimento da I_{NaP} (R. Leão et al., 2012; Strazza et al., 2021) (figura 23C). A corrente total em -55 mV foi mais positiva em neurônios pré-audição (pré-silentes 101.1 ± 14.62 pA; pós-silentes 40.74 ± 20.21 pA; ativos -83.69 ± 24.68 pA; ANOVA: $p < 0,0001$; figura 23D). Deste modo, sugeriu-se que a I_{NaP} fosse maior após o início da audição. Para responder essa pergunta, a I_{NaP} foi medida em *voltage-clamp* como a corrente persistente de entrada sensível ao TTX. Em neurônios silentes pré audição a I_{NaP} apresentou-se menor em comparação aos outros estados neuronais (pré silentes -30.73 ± 8.01 pA; pós silentes -75.24 ± 14.46 pA; ativos -158.1 ± 27.53 pA; ANOVA: $p < 0,0001$; figura 23F). Com isso, a I_{NaP} é mais abundante após a audição e essa característica possibilita o modo de disparo espontâneo dos neurônios fusiformes.

4.6 A condutância da corrente I_H é maior em neurônios fusiformes imaturos em comparação aos neurônios ativos

Os canais controlados por nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização

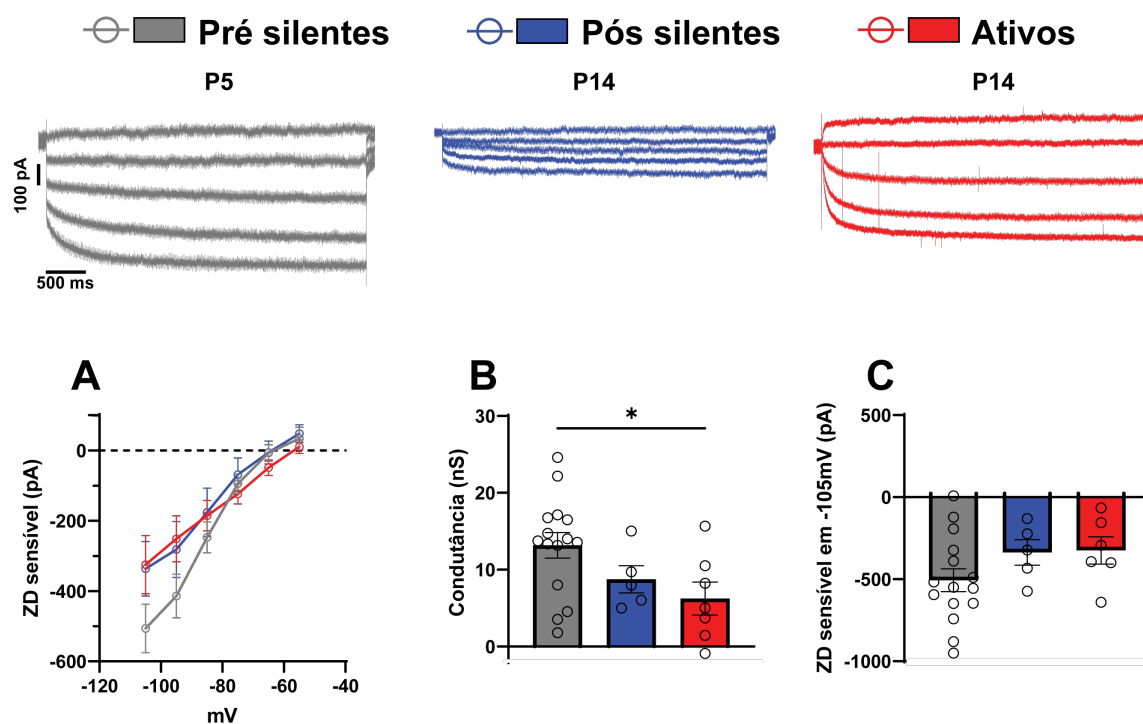


Figura 24 – I_H nos neurônios fusiformes. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** – Corrente sensível ao ZD7288. **B** – Condutância calculada como o coeficiente angular entre os potenciais -105 e -65 mV. **C** – Valor máximo da corrente sensível medido em -105 mV. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

(HCN - *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) medeiam a corrente H (I_H). Esses canais são compostos por proteínas integrais de membrana e modulam uma corrente catiônica não seletiva e dependente de voltagem (Lüthi & McCormick, 1998). Nos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal, ela exerce um papel fundamental no controle da resistência de membrana desses neurônios (Ceballos et al., 2016). Como os resultados de *current-clamp* evidenciaram um *sag* maior e uma maior resistência de entrada medida no pico da hiperpolarização nos animais mais novos, decidiu-se investigar se essa corrente era mais expressa nos animais mais jovens. Na figura 24 são mostradas as diferenças na expressão da I_H nas diferentes idades. Em -105 mV, a corrente medida não foi diferente significativamente (-506.3 ± 69.15 pA, -336.8 ± 77.67 pA, -324.7 ± 83.11 pA para pré ($n=15$), pós silentes ($n=5$) e ativos ($n=7$) respectivamente ANOVA $p > 0.05$). Entretanto,

a condutância, medida como o coeficiente angular entre -105 mV e -65 mV, foi diferente entre os neurônios pré audição e os neurônios ativos. A limitação foi provavelmente o número de células registradas. Porém, o resultado encontrado será investigado em estudos posteriores.

4.7 O perfil I/V das correntes de potássio retificadoras de entrada (KIR)

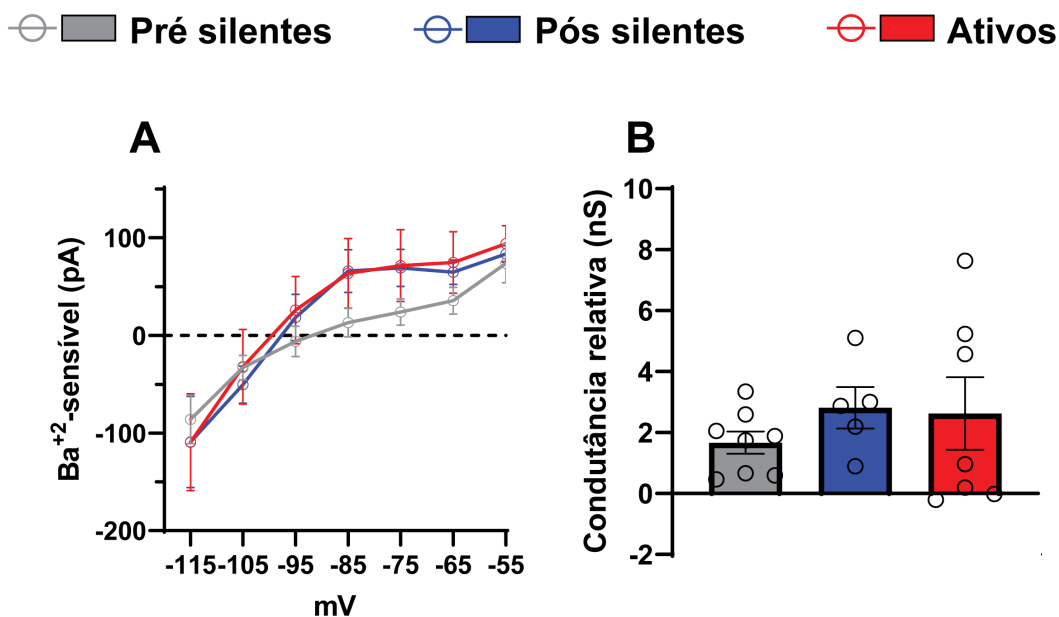


Figura 25 – Perfil I-V da corrente sensível ao Ba²⁺. Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. **A** – Corrente sensível ao Ba²⁺ 200μM em diferentes etapas do desenvolvimento. **B** - Condutância da corrente Ba²⁺ sensível. p <0,05 *, p <0,01 **, p <0,001 ***, p <0,0001 ****.

Em estudos anteriores de Leão et al. (2012), descobriu-se que condutâncias KIR são as responsáveis por diferenciar neurônios silentes dos ativos em animais adultos. O perfil I/V da corrente sensível ao Ba²⁺ foi bem distinto quando comparados com os neurônios pós audição (figura 25A) mas não observamos diferenças significativas na condutância entre os dois grupos (figura 25B). Assim como os resultados da I_H, não se pode tirar conclusões definitivas com relação a essa corrente, pois o número de células registradas foi muito baixo (n=8, 5 e 7 para pré, pós-silentes e ativos respectivamente). Entretanto, esses resultados iniciais servirão de base para estudos posteriores.

4.8 As correntes de vazamento sugerem um componente de potássio maior nos neurônios fusiformes de animais mais jovens

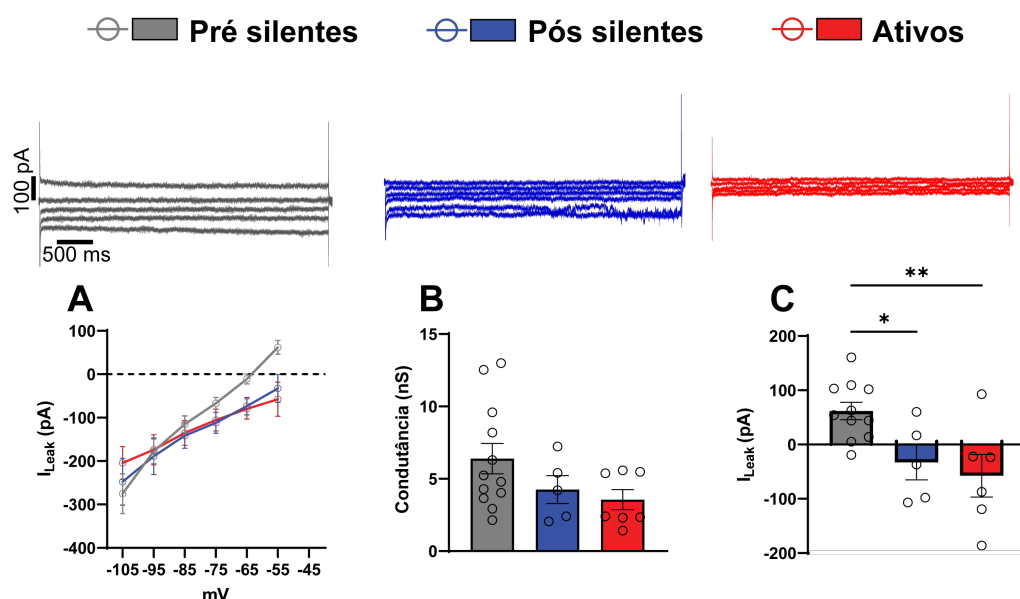


Figura 26 - Em cinza são representados neurônios silentes pré-auditivos, neurônios pós silentes são representados em azul e neurônios ativos em vermelho. Na parte superior são representados os traçados das correntes de cada tipo neuronal. **A** – Perfil I-V da corrente de vazamento resultante após a administração de TTX, ZD e Ba^{+2} . **B** – Condutância da corrente de vazamento. **C** – Corrente medida em -55 mV. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

Segundo Ceballos et al (2016), consideramos como corrente de vazamento aquela corrente remanescente na presença de TTX, ZD e Ba^{+2} . Analisando essa corrente nos neurônios fusiformes pré- e pós-audição percebeu-se que o potencial de reversão foi mais hiperpolarizado em animais mais jovens (-64.75 ± 0.35 mV) em comparação aos animais pós audição (-47.98 ± 0.21 mV e -37.83 ± 0.14 mV pós silentes e ativos, respectivamente). De fato, os neurônios fusiformes silentes pré audição apresentam uma corrente positiva (61.81 pA \pm 15.96) em -55 mV enquanto os neurônios silentes pós audição e ativos uma corrente negativa (-32.89 pA \pm 32.28 e -57.58 pA \pm 39.24 , respectivamente), significativamente distintas (ANOVA, $p < 0.01$) (figura 26C). Entretanto, a condutância entre -105 mV e -65 mV não foi significativamente diferente. Esses resultados sugerem que nos neurônios fusiformes pré-audição predomine condutâncias de vazamento permeáveis a potássio em relação às de sódio.

Ambos os resultados para as correntes sensíveis ao TTX, ZD e Ba²⁺ servirão de apoio para os estudos posteriores dessas condutâncias, bem como o resultado das correntes de vazamento.

Tabela 1 – Pós testes LSD de Fisher ANOVA. O número de células (n) para as variáveis foram 50 de pré-silentes, 18 de pós-silentes e 20 de ativo. Alguns valores de n foram diferentes: potencial de membrana em repouso, n = 16 de pré-silentes, 8 de pós-silentes e 7 de ativo; o n para número de potenciais de ação em 250 pA de pré-silentes, pós-silentes e ativo foram 38, 11 e 14, respectivamente; corrente em -55 mV, n = 41, 16 e 20 para pré-, pós-silentes e ativo, respectivamente; I_{NaP} n= 15, 6 e 13 para pré-, pós-silentes e ativo, respectivamente. Os valores em negrito destacam $\alpha < 0,05$.

		Média 1	Média 2	Dif. Média	p-valor	95.00% CI da dif.
Limiar de atividade (mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	-56.96	-61.27	4.307	0.007	1.202 a 7.411
	Pré-silentes vs. Ativos	-56.96	-65.80	8.838	<0.0001	5.849 a 11.83
	Pós-silentes vs. Ativos	-61.27	-65.80	4.532	0.0156	0.8822 a 8.181
Amplitude AP (Δ mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	76.14	89.96	-13.82	0.0001	-20.67 a -6.979
	Pré-silentes vs. Ativos	76.14	96.00	-19.35	<0.0001	-26.44 a -13.27
	Pós-silentes vs. Ativos	89.96	96.00	-6.033	0.1396	-14.08 a 2.012
Latência AP (s)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	0.2169	0.0563	0.1605	0.0054	0.0487 a 0.2724
	Pré-silentes vs. Ativos	0.2169	0.04334	0.1735	0.0019	0.0658 a 0.2813
	Pós-silentes vs. Ativos	0.0563	0.04334	0.0130	0.8445	-0.1185 a 0.1445
Limiar AP (mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	-42.73	-43.22	0.4942	0.6674	-1.785 a 2.773
	Pré-silentes vs. Ativos	-42.73	-45.73	2.92	0.009	0.7292 a 5.119
	Pós-silentes vs. Ativos	-43.22	-45.73	2.430	0.075	-0.2495 a 5.109
fAHP (Δ mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	19.68	24.45	-4.764	0.0051	-8.054 a -1.474
	Pré-silentes vs. Ativos	19.68	26.66	-6.979	<0.0001	-10.15 a -3.812
	Pós-silentes vs. Ativos	24.45	26.66	-2.216	0.2577	-6.083 a 1.651
Corrente em -55mV	Pré-silentes vs. Pós-silentes	101.1	40.74	60.34	0.0360	4.044 a 116.6
	Pré-silentes vs. Ativos	101.1	-83.69	184.8	<0.0001	132.7 a 236.9
	Pós-silentes vs. Ativos	40.74	-83.69	124.4	0.0002	60.38 a 188.5
Halfwidth (ms)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	0.4256	0.2181	0.2075	<0.0001	0.1080 a 0.3069
	Pré-silentes vs. Ativos	0.2181	0.1961	0.2295	<0.0001	0.1337 a 0.3252
	Pós-silentes vs. Ativos	0.2181	0.1961	0.02201	0.7090	-0.0949 a 0.1389
I_{NaP} (-55mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	-30.73	-75.24	44.51	0.0941	-11,21 a 132,6
	Pré-silentes vs. Ativos	-30.73	-158.1	127.4	0.0002	71,38 a 199,2
	Pós-silentes vs. Ativos	-75.24	-158.1	82.87	0.0688	-6,244 a 155,4
Max. Rate of rise (V.s⁻¹)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	564.1	943.8	-379.8	<0.0001	-512.4 a -247.1
	Pré-silentes vs. Ativos	564.1	1041	-476.9	<0.0001	-604.7 a -349.2
	Pós-silentes vs. Ativos	943.8	1041	-97.16	0.2187	-253.1 a 58.76
(τ)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	21.26	23.02	-1.75	0.6082	-8.540 a 5.029
	Pré-silentes vs. Ativos	21.26	25.72	-4.459	0.1783	-10.99 a 2.074
	Pós-silentes vs. Ativos	23.02	25.72	-2.704	0.5020	-10.68 a 5.271

Nº de potenciais de ação (250 pA)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	41	71	30	0.0074	-52 a -8
	Pré-silentes vs. Ativos	41	62	21	0.0390	-41 a -1
	Pós-silentes vs. Ativos	62	71	9	0.4766	-17 a 34
R input instant (MΩ)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	204.5	139.8	66.83	0.0046	17.67 a 113.3
	Pré-silentes vs. Ativos	204.5	142.3	62.2	0.0061	14.90 a 108.6
	Pós-silentes vs. Ativos	137.7	142.3	-4.610	0.8648	-60.92 a 53.40
R input ss (MΩ)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	94.73	93.62	1.106	0.9290	-23.53 a 25.74
	Pré-silentes vs. Ativos	94.73	100.2	-5.453	0.6487	-29.18 a 18.24
	Pós-silentes vs. Ativos	93.62	100.2	-6.559	0.6535	-35.52 a 22.40
Potencial de repouso da membrana (mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	-67.24	-66.71	-0.534	0.8112	-5.072 a 4.005
	Pré-silentes vs. Ativos	-67.24	-62.01	-5.235	0.0319	-9.980 a -0.4894
	Pós-silentes vs. Ativos	-66.71	-62.01	-4.701	0.0834	-10.07 a 0.6643
Rheobase (pA)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	117.7	75	42.71	0.0153	8.405 a 77.01
	Pré-silentes vs. Ativos	117.7	55	62.71	0.0003	29.68 a 95.74
	Pós-silentes vs. Ativos	75	55	20	0.3268	-20.32 a 60.32
Sag (Δ mV)	Pré-silentes vs. Pós-silentes	18.35	7.524	11.04	0.0002	5.422 a 16.66
	Pré-silentes vs. Ativos	18.35	8.133	10.88	0.0002	5.379 a 16.39
	Pós-silentes vs. Ativos	7.524	8.133	-0.1591	0.9625	-6.875 a 6.557

Tabela 2 - Dados estatísticos das correlações com a idade. Os valores de n para as variáveis foram 50 de pré-silentes, 18 de pós-silentes e 20 de ativos. Valores em negrito indicam r de Person entre 0.5 e 1 ou -0.5 e -1.

		Pearson r	R ²	p valor	95% CI
Limiar de atividade (mV)	Pré-silentes	0.1073	0.0115	0.7834	-0.5995 a 0.7201
	Pós-silentes	-0.1606	0.0258	0.7309	-0.8151 a 0.6740
	Ativos	-0.6687	0.4471	0.0698	-0.9335 a 0.06805
	Todos	-0.6063	0.3822	0.0107	-0.8526 a -0.1767
Amplitude AP (Δ mV)	Pré-silentes	0.8009	0.6415	0.0095	0.2923 a 0.9564
	Pós-silentes	-0.1092	0.01192	0.8157	-0.7967 a 0.7016
	Ativos	0.394	0.1552	0.3342	-0.4301 a 0.8599
	Todos	0.8777	0.7703	<0.0001	0.6761 a 0.9570
Latência AP (s)	Pré-silentes	0.2506	0.06282	0.5154	-0.4961 a 0.7842
	Pós-silentes	0.4414	0.1948	0.3215	-0.4669 a 0.8965
	Ativos	0.4061	0.1649	0.3182	-0.4183 a 0.8636
	Todos	-0.3040	0.09241	0.2524	-0.6950 a 0.2257
Limiar AP (mV)	Pré-silentes	-0.1809	0.0371	0.6414	-0.7544 a 0.5492
	Pós-silentes	-0.0919	0.0084	0.8446	-0.7903 a 0.7103
	Ativos	0.0467	0.0022	0.9126	-0.6804 a 0.7274
	Todos	-0.3878	0.1378	0.1504	-0.7411 a 0.1336
fAHP (Δ mV)	Pré-silentes	-0.5144	0.2798	0.0783	-0.8784 a 0.2274
	Pós-silentes	0.3622	0.1312	0.2123	-0.5375 a 0.8763
	Ativos	0.5595	0.3131	0.0746	-0.2396 a 0.9067
	Todos	0.5439	0.271	0.0147	0.06605 a 0.8189
Halfwidth (ms)	Pré-silentes	-0.8846	0.7826	0.001	-0.9756 a -0.5346
	Pós-silentes	-0.5098	0.2599	0.2425	-0.9125 a 0.3948
	Ativos	-0.3377	0.114	0.4134	-0.8420 a 0.4816
	Todos	-0.8668	0.7513	<0.0001	-0.9530 a -0.6506
Max. Rate of rise (V.s⁻¹)	Pré-silentes	0.8936	0.7986	0.0012	0.5646 a 0.9776
	Pós-silentes	0.1997	0.0399	0.6677	-0.6513 a 0.8282
	Ativos	0.5185	0.2688	0.188	-0.2934 a 0.8958
	Todos	0.9256	0.8567	<0.0001	0.7943 a 0.9743
(τ)	Pré-silentes	0.1737	0.03018	0.6549	-0.5544 a 0.7512
	Pós-silentes	0.265	0.0702	0.5657	-0.6097 a 0.8487
	Ativos	0.0975	0.0095	0.8183	-0.6520 a 0.7506
	Todos	0.4956	0.2456	0.0509	-0.0002 a 0.7958
R input instant (MΩ)	Pré-silentes	-0.8292	0.6876	0.0057	-0.9630 a -0.3675
	Pós-silentes	-0.6513	0.4242	0.113	-0.9422 a 0.1997
	Ativos	-0.2913	0.0848	0.484	-0.8263 a 0.5202
	Todos	-0.7915	0.6265	0.0003	-0.9245 a -0.4869

R input ss (MΩ)	Pré-silentes	-0.5058	0.2559	0.1647	-0.8758 a 0.2384
	Pós-silentes	-0.586	0.3434	0.1668	-0.9291 a 0.2990
	Ativos	-0.1784	0.03182	0.6726	-0.7845 a 0.6020
	Todos	-0.1832	0.03357	0.4970	-0.6224 a 0.3437
Rheobase (pA)	Pré-silentes	0.3437	0.1182	0.3651	-0.4151 a 0.8205
	Pós-silentes	-0.2689	0.07229	0.5599	-0.8499 a 0.6071
	Ativos	-0.04647	0.00215	0.9130	-0.7273 a 0.6805
	Todos	-0.3897	0.1519	0.1356	-0.7421 a 0.1313
Sag (Δ mV)	Pré-silentes	-0.8481	0.7193	0.0039	-0.9674 a -0.4212
	Pós-silentes	-0.2521	0.0636	0.5854	-0.8448 a 0.6183
	Ativos	-0.3042	0.0925	0.4638	-0.8308 a 0.5097
	Todos	-0.8967	0.8042	<0.0001	-0.9640 a -0.7220

4.9 A privação auditiva de curto prazo pode alterar propriedades eletrofisiológicas do neurônio fusiforme do DCN

Ao privar os animais por 5 dias, foi possível averiguar que algumas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes poderiam estar alteradas, principalmente as propriedades do potencial de ação. Os perfis V-I apresentaram

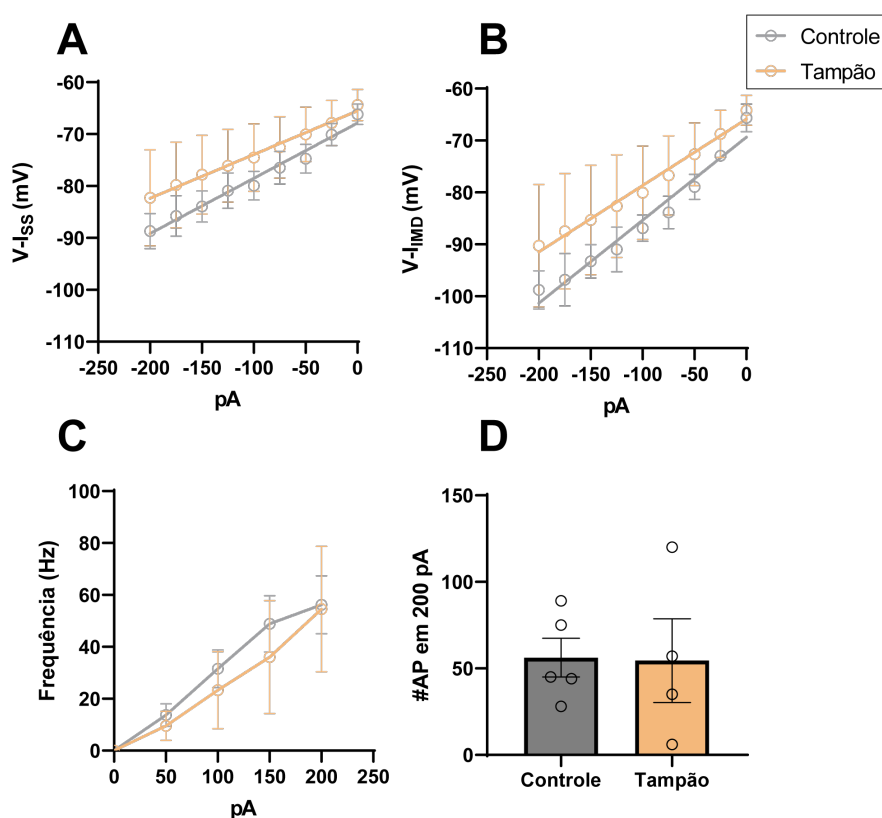


Figura 27 – O perfil V-I dos neurônios fusiformes de animais acusticamente privados, bem como a taxa de disparo neuronal. **A** e **B** – Perfis V-I medidos no estado estacionário e no pico da hiperpolarização. **C** e **D** - Taxa de disparo dos neurônios fusiformes a cada corrente injetada e número de potenciais de ação em 200 pA, respectivamente. n=4 para os animais tampão e n=5 para os animais controle.

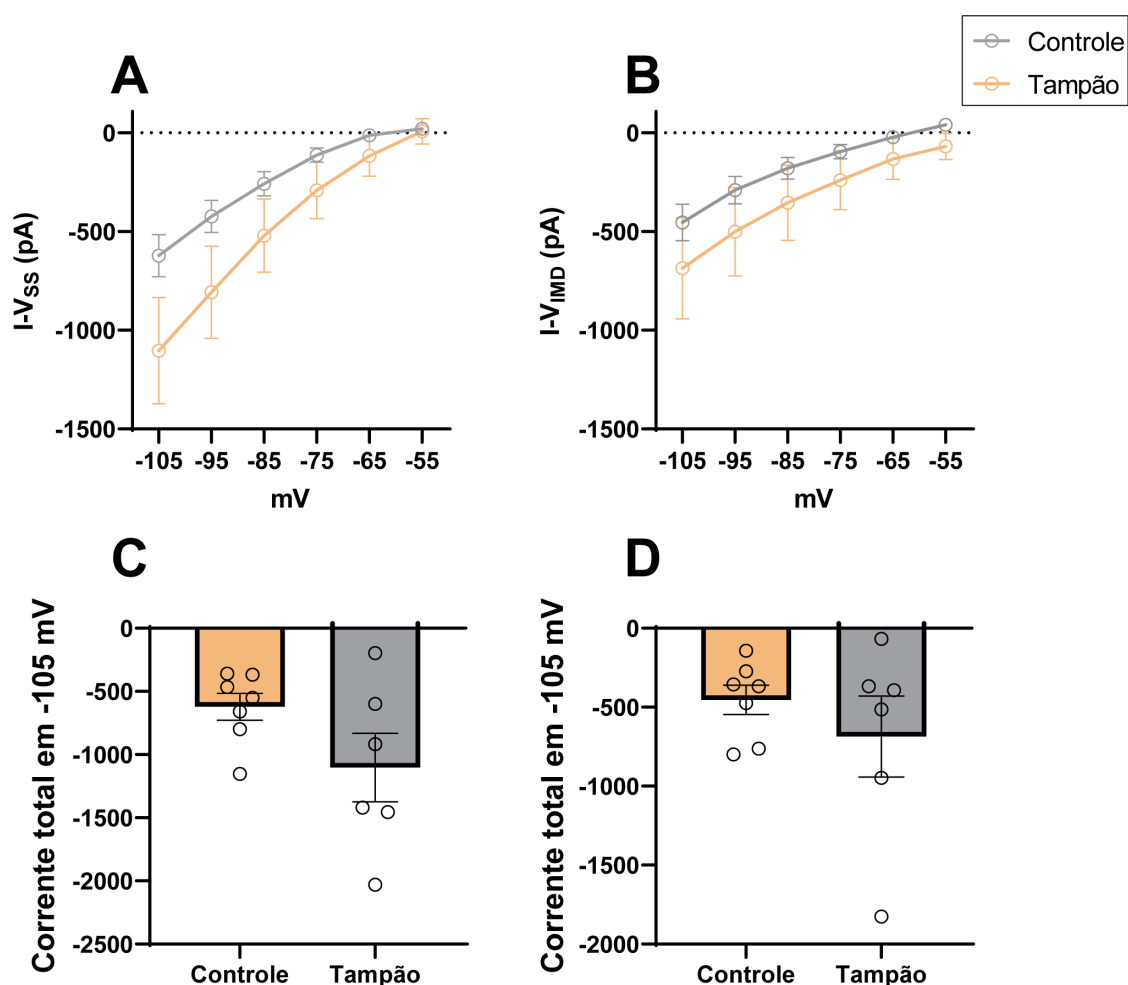


Figura 28 – Perfis I-V de neurônios fusiformes de animais acusticamente privados. A e B – I-Vs no estado estacionário e logo após o pulso de voltagem. C e D – corrente total em -105 mV. n=6 para animais do grupo Tampão e Controle.

inclinações diferentes entre os grupos Tampão e Controle, tanto no estado estacionário ($p=0.0045$) quanto medidos no pico do *sag* ($p=0.0269$), na análise de regressão linear (figura 27A e B). A inclinação da frequência pela corrente injetada não apresentou diferença estatística, bem como o número de potências de ação em 200 pA ($p=0.40$ e 0.94 , respectivamente, figura 27C e D). Quando se avalia a corrente total em -105 mV, não há diferença alguma tanto no período estacionário quanto para a medição imediata ($p=0.10$ e 0.38 , respectivamente, figura 28C e D). Nenhuma das propriedades de membrana nem o limiar de atividade apresentam diferenças estatísticas (figura 29).

Contudo, o que mais chama atenção são as alterações nas propriedades do potencial de ação (figura 30). A amplitude do potencial de ação nos animais acusticamente privados foi menor em comparação aos animais controle (Tampão

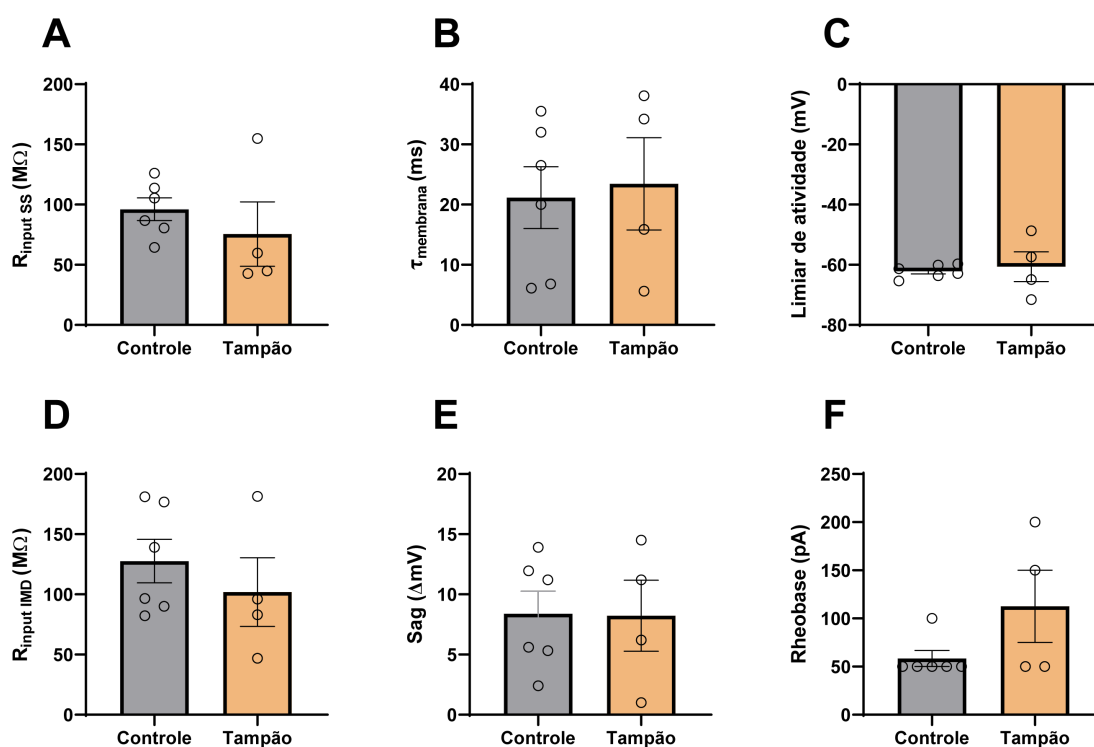


Figura 29 – Propriedades de membrana bem como o limiar de atividade não estão alterados nos animais acusticamente privados. **A** e **D** – R_{input} no estado estacionário e imediata, respectivamente. **B** – Constante de tempo da membrana. **C** – Limiar de atividade. **E** – sag. **F** – Rheobase.

73.94 mV \pm 3.86, n=4; Controle, 89.59 mV \pm 3.73, n=6, p=0.02) bem como o *max. rate of rise* (Tampão 719.5 V.s⁻¹ \pm 53.59, n=4; Controle, 957.6V.s⁻¹ \pm 67.85, n=6, p=0.03) e o limiar do potencial de ação (Tampão -38.23 mV \pm 1.648, n=4; Controle -43.89 mV \pm 0.8235. Os parâmetros de latência do potencial de ação, a *halfwidth* e a hiperpolarização rápida pós-potencial (fAHP), não apresentaram diferenças significativas.

Esses resultados sugerem que a privação acústica, mesmo que seja por poucos dias, pode influenciar em propriedades do potencial de ação do neurônio sem afetar tanto as características da membrana. Entretanto, a quantidade de células registradas foi muito aquém para inferir que qualquer alteração seja provocada exclusivamente pela privação, uma vez que para esse experimento não testamos animais *sham* para controlar possíveis efeitos do manuseio durante o processo de colocar o tampão. Estudos posteriores são necessários para melhores inferências.

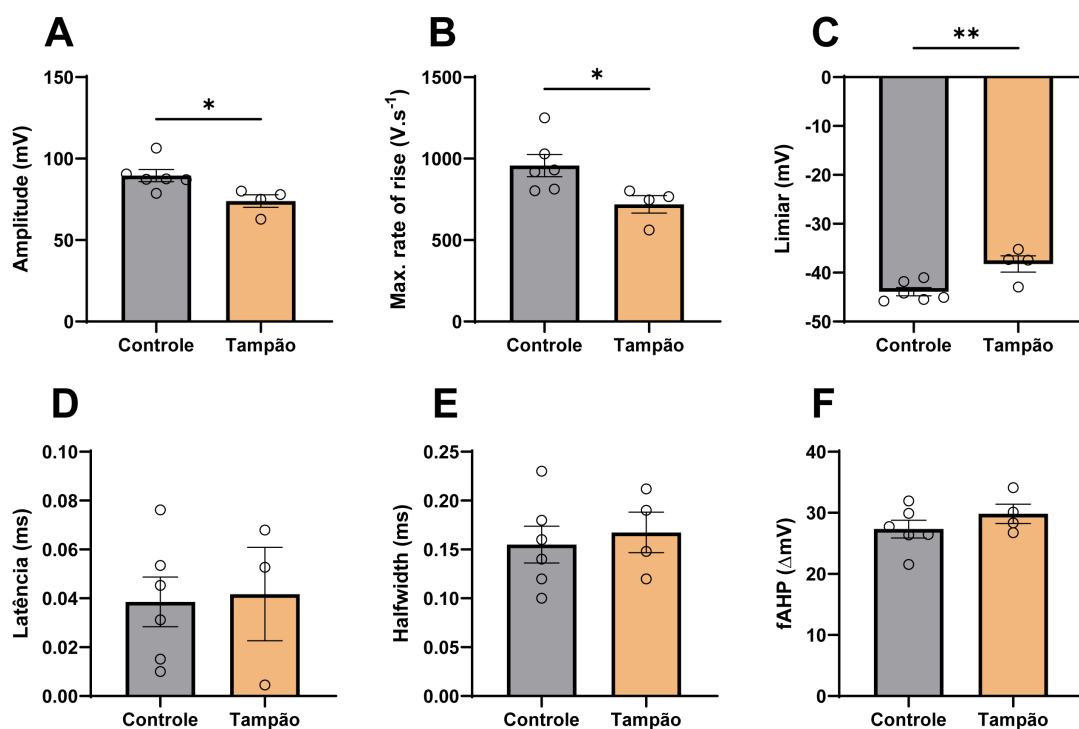


Figura 30 – Propriedades do potencial de ação apresentam alterações nos animais privados acusticamente. **A** – Amplitude do potencial de ação. **B** – *Max. rate of rise*. **C** – Limiar do potencial de ação. **D** – Latência do primeiro potencial medido da rheobase. **E** – *Halfwidth* do potencial de ação. **F** – Hiperpolarização pós potencial de ação. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

4.10 A análise de componentes principais sugere que os parâmetros eletrofisiológicos sejam diferentes entre as fases pré e pós-auditiva

Em busca de extrair correlações multidimensionais não enviesadas dos parâmetros eletrofisiológicos, foi feita uma análise de componentes principais (PCA). Como algumas características são diferentes entre os neurônios pré e pós audição, bem como entre neurônios silentes e ativos, a PCA tornou possível avaliar todos os parâmetros de maneira conjunta e averiguar se as diferenças encontradas nas análises estatísticas anteriores seriam suficientes para segregar alguns grupos. Foram analisados 12 parâmetros eletrofisiológicos e a idade dos animais.

Ao todo foram contabilizados 13 componentes principais (PC) onde ~70% da diferença encontrada é explicada nos 3 primeiros e 95% por 8 PCs (figura 31A). Contudo, praticamente todos os parâmetros analisados apresentam variações nos dois primeiros componentes, o que sugere uma possível separação entre grupos. A

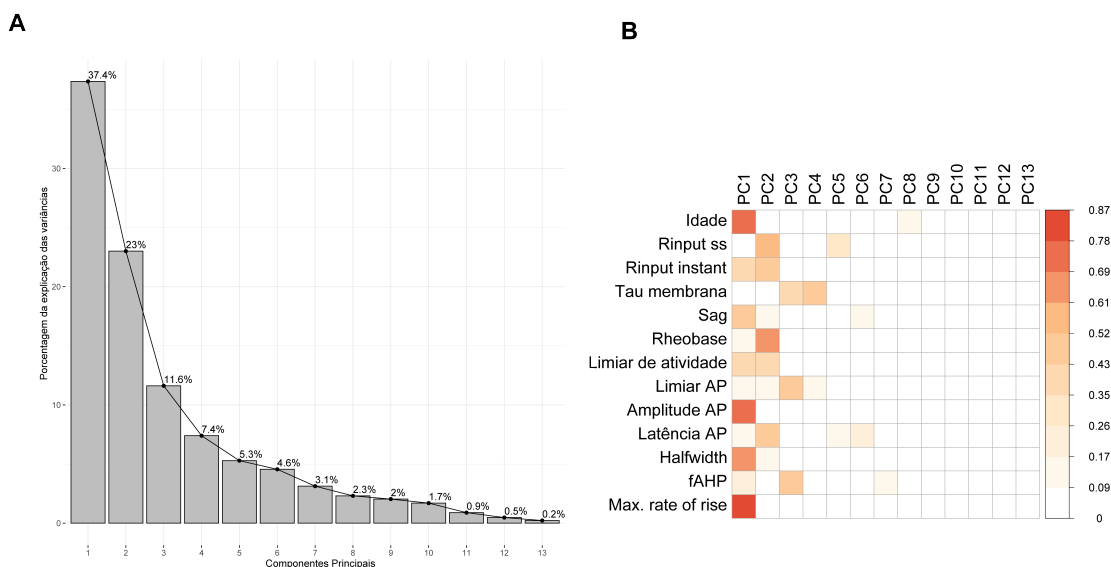


Figura 31 – Gráfico Scree e participação de cada parâmetro em cada um dos componentes principais. **A** – Gráfico scree mostrando quanto cada componente principal (PC) explica as variações encontradas nos dados. **B** – Contribuição de cada parâmetro nos 13 componentes analisados pela PCA. Cores próximas ao vermelho sugerem maiores contribuições.

constante de tempo da membrana, o limiar do potencial de ação e o fAHP mostram pequenas variações e aparecem em PCs que explicam pouca variação (figura 31B). Quando se analisou os dois primeiros componentes principais, verificou-se a formação de dois grupos de células de acordo com suas distribuições nos PCs (figura 32A): um grupo de neurônios com uma variação maior no PC1, à direita no gráfico, e outro grupo com variações em ambos os componentes, à esquerda do gráfico. As células à direita eram de animais mais velhos, quando comparadas as células que estavam ao lado esquerdo do gráfico. Inclusive, neurônios registrados de animais no período audível, bem como grande parte dos neurônios ativos, pertencem a esse grupo. Para averiguar se a idade dos animais realmente influenciava o PC1, plotou-se esse parâmetro contra a variação nesse componente e foi comprovado que neurônios de animais mais velhos estavam agrupados preferencialmente ao lado direito do PC1 com um aumento na mediana da idade após a transição de valores negativos para valores positivos no PC1 (figura 32B, C). Interessantemente, somente a R_{input} no estado estacionário não variou ao longo do PC1 sugerindo que esse parâmetro não varia ao longo do desenvolvimento do animal (figura 32A). Os parâmetros fAHP, constante de tempo da membrana e o limiar do potencial de ação variam ao longo do PC3 e não apresentaram variações ao longo do PC1 e possivelmente não se relacionam com a

idade do animal. As variações de todos os parâmetros ao longo do PC1 são mostradas nas figuras 33 e 34.

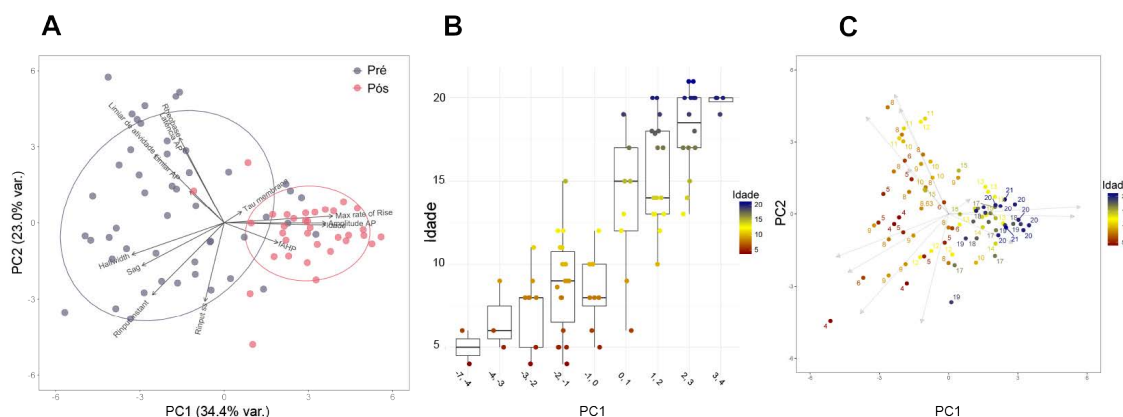


Figura 32 – O gráfico de PC1 vs. PC2 segrega dois grupos de neurônios: pré e pós audição. **A** - Gráfico de PC1 vs. PC2. Em lilás são representados neurônios pré audição e em vermelho neurônios pós audição. **B** – Gráfico da idade variando ao longo do PC1. Na representação de calor, as células em vermelho são de animais mais jovens, em amarelo idades próximas ao início da audição e em azuis animais mais velhos. **C** – A idade dos animais varia ao longo do PC1. O gráfico acima mostra cada célula identificada com a respectiva idade do animal. Cores próximas ao vermelho indicam animais mais jovens e cores próximas ao azul, animais mais velhos. As idades intermediárias estão próximas da cor amarela.

Dois parâmetros relacionados ao potencial de ação variam praticamente em paralelo em direção ao grupo dos animais pós-audição: amplitude e *Max. rate of rise* (figura 31A). Isso sugere que há um aumento desses valores conforme a idade do animal, especialmente durante o período pós audição. A média da idade desse grupo (A) foi de 16.03 ± 0.5 dias. Com isso, foi usado o PC1 para comparar os outros parâmetros relacionados à idade. Outros parâmetros variam em direções opostas no PC1, o que sugere que sejam maiores em animais mais novos. Esses parâmetros foram agrupados em dois subgrupos que englobam suas variações no PC2 (figura 35A). O primeiro subgrupo (B) consistiu entre rheobase, limiar de atividade e latência, enquanto o outro subgrupo foi formado pela *halfwidth*, *sag* e a resistência de entrada, seja ela no estado estacionário quando medida no pico da hiperpolarização. A idade média dos animais nesses subgrupos foi significativamente diferente (subgrupo (B) 6.0 ± 0.6 dias; subgrupo (C) 8.9 ± 0.5 dias; $p=0.017$), e ambos distintos em comparação ao grupo (A) dos animais mais velhos ($p<0.001$).

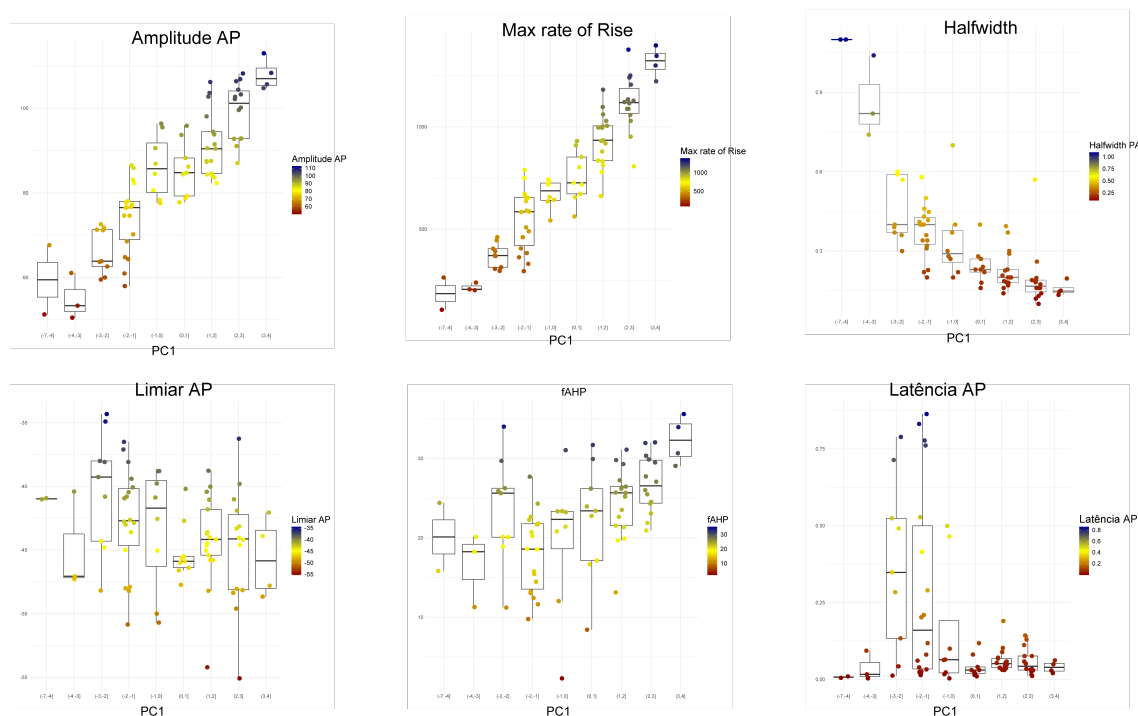


Figura 34 - Resumo das variações ao longo do PC1, segunda parte.

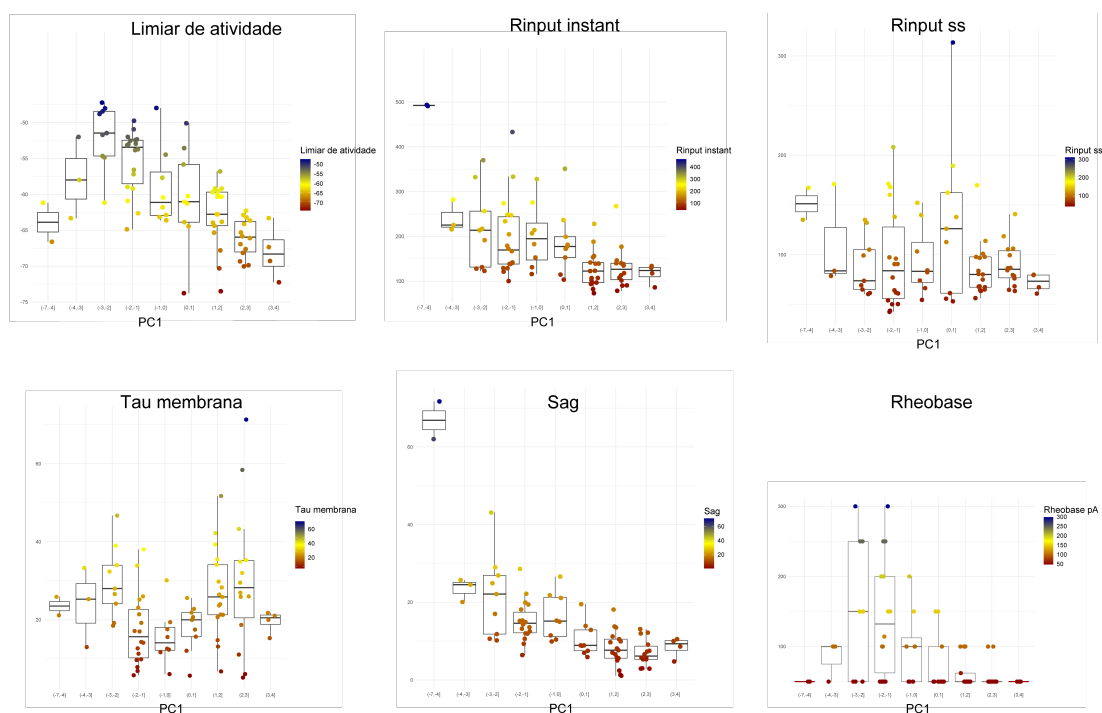


Figura 33 – Resumo das variações ao longo do PC1, primeira parte.

Ao analisar neurônios pré e pós audição separadamente com a PCA, pode-se observar que alguns parâmetros variam em paralelo na fase pré auditiva, ao contrário da fase pós auditiva (figura 36A, B). Para um melhor entendimento de como esses

parâmetros se correlacionam, foram feitos correlogramas de ambas as fases (figura 36C, D). Ao comparar as correlações, ficou evidente que havia menos correlações entre os parâmetros na fase pós auditiva. Evidenciou-se fortes correlações entre *halfwidth*, *max. rate of rise* e a amplitude do potencial de ação na fase pré auditiva. O limiar de atividade apresentou uma forte correlação positiva com a rheobase em ambas as fases e uma moderada correlação com o limiar do potencial de ação. Como esperado, no período pré audição, a R_{input} imediata apresentou uma correlação negativa com o sag e uma correlação positiva moderada com a rheobase e o limiar de atividade (figura 36C).

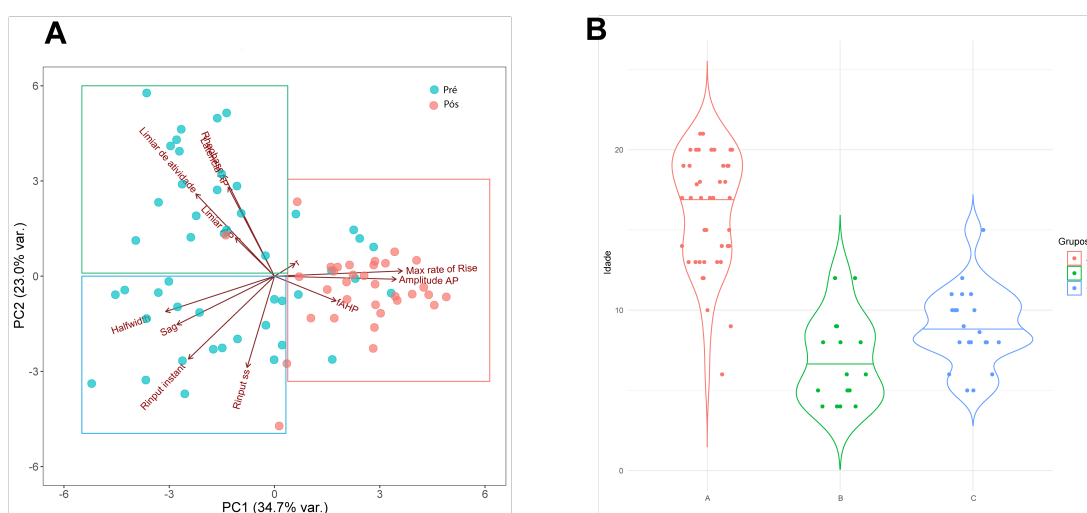


Figura 35 – Os diferentes grupos segregados na PCA apresentam diferentes idades. **A** – Gráfico PC1 vs. PC2 e os grupos encontrados. **B** – Gráfico em violino evidenciando a diferença entre os diferentes grupos: em vermelho o grupo sinalizado em **A**, presente majoritariamente ao lado direito do gráfico com *Max. rate of rise* e Amplitude AP sendo os principais vetores; em azul, o grupo sinalizado em **A** contendo *Halfwidth*, sag, R_{input} no estado estacionário e instantânea; em verde o grupo com os vetores Limiar de atividade, Rheobase, Limiar AP e Latência AP.

Com a análise de componentes principais foi possível averiguar as correlações e as variações dos parâmetros conforme o desenvolvimento do animal, representado pelo PC1, além de segregar os dados em 3 grupos: representando a fase pós-audição, onde *halfwidth*, sag e R_{input} variam juntos e outro onde a latência, rheobase e limiar de atividade se correlacionam. Um resumo de toda a análise pode ser vista na figura 37.

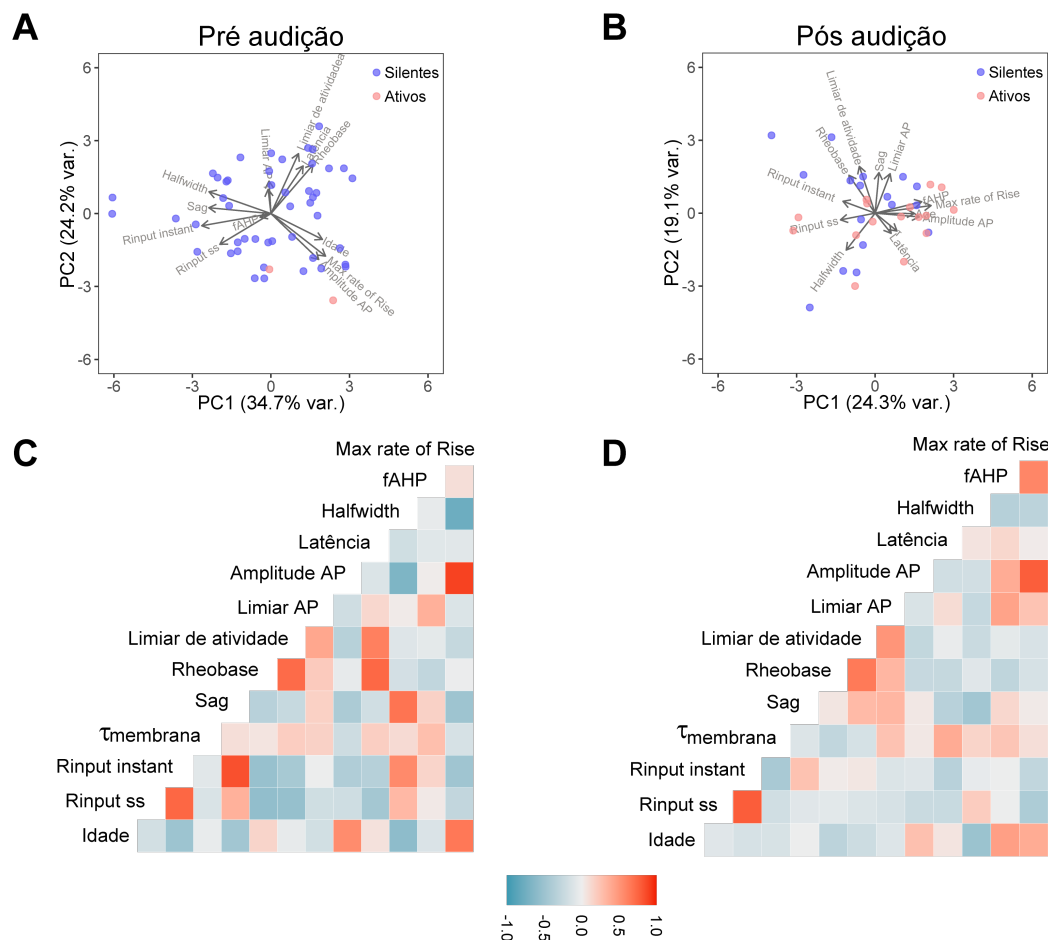


Figura 36 – Análise de componentes principais de animais pré e pós audição. **A** – PCA de animais pré audição. Em lilás são representados neurônios silentes e em vermelho, ativos. **B** – PCA de animais pós audição. Em lilás são representados neurônios silentes e em vermelho, ativos. Nota-se uma maior proporção de neurônios ativos. **C-D** – Correlograma dos parâmetros avaliados nos animais pré audição e pós audição respectivamente. Cores próximas ao azul indicam correlações negativas, enquanto cores próximas ao vermelho, correlações positivas.

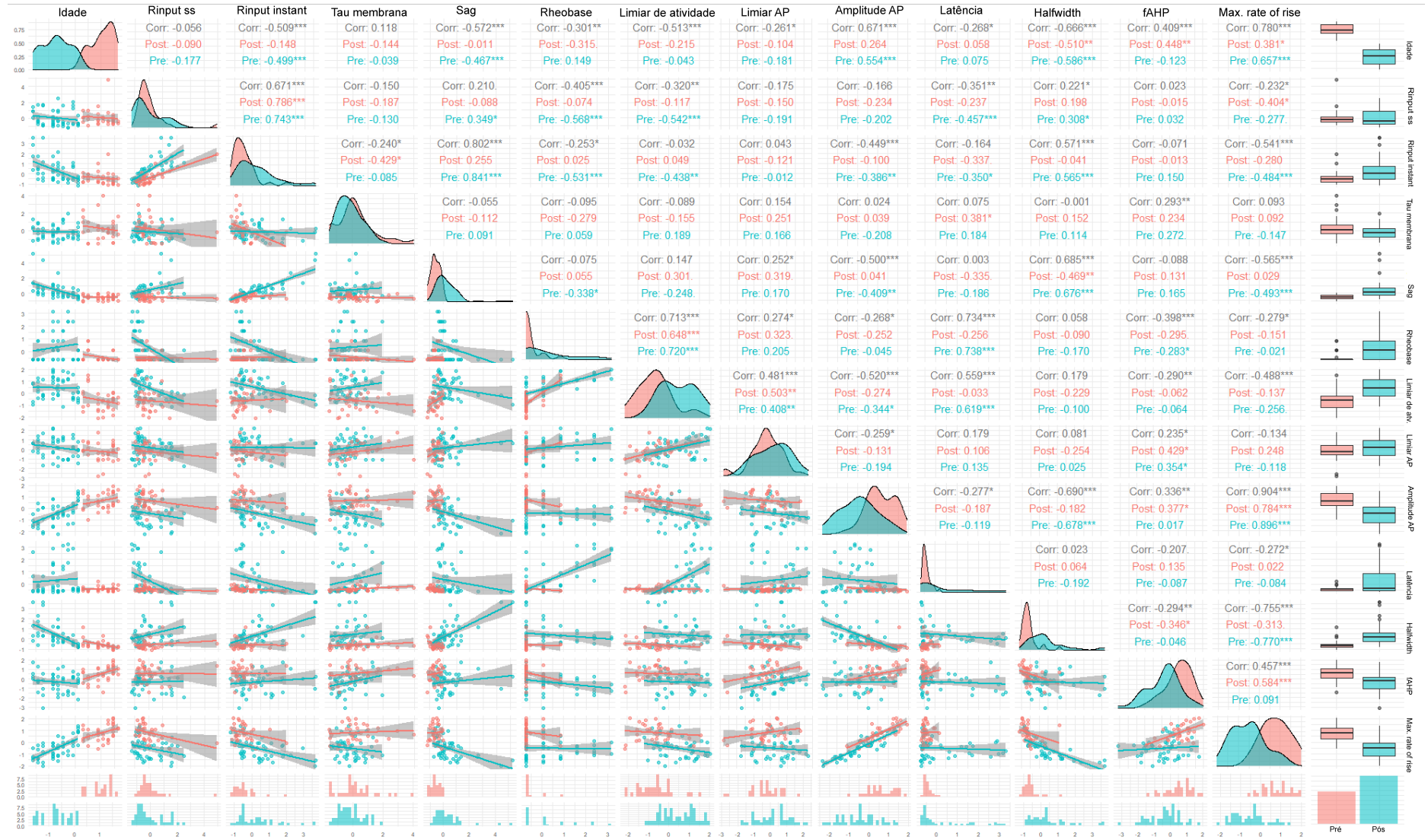


Figura 37 – Resumo de todas as informações extraídas pela análise de componentes principais. Em azul são representados neurônios de animais pré audição e em rosa neurônios de animais pós audição.

4.11 O tampão aumenta os limiares auditivos dos animais em resposta aos clicks

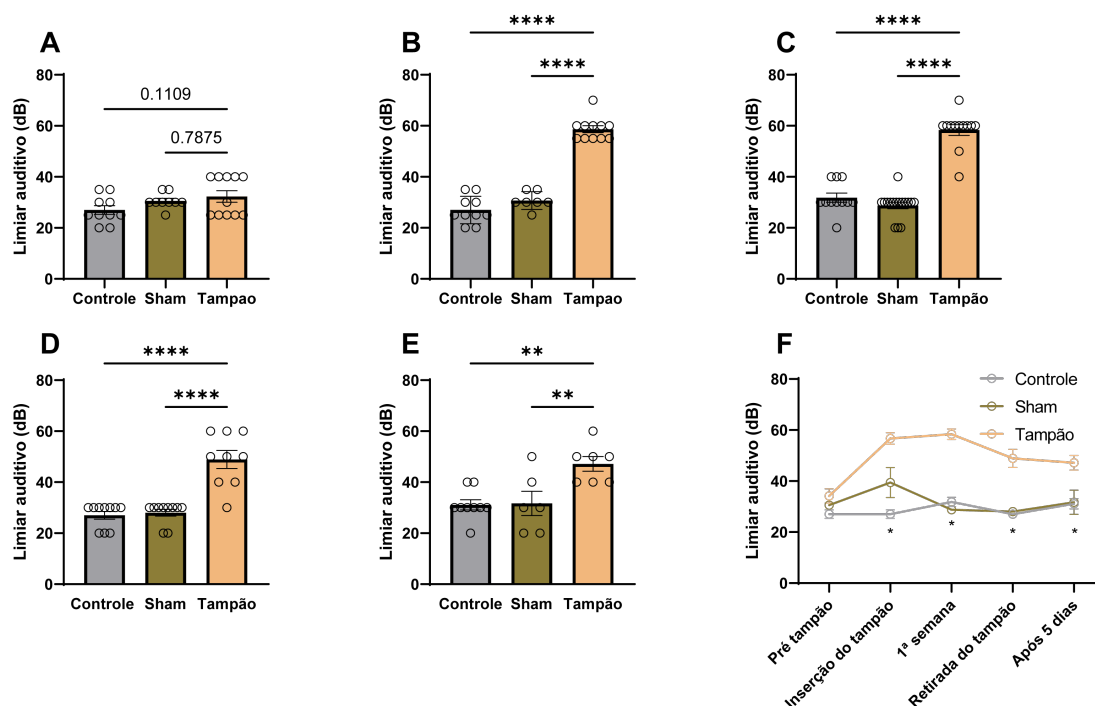


Figura 38 – Limiares auditivos em resposta ao estímulo de *click* em diferentes idades. **A** – Limiares auditivos antes inserção do tampão, em 14 dias, logo após a inserção do tampão (**B**) e após uma semana do procedimento (limiar medido com a presença do tampão) (**C**). **D** – Limiar após a retirada do tampão, 30 dias após sua inserção. **E** – Limiar auditivo 5 dias após a retirada do tampão. **F** – Variação dos limiares auditivos das diferentes etapas. Nos gráficos de barras: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0,05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

Primeiramente foi necessário averiguar se o tampão de silicone era efetivo em privar acusticamente os animais em resposta aos *clicks*. Em P14, os animais não apresentaram diferenças nos limiares auditivos, antes do tampão ser inserido (ANOVA $p=0.13$, $F=2.24$, figura 38A). Logo após a inserção do tampão, o limiar acústico dos animais do grupo Tampão foi maior (figura 38B), apresentando uma média de 58.64 dB SPL \pm 1.36 ($n=11$), em comparação ao grupo Sham (30.71 dB SPL \pm 1.30, $n=7$) e controle (27.77 dB SPL \pm 1.70, $n=10$). Após uma semana, foi verificado se o tampão estava inserido corretamente, pois os animais crescem muito nesse período. Após as reinscrições foi verificado novamente a eficiência do tampão em privar o som desses animais (figura 38C). Como esperado, os limiares dos animais do grupo Tampão apresentaram um limiar auditivo, em resposta aos *clicks*, maior (58.33 dB SPL \pm 2.07, $n=12$) em comparação ao grupo Sham (28.75 dB SPL \pm 1.25, $n=16$) e ao grupo

Controle (32 ± 2 dB SPL, $n=11$). Durante os 30 dias de privação acústica, os animais do grupo Tampão foram avaliados periodicamente para averiguação do estado da privação e como estava inserido o tampão. Quando era necessário a reinserção, o animal era anestesiado e o tampão recolocado. Em seguida, os limiares foram reavaliados. Ao final dos 30 dias, o tampão foi retirado e ambos os grupos tiveram os limiares averiguados após a retirada do tampão. O limiar do grupo dos animais acusticamente privados se manteve elevado, com uma leve diminuição de aproximadamente 10 dB em comparação ao ABR de uma semana (49 ± 3.5 dB SPL $n=9$, figura 38D e F). Entretanto, essa diminuição não foi suficiente para deixar os valores semelhantes com os outros grupos (Sham 28 ± 1.33 dB SPL, $n=10$; controle 27 ± 1.53 dB SPL, $n=10$). Como após a retirada do tampão pode haver uma quantidade grande de cera no pavilhão auditivo desses animais, optou-se por avaliar os limiares em repostas aos *clicks* 5 dias depois desse procedimento. Surpreendentemente, os limiares ainda permaneciam elevados nos animais que foram privados (47.14 ± 2.86 dB SPL, $n=7$, figura 34E) em comparação com os animais Sham e Controles, 31.6 ± 4.8 dB SPL ; 31 ± 2 dB SPL, $n= 6$ e 9 , respectivamente (figura 38E). A figura 38F resume os limiares em resposta aos *clicks* ao longo das diferentes aferições dos limiares. Os asteriscos em cada ponto do gráfico indicam onde o grupo dos animais Tampão foram distintos tanto dos animais Sham quanto dos Controles. Na figura 39, é mostrado como os limiares em resposta aos diferentes tons puros foram afetados em 30 dias de privação acústica. Após a retirada do tampão, os animais apresentaram a média dos limiares elevados em resposta as frequências 8, 16 e 24 kHz (70 dB SPL, 65 dB SPL, 63 dB SPL, respectivamente). Não houve diferenças entre os animais Sham e Controles em nenhum dos experimentos supracitados.

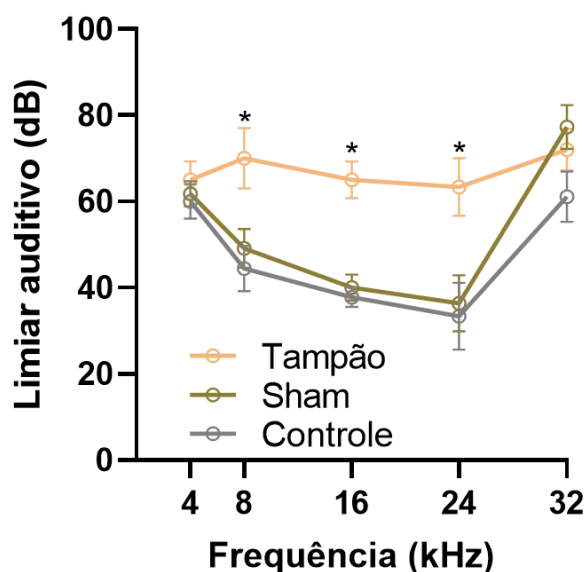


Figura 39 – Limiares auditivos em diferentes frequências logo após a retirada do tampão. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

4.12 A amplitude e a latência das ondas do ABR são diferentes nos animais acusticamente privados

As ondas do ABR evidenciam se os neurônios de determinado núcleo auditivo estão disparando potenciais de ação em sincronia. A onda I reflete a resposta do nervo coclear, a onda II dos núcleos cocleares, a onda III dos núcleos olivares superiores, a IV dos núcleos do lemnisco lateral e a onda V a resposta do colículo inferior. Em resposta aos estímulos *click*, as ondas do ABR dos animais acusticamente privados apresentaram diferenças em suas amplitudes após uma semana de inserção do tampão (figura 40), pois o tampão bloqueia o meato acústico desses animais. Logo após a retirada do tampão, os animais que foram acusticamente privados apresentaram uma onda I menor em baixas intensidades (figura 41). A onda IV também apresentou uma diferença significativa na sua amplitude em 60 dB (figura 41) após a retirada do tampão.

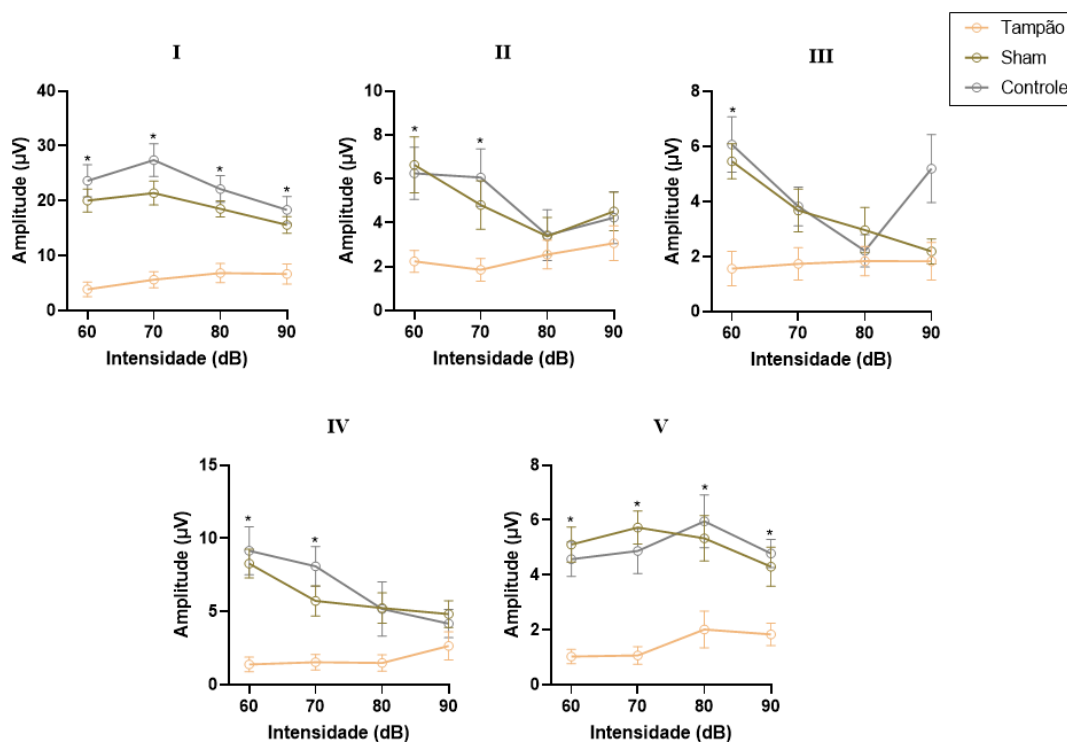


Figura 40 – Amplitude das ondas do ABR em resposta ao estímulo *click* após uma semana da inserção do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e o grupo controle na ANOVA de dois fatores.

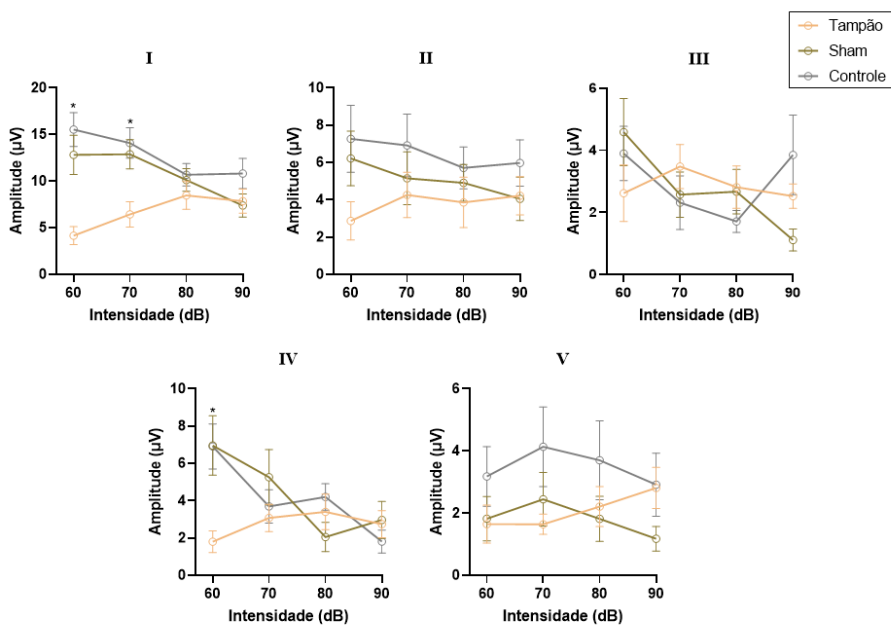


Figura 41 - Amplitude das ondas do ABR em resposta ao estímulo *click* logo após a retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e o grupo controle na ANOVA de dois fatores.

Tabela 3 – Resumo estatística da amplitude Onda I do ABR nos testes com clicks, após a retirada do tampão. Dif. Média: Diferenças entre as médias; CI: intervalo de confiança; M1: média 1; M2: média 2.

Onda I	Dif. Média	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
70 dB					
Tampão vs. Sham	-6.447	-10.84 a -2.051	0.0066	6.437	12.88
Tampão vs. Controle	-7.658	-12.16 a -3.151	0.0025	6.437	14.09
Sham vs. Controle	-1.210	-6.004 a 3.583	0.6009	12.88	14.09
60 dB					
Tampão vs. Sham	-8.664	-13.69 a -3.635	0.0026	4.163	12.83
Tampão vs. Controle	-11.38	-15.85 a -6.908	0.0001	4.163	15.54
Sham vs. Controle	-2.715	-8.576 a 3.146	0.3420	12.83	15.54

Tabela 4 – Resumo estatístico da amplitude da Onda IV do ABR do teste com clicks, após a retirada do tampão. Dif. Média: Diferenças entre as médias; CI: intervalo de confiança; M1: média 1; M2: média 2.

Onda IV	Dif. Média	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
60 dB					
Tampão vs. Sham	-5.163	-8.878 a -1.448	0.0107	1.801	6.964
Tampão vs. Controle	-5.113	-8.055 a -2.170	0.0027	1.801	6.913
Sham vs. Controle	0.05047	-4.177 a 4.278	0.9801	6.964	6.913

Por mais que os limiares e resposta aos *clicks* estavam alterados depois de 5 dias da retirada do tampão, não houve diferenças significativas na amplitude e na latência das ondas (figuras 42 e 43). A de se salientar que os protocolos foram feitos a partir de 90 dB até 20 dB SPL. Entretanto, as análises das amplitudes das ondas levaram em consideração os limiares dos animais do grupo Tampão, uma vez que não seria possível comparar valores abaixo de 60 dB nas amplitudes das ondas.

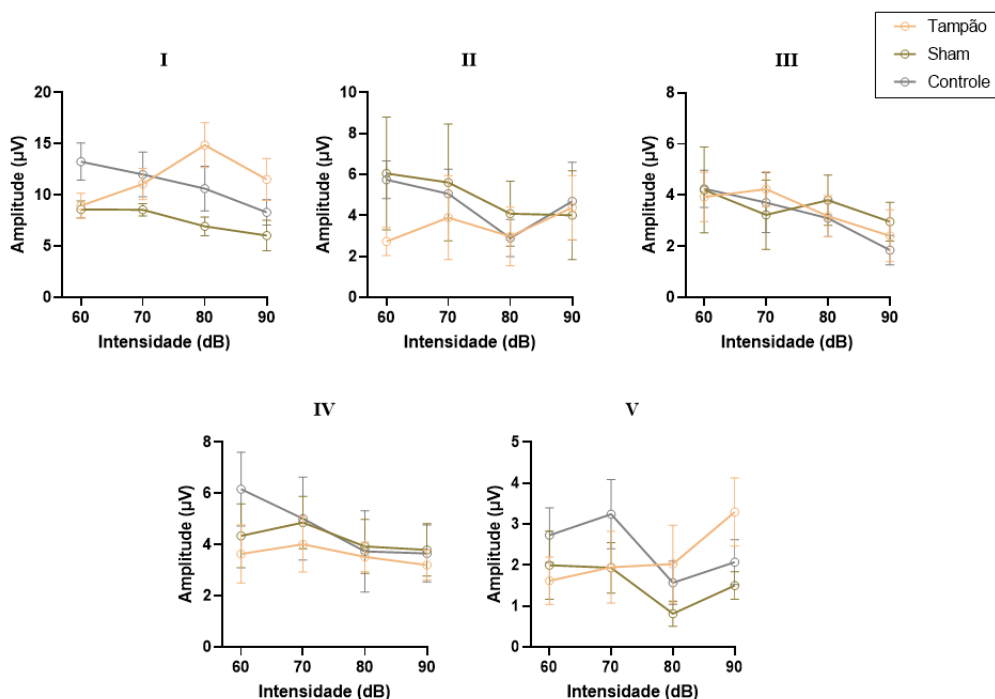


Figura 43 - Amplitude das ondas do ABR em resposta ao estímulo *click* após 5 dias da retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

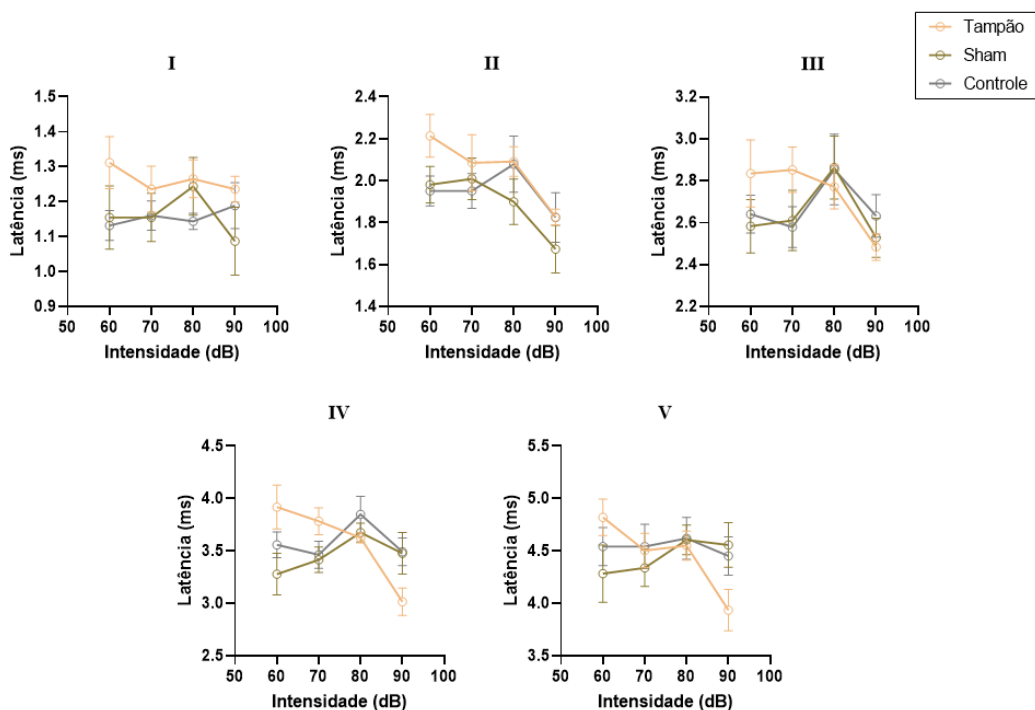


Figura 42 - Latência das ondas do ABR em resposta ao estímulo *click* em diferentes amplitudes 5 após a retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

Como as respostas aos estímulos de tons puros apresentam ondas menores, foi avaliado apenas as amplitudes e as latências das ondas I e II (figura 44), após a retirada dos tampões, em 70 dB. A amplitude da onda I foi significativamente menor nas frequências 16 e 24kHz (figura 44A) com nenhuma alteração na latência (figura 44A'), nos animais do grupo Tampão, em comparação aos Sham e Controles. Com relação a amplitude da onda II, houve diferença na amplitude apenas na frequência de 8 kHz (figura 44B) com nenhuma alteração na latência (figura 44B').

Ao avaliar a latência das ondas em resposta aos estímulos de *click* uma semana após a inserção do tampão, as ondas I, II e III apresentaram diferenças entre o grupo Tampão e os grupos Sham e Controle em todas as intensidades (figura 45, tabela 7). A onda IV apresentou diferenças em 60 e 70 dB SPL (figura 45, tabela 7). Essas latências maiores eram esperadas, uma vez que o ABR foi feito com o meato acústico dos animais ainda fechado. Após a retirada do tampão, as latências das ondas em resposta aos clicks se comportaram de maneira semelhantes entre os grupos (figura 46). Contudo, as ondas I e II apresentaram latências maiores no grupo Tampão, nas amplitudes de 80 e 60 dB, o que pode sugerir uma possível interferência na condução do som até a cóclea e do impulso nervoso aos núcleos cocleares.

Tabela 5 – Resumo estatístico da amplitude das Ondas I e II do ABR com tons puros, após a retirada do tampão, em 70dB. Dif. Média: Diferenças entre as médias; CI: intervalo de confiança; M1: média 1; M2: média 2.

Onda I	Dif. Média	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
16 kHz					
Controle vs. Sham	-0.05008	-1.759 a 1.659	0.9516	3.054	3.104
Controle vs. Tampão	1.833	0.3444 a 3.321	0.0204	3.054	1.221
Sham vs. Tampão	1.883	0.3153 a 3.450	0.0223	3.104	1.221
24 kHz					
Controle vs. Sham	0.4604	-1.451 a 2.372	0.6147	4.167	3.707
Controle vs. Tampão	3.049	1.404 a 4.694	0.0024	4.167	1.118
Sham vs. Tampão	2.588	0.9327 a 4.244	0.0052	3.707	1.118
Onda II	Dif. Média	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
8 kHz					
Controle vs. Sham	-0.004658	-2.398 a 2.389	0.9967	3.769	3.773
Controle vs. Tampão	2.825	0.5847 a 5.056	0.0226	3.769	0.9480
Sham vs. Tampão	2.825	0.1925 a 5.458	0.0380	3.773	0.9480

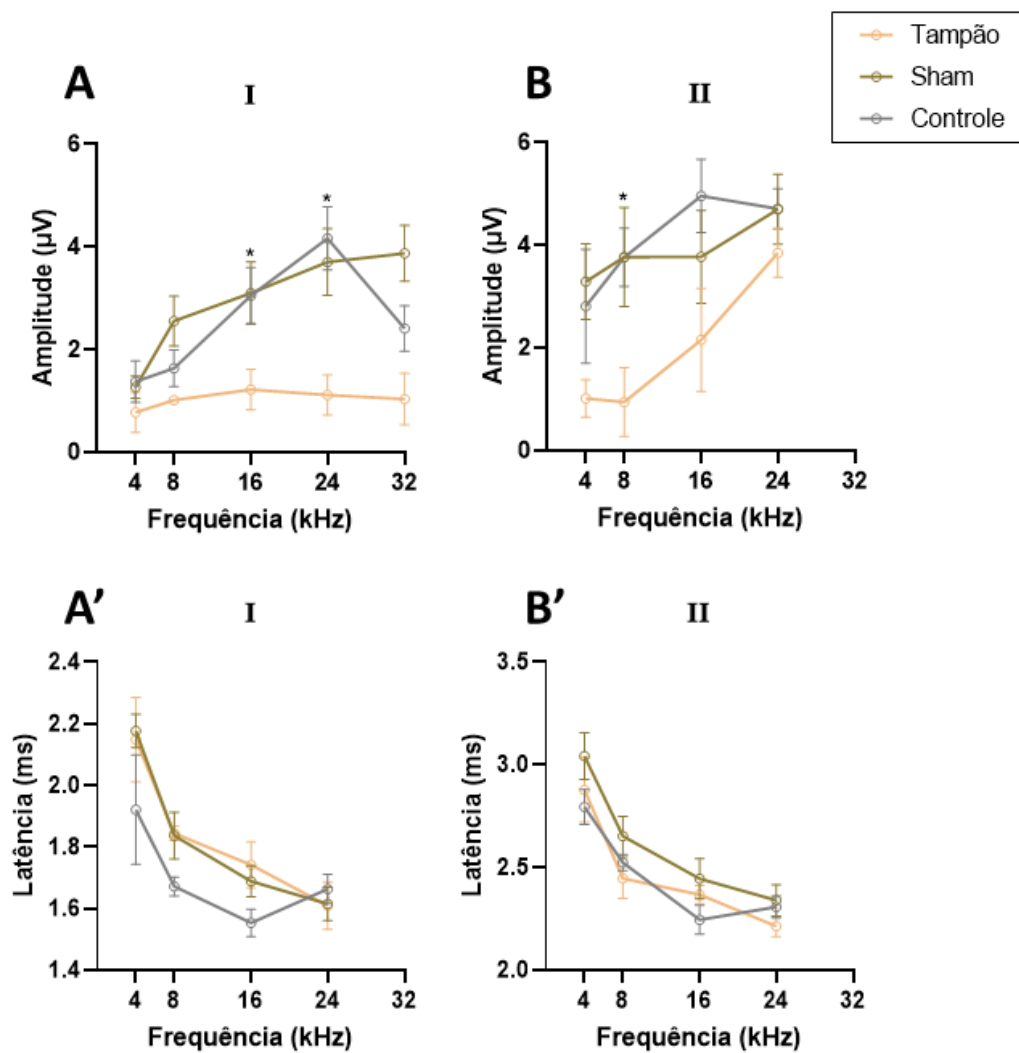


Figura 44 – Amplitude e latência das ondas I e II em diferentes frequências, logo após a retirada do tampão. **A** – Amplitude da onda I evidenciando diferenças entre o grupo tampão e os grupos sham e controle em 16 e 24kHz. **B** – A onda II só difere em 8 kHz. Não houve diferenças nas latências tanto para onda I quanto para onda II (**A'**, **B'**).

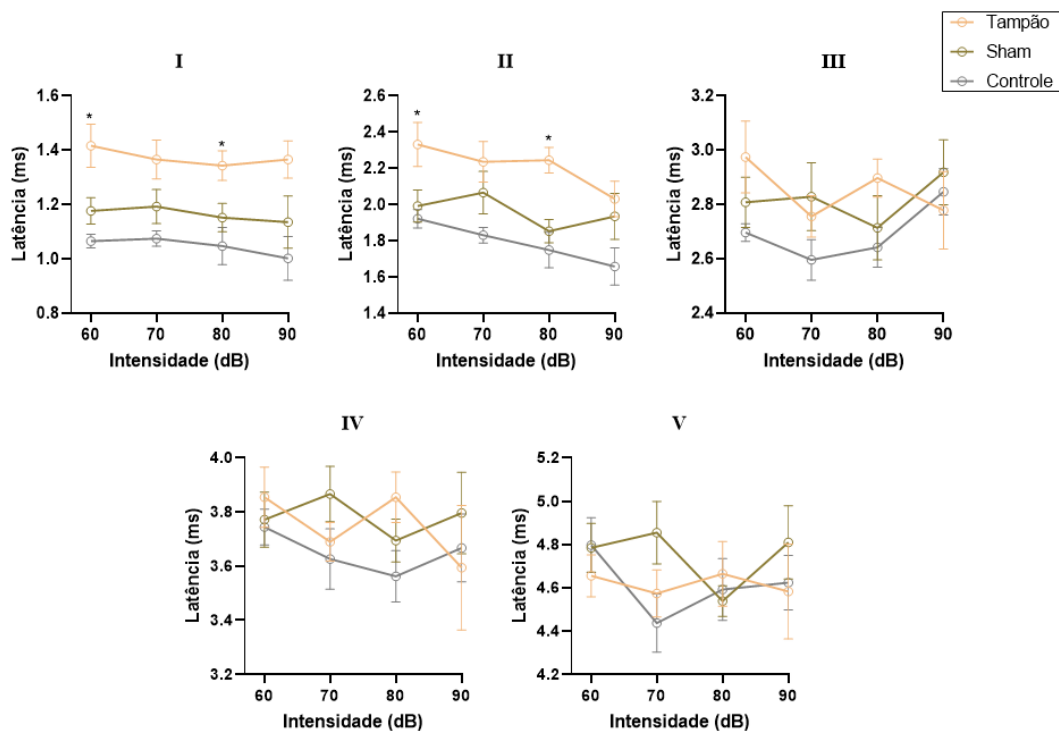


Figura 45 - Latência das ondas do ABR em resposta ao estímulo click em diferentes amplitudes logo após a retirada do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

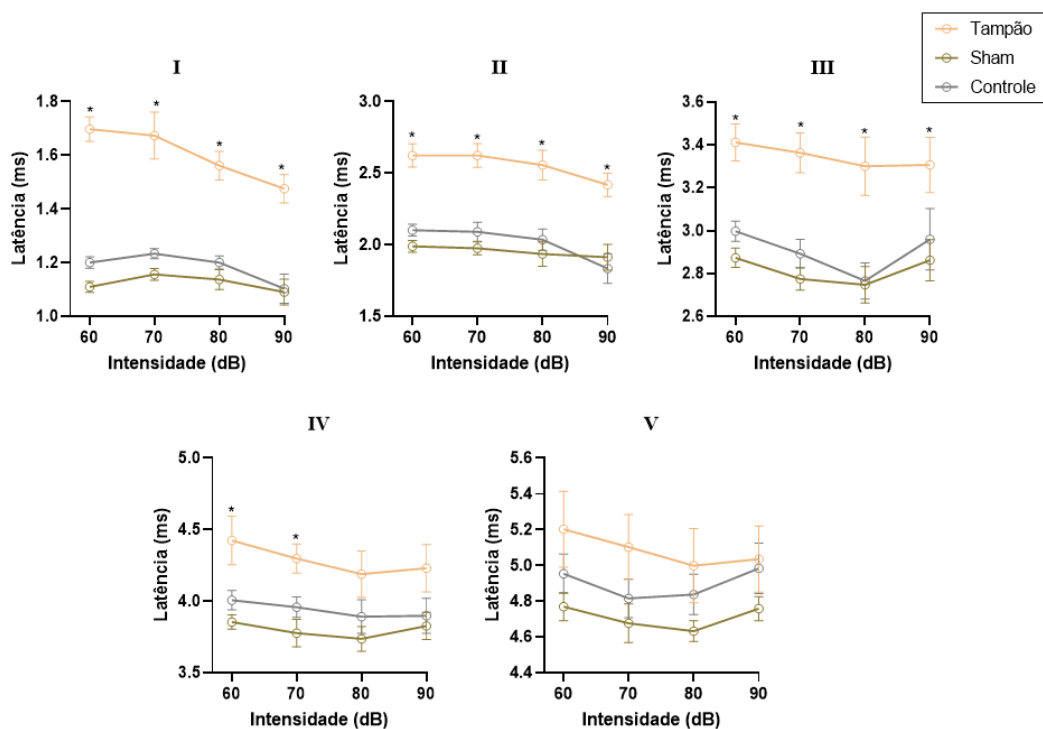


Figura 46 – Latência das ondas do ABR em resposta ao estímulo *click* em diferentes amplitudes uma semana após a inserção do tampão. Os algarismos romanos I, II, III, IV, V representam as diferentes ondas. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0.05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores.

Tabela 6 - Resumo estatístico da latência das Ondas I e II do ABR em resposta aos clicks, uma semana após a inserção do tampão. Dif. Média: Diferenças entre as médias; CI: intervalo de confiança; M1: média 1; M2: média 2.

Onda I	Dif. Média	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
90 dB					
Tampão vs. Sham	0.3854	0.2366 a 0.5342	<0.0001	1.476	1.091
Tampão vs. Controle	0.3727	0.2148 a 0.5306	<0.0001	1.476	1.103
Sham vs. Controle	-0.01267	-0.1631 a 0.1377	0.8630	1.091	1.103
80 dB					
Tampão vs. Sham	0.4247	0.2890 a 0.5604	<0.0001	1.562	1.137
Tampão vs. Controle	0.3615	0.2353 a 0.4878	<0.0001	1.562	1.200
Sham vs. Controle	-0.06312	-0.1545 a 0.02824	0.1664	1.137	1.200
70 dB					
Tampão vs. Sham	0.5173	0.3199 a 0.7148	0.0001	1.674	1.156
Tampão vs. Controle	0.4398	0.2433 a 0.6363	0.0005	1.674	1.234
Sham vs. Controle	-0.07753	-0.1377 a -0.01737	0.0137	1.156	1.234
60 dB					
Tampão vs. Sham	0.5877	0.4786 a 0.6967	<0.0001	1.697	1.110
Tampão vs. Controle	0.4972	0.3878 a 0.6067	<0.0001	1.697	1.200
Sham vs. Controle	-0.09045	-0.1525 a -0.02838	0.0062	1.110	1.200
Onda II	Dif. Média.	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
90 dB					
Tampão vs. Sham	0.5057	0.2533 a 0.7581	0.0004	2.419	1.913
Tampão vs. Controle	0.5852	0.3074 a 0.8630	0.0003	2.419	1.834
Sham vs. Controle	0.07952	-0.2072 a 0.3663	0.5710	1.913	1.834
80 dB					
Tampão vs. Sham	0.6217	0.3436 a 0.8998	0.0001	2.557	1.935
Tampão vs. Controle	0.5218	0.2540 a 0.7897	0.0007	2.557	2.035
Sham vs. Controle	-0.09989	-0.3331 a 0.1333	0.3854	1.935	2.035
70 dB					
Tampão vs. Sham	0.6478	0.4478 a 0.8478	<0.0001	2.624	1.976
Tampão vs. Controle	0.5330	0.3117 a 0.7543	<0.0001	2.624	2.091
Sham vs. Controle	-0.1148	-0.2831 a 0.05350	0.1695	1.976	2.091
60 dB					
Tampão vs. Sham	0.6341	0.4371 a 0.8312	<0.0001	2.624	1.990
Tampão vs. Controle	0.5218	0.3239 a 0.7197	<0.0001	2.624	2.102
Sham vs. Controle	-0.1123	-0.2344 a 0.009776	0.0696	1.990	2.102

Tabela 7 – Resumo estatístico da latência das Ondas III e IV do ABR em resposta aos clicks, uma semana após a inserção do tampão. Dif. Média: Diferenças entre as médias; CI: intervalo de confiança; M1: média 1; M2: média 2.

Onda III	Dif. Média.	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
90 dB					
Tampão vs. Sham	0.4447	0.1130 a 0.7765	0.0108	3.307	2.862
Tampão vs. Controle	0.3471	-0.05321 a 0.7474	0.0858	3.307	2.959
Sham vs. Controle	-0.09765	-0.4596 a 0.2643	0.5782	2.862	2.959
80 dB					
Tampão vs. Sham	0.5538	0.2192 a 0.8883	0.0025	3.301	2.747
Tampão vs. Controle	0.5351	0.1998 a 0.8704	0.0034	3.301	2.766
Sham vs. Controle	-0.01864	-0.2658 a 0.2286	0.8775	2.747	2.766
70 dB					
Tampão vs. Sham	0.5886	0.3640 a 0.8132	<0.0001	3.363	2.774
Tampão vs. Controle	0.4706	0.2307 a 0.7104	0.0005	3.363	2.892
Sham vs. Controle	-0.1180	-0.2960 a 0.05992	0.1820	2.774	2.892
60 dB					
Tampão vs. Sham	0.5385	0.3315 a 0.7455	<0.0001	3.411	2.873
Tampão vs. Controle	0.4145	0.2054 a 0.6236	0.0006	3.411	2.997
Sham vs. Controle	-0.1240	-0.2604 a 0.01244	0.0728	2.873	2.997
Onda IV					
	Dif. Média.	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
70 dB					
Tampão vs. Sham	0.5201	0.2293 a 0.8109	0.0012	4.298	3.777
Tampão vs. Controle	0.3392	0.07853 a 0.5998	0.0136	4.298	3.958
Sham vs. Controle	-0.1809	-0.4295 a 0.06772	0.1461	3.777	3.958
60 dB					
Tampão vs. Sham	0.5699	0.1782 a 0.9616	0.0086	4.424	3.854
Tampão vs. Controle	0.4171	0.01831 a 0.8159	0.0418	4.424	4.007
Sham vs. Controle	-0.1528	-0.3290 a 0.02340	0.0855	3.854	4.007

Tabela 8 – Resumo estatístico da latência das Ondas I e II do ABR em resposta aos clicks, após a retirada do tampão. Dif. Média: Diferenças entre as médias; CI: intervalo de confiança; M1: média 1; M2: média 2.

Onda I	Dif. Média.	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
80 dB					
Tampão vs. Sham	0.1918	0.03258 a 0.3510	0.0211	1.344	1.152
Tampão vs. Controle	0.2961	0.1087 a 0.4835	0.0042	1.344	1.048
Sham vs. Controle	0.1043	-0.07966 a 0.2883	0.2459	1.152	1.048
60 dB					
Tampão vs. Sham	0.2401	0.03930 a 0.4409	0.0226	1.417	1.177
Tampão vs. Controle	0.3508	0.1639 a 0.5376	0.0020	1.417	1.066
Sham vs. Controle	0.1107	-0.008126 a 0.2295	0.0654	1.177	1.066

Onda II	Dif. Média.	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
80 dB					
Tampão vs. Sham	0.3927	0.1899 a 0.5955	0.0008	2.246	1.853
Tampão vs. Controle	0.4966	0.2379 a 0.7552	0.0010	2.246	1.749
Sham vs. Controle	0.1039	-0.1479 a 0.3556	0.3914	1.853	1.749
60 dB					
Tampão vs. Sham	0.3398	0.01931 a 0.6604	0.0391	2.332	1.993
Tampão vs. Controle	0.4100	0.1186 a 0.7014	0.0103	2.332	1.922
Sham vs. Controle	0.07016	-0.1479 a 0.2882	0.5019	1.993	1.922

4.13 O reflexo do sobressalto acústico dos animais é afetado pela privação auditiva

Há alguns anos estudado, o reflexo do sobressalto acústico pode ser modulado por diferentes regiões cerebrais. Neste trabalho, a privação auditiva por 30 dias, iniciou-se na abertura do meato acústico do animal, percorrendo todo o período crítico da audição. Ao final desse período foram feitos dois experimentos comportamentais para avaliar o gatilho sensorio motor acústico dos animais. O primeiro foi o PPI seguido do GPIAS. O traçado representativo da movimentação de um dos animais estudados pode ser visualizado nas figuras 47 e 48.

Além da informação sobre o funcionamento do gatilho sensorio motor, obteve-se em conjunto, elucidações do reflexo do sobressalto desses animais. Os parâmetros avaliados do reflexo do sobressalto foram a amplitude e a latência do reflexo, bem como a influência das frequências no sobressalto no teste GPIAS. De maneira geral os animais privados apresentam uma amplitude do sobressalto, medida em milivolt, reduzida com uma latência maior, medida em milissegundos, entre a percepção do estímulo acústico e o reflexo do sobressalto.

Ao avaliarmos a média dos 5 estímulos após o primeiro estímulo SR, há uma forte diferença entre os animais do grupo Tampão tanto para os Shams quanto para os Controles, tanto na amplitude, em milivolt (ANOVA, $F=12.63$, $p<0.0001$, figura 49A) quanto na latência, em milissegundos (ANOVA, $F=6.51$, $p=0.0028$, figura 49A'). Essa mesma diferença foi encontrada nos testes No PPI/No GAP_{WN}, onde são deflagrados os reflexos entre os testes PPI e GAP_{WN} (Amplitude, ANOVA, $F=17.58$, $p<0.0001$, figura 49B; Latência ANOVA, $F=7.03$, $p=0.0018$, figura 49B'). Os resultados dos pós testes podem ser vistos na tabela 9.

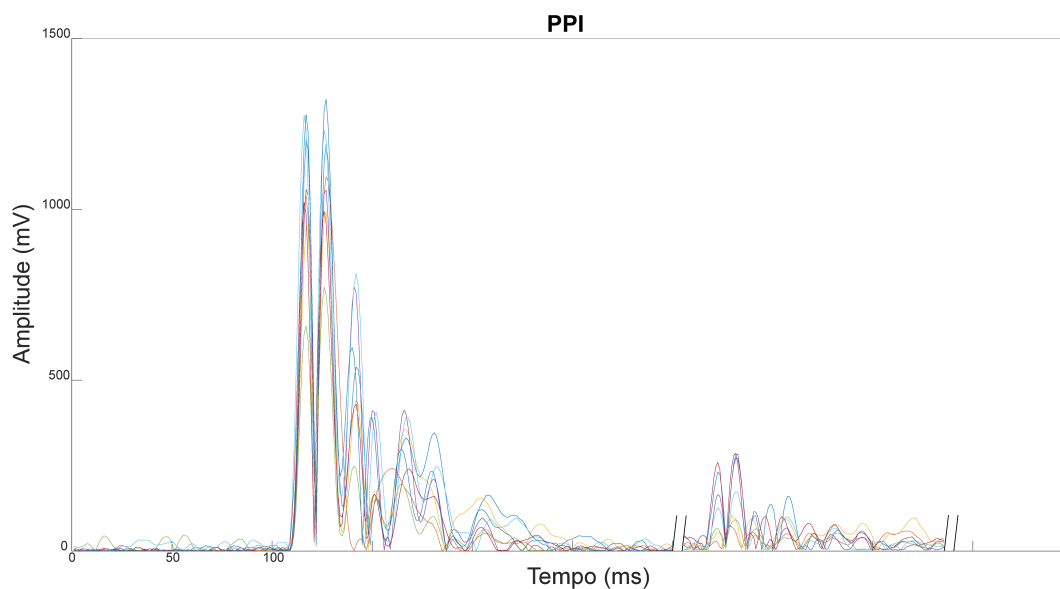


Figura 47 – Traçados de respostas motoras de um animal no teste de PPI. A esquerda, respostas ao estímulo *No PPI*. A direita, a resposta do reflexo do sobressalto inibida ~80%.

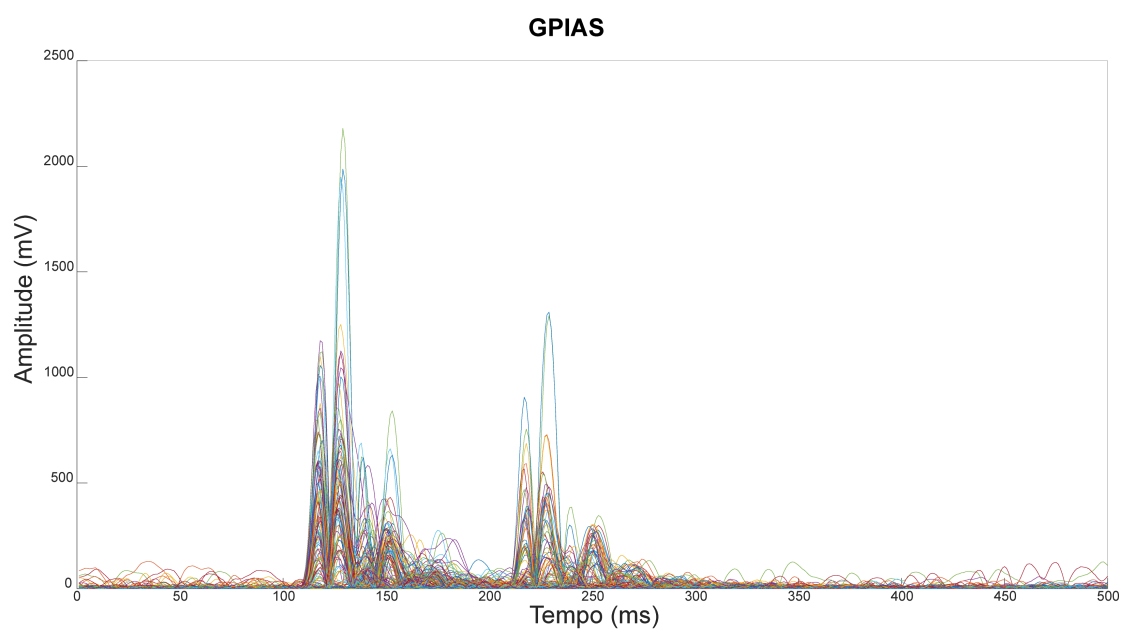


Figura 48 - Traçados de respostas motoras de um animal no teste de GPIAS. Respostas do mesmo animal representado na **Figura 47**. Todos os blocos *No GAP* e *GAP* estão representados na figura acima, de maneira contínua. A esquerda, respostas ao estímulo *No GAP*. A direita, a resposta do reflexo do sobressalto inibida nas diferentes frequências.

Amplitude Hab.	Controle	Sham	Tampão
n	20	20	23
Média	1186	1102	557.0
Erro padrão da média	89.36	142.7	51.70
p-valor	<0.0001	0.0002	
Amplitude NoPPI/NoGAP_{wn}			
n	20	20	23
Média	979.6	917.4	411.8
Erro padrão da média	70.60	107.6	43.32
p-valor	<0.0001	<0.0001	
Latência Hab.			
n	20	20	22
Média	25.24	25.35	30.07
Erro padrão da média	1.038	1.150	1.099
p-valor	0.0027	0.0033	
Latência NoPPI/NoGAP_{WN}			
n	20	20	22
Média	25.21	25.23	28.93
Erro padrão da média	0.7221	0.8421	0.8716
p-valor	0.0020	0.0021	

Tabela 9 – Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das amplitudes e latências do reflexo do sobressalto.

As amplitudes dos primeiros 6 estímulos SR, quando analisadas em conjunto, quando o som de fundo apresentado foi o ruído branco, diferiram entre o grupo Tampão dos grupos Sham e Controle, com nenhuma interação nos estímulos da habituação e os grupos avaliados, pelo teste de ANOVA de dois fatores (ANOVA, $F=0.96$, $p=0.43$, Interação, $F=1.33$, $p=0.21$, figura 50A). Não houve variação significativa dentro da habituação. Ou seja, estatisticamente os animais não apresentam diferenças entre cada estímulo SR. Quando o som de fundo foi de 4kHz, as diferenças na amplitude do reflexo de sobressalto ocorreram no primeiro, terceiro, quarto e quinto estímulos (figura 50B, tabela 10).

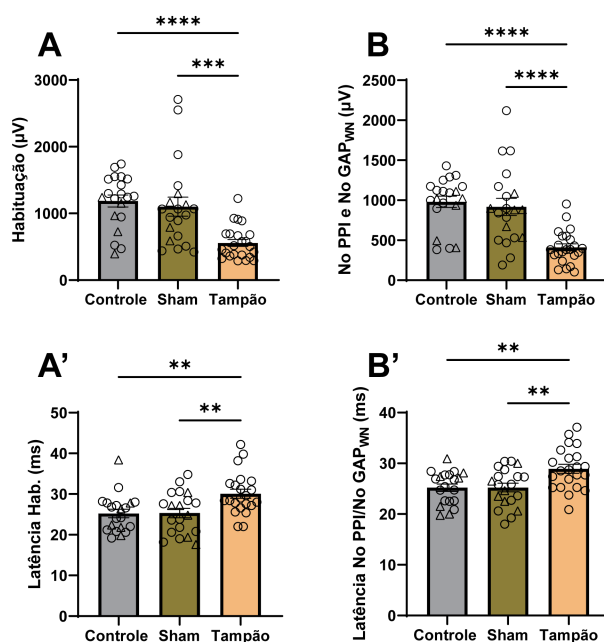


Figura 49 – O reflexo do sobressalto é menor e a latência maior nos animais que foram privados acusticamente. **A** – Média das respostas do reflexo do sobressalto dos 5 estímulos, após a aclimação e o primeiro reflexo do sobressalto, com suas respectivas latências (**A'**), nos testes de PPI e GPIAS. **B** – Média das respostas do reflexo do sobressalto do blocos *No PPI* e *No GAP_{WN}* e suas respectivas latências (**B'**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****. Os triângulos representam animais fêmeas.

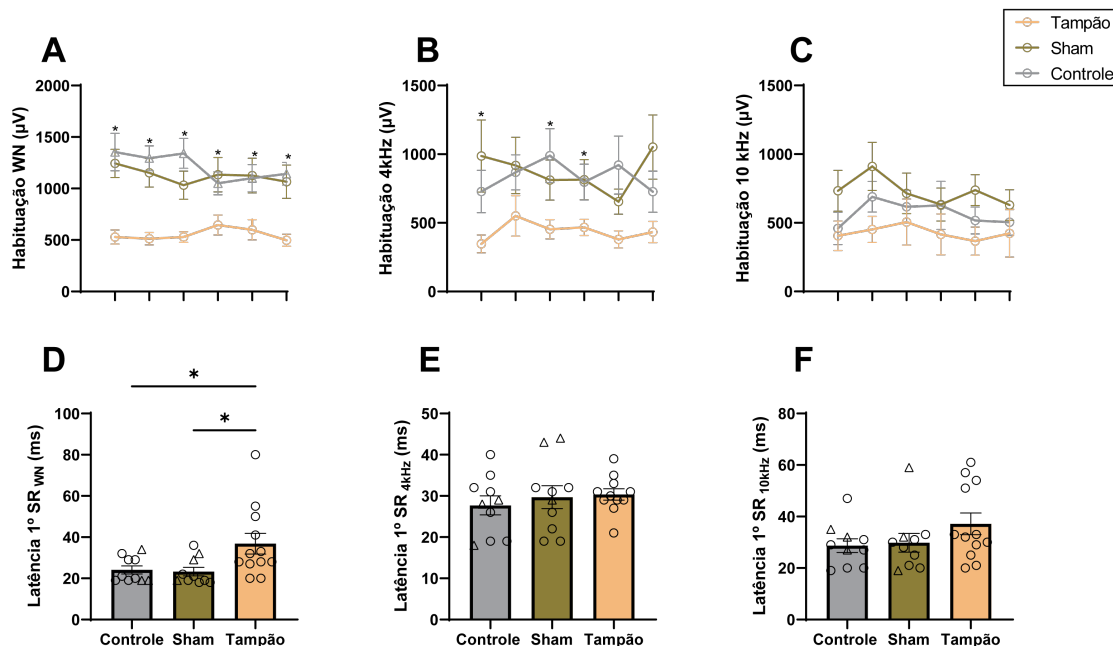


Figura 50 – O reflexo do sobressalto pode ser afetado pela frequência do som de fundo, parte 1. **A** – Todos os 6 estímulos dos animais do grupo tampão após a aclimação são diferentes dos outros grupos, quando o som de fundo é WN, incluindo a latência do primeiro estímulo (**D**). **B** – Já em 4 kHz de som de fundo, não ocorrem tantas diferenças, com exceção do primeiro estímulo, e a latência no primeiro estímulo não apresentou diferenças significativas (**E**). **C, F** – Nenhuma diferença foi encontrada tanto nos pulsos quanto na latência em 10kHz. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0,05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores. Os triângulos representam animais fêmeas.

Tabela 10 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das amplitudes na habituação em 4kHz

Amp. SR 4kHz	Dif. Média.	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
1°					
Controle vs. Sham	-258.7	-908.9 a 391.5	0.4088	728.1	986.8
Controle vs. Tampão	381.2	18.42 a 743.9	0.0409	728.1	346.9
Sham vs. Tampão	639.9	37.79 a 1242	0.0394	986.8	346.9
2°					
Controle vs. Sham	-49.16	-566.3 a 468.0	0.8422	868.5	917.7
Controle vs. Tampão	317.5	-90.74 a 725.7	0.1204	868.5	551
Sham vs. Tampão	366.6	-168.5 a 901.7	0.1665	917.7	551
3°					
Controle vs. Sham	176.6	-341.8 a 695.0	0.4816	989.1	812.5
Controle vs. Tampão	535.9	79.06 a 992.8	0.0254	989.1	453.2
Sham vs. Tampão	359.3	7.168 a 711.5	0.0461	812.5	453.2
4°					
Controle vs. Sham	-17.33	-428.6 a 393.9	0.9304	796.9	814.3
Controle vs. Tampão	329.5	19.62 a 639.4	0.0389	796.9	467.4
Sham vs. Tampão	346.8	3.715 a 690.0	0.0479	814.3	467.4
5°					
Controle vs. Sham	266.2	-235.3 a 767.7	0.2705	920.7	654.4
Controle vs. Tampão	541.6	52.95 a 1030	0.033	920.7	379.1
Sham vs. Tampão	275.4	40.80 a 510.0	0.0241	654.4	379.1
6°					
Controle vs. Sham	-324.8	-917.0 a 267.5	0.2612	727.1	1052
Controle vs. Tampão	294	-69.14 a 657.2	0.1042	727.1	433.1
Sham vs. Tampão	618.8	75.33 a 1162	0.0292	1052	433.1

A amplitude do reflexo do sobressalto não foi estatisticamente diferente em 10 kHz e em 20 kHz em nenhum dos estímulos SR (figura 50C, figura 51B, respectivamente). Contudo em 16 kHz, há diferenças significativas no primeiro, segundo e sexto estímulos (figura 51A, tabela 11).

A latência do primeiro estímulo SR apresentado também foi diferente nos animais acusticamente privados, quando o som de fundo foi o ruído branco (ANOVA, $F=4.65$, $p=0.02$, figura 46D), não apresentando nenhuma diferença nas latências nas frequências 4, 10, 16 e 20 kHz (figuras 46E, F e 47C, D). Em resumo, a privação acústica provavelmente altera o reflexo do sobressalto nos animais e frequências características parecem influenciar na resposta. Os testes de ABR mostraram que há possíveis alterações na percepção do som em tons puros nas frequências de 8, 16 e 24 kHz. Isso pode responder algumas alterações na resposta dos sobressaltos desses animais. Algo a levar em consideração é que os limiares desses animais também

estão alterados. Contudo, o estímulo do sobressalto (120 dB) ultrapassa esse limiar e o som de fundo (65 db) é limítrofe.

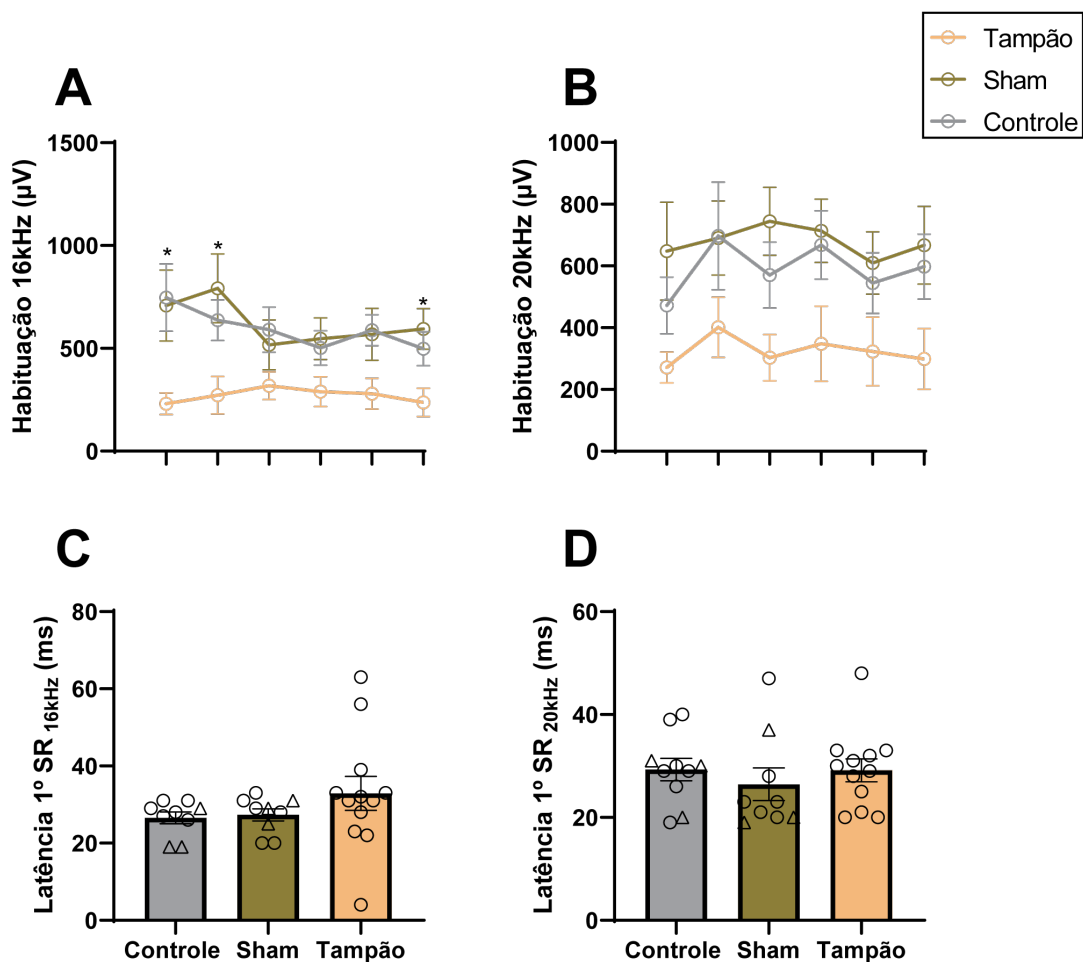


Figura 51 - O reflexo do sobressalto pode ser afetado pela frequência do som de fundo, parte 2. **A** – Em 16kHz, os dois primeiros estímulos são diferentes nos animais tampão, mas com nenhuma diferença nas latências do primeiro reflexo do sobressalto (**C**). **B** – Em 20kHz não há diferenças significativas, tanto para o reflexo do sobressalto quanto para a latência do primeiro reflexo (**D**). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****. Os asteriscos nos gráficos de linhas representam diferenças ($p < 0,05$) entre o grupo tampão e o grupo sham e controle na ANOVA de dois fatores. Os triângulos representam animais fêmeas.

Amp. 16kHz	Dif. Média	95% CI da diferença	p-valor	M1	M2
1º					
Controle vs. Sham	38.18	-464.0 a 540.3	0.8749	746.5	708.3
Controle vs. Tampão	516.1	134.7 a 897.4	0.0126	746.5	230.4
Sham vs. Tampão	477.9	77.89 a 877.9	0.0235	708.3	230.4
2º					
Controle vs. Sham	-154.3	-571.0 a 262.4	0.4416	637.4	791.7
Controle vs. Tampão	365.9	82.58 a 649.1	0.014	637.4	271.6
Sham vs. Tampão	520.2	110.6 a 929.7	0.0164	791.7	271.6
3º					
Controle vs. Sham	74.22	-270.9 a 419.3	0.6566	590.7	516.5
Controle vs. Tampão	272.5	-2.819 a 547.8	0.0521	590.7	318.2
Sham vs. Tampão	198.3	-100.0 a 496.6	0.1763	516.5	318.2
4º					
Controle vs. Sham	-44.07	-322.6 a 234.5	0.743	502.2	546.3
Controle vs. Tampão	212.9	-19.08 a 445.0	0.0698	502.2	289.3
Sham vs. Tampão	257	-6.774 a 520.8	0.0555	546.3	289.3
5º					
Controle vs. Sham	19.87	-294.8 a 334.5	0.8946	588.2	568.3
Controle vs. Tampão	308.8	86.98 a 530.6	0.0088	588.2	279.4
Sham vs. Tampão	288.9	-24.52 a 602.3	0.0682	568.3	279.4
6º					
Controle vs. Sham	-96.65	-368.3 a 175.0	0.4637	497.6	594.3
Controle vs. Tampão	261.2	35.70 a 486.8	0.0255	497.6	236.4
Sham vs. Tampão	357.9	103.1 a 612.6	0.0088	594.3	236.4

Tabela 11 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das amplitudes na habituação em 16kHz

4.14 Animais acusticamente privados apresentam um PPI menor e um GPIAS menor em diferentes frequências

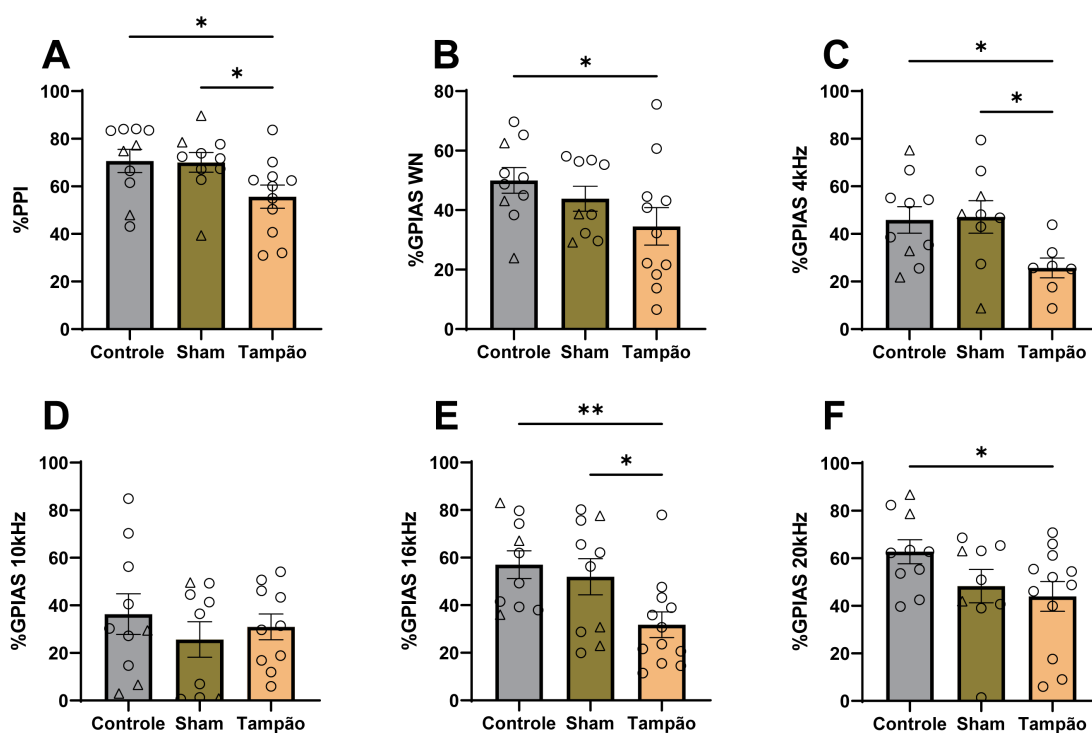


Figura 52 – Os animais que foram privados acusticamente apresentam o gatilho sensório motor acústico, avaliado pelos testes de PPI e GPIAS, alterado. **A** – Os animais do grupo tampão apresentam um menor PPI quando comparados entre os grupos sham e controle. Em **B** e **F** os animais do grupo tampão apresentaram diferenças no teste de GPIAS apenas em comparação com os animais controles nos estímulos em WN e 20kHz. Em **C** e **E** os animais do grupo tampão apresentaram diferenças significativas em comparação aos grupos controle e sham em estímulos de 4 e 16 kHz. **D** – O teste GPIAS em 10kHz não apresentou nenhuma diferença estatística. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ *****. Os triângulos representam animais fêmeas.

Como mencionado anteriormente, o reflexo do sobressalto acústico pode ser modulado. Dessa forma é possível avaliar o funcionamento do gatilho sensório motor acústico. Neste trabalho, utilizou-se os ensaios comportamentais de PPI e GPIAS para a avaliação do gatilho. Todos os animais testados no PPI apresentaram uma inibição do reflexo de sobressalto. Contudo, no GPIAS, alguns animais não responderam a ausência de som, não apresentando inibição no reflexo de sobressalto principalmente no grupo Tampão em 4 kHz (5 de 12 animais). No grupo Sham, 1 animal de 10 não respondeu a essa frequência. Em 10 kHz, 2 animais de 12 não responderam no grupo Tampão e 1 de 10 no grupo Sham. Em 16 kHz, todos os animais avaliados apresentaram uma inibição do sobressalto e em 20 kHz, 1 de 10 animais Sham não apresentou inibição. Todos os animais controles apresentaram uma inibição no teste GPIAS.

Os animais privados acusticamente apresentaram uma alteração no gatilho sensorio motor acústico (figura 52). No protocolo de PPI (figura 52A), os animais do grupo Tampão apresentaram uma inibição de $55.64\% \pm 4.87$ (n=11) do sobressalto em comparação aos animais Sham ($70.08\% \pm 4.15$, n=10) e aos animais Controle ($70.67\% \pm 4.86$, n=10), uma inibição 25% menor aproximadamente. Ao avaliar a detecção da ausência de som do protocolo GPIAS, obteve-se resultados interessantes. Com o ruído branco (WN) de som de fundo, o animais do grupo Tampão apresentaram uma inibição menor apenas em comparação aos animais controles ($34.51\% \pm 6.31$ contra $50.00\% \pm 4.31$, $p=0.04$, n=12 e 10, respectivamente, figura 52B). No entanto, no som de fundo centralizado em 4 kHz, tanto os Sham quanto os Controles apresentaram uma inibição maior em comparação aos animais Tampão (Tampão $25.72\% \pm 4.16$, n=7; Sham $47.15\% \pm 6.84$, n=9, $p=0.022$; Controle 45.86 ± 5.60 , n=10, $p=0.027$, figura 52C). Ao analisar a frequência de 10 kHz, não se obteve nenhuma diferença significativa (figura 52D), diferentemente da frequência em 16 kHz, onde os grupos Sham e Controle apresentaram diferenças significativas dos animais do grupo Tampão (Tampão $31.91\% \pm 5.40$, n=12; Sham $51.99\% \pm 7.58$, n=10, $p=0.03$; Controle $57.03\% \pm 5.81$, n=10, $p=0.007$, figura 52E). Na frequência de 20 kHz houve apenas diferença entres os grupos Controle e Tampão (Tampão $43.96\% \pm 6.28$, n=12, Sham $48.26\% \pm 7.00$, n=9, $p=0.12$, Controle $62.75\% \pm 5.05$, n=10, $p=0.03$, figura 52F).

Com esses dados presume-se que o gatilho sensorio motor acústico dos animais que passaram pela privação auditiva esteja alterado em conjunto com o reflexo do sobressalto. Outros experimentos, como o PPI em diferentes frequências, o limiar de detecção do *gap* e do pré-pulso, a variação do intervalo entre os estímulos, são necessários para elucidar melhor os mecanismos envolvidos nessas alterações provocadas pela privação acústica.

4.15 As latências do sobressalto apresentam comportamentos diferentes quando os animais são pré estimulados

Como visto anteriormente, a latência do primeiro estímulo do sobressalto não é estatisticamente diferente entre os grupos, com exceção de quando o som de fundo é um ruído branco (figura 46). A análise dos testes NoPPI/NoGAP_{WN} evidenciou diferenças na latência quando o som de fundo apresentado era um ruído branco (ANOVA, $F=7.029$, $p=0.001$, figura 49A). O grupo Tampão apresentou $28.93\text{ms} \pm 0.87$

(n=22) de latência, enquanto o Sham $25.23\text{ms} \pm 0.84$ (n=20, $p=0.002$) e o Controle $25.21\text{ms} \pm 0.72$ (n=20, $p=0.002$). Quando se altera a frequência para 4kHz no ensaio GPIAS, a latência ainda é maior no grupo Tampão (ANOVA, $F=7.062$, $p=0.0033$, figura 49B, tabela 12). Essas diferenças ainda são encontradas nas frequências de 10, 16 e 20 kHz (figura 53C-E, tabela 13)

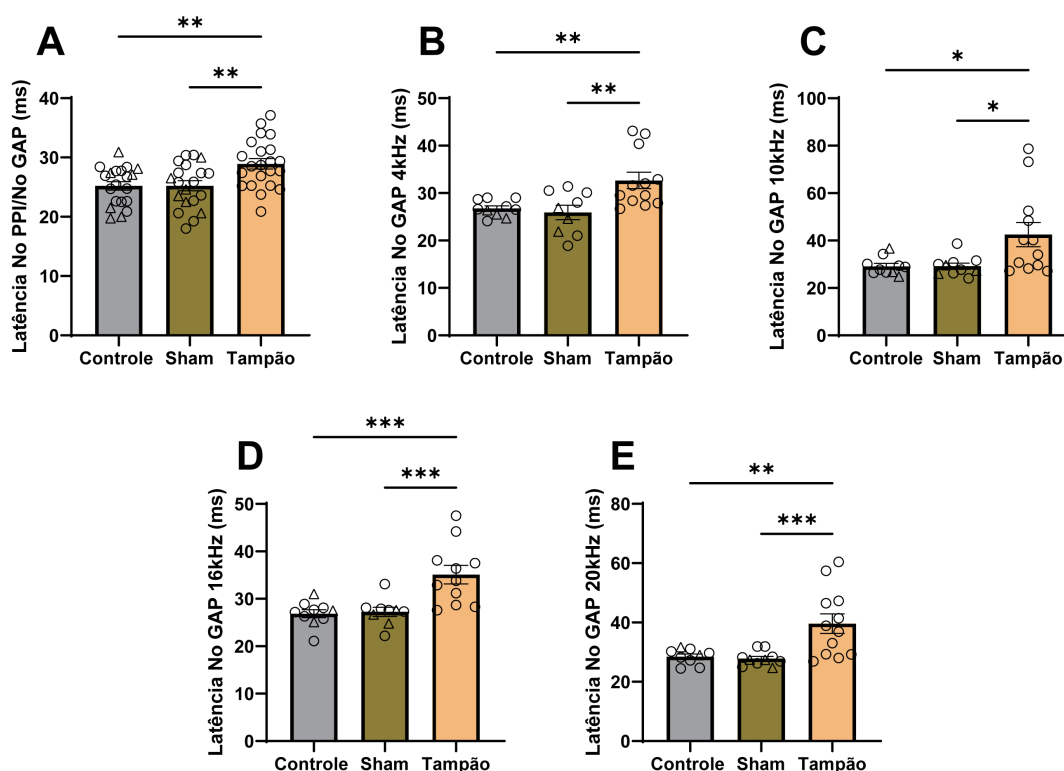


Figura 53 – As latências no reflexo do sobressalto são mais lentas em animais privados acusticamente. Em todas as frequências avaliadas, a latência foi maior nos animais do grupo tampão em comparação aos controles e aos animais sham. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ *****. Os triângulos representam animais fêmeas.

	Controle	Sham	Tampão
Latência NoGAP 4kHz			
n	10	9	12
Média	26.77	25.92	32.66
Erro padrão	0.5489	1.515	1.722
p-valor	0.0054	0.0023	
Latência NoGAP 10kHz			
n	10	10	12
Média	29.16	29.18	42.51
Erro padrão	1.182	1.295	5.113
p-valor	0.0102	0.0103	
Latência NoGAP 16kHz			
n	10	9	11
Média	26.87	27.26	35.11
Erro padrão	0.8285	0.9677	1.95
p-valor	0.0003	0.0006	
Latência NoGAP 20kHz			
n	9	10	12
Média	28.48	27.81	39.6
Erro padrão	0.8644	0.7832	3.281
p-valor	0.002	0.0009	

Tabela 12 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das latências dos testes NoGAP em 4, 10, 16 e 29 kHz.

Surpreendentemente, as latências dos sobressaltos nos testes que possuíam um pré pulso, tanto acústico quanto com ausência de som, não foram diferentes, com exceção do GAP_{WN} (figura 54A-F, tabela 13). Aparentemente, a modulação do gatilho sensorio motor por um pré pulso, seja ele com som ou sem, altera a velocidade na resposta do gatilho sensorio motor acústico, provavelmente devido ao animal já estar atento.

	Controle	Sham	Tampão
Latência PPI			
n	10	10	10
Média	32.53	32.29	34.44
Erro padrão	3.475	3.835	1.426
p-valor	0.6658	0.6266	
Latência GAP WN			
n	10	10	12
Média	27.4	28.77	34.82
Erro padrão	1.287	1.6	1.422
p-valor	0.001	0.0056	
Latência GAP 4kHz			
n	10	10	11
Média	29.64	31.68	30.03
Erro padrão	1.404	2.972	0.9624
p-valor	0.8872	0.5463	
Latência GAP 10kHz			
n	10	10	12
Média	36.46	33.38	36.46
Erro padrão	2.397	2.193	2.187
p-valor	0.9996	0.3383	
Latência GAP 16kHz			
n	10	10	12
Média	39.94	34.92	37.28
Erro padrão	2.09	1.885	1.677
p-valor	0.3186	0.3742	
Latência GAP 20kHz			
n	10	10	12
Média	34.44	33.26	41.2
Erro padrão	1.98	2.541	3.413
p-valor	0.0979	0.054	

Tabela 13 - Pós testes de comparações múltiplas LSD de Fisher das latências dos testes PPI e GAP em WN, 4, 10, 16 e 29 kHz.

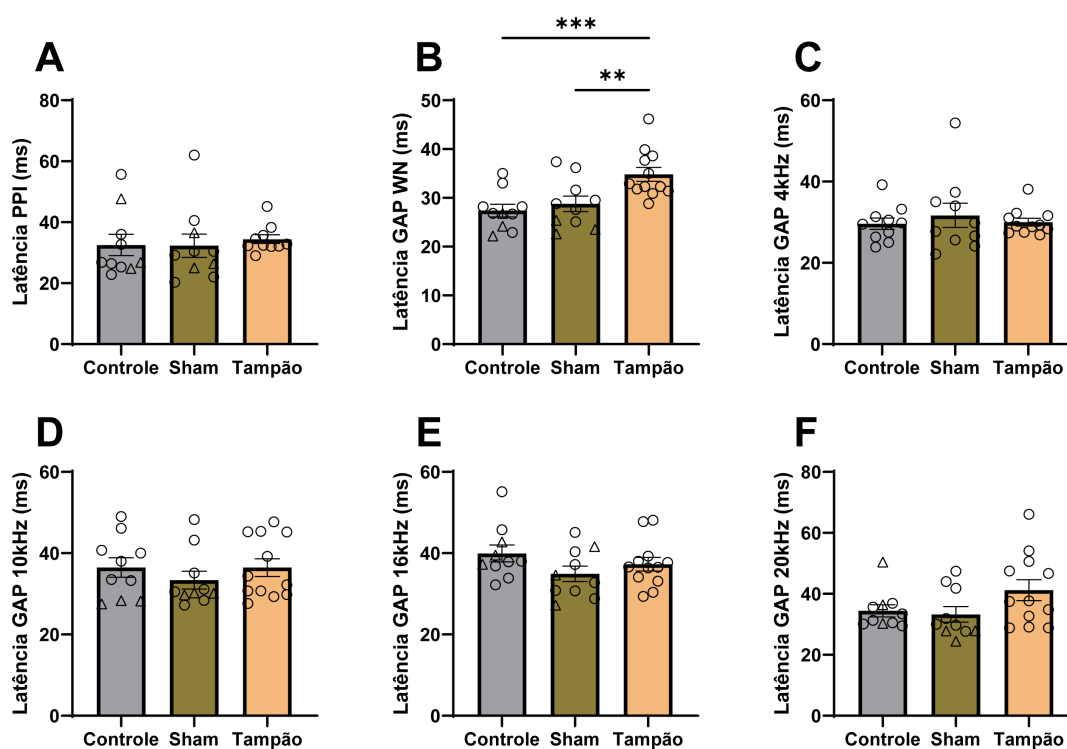


Figura 54 – As latências do reflexo do sobressalto não apresentam diferenças quando o estímulo apresenta um pré-pulso, seja ele de som ou de silêncio, com exceção do GAP_{WN} (B). $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****. Os triângulos representam animais fêmeas.

5. DISCUSSÃO

5.1 As propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes de camundongos se desenvolvem ao longo dos dias pós-natais

Muitas alterações, sejam elas de cunho morfológico ou eletrofisiológico, ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal dos neurônios do tronco auditivo, com intuito de preparar as vias auditivas para o início da audição que ocorre em torno de 12 a 14 dias de vida. O Cálice de Held, uma sinapse gigante formada entre os neurônios *bushy* globulares presentes no núcleo coclear anteroventral (aVCN) e os neurônios principais do núcleo medial do corpo trapezoide (MNTB), tem sido amplamente estudada desde a fase pré-auditiva até a fase pós-auditiva. Esses estudos fornecem grande parte do conhecimento sobre a maturação dos neurônios auditivos do tronco cerebral de roedores. Alguns deles indicam que as mudanças nas propriedades eletrofisiológicas sinápticas dos neurônios principais do MNTB e do Cálice de Held ocorrem próximo a abertura do meato acústico (Awatramani et al., 2005; Iwasaki & Takahashi, 1998; Joshi & Wang, 2002; R. M. Leão et al., 2005; R. M. Leão & von Gersdorff, 2002, 2009b; P. A. Nakamura & Cramer, 2011; Y. Nakamura & Takahashi, 2007; Oleskevich & Walmsley, 2002; Taschenberger et al., 2002; Taschenberger & von Gersdorff, 2000). Embora algumas mudanças sejam observadas no período pós audição, o efeito da privação acústica não impactou a taxa de disparo dos neurônios principais do MNTB e a neurotransmissão no Cálice de Held (Grande et al., 2014; Leao et al., 2006). No entanto, tem-se evidências que, tanto em humanos quanto em roedores, há um período crítico entre o começo da audição e os primeiros anos/dias de vida que é crucial para a maturação completa e adequada do sistema auditivo (de Villers-Sidani et al., 2007; Knipper et al., 2020; Kral & Eggermont, 2007; Popescu & Polley, 2010; Sharma et al., 2016; Sun et al., 2011; Thai-Van et al., 2007; Zhuang et al., 2017b).

As propriedades eletrofisiológicas dos neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal se desenvolvem, desde o início da vida dos animais estudados – 4 dias após o nascimento até 21 dias de vida. Nesse período, com 14 dias de vida, ocorreu a abertura do meato acústico e considerou-se a fase pré-auditiva entre P4 e P13 e a fase pós auditiva entre P14 e P21. Além de considerar a abertura do meato acústico, também se levou em consideração os registros de ABR e o reflexo do sobressalto em resposta a batida de palmas. Interessantemente, foi encontrado a primeira onda no registro de ABR dos animais com 13 dias, após um estímulo de alta intensidade,

mesmo que os animais não apresentassem a abertura do meato e nem o sobressalto. Assim, embora nessa idade alguma atividade do tronco cerebral seja evocada por um estímulo de som elevado, a ausência das outras ondas indica que não há um processamento auditivo correto. Em P14, o limiar auditivo diminuiu e coincidiu com a maior definição das outras ondas do ABR, o que sugere um processo de maturação das vias auditivas. Contudo, o estabelecimento da audição não ocorre de maneira abrupta, mas há uma melhora significativa após a abertura do meato. Há alguns relatos que mostram o córtex de alguns roedores respondendo a estímulos elevados antes da abertura do meato acústico, provavelmente por condução óssea (Makarov et al., 2021; Meng et al., 2021; Wess et al., 2017). Sendo assim, não há um ponto específico de início abrupto da audição, mas a abertura do meato e a transição de um estado surdo para um estado audível são pontos de referência do começo do período crítico para a maturação das respostas acústicas corticais (de Villers-Sidani et al., 2007).

Os neurônios fusiformes são os neurônios principais do DCN e uma hiperatividade patológica nessas células pode estar relacionada com a gênese do tinnitus em diferentes modelos animais (Brozoski et al., 2002; Kaltenbach et al., 2005; Manzoor et al., 2013; S. Shore et al., 2007). Além disso, o tinnitus depende do estabelecimento da audição uma vez que indivíduos congenitamente surdos não possuem tinnitus (S. Y. Lee et al., 2017; Rosing et al., 2016). Com isso, sugere-se que as mudanças que ocorrem no DCN depois do estabelecimento da audição possam ser relevantes na susceptibilidade ao tinnitus. O maior achado deste trabalho foi que os neurônios tidos como ativos, ou seja, que disparam potenciais de ação de maneira espontânea (R. Leão et al., 2012), são encontrados predominantemente na fase após o estabelecimento da audição. Apenas alguns neurônios ativos foram encontrados no DCN de animais antes de P14: um neurônio em P12 e um em P13, de um total de 9 neurônios registrados. A proporção dos neurônios ativos aumenta progressivamente após o início da audição, atingindo a proporção maior em torno de P18/19, o que sugere que o aparecimento dos neurônios fusiformes ativos depende da chegada robusta da informação sensorial. Ademais, sugere que esse estado neuronal seja importante para as computações neurais do DCN e possa ser relevante no surgimento do tinnitus. Mas, o que está por trás do surgimento dos neurônios ativos?

Em neurônios de animais pré-audição, o limiar de atividade é mais despolarizado, comparado ao de animais mais velhos. Essa característica está

relacionada com uma menor expressão na corrente de sódio persistente (I_{NaP}). A I_{NaP} deriva de um estado não inativante de canais de sódio dependentes de voltagem, com uma ativação mais hiperpolarizada em comparação a apresentada pelas correntes inativantes. Ela está presente em diversos tipos neuronais nas mais variadas regiões do sistema nervoso central como o hipocampo, tálamo, cerebelo, neocórtex, córtex entorrinal e regiões do tronco como os núcleos cocleares (Alzheimer et al., 1993; Ceballos et al., 2017a, 2017b; Crill, 1996; Hsu et al., 2018; Ma et al., 1997; Taylor, 1993). Os resultados apresentados sugerem que há uma maior expressão da I_{NaP} nos neurônios fusiformes do DCN de animais após o início da audição, pois I_{NaP} aproxima o limiar de atividade do limiar do potencial de ação e isso promove o disparo espontâneo de potenciais de ação. Ou seja, a I_{NaP} é responsável pela existência do estado ativo dos neurônios fusiformes (R. Leão et al., 2012). Um efeito semelhante ocorre em neurônios hipocámpais do Corno de Ammon 1 (CA1), onde a densidade da I_{NaP} em neurônios de animais mais jovens (P12-16) foi menor em comparação ao de animais mais velhos (P60-75) (Lunko et al., 2014). Outra evidência que correlaciona o aumento da expressão da I_{NaP} conforme a idade do animal é sua maior densidade em neurônios trigeminais mesencefálicos em animais P14-17 quando comparados a animais P0-6 (Enomoto et al., 2018).

A I_{NaP} está relacionada com a expressão das subunidades β -auxiliares dos canais de sódio (Aman et al., 2009; Bant & Raman, 2010; Qu et al., 2001) e essas subunidades podem estar hiper expressas nos neurônios fusiformes após o início da audição. Já foi dito que a I_{NaP} é essencial para diminuir o limiar de atividade e consequentemente permitir o disparo espontâneo dos neurônios fusiformes, e que o aparecimento da I_{NaP} após P14 possa estar relacionado com o aparecimento dos neurônios ativos. Entretanto, se faz necessário um estudo mais aprofundado sobre o desenvolvimento de outras condutâncias subliminares que afetam o potencial de membrana, como a I_H , KIR e de vazamento (Ceballos et al., 2016), e como é a respectiva expressão na maturação das propriedades passivas dos neurônios fusiformes que possibilitem o aparecimento do estado ativo desses neurônios. Entretanto, nesses animais, o aumento na expressão da I_{NaP} após o início da audição parece ser responsável por criar o estado ativo dos neurônios fusiformes.

Registros de current-clamp geram uma quantidade enorme de informação sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios estudados que refletem as interações dinâmicas de canais iônicos expressos na membrana. Comparou-se

diversos parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios fusiformes durante o desenvolvimento a partir de P4 a P21. E ao aplicar a análise de componentes principais nos dados, foi possível detectar variações e interações entre os parâmetros ao longo do desenvolvimento. A análise permitiu uma separação entre neurônios pré e pós audição ao longo do PC1. Essa segregação sugere fortemente que algumas mudanças ocorrem pré-audição e outras ocorrem pós-audição. Junto a isso, foi encontrado que os neurônios pré-audição podem ser divididos ao longo do PC2, com diferenças significativas entre as idades desses dois subgrupos. Ao analisar os vetores dos diferentes parâmetros no gráfico PC1 em função do PC2, a amplitude do potencial de ação e o ROR variam praticamente em paralelo com a idade, enquanto rheobase, limiar de atividade, latência do potencial de ação, *halfwidth* e sag se correlacionam negativamente com a idade. A resistência de entrada, *halfwidth* e o sag variam negativamente com o PC2, no grupo dos animais pré audição, e a rheobase, latência e limiar de atividade no grupo dos animais mais velhos. A segregação ao longo do PC2 sugere que as mudanças nesses parâmetros sejam provocadas por diferentes “programas” durante a fase pré-auditiva.

A análise do gráfico *box-plot* dos parâmetros evidenciou uma correlação quase linear entre a amplitude do potencial de ação e ROR com o PC1, o que sugere fortemente sua correlação com a idade. Por outro lado, a *halfwidth* diminui com o PC1 enquanto o limiar do potencial de ação não mostra alguma correlação com o PC1 ou PC2, somente uma fraca correlação negativa com a idade. Entretanto, não houve diferenças entre esses parâmetros nos neurônios fusiformes silentes e ativos pós-audição. Isso sugere que os potenciais de ação dos neurônios fusiformes tornam-se mais rápidos e maiores durante o desenvolvimento, independente do estado neuronal quieto ou ativo.

Curiosamente, as mudanças nos parâmetros subliminares apresentaram mudanças consideráveis antes do início da audição. Enquanto a resistência de entrada imediata foi maior nos neurônios pré audição, a resistência de membrana aferida no estado estacionário não apresentou nenhuma diferença, de acordo com o maior sag nos animais pré audição. O sag de despolarização reflete a ativação da I_H pela abertura dos canais HCN em potenciais hiperpolarizados. Estes canais parecem equalizar a resistência de entrada em neurônios fusiformes do DCN (Ceballos et al., 2016) e são provavelmente mais proeminentes em neurônios pré audição. A amplitude do sag também é afetada pela resistência de entrada imediata (Ceballos et al., 2016)

que é maior nos neurônios pré-audição. Provavelmente, o refinamento das condutâncias envolvidas no sag e na resistência de entrada imediata acontecem nos primeiros estágios de desenvolvimento pós-natal, pois a maior variação nesses parâmetros ocorre antes de P10. Essas mudanças no sag e na resistência de entrada imediata nos neurônios fusiformes pré-audição, não são visualizadas nos neurônios pós-audição na PCA, e possivelmente a I_H esteja equalizando a resistência de membrana em neurônios pré-audição (Ceballos et al., 2016).

As variações na latência e na rheobase estão fortemente correlacionadas e são mais significantes em neurônios de animais na fase pré-audição, mas não em neurônios pós-audição. Essas flutuações sugerem variações na expressão de canais de potássio dependentes de voltagem ativados em baixas voltagens que controlam a latência em neurônios fusiformes (Kanold & Manis, 1999).

O presente estudo confirmou que o potencial de repouso da membrana de neurônios ativos é mais despolarizado do que os neurônios silentes pré e pós-audição. Essa diferença é causada por condutâncias de potássio retificadoras de entrada aumentadas nos neurônios silentes (R. Leão et al., 2012). Em neurônios ativos, o potencial de membrana mais despolarizado ultrapassa o limiar de atividade, regulado pela I_{NaP} , e conseqüentemente há o disparo espontâneo (Ceballos et al., 2017b; R. Leão et al., 2012). Nos neurônios pré-audição, a menor expressão da I_{NaP} aumenta a diferença entre o potencial de repouso da membrana e o limiar de atividade, o que torna muito difícil o disparo de potenciais de ação nesses neurônios, o que corrobora com a maior rheobase em comparação com os neurônios pós-audição. As correlações na PCA evidenciaram que a rheobase tem uma forte correlação positiva entre o limiar de atividade, tanto pré como pós-audição, mas uma forte correlação negativa com a resistência de entrada, somente em neurônios pré-audição. Portanto, variações nas condutâncias da membrana que impactam a rheobase são mais encontradas nos neurônios pré-audição. Isso sugere que as mudanças nas condutâncias subliminares são menos cruciais nos neurônios pós-audição.

Contudo, as diferenças encontradas no potencial de repouso de membrana sugerem que a I_{KIR} possa regular o modo de disparo, assim como descrito anteriormente (R. Leão et al., 2012). Surpreendentemente, o RMP foi similar entre os neurônios silentes pré e pós-audição e isso indica que os níveis de I_{KIR} entre esses tipos neuronais sejam equivalentes e que possivelmente haja uma diminuição nessa condutância em alguns neurônios após o início da audição que leva ao surgimento do

estado ativo dos neurônios fusiformes. Entretanto, outras condutâncias podem afetar o RMP, tais como a própria I_H e as correntes de vazamento sejam elas de potássio ou sódio (Ceballos et al., 2016; R. Leão et al., 2012) e podem ser reguladas de maneiras distintas durante o desenvolvimento.

Em geral, a PCA sugere que há muitas mudanças nas propriedades passivas dos neurônios fusiformes que ocorrem antes do início da audição, mas o refinamento do potencial de ação ocorre pós-audição. Somado a isso, há mais correlações entre os parâmetros observados no período pré audição e isso indica que diversas mudanças ocorrem neste período de maneira coordenada e tendem a estabilizar após o início da audição.

5.2 Os potenciais de ação dos neurônios fusiformes são afetados pela privação precoce acústica de curto prazo

Os resultados encontrados sugerem que os neurônios fusiformes do núcleo coclear dorsal apresentam um padrão de potencial de ação diferente quando os animais passam pela privação auditiva de curto prazo. Os animais estudados foram privados acusticamente no mesmo dia em que o meato acústico abriu (P14). Ou seja, desde o início a experiência sensorial desses animais foi afetada com a audição fora dos padrões normais de funcionamento, apresentando limiares em resposta aos *clicks* e a frequências específicas elevados, além de alterações no padrão das ondas do ABR, principalmente na onda I. Esses resultados indicam uma possível diminuição na taxa de disparo dos neurônios do gânglio espiral.

Ao privar o sentido de um animal, mudanças drásticas no funcionamento tanto das redes neurais quanto das células envolvidas, principalmente se a privação ocorrer durante períodos críticos do desenvolvimento sensorial, podem ocorrer. Em roedores, a abertura do meato acústico ocorre entre 10 e 14 dias e marca o início do período crítico importante para o sentido da audição, com duração de quatro a cinco dias. Esse intervalo de tempo se assemelha a quantidade de dias que os animais do presente trabalho ficaram privados de som. Nos humanos, esse mesmo período ocorre na vida intrauterina, com o início da audição ocorrendo na 27ª semana de gestação e se prolongando de 6 a 12 meses de vida pós-natal (Knipper et al., 2020).

Ainda sabe-se pouco sobre como o sistema nervoso central se organiza, durante o desenvolvimento, para manter as funções cerebrais em funcionamento

pleno na vida adulta, mesmo com o sistema passando por modificações bioquímicas e alterações substanciais na atividade sensorial (O'Leary et al., 2014). Uma das hipóteses, é que a concentração do cálcio intracelular seja modulada pela atividade sensorial, pois a elevação na frequência de disparos de potenciais de ação aumenta o cálcio intracelular, em resposta a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (O'Leary et al., 2014). Logo, a privação sensorial pode estar relacionada com a diminuição da sinalização bioquímica do cálcio e uma consequente diminuição na expressão de canais iônicos. A excitabilidade neuronal e o formato do potencial de ação são determinados pelos índices de canais iônicos expressos na membrana neuronal. Por exemplo, camundongos congenitamente surdos apresentam condutâncias de potássio ativados em baixa voltagem diminuídas (Leao et al., 2004), o que leva a um aumento na excitabilidade dos neurônios do MNTB. Outros tipos de canais afetados por alterações na audição são canais de sódio dependentes de voltagem. Em neurônios fusiformes de animais que apresentavam tinnitus, induzido pelo modelo do salicilato, a expressão aberrante de canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v 1.6 levou a um aumento na excitabilidade. Os neurônios fusiformes, estudados nesse trabalho, podem estar sofrendo modulações negativas na expressão de canais Na_v , após a privação auditiva, pois apresentaram um limiar maior, com a amplitude e o *maximum rate of rise* diminuídos (Bean, 2007; Cohen et al., 1981). Além disso, essas alterações podem ser reflexo de um atraso na maturação desses neurônios mediadas pela experiência sensorial, devido a privação auditiva no início do período crítico (Nakamura et al., 2020), pois resultados semelhantes foram encontrados em neurônios de animais mais jovens.

Algumas considerações: primeiro, o número de neurônios fusiformes registrados de animais que passaram pela privação acústica foi baixo. Entretanto, os resultados dos parâmetros do potencial foram robustos, mesmo com um número de células reduzido. Segundo, ainda são necessários experimentos com animais sham, pois o procedimento de privação acústica exige anestésiar os animais. Nessa idade, a administração de drogas que atuam no sistema nervoso central pode alterar o desenvolvimento durante o período crítico da audição (Nakamura et al., 2020). Contudo, esses resultados ajudarão a compreender outros experimentos que porventura serão feitos para responder as hipóteses deixadas em aberto.

5.3 A privação acústica de longo prazo altera o funcionamento do gatilho sensorial motor acústico dos camundongos

Durante 30 dias, os animais estudados foram privados acusticamente. A privação ocorreu desde a abertura do canal auditivo, o início do período crítico. Durante os períodos críticos, o cérebro é altamente plástico e alterar a experiência sensorial auditiva pode acarretar disfunções na aprendizagem em ratos (De Villers-Sidani et al., 2007). Os dados encontrados sugerem uma diminuição no reflexo do sobressalto dos animais, moduladas pela frequência do som de fundo, uma menor inibição do reflexo por pré-pulso de som, bem como uma diminuição na detecção da ausência de som nas frequências de 4kHz e 16kHz. Somado a isso, os limiares auditivos dos animais após 30 dias de privação acústica permanecem alterados cinco dias após o término do protocolo de privação auditiva. O reflexo do sobressalto acústico possui um componente neural acústico e outro motor. Neurônios da raiz no nervo coclear constituem o componente acústico enquanto o núcleo reticular pontino caudal e seus neurônios gigantes, junto aos neurônios motores inferiores, na medula espinhal, constituem a parte motora (Gómez-Nieto et al., 2014; Y. Lee et al., 1996).

Um reflexo do sobressalto diminuído foi encontrado em ratos que apresentam crises epilépticas audiogênicas (Cunha et al., 2020) provavelmente por apresentarem um déficit motor. No entanto, diferente dos resultados apresentados, esses animais apresentaram uma maior sensibilidade no ensaio de inibição pelo pré-pulso. Contudo, a resposta do reflexo sobressalto foi menor em camundongos de 2 meses de idade, quando comparados a animais com 6 meses de idade nas frequências de 4kHz e 8kHz (Xiong et al., 2017). Essa diferença está relacionada com a atividade dos neurônios do colículo inferior (IC), uma vez que neurônios de animais jovens apresentam uma taxa de disparo espontânea menor (Xiong et al., 2017). Uma das aferências do colículo inferior é o neurônio fusiforme do DCN, (Oertel & Young, 2004b; Young & Davis, 2002; S. Zhang & Oertel, 1994). Os animais que foram privados acusticamente em curto prazo apresentaram neurônios fusiformes com um limiar do potencial de ação maior e uma amplitude menor, o que pode acarretar uma menor excitação nos neurônios do colículo inferior, em uma privação auditiva de longo prazo. Outros experimentos são necessários para comprovar a hipótese que neurônios fusiformes tenham uma excitabilidade reduzida e interfiram na excitabilidade do colículo inferior, e conseqüentemente no reflexo do sobressalto. Contudo, esses experimentos sugerem

o envolvimento do DCN na diminuição do reflexo do sobressalto, por ser um aferência importante do colículo inferior (Oertel & Young, 2004b; Young & Davis, 2002; S. Zhang & Oertel, 1994).

Os animais acusticamente privados apresentaram uma diminuição na inibição do reflexo do sobressalto. Ao longo dos anos, o gatilho sensorio motor acústico (ASG) é avaliado e reavaliado para compreender quais são as regiões cerebrais envolvidas nesse filtro de informações sensoriais. Regiões como o hipocampo central, colículo inferior, córtex pré-frontal e a própria conectividade córtico-cortical podem modular o gatilho sensorio motor acústico e o núcleo coclear ventral (Dissanayake et al., 2008; Khani et al., 2019; Tripathi et al., 2021; Vohs et al., 2009; Witten et al., 2014). Khany et al. (2019), a partir de registros epicranianos e intracranianos, avaliaram a rede neural em larga escala o gatilho sensorio motor acústico em camundongos acordados. No estudo, os autores avaliaram diferentes intervalos entre os estímulos (ISI) além de registrarem a atividade cerebral nos dois estímulos aplicados. Nos primeiros 17 ms após o primeiro estímulo de som, a atividade cerebral, registrada a partir de registros eletrofisiológicos epicraniais, foi predominantemente caudal e detectável na superfície dorsal do cérebro, condizente com a região do colículo inferior. Entre 18 e 54 ms após o primeiro pulso, os registros de voltagem abrangem a lateral do cérebro e sugerem o envolvimento do córtex auditivo primário (Au1). De 55 ms a 120 ms depois do pulso de som, as imagens mostraram regiões centro-frontais recrutadas, sugerindo o envolvimento do córtex cingulado anterior (ACC). Esses dados sugerem que regiões frontais como o ACC podem estar envolvidas no ASG. Curiosamente, em ISI mais curtos, como 125 e 250 ms, o primeiro pulso de som estimulou as regiões do IC, Au1 e ACC e o segundo pulso de som não alterou o registro epicranial. Essas regiões permanecem ativas por aproximadamente 350 ms e o segundo estímulo acústico parece ser processado da mesma maneira que o primeiro estímulo, apenas com a amplitude reduzida. Essa diminuição da amplitude é sugerida devido aos registros intracraniais, onde evidenciou-se que a computação das regiões do IC, Au1 e ACC é alterada localmente e a proporção da inibição pelo pré pulso é maior conforme atinge as regiões superiores. No ACC ocorre a inibição pelo pré pulso até dois segundos após o primeiro pulso (Khani et al., 2019). Neste mesmo trabalho, os autores sugerem a participação do núcleo coclear ventral (VCN) no gatilho sensorio acústico. Como observado, o IC exerce um papel fundamental no gatilho sensorio motor acústico e recebe informações tanto do DCN quanto do VCN.

Alguns trabalhos mostram o envolvimento do DCN no gatilho sensório motor acústico, mas aferido pelo GPIAS (Han et al., 2019; Heeringa et al., 2018). O teste de inibição do sobressalto a partir de um pré-pulso de silêncio (GPIAS) é utilizado para aferir o ASG e avaliar a presença do tinnitus em animais e em humanos (Anderson & Linden, 2016; Ku et al., 2017, 2020; Shen, 2014). O tinnitus é um sintoma onde ocorre a percepção de um som fantasma em uma frequência característica e estudos relacionam o DCN como a origem do tinnitus devido a uma hiperexcitabilidade dos neurônios fusiformes com uma redistribuição das projeções glutamatérgicas aos núcleos cocleares (Heeringa et al., 2018; S. E. Shore & Zhou, 2006; Wu et al., 2016). Os resultados apresentados sugerem que os animais não estejam detectando a ausência de som em 4 e 16 kHz, com diferenças significativas entre os animais controles e sham. Em um primeiro momento, supõe-se que esses animais estejam com tinnitus. Entretanto, os limiares auditivos medidos pelo ABR estão elevados, inclusive na frequência de 16 kHz. Como o som de fundo nos testes GPIAS é de 65 dB e a média dos limiares acústicos aproxima-se de 60 dB, os animais podem não estar ouvindo o som apropriadamente. Outra hipótese é que a resposta motora desses animais esteja afetada, pois estudos em nosso laboratório mostraram que os animais após 30 dias de tampão estavam com o movimento comprometido no teste de labirinto aberto.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi mostrado que neurônios fusiformes do DCN amadurecem suas propriedades eletrofisiológicas durante o desenvolvimento pós-natal, com mudanças encontradas tanto antes quanto depois do início da audição. O aumento na expressão da I_{NaP} e o aparecimento do estado ativo após o início da audição sugere que o estímulo acústico pode desencadear essas alterações. A expressão da I_H e da I_{KIR} também aumentam conforme o animal amadurece. Além disso, a privação auditiva de curto prazo foi capaz de modificar os potenciais de ação dos neurônios fusiformes. A região do núcleo coclear dorsal é tida muitas vezes como a região onde se origina o tinnitus, pois é relacionada a um aumento na taxa de disparo desse tipo neuronal. Uma vez que esse período é crítico na audição e no desenvolvimento do tinnitus, acredita-se que a perda auditiva precoce possa alterar o funcionamento fisiológico normal e possivelmente impactar a audição e possibilitar o aparecimento do tinnitus.

Estudos posteriores de privação acústica acompanhados de estudos de biofísica celular são necessários para testar essa hipótese. A privação auditiva de longo prazo, durante o período crítico da audição, alterou o funcionamento do gatilho sensorio motor acústico dos camundongos e o processamento do circuito do reflexo do sobressalto. Nos ensaios de PPI e GPIAS, os animais privados de som apresentaram uma menor inibição do reflexo do sobressalto, com as frequências de 4 e 16 kHz estando em evidência no teste de GPIAS. Sugere-se também o envolvimento do DCN na diminuição do reflexo do sobressalto, pois os neurônios fusiformes, uma das principais aferências do colículo inferior, apresentaram um potencial de ação com um limiar elevado e uma amplitude reduzida, na privação acústica de curto prazo. Animais com o reflexo de sobressalto acústico diminuído apresentam neurônios do colículo inferior com uma menor taxa de disparo espontâneo (Xiong et al., 2017), o que pode ser relacionado com uma menor excitabilidade dos neurônios fusiformes. Outros experimentos comportamentais que averiguem a parte motora, como o teste de performance *rotarod* e o de labirinto em campo aberto, responderiam muito bem se o animal privado apresenta algum déficit motor e se esse déficit diminui a amplitude das respostas nos ensaios de PPI e GPIAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alford, B. R., & Ruben, R. J. (1963). XIX Physiological, Behavioral and Anatomical Correlates of the Development of Hearing in the Mouse. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 72(1), 237–247. <https://doi.org/10.1177/000348946307200119>
- Alzheimer, C., Schwindt, P. C., & Crill, W. E. (1993). Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *Journal of Neuroscience*, 13(2), 660–673. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-02-00660.1993>
- Aman, T. K., Grieco-Calub, T. M., Chen, C., Rusconi, R., Slat, E. A., Isom, L. L., & Raman, I. M. (2009). Regulation of persistent na current by interactions between β subunits of voltage-gated na channels. *Journal of Neuroscience*, 29(7), 2027–2042. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4531-08.2009>
- Anderson, L. A., & Linden, J. F. (2016). Mind the gap: Two dissociable mechanisms of temporal processing in the auditory system. *Journal of Neuroscience*, 36(6), 1977–1995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1652-15.2016>
- Assad, J. A., Shepherd, G. M. G., & Corey, D. P. (1991). Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron*, 7(6), 985–994. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90343-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90343-X)
- Awatramani, G. B., Turecek, R., & Trussell, L. O. (2005). Staggered development of GABAergic and glycinergic transmission in the MNTB. *Journal of Neurophysiology*, 93(2), 819–828. <https://doi.org/10.1152/jn.00798.2004>
- Bant, J. S., & Raman, I. M. (2010). Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel β 4 in cultured cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12357–12362. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005633107>
- Bhatara, A., Babikian, T., Laugeson, E., Tachdjian, R., & Slinger, Y. S. (2013). Impaired timing and frequency discrimination in high-functioning autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43(10), 2312–2328. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1778-y>
- 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the*

- Society for Neuroscience*, 27(51), 13926–13937.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3520-07.2007>
- Brozoski, T. J., Bauer, C. A., & Caspary, D. M. (2002). Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *Journal of Neuroscience*, 22(6), 2383–2390. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-06-02383.2002>
- Cant, N. B., & Benson, C. G. (2003). Parallel auditory pathways: Projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Research Bulletin*, 60(5–6), 457–474. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00050-9)
- Ceballos, C. C., Li, S., Roque, A. C., Tzounopoulos, T., & Leão, R. M. (2016). It equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(OCT2016). <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00249>
- Ceballos, C. C., Roque, A. C., & Leão, R. M. (2017a). The role of negative conductances in neuronal subthreshold properties and synaptic integration. *Biophysical Reviews*, 9(5), 827–834. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0300-8>
- Ceballos, C. C., Roque, A. C., & Leão, R. M. (2017b). A Negative Slope Conductance of the Persistent Sodium Current Prolongs Subthreshold Depolarizations. *Biophysical Journal*, 113(10), 2207–2217. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.047>
- Chen, Z., & Yuan, W. (2015). Central plasticity and dysfunction elicited by aural deprivation in the critical period. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 9, Issue June, p. 26). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00026>
- Clarkson, C., Antunes, F. M., & Rubio, M. E. (2016). Conductive hearing loss has long-lasting structural and molecular effects on presynaptic and postsynaptic structures of auditory nerve synapses in the cochlear nucleus. *Journal of Neuroscience*, 36(39), 10214–10227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0226-16.2016>
- Crill, W. E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annual Review of Physiology*, 58(31), 349–362. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.002025>
- Cunha, A. O. S., Moradi, M., de Deus, J. L., Ceballos, C. C., Benites, N. M., de Barcellos Filho, P. C. G., de Oliveira, J. A. C., Garcia-Cairasco, N., & Leão, R. (2020). Alterations in brainstem auditory processing, the acoustic startle response

- and sensorimotor gating of startle in Wistar audiogenic rats (WAR), an animal model of reflex epilepsies. *Brain Research*, 1727. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146570>
- Dagostin, A. L. A., Leão, R. M. X., & Lucas, G. de A. (2012). *Caracterização eletrofisiológica dos neurônios do Nidopálio Caudomedial, uma área responsável pelo processamento auditivo em aves canoras*. Universidade de São Paulo.
- Davis, M. (1984). The Mammalian Startle Response. *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, 287–351. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2286-1_10
- Davis, M., Gendelman, D. S., Tischler, M. D., & Gendelman, P. M. (1982). A primary acoustic startle circuit: Lesion and stimulation studies. *Journal of Neuroscience*, 2(6), 791–805. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.02-06-00791.1982>
- De Villers-Sidani, E., Chang, E. F., Bao, S., & Merzenich, M. M. (2007). Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. *Journal of Neuroscience*, 27(1), 180–189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3227-06.2007>
- de Villers-Sidani, E., Chang, E. F., Bao, S., & Merzenich, M. M. (2007). Critical Period Window for Spectral Tuning Defined in the Primary Auditory Cortex (A1) in the Rat. *Journal of Neuroscience*, 27(1), 180–189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3227-06.2007>
- Dissanayake, D. W. N., Zachariou, M., Marsden, C. A., & Mason, R. (2008). Auditory gating in rat hippocampus and medial prefrontal cortex: effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2. *Neuropharmacology*, 55(8), 1397–1404. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.08.039>
- Dodge, R., & Loutit, C. M. (1926). Modification of the pattern of the guinea pig's reflex response to noise. *Journal of Comparative Psychology*, 6(3), 267–285. <https://doi.org/10.1037/h0072276>
- Dufour, M. A., Woodhouse, A., Amendola, J., & Goillard, J. M. (2014). Non-linear developmental trajectory of electrical phenotype in rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *ELife*, 3, 4059. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.04059>
- Ehret, G. (1976). Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *Journal of the American Audiology Society*, 1(5), 179–184. <http://europepmc.org/abstract/MED/956003>

- Enomoto, A., Seki, S., Tanaka, S., Ishihama, K., Yamanishi, T., Kogo, M., & Hamada, S. (2018). Development of resurgent and persistent sodium currents in mesencephalic trigeminal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *96*(2), 305–312. <https://doi.org/10.1002/jnr.24134>
- Finney, E. M., Fine, I., & Dobkins, K. R. (2001). Visual stimuli activate auditory cortex in the deaf. *Nature Neuroscience*, *4*(12), 1171–1173. <https://doi.org/10.1038/nn763>
- Fitch, R. H., Threlkeld, S. W., McClure, M. M., & Peiffer, A. M. (2008). Use of a modified prepulse inhibition paradigm to assess complex auditory discrimination in rodents. *Em Brain Research Bulletin* (Vol. 76, Issues 1–2, p. 1–7). *Brain Res Bull.* <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.07.013>
- Fleming, G. W. T. H. (1939). The Startle Pattern. By C. Landis, Ph.D., and W. A. Hunt, Ph.D. New York: Farrar & Rinehart, 1939. Pp. xiii + 168. Price \$2.50. *Journal of Mental Science*, *85*(357), 808–809. <https://doi.org/10.1192/bjp.85.357.808-b>
- Forlano, P. M., Ghahramani, Z. N., Monestime, C. M., Kurochkin, P., Chernenko, A., & Milkis, D. (2015). Catecholaminergic innervation of central and peripheral auditory circuitry varies with reproductive state in female midshipman fish, *porichthys notatus*. *PLoS ONE*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121914>
- Friston, K. (2018). Does predictive coding have a future? *Nature Neuroscience*, *21*(8), 1019–1021. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0200-7>
- Fujino, K., & Oertel, D. (2003). Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 265–270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0135345100>
- Giraud, A. L., & Arnal, L. H. (2018). Hierarchical Predictive Information Is Channeled by Asymmetric Oscillatory Activity. *Em Neuron* (Vol. 100, Issue 5, p. 1022–1024). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.020>
- Gómez-Nieto, R., de Horta-Júnior, J. de A. C., Castellano, O., Millian-Morell, L., Rubio, M. E., & López, D. E. (2014). Origin and function of short-latency inputs to the neural substrates underlying the acoustic startle reflex. *Frontiers in Neuroscience*, *8*(8 JUL), 216. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00216>
- Gordon-Salant, S., & Fitzgibbons, P. J. (1993). Temporal factors and speech recognition performance in young and elderly listeners. *Journal of Speech and Hearing Research*, *36*(6), 1276–1285. <https://doi.org/10.1044/jshr.3606.1276>

- Grande, G., Negandhi, J., Harrison, R. v., & Wang, L. Y. (2014). Remodelling at the calyx of Held-MNTB synapse in mice developing with unilateral conductive hearing loss. *Journal of Physiology*, *592*(7), 1581–1600. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268839>
- Guo, W., Fan, S., Xiao, D., Dong, H., Xu, G., Wan, Z., Ma, Y., Wang, Z., Xue, T., Zhou, Y., Li, Y., & Xiong, W. (2021). A Brainstem reticulotegmental neural ensemble drives acoustic startle reflexes. *Nature Communications*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26723-9>
- Hack, M. H. (1968). The developmental Preyer reflex in the sh-1 mouse. *Journal of Auditory Research*, *8*(4), 449–457.
- Han, K. H., Mun, S. K., Sohn, S., Piao, X. Y., Park, I., & Chang, M. (2019). Axonal sprouting in the dorsal cochlear nucleus affects gap-prepulse inhibition following noise exposure. *International Journal of Molecular Medicine*, *44*(4), 1473. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4316>
- Hancock, K. E., & Voigt, H. F. (2002). Intracellularly labeled fusiform cells in dorsal cochlear nucleus of the gerbil. I. Physiological response properties. *Journal of Neurophysiology*, *87*(5), 2505–2519. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2505>
- Heeringa, A. N., Wu, C., Chung, C., West, M., Martel, D., Liberman, L., Liberman, M. C., & Shore, S. E. (2018). Glutamatergic Projections to the Cochlear Nucleus are Redistributed in Tinnitus. *Neuroscience*, *391*, 91. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.09.008>
- Hensch, T. K. (2004). Critical period regulation. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 27, Issue 1, p. 549–579). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327>
- Hsu, C. L., Zhao, X., Milstein, A. D., & Spruston, N. (2018). Persistent Sodium Current Mediates the Steep Voltage Dependence of Spatial Coding in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Neuron*, *99*(1), 147-162.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.025>
- Iliadou, V., Bamiou, D. E., Sidiras, C., Moschopoulos, N. P., Tsolaki, M., Nimatoudis, I., & Chermak, G. D. (2017). The use of the gaps-in-noise test as an index of the enhanced left temporal cortical thinning associated with the transition between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of the American Academy of Audiology*, *28*(5), 463–471. <https://doi.org/10.3766/jaaa.16075>

- Ison, J. R., O'Connor, K., Bowen, G. P., & Bocirnea, A. (1991). Temporal resolution of gaps in noise by the rat is lost with functional decortication. *Behavioral Neuroscience*, *105*(1), 33–40. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.105.1.33>
- Iwasaki, S., & Takahashi, T. (1998). Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *Journal of Physiology*, *509*(2), 419–423. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.419bn.x>
- Jacobs, R. A., & Hudspeth, A. J. (1990). Ultrastructural correlates of mechano-electrical transduction in hair cells of the bullfrog's internal ear. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *55*, 547–561. <https://doi.org/10.1101/SQB.1990.055.01.053>
- Joshi, I., & Wang, L. Y. (2002). Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem. *Journal of Physiology*, *540*(3), 861–873. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013506>
- Kaltenbach, J. A., Zhang, J., & Finlayson, P. (2005). Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hearing Research*, *206*(1–2), 200–226. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.02.013>
- Kandel, E. R., Koester, J., Mack, S., & Siegelbaum, S. (2021). *Principles of neural science: Vol. 6 ed.*
- Kandler, K., & Herbert, H. (1991). Auditory projections from the cochlear nucleus to pontine and mesencephalic reticular nuclei in the rat. *Brain Research*, *562*(2), 230–242. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90626-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90626-7)
- Kanold, P. O., & Manis, P. B. (1999). Transient potassium currents regulate the discharge patterns of dorsal cochlear nucleus pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, *19*(6), 2195–2208. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02195.1999>
- Keay, K. A., Redgrave, P., & Dean, P. (1988). Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Research Bulletin*, *20*(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(88\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(88)90004-4)
- Khani, A., Lanz, F., Loquet, G., Schaller, K., Michel, C., & Quairiaux, C. (2019). Large-scale networks for auditory sensory gating in the awake mouse. *ENeuro*, *6*(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0207-19.2019>
- Kim, B. J., Kim, J., Park, I. Y., Jung, J. Y., Suh, M. W., & Oh, S. ha. (2018). Effects of transient auditory deprivation during critical periods on the development of

- auditory temporal processing. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, *104*, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.10.045>
- Knipper, M., van Dijk, P., Schulze, H., Mazurek, B., Krauss, P., Scheper, V., Warnecke, A., Schlee, W., Schwabe, K., Singer, W., Braun, C., Delano, P. H., Fallgatter, A. J., Ehlis, A. C., Searchfield, G. D., Munk, M. H. J., Baguley, D. M., & Rüttiger, L. (2020). The neural bases of tinnitus: lessons from deafness and cochlear implants. *Em Journal of Neuroscience* (Vol. 40, Issue 38, p. 7190–7202). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1314-19.2020>
- Kral, A., & Eggermont, J. J. (2007). What's to lose and what's to learn: Development under auditory deprivation, cochlear implants and limits of cortical plasticity. *Em Brain Research Reviews* (Vol. 56, Issue 1, p. 259–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.021>
- Ku, Y., Ahn, J. woo, Kwon, C., Kim, D. Y., Suh, M. W., Park, M. K., Lee, J. H., Oh, S. H., & Kim, H. C. (2017). The gap-prepulse inhibition deficit of the cortical N1-P2 complex in patients with tinnitus: The effect of gap duration. *Hearing Research*, *348*, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.03.003>
- Ku, Y., Kim, D. Y., Kwon, C., Noh, T. S., Park, M. K., Lee, J. H., Oh, S. H., Kim, H. C., & Suh, M. W. (2020). Effect of age on the gap-prepulse inhibition of the cortical N1-P2 complex in humans as a step towards an objective measure of tinnitus. *PLoS ONE*, *15*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241136>
- le Duc, J., Fournier, P., & Hébert, S. (2016). Modulation of prepulse inhibition and startle reflex by emotions: A comparison between young and older adults. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00033>
- Leão, R., Li, S., Doiron, B., & Tzounopoulos, T. (2012). Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, *107*(11), 3008–3019. <https://doi.org/10.1152/jn.00660.2011>
- Leão, R. M., Kushmerick, C., Pinaud, R., Renden, R., Li, G. L., Taschenberger, H., Spirou, G., Levinson, S. R., & von Gersdorff, H. (2005). Presynaptic Na⁺ channels: Locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *Journal of Neuroscience*, *25*(14), 3724–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3983-04.2005>

- Leão, R. M., & von Gersdorff, H. (2002). Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of Held synapse during development by inhibiting glutamate release. *Journal of Neurophysiology*, 87(5), 2297–2306. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2297>
- Leão, R. M., & von Gersdorff, H. (2009a). Synaptic vesicle pool size, release probability and synaptic depression are sensitive to Ca²⁺ buffering capacity in the developing rat calyx of held. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(1), 94–104. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000100014>
- Leão, R. M., & von Gersdorff, H. (2009b). Synaptic vesicle pool size, release probability and synaptic depression are sensitive to Ca²⁺ buffering capacity in the developing rat calyx of held. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(1), 94–104. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000100014>
- Leao, R. N., Berntson, A., Forsythe, I. D., & Walmsley, B. (2004). Reduced low-voltage activated K⁺ conductances and enhanced central excitability in a congenitally deaf (dn/dn) mouse. *Journal of Physiology*, 559(1), 25–33. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.067421>
- Leao, R. N., Sun, H., Svahn, K., Berntson, A., Youssoufian, M., Paolini, A. G., Fyffe, R. E. W., & Walmsley, B. (2006). Topographic organization in the auditory brainstem of juvenile mice is disrupted in congenital deafness. *Journal of Physiology*, 571(3), 563–578. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098780>
- Lee, S. Y., Nam, D. W., Koo, J. W., de Ridder, D., Vanneste, S., & Song, J. J. (2017). No auditory experience, no tinnitus: Lessons from subjects with congenital- and acquired single-sided deafness. *Hearing Research*, 354, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.08.002>
- Lee, Y., López, D. E., Meloni, E. G., & Davis, M. (1996). A primary acoustic startle pathway: Obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *Journal of Neuroscience*, 16(11), 3775–3789. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-11-03775.1996>
- Lemvig, C. K., Jepsen, J. R. M., Fagerlund, B., Pagsberg, A. K., Glenthøj, B. Y., Rydkjær, J., & Oranje, B. (2020). Auditory sensory gating in young adolescents with early-onset psychosis: a comparison with attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*, 45(4), 649–655. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0555-9>

- Li, X., Qiao, Y., Shen, H., Niu, Z., Shang, Y., & Guo, H. (2019). Topological reorganization after partial auditory deprivation—a structural connectivity study in single-sided deafness. *Hearing Research*, 380, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2019.05.010>
- Lingenhöhl, K., & Friauf, E. (1994). Giant neurons in the rat reticular formation: A sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *Journal of Neuroscience*, 14(31), 1176–1194. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01176.1994>
- Lu, J., Cui, Y., Cai, R., Mao, Y., Zhang, J., & Sun, X. (2008). Early auditory deprivation alters expression of NMDA receptor subunit NR1 mRNA in the rat auditory cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 86(6), 1290–1296. <https://doi.org/10.1002/jnr.21577>
- Lunko, O., Isaev, D., Maximyuk, O., Ivanchick, G., Sydorenko, V., Krishtal, O., & Isaeva, E. (2014). Persistent sodium current properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons of young and adult rats. *Neuroscience Letters*, 559, 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.035>
- Lüthi, A., & McCormick, D. A. (1998). H-current: Properties of a neuronal and network pacemaker. In *Neuron* (Vol. 21, Issue 1, p. 9–12). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80509-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80509-7)
- Ma, J. Y., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (1997). Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Neuron*, 19(2), 443–452. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80952-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80952-6)
- Makarov, R., Sintsov, M., Valeeva, G., Starikov, P., Negrov, D., & Khazipov, R. (2021). Bone conducted responses in the neonatal rat auditory cortex. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96188-9>
- Manis, P. B. (1990). Membrane properties and discharge characteristics of guinea pig dorsal cochlear nucleus neurons studied in vitro. *Journal of Neuroscience*, 10(7), 2338–2351. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-07-02338.1990>
- Manzoor, N. F., Gao, Y., Licari, F., & Kaltenbach, J. A. (2013). Comparison and contrast of noise-induced hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus and inferior colliculus. *Hearing Research*, 295, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.04.003>
- Marcotti, W., Géléoc, G. S. G., Lennan, G. W. T., & Kros, C. J. (1999). Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner

- and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 439(1–2), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s004240051134>
- May, B. J. (2000). Role of the dorsal cochlear nucleus in the sound localization behavior of cats. *Hearing Research*, 148(1–2), 74–87. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(00\)00142-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(00)00142-8)
- McArthur, G. M., & Bishop, D. V. M. (2001). Auditory Perceptual Processing in People with Reading and Oral Language Impairments: Current Issues and Recommendations. *Dyslexia*, 7(3), 150–170. <https://doi.org/10.1002/dys.200>
- Meng, X., Mukherjee, D., Kao, J. P. Y., & Kanold, P. O. (2021). Early peripheral activity alters nascent subplate circuits in the auditory cortex. *Science Advances*, 7(7), 9155–9167. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc9155>
- Merabet, L. B., & Pascual-Leone, A. (2010). Neural reorganization following sensory loss: The opportunity of change. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 11, Issue 1, p. 44–52). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn2758>
- Miller, E. A., Kastner, D. B., Grzybowski, M. N., Dwinell, M. R., Geurts, A. M., & Frank, L. M. (2021). Robust and replicable measurement for prepulse inhibition of the acoustic startle response. *Molecular Psychiatry*, 26(6), 1909–1927. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0703-y>
- Milstein, M. L., Musa, H., Balbuena, D. P., Anumonwo, J. M. B., Auerbach, D. S., Furspan, P. B., Hou, L., Hu, B., Schumacher, S. M., Vaidyanathan, R., Martens, J. R., & Jalife, J. (2012). Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1109370109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201109370SI.PDF>
- Miranda, J. A., & Wilczynski, W. (2009). Female reproductive state influences the auditory midbrain response. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 195(4), 341–349. <https://doi.org/10.1007/s00359-008-0410-7>
- Moody, W. J., & Bosma, M. M. (2005). Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiological Reviews*, 85(3), 883–941. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2004>
- Motulsky, H. J., & Brown, R. E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - A new method based on robust nonlinear regression and

- the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 123.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>
- Mowery, T. M., Kotak, V. C., & Sanes, D. H. (2014). Transient Hearing Loss Within a Critical Period Causes Persistent Changes to Cellular Properties in Adult Auditory Cortex. *Cerebral Cortex*, 25(8), 2083–2094.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhu013>
- Nakamura, P. A., & Cramer, K. S. (2011). Formation and maturation of the calyx of Held. Em *Hearing Research* (Vol. 276, Issues 1–2, p. 70–78). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.11.004>
- Nakamura, Y., & Takahashi, T. (2007). Developmental changes in potassium currents at the rat calyx of Held presynaptic terminal. *Journal of Physiology*, 581(3), 1101–1112. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.128702>
- Niven, J. E., & Laughlin, S. B. (2008). Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. Em *Journal of Experimental Biology* (Vol. 211, Issue 11, p. 1792–1804). <https://doi.org/10.1242/jeb.017574>
- Oertel, D., & Young, E. D. (2004a). What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? Em *Trends in Neurosciences* (Vol. 27, Issue 2, p. 104–110). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.12.001>
- Oertel, D., & Young, E. D. (2004b). What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? Em *Trends in Neurosciences* (Vol. 27, Issue 2, p. 104–110). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.12.001>
- O'Leary, T., Williams, A. H., Franci, A., & Marder, E. (2014). Cell types, network homeostasis, and pathological compensation from a biologically plausible ion channel expression model. *Neuron*, 82(4), 809–821.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.04.002>
- Oleskevich, S., & Walmsley, B. (2002). Synaptic transmission in the auditory brainstem of normal and congenitally deaf mice. *Journal of Physiology*, 540(2), 447–455.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013821>
- Parham, K., & Kim, D. O. (1992). Analysis of temporal discharge characteristics of dorsal cochlear nucleus neurons of unanesthetized decerebrate cats. *https://doi.org/10.1152/Jn.1992.67.5.1247*, 67(5), 1247–1263.
<https://doi.org/10.1152/JN.1992.67.5.1247>

- Pellet, J. (1990). Neural organization in the brainstem circuit mediating the primary acoustic head startle: An electrophysiological study in the rat. *Physiology and Behavior*, 48(5), 727–739. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90218-S](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90218-S)
- Pilati, N., Large, C., Forsythe, I. D., & Hamann, M. (2012a). Acoustic over-exposure triggers burst firing in dorsal cochlear nucleus fusiform cells. *Hearing Research*, 283(1–2), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.10.008>
- Pilati, N., Large, C., Forsythe, I. D., & Hamann, M. (2012b). Acoustic over-exposure triggers burst firing in dorsal cochlear nucleus fusiform cells. *Hearing Research*, 283(1–2), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.10.008>
- Polley, D. B., Steinberg, E. E., & Merzenich, M. M. (2006). Perceptual learning directs auditory cortical map reorganization through top-down influences. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4970–4982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3771-05.2006>
- Popescu, M. v., & Polley, D. B. (2010). Monaural Deprivation Disrupts Development of Binaural Selectivity in Auditory Midbrain and Cortex. *Neuron*, 65(5), 718–731. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.02.019>
- Prosser, C. L., & Hunter, W. S. (1936). THE EXTINCTION OF STARTLE RESPONSES AND SPINAL REFLEXES IN THE WHITE RAT. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 117(4), 609–618. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1936.117.4.609>
- Qi, R., Li, M., Ma, Y., & Chen, N. (2015). State-dependent changes in auditory sensory gating in different cortical areas in rats. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126684>
- Qu, Y., Curtis, R., Lawson, D., Gilbride, K., Ge, P., DiStefano, P. S., Silos-Santiago, I., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (2001). Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the β 1, β 2, and β 3 subunits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18(5), 570–580. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1039>
- Rao, R. P. N., & Ballard, D. H. (1999). Predictive coding in the visual cortex: A functional interpretation of some extra-classical receptive-field effects. *Nature Neuroscience*, 2(1), 79–87. <https://doi.org/10.1038/4580>
- Robles, L., & Ruggero, M. A. (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiological Reviews*, 81(3), 1305–1352. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.3.1305>

- Rosing, S. N., Schmidt, J. H., Wedderkopp, N., & Baguley, D. M. (2016). Prevalence of tinnitus and hyperacusis in children and adolescents: A systematic review. *Em BMJ Open* (Vol. 6, Issue 6). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010596>
- Sharma, M., Bist, S. S., & Kumar, S. (2016). Age-related maturation of wave V latency of auditory brainstem response in children. *Journal of Audiology and Otology*, 20(2), 97–101. <https://doi.org/10.7874/jao.2016.20.2.97>
- Shen, Y. (2014). Gap detection and temporal modulation transfer function as behavioral estimates of auditory temporal acuity using band-limited stimuli in young and older adults. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research*, 57(6), 2280–2292. https://doi.org/10.1044/2014_JSLHR-H-13-0276
- Shore, S. E., & Zhou, J. (2006). Somatosensory influence on the cochlear nucleus and beyond. *Hearing Research*, 216–217(1–2), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.01.006>
- Shore, S., Zhou, J., & Koehler, S. (2007). Neural mechanisms underlying somatic tinnitus. *Em Progress in Brain Research* (Vol. 166). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)66010-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)66010-5)
- Singla, S., Dempsey, C., Warren, R., Enikolopov, A. G., & Sawtell, N. B. (2017). A cerebellum-like circuit in the auditory system cancels responses to self-generated sounds. *Nature Neuroscience*, 20(7), 943–950. <https://doi.org/10.1038/nn.4567>
- Sisneros, J. A., & Bass, A. H. (2003). Seasonal plasticity of peripheral auditory frequency sensitivity. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 1049–1058. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-03-01049.2003>
- Snell, K. B. (1997). Age-related changes in temporal gap detection. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 101(4), 2214–2220. <https://doi.org/10.1121/1.418205>
- Sonntag, M., Englitz, B., Kopp-Scheinpflug, C., & RübSamen, R. (2009). Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: An in vivo study in mice. *Journal of Neuroscience*, 29(30), 9510–9520. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1377-09.2009>
- Strazza, P. S., de Siqueira, D. V. F., & Leão, R. M. (2021). ATP-sensitive K⁺ channels control the spontaneous firing of a glycinergic interneuron in the auditory

- brainstem. *Journal of Physiology*, 599(5), 1611–1630.
<https://doi.org/10.1113/JP280233>
- Strouse, A., Ashmead, D. H., Ohde, R. N., & Grantham, D. W. (1998). Temporal processing in the aging auditory system. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 104(4), 2385–2399. <https://doi.org/10.1121/1.423748>
- Sun, W., Manohar, S., Jayaram, A., Kumaraguru, A., Fu, Q., Li, J., & Allman, B. (2011). Early age conductive hearing loss causes audiogenic seizure and hyperacusis behavior. *Hearing Research*, 282(1–2), 178–183.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.08.004>
- Swerdlow, N. R. (2009). Prepulse Inhibition of Startle in Humans and Laboratory Models. Em *Encyclopedia of Neuroscience* (p. 947–955). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01938-0>
- Taschenberger, H., Leão, R. M., Rowland, K. C., Spirou, G. A., & von Gersdorff, H. (2002). Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron*, 36(6), 1127–1143. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01137-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01137-6)
- Taschenberger, H., & von Gersdorff, H. (2000). Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: Developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 9162–9173.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-24-09162.2000>
- Taylor, C. P. (1993). Na⁺ currents that fail to inactivate. *Trends in Neurosciences*, 16(11), 455–460. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90077-Y](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90077-Y)
- Thai-Van, H., Cozma, S., Boutitie, F., Disant, F., Truy, E., & Collet, L. (2007). The pattern of auditory brainstem response wave V maturation in cochlear-implanted children. *Clinical Neurophysiology*, 118(3), 676–689.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.11.010>
- Tripathi, A., Sato, S. S., & Medini, P. (2021). Cortico-cortical connectivity behind acoustic information transfer to mouse orbitofrontal cortex is sensitive to neuromodulation and displays local sensory gating: relevance in disorders with auditory hallucinations? *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, 46(3), E371–E387. <https://doi.org/10.1503/JPN.200131>
- Tzounopoulos, T., Kim, Y., Oertel, D., & Trussell, L. O. (2004). Cell-specific, spike timing-dependent plasticities in the dorsal cochlear nucleus. *Nature Neuroscience*, 7(7), 719–725. <https://doi.org/10.1038/nn1272>

- Vohs, J. L., Chambers, R. A., Krishnan, G. P., O'Donnell, B. F., Hetrick, W. P., Kaiser, S. T., Berg, S., & Morzorati, S. L. (2009). Auditory sensory gating in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Neuropsychobiology*, *60*(1), 12–22. <https://doi.org/10.1159/000234813>
- Weible, A. P., Liu, C., Niell, C. M., & Wehr, M. (2014). Auditory cortex is required for fear potentiation of gap detection. *Journal of Neuroscience*, *34*(46), 15437–15445. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3408-14.2014>
- Weible, A. P., Yavorska, I., & Wehr, M. (2020). A Cortico-Collicular Amplification Mechanism for Gap Detection. *Cerebral Cortex*, *30*(6), 3590–3607. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz328>
- Wess, J. M., Isaiah, A., Watkins, P. v., & Kanold, P. O. (2017). Subplate neurons are the first cortical neurons to respond to sensory stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(47), 12602–12607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710793114>
- Witten, L., Oranje, B., Mørk, A., Steiniger-Brach, B., Glenthøj, B. Y., & Bastlund, J. F. (2014). Auditory sensory processing deficits in sensory gating and mismatch negativity-like responses in the social isolation rat model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, *266*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2014.02.048>
- Wu, C., Stefanescu, R. A., Martel, D. T., & Shore, S. E. (2016). Tinnitus: Maladaptive auditory-somatosensory plasticity. In *Hearing Research* (Vol. 334, p. 20–29). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.06.005>
- Xiong, B., Alkharabsheh, A., Manohar, S., Chen, G. di, Yu, N., Zhao, X., Salvi, R., & Sun, W. (2017). Hyperexcitability of Inferior Colliculus and Acoustic Startle Reflex with Age-Related Hearing Loss. *Hearing Research*, *350*, 32. <https://doi.org/10.1016/J.HEARES.2017.03.011>
- Yeomans, J. S., & Frankland, P. W. (1995). The acoustic startle reflex: neurons and connections. In *Brain Research Reviews* (Vol. 21, Issue 3, p. 301–314). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(96\)00004-5](https://doi.org/10.1016/0165-0173(96)00004-5)
- Young, E. D., & Davis, K. A. (2002). *Circuitry and Function of the Dorsal Cochlear Nucleus* (Vol. 21205, Issue 410, p. 160–206). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3654-0_5
- Zhang, L. I., Bao, S., & Merzenich, M. M. (2002). Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 99(4), 2309–2314.
<https://doi.org/10.1073/pnas.261707398>

- Zhang, S., & Oertel, D. (1994). Neuronal circuits associated with the output of the dorsal cochlear nucleus through fusiform cells. *Journal of Neurophysiology*, 71(3), 914–930. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.3.914>
- Zhou, Z. J., & Fain, G. L. (1996). Starburst amacrine cells change from spiking to nonspiking neurons during retinal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8057–8062. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8057>
- Zhuang, X., Sun, W., & Xu-Friedman, M. A. (2017a). Changes in properties of auditory nerve synapses following conductive hearing loss. *Journal of Neuroscience*, 37(2), 323–332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0523-16.2016>
- Zhuang, X., Sun, W., & Xu-Friedman, M. A. (2017b). Changes in properties of auditory nerve synapses following conductive hearing loss. *Journal of Neuroscience*, 37(2), 323–332. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0523-16.2016>
- Zugaib, J., Ceballos, C. C., & Leão, R. M. (2016). High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Hearing Research*, 332, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.10.008>

**ANEXO A – ARTIGO RELACIONADO À
TESE**

Development of spontaneous firing of fusiform neurons from the dorsal cochlear nucleus of mice occurs after hearing onset.

Nikollas M. Benites¹, Beatriz Rodrigues¹, Carlos H. Silveira², Ricardo M. Leão¹

1 - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto SP, Brazil.

2 - Institute of Technological Sciences, Federal University of Itajubá, Itabira MG, Brazil.

Abstract

The dorsal cochlear nucleus (DCN) in the auditory brainstem integrates auditory and somatosensory information. Mature fusiform neurons express two qualitative intrinsic states in equal proportions: quiet, with no spontaneous regular action potential firing, or active, with regular spontaneous action potential firing. However, how these firing states and other electrophysiological properties of fusiform neurons develop during early postnatal days to adulthood is not known. Thus, we recorded fusiform neurons from mice from P4 to P21 and analyzed their electrophysiological properties. In the pre-hearing phase (P4-P13), we found that fusiform neurons are mostly quiet, with the active state emerging after hearing onset at P14. Subthreshold properties present more variations before hearing onset, while action potential properties vary more after P14, developing bigger, shorter, and faster action potentials. Interestingly, the activity threshold is more depolarized in pre-hearing cells suggesting that persistent sodium current (I_{NaP}) increases its expression after hearing. In fact, I_{NaP} increases its expression after hearing, accordingly with the development of active neurons. Thus, we suggest that the post-hearing expression of I_{NaP} creates the active state of the fusiform neuron. At the same time, other changes refine the passive membrane properties and increase the speed of action potential firing of fusiform neurons.

Introduction

The electrophysiological activity of mature neurons in the central nervous system is different from that displayed during development. The biophysical properties of the ionic currents of neurons undergo constant change during the period of neuronal development. Consequently, the behavior of individual neurons and the networks in which they are part is different from behavior seen in the adult state. The biophysical properties of these currents, such as voltage dependence, kinetics, and the subunits that make up the ion channel, can change during development (Moody & Bosma, 2005). However, the complex mechanisms by which the different biophysical properties of subliminal currents establish the different neuronal phenotypes are not fully understood. For example, several neurons fire spontaneously during the embryonic and postnatal period, and this spontaneous activity disappears in adulthood (Moody & Bosma, 2005). Transient expression of ionic currents during development that disappears later in adulthood is also common, e.g., sodium and potassium currents disappear in adult retinal and cochlear neurons (Zhou & Fain, 1996); Marcotti *et al.*, 1999).

The rodent auditory brainstem neurons undergo several physiological and morphological changes in the postnatal period culminating around the 12th-14th postnatal day when the ear canal opens, and the animal begins to hear. Several experiments in the Medial Nucleus of the Trapezoid Body (MNTB) showed that this region undergoes several alterations during the pre-hearing period. For example, pre-synaptic action potentials become shorter during development, as do pre-synaptic sodium currents (Taschenberger & Von Gersdorff, 2000; Leão *et al.*, 2005*b*), and the calyceal terminals progressively increase their ability to trigger action potentials at high frequency without failing, a consequence of a faster recovery from the inactivation of these channels (Taschenberger & Von Gersdorff, 2000; Leão *et al.*, 2005*b*). The synaptic also vesicles become more coupled to calcium channels, increasing their likelihood of exocytosis (Taschenberger *et al.*, 2002; Leão & von Gersdorff, 2009). These alterations, among others, occur before the opening of the auditory canal at P12, suggesting that they are pre-programmed alterations and not triggered by sensory experience. However, sensory hearing deprivation is known to cause subtle but

essential changes in excitability and neurotransmission in the MNTB and bushy cells in the anteroventral cochlear nucleus (Leao *et al.*, 2004, 2006; Leão *et al.*, 2005b; Grande *et al.*, 2014; Clarkson *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2017). Thus, it seems that, at least in these synapses, most of the alterations originate from genetic programming. However, sensory-dependent post-hearing changes occur that are relevant for the fine-tuning of the auditory processing.

The dorsal cochlear nucleus (DCN) is part of the cochlear nuclei that are the first central station of the auditory pathway and integrates acoustic information with multimodal sensory signals that come from the most diverse areas of the brain (Fujino & Oertel, 2003; Oertel & Young, 2004; Pilati *et al.*, 2012a) and its neural pathways assume to detect spectral cues for localizing sounds (May, 2000; Young & Davis, 2002; Oertel & Young, 2004) as well to filter out self-generated noise (Shore & Zhou, 2006; Singla *et al.*, 2017). The fusiform (or principal) neuron of the DCN integrates the afferent synaptic inputs to the DCN, projecting axons to the inferior colliculus (Cant & Benson, 2003). The fusiform neurons exhibit a regular firing pattern when stimulated with a constant depolarizing current (Pilati *et al.*, 2012b). Furthermore, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that fusiform neurons exist in one of two qualitatively different intrinsic states: a quiet state, where the membrane potential remains close to a stable resting membrane potential (RMP), or a spontaneously active state, where action potentials are spontaneously fired (Leao *et al.*, 2012). Close to 50% of fusiform present spontaneous (active neurons) firing, while the other 50% do not fire spontaneous (quiet neurons) (Pilati *et al.*, 2012b; Leao *et al.*, 2012; Zugaib *et al.*, 2016).

The active firing state is created by the expression of a persistent sodium current (I_{NaP}) that lowers the threshold for action potential firing and an inward-rectifying potassium current that sets the membrane potential above or below the threshold set for I_{NaP} (Leao *et al.*, 2012; Ceballos *et al.*, 2016). These two states increase the dynamic range of fusiform neurons allowing these neurons to decrease firing in response to acoustic stimulation (Young & Davis, 2002). However, the development of this heterogeneity is unknown. Here we aim to study the development of the intrinsic electrophysiological properties of fusiform neurons of the DCN from the pre-hearing period to the post-hearing period. We

found that the active state develops after hearing onset in parallel with the expression of I_{NaP} . We hypothesized that the expression of I_{NaP} is regulated by hearing and creates the firing diversity seen in these neurons

Materials and Methods

Animals. We used Swiss mice of both sexes from postnatal days 4 to 21 (P4-21). On most occasions, pregnant females were monitored each day to check the day of birth of the pups. Animals were kept in a 12/12 hours dark/light cycle with food and water *ad libitum*. The ethics committee animal experimentation of the University of São Paulo approved all procedures (CEUA. Protocol 133/2018).

Auditory brainstem response (ABR) - For recording ABRs, we used an RZ6 multi-processor (Tucker Davis Technology, USA) connected to a speaker (Multi-Field Magnetic Speaker, Tucker Davis Technology), which were previously calibrated in the open field configuration. Animals were anesthetized with ketamine-xylazine (60mg/kg and 10mg/kg, respectively, i.p.) after a sedative dose of isoflurane. The animals were laid on a non-electrical heating pad inside an electrically and acoustically isolated chamber. Three platinum needle electrodes (impedance ~ 1 k Ω) were placed in the head of the animals in the following way: a reference electrode, below the pina ipsilateral to the stimulus; a ground electrode, placed at the contralateral pina; and a recording electrode at the head vertex. Electrodes were connected to a RA4PA medusa preamplifier (Tucker Davis Technology, USA) and connected to the RZ6 multi-processor system via an optic fiber. Data were acquired with the BioSigRZ software (25 kHz of the sampling rate). A 0.1 ms, single-channel mono-phasic click protocol was presented at a rate of 21/s from 90 to 20 dB SQL in 10 dB steps. The software averaged 512 neural responses to each stimulus presentation with a gain set at 20 dB. Data were filtered from 0.3 to 3 kHz and stored for offline analysis. The threshold was considered as the lowest intensity level where sound stimulus-evoked any wave peak could be recognized.

Brainstem slice preparation. Mice were anesthetized with isoflurane and decapitated. The brainstems were being removed after cutting the vestibulocochlear nerve. The brainstems were dipped in melted agarose (2,5%) at 38°C, and the temperature was quickly reduced with a metal block to solidify

the agarose. The piece was mounted in a compresstome (VF300-0Z, Precisionary Instruments, USA), and coronal brain slices containing the dorsal cochlear nucleus, DCN, (200 μm thick) were cut, in an ice-cold solution containing (in mM) 87 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 0.2 CaCl_2 , 7 MgCl_2 , 25 dextrose, and 75 sucrose, pH 7.4 when oxygenated with 95% O_2 /5% CO_2 . After, the slices were incubated in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for 35 minutes at 35°C and then at room temperature (25°C) for electrophysiological experiments. The aCSF containing (in mM) 120 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , and 10 dextrose, pH 7.4 when oxygenated with 95% O_2 /5% CO_2 (osmolality 310 mOsmol/kg H_2O).

Electrophysiology – The DCN and fusiform cells were localized under oblique illumination with a microscope (BX51W, Olympus, Japan). Recordings were obtained with borosilicate microelectrodes (BF150-86-10, Sutter Instrument Company, USA) with resistance between 2 and 4 $\text{M}\Omega$ when filled with internal solution (in mM) 130 K-gluconate, 20 KCl, 10 Na_2 -phosphocreatine, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 2 Mg-ATP, and 0.2 Na-GTP, pH 7.4 adjusted with KOH, with a final osmolality of 295 mOsmol/kg H_2O . Fusiform cells were identified by their location at the principal layer in the DCN and biophysical characteristics (Tzonopoulos et al., 2003). Whole-cell patch-clamp recordings were performed using an EPC-10 patch-clamp amplifier (Heka Electronics, Germany) under continuously aCSF perfusion ($\sim 1\text{mL}/\text{min}$) and temperature (31-34°C) controlled using an in-line heater (Warner Instruments). Whole-cell recordings started after at least 5 minutes after attaining whole-cell configurations. Series resistance was monitored constantly during the recordings, and neurons with $>20\text{ M}\Omega$ were discarded. Series resistance compensation was compensated between 50 and 80%

Recordings were performed in the presence of strychnine (2 μM), picrotoxin (100 μM), and DNQX (10 μM). Quiet neurons were neurons with no action potential firing at rest, or sparse, the unregular firing of less than 1 Hz (Leão et al., 2011). Resting membrane potential was measured in the presence of tetrodotoxin (TTX; Alomone Labs, Israel) (0.5 μM). Voltage-current relationships were performed by injecting 1s current pulses with 50 pA steps from -200 pA. In

active neurons, DC negative current (-20 pA to -200 pA) was injected to stop the action potentials firing.

Voltage-clamp recordings were performed at a holding potential of -65 mV with voltage membrane from -105 mV to -55mV in 10mV steps. Data were acquired using the PATCHMASTER (Heka) at a 50 kHz rate and filtered at a low-pass filter (3 kHz, Bessel).

Data analysis. All recordings were corrected offline by subtracting a measured liquid junction potential of -10mV. Data were analyzed using routines written in Igor Pro (Wavemetrics, Portland, USA). We measure the RMP using the modal voltage determined by an all-points histogram from a stretch of 52 seconds. Input resistance was measured by analyzing the slope of the VI relationship at steady-state (last 100 ms) and at the peak of the hyperpolarization. The membrane time constant was obtained fitting a single exponential function on the hyperpolarizing decay during a -50 pA pulse. The depolarization sag was calculated as the difference between the peak and the steady-state hyperpolarization produced by a -200 pA current. Rheobase is defined as minimal current necessary for firing an action potential from the rest or in active neurons from a potential close to -70 mV. The activity threshold was calculated as in Leão et al. (2011) as the mean membrane potential at the current step right before the start of spontaneous action potential firing.

Action potential parameters were measured using a phase plane plot (dV/dt vs. V) from the first action potential at rheobase. The threshold was considered the potential in the phase plane, at which the slope reached $10 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Action potential amplitude was calculated as the difference between the threshold and the action potential peak calculated in the phase plane plot as the more depolarized point of 0 V/s. The maximum rate of rise (ROR) was calculated as the peak value in the phase plane plot.

Half-width was the action potential duration at half of the amplitude, and the latency was the time between the start of the stimulus and the threshold of the first action potential at rheobase. Fast afterhyperpolarization (fAHP) was the difference between the threshold and the more hyperpolarized potential after action potential repolarization.

Data are presented as the mean \pm SEM. We compared the differences in means using Student t-tests, one-way analysis of variance (ANOVA) with a Fischer's post-test, correlation, and linear regression performed in GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, USA) with a significance level set at $p < 0.05$. The principal component analysis was performed using a routine written in R.

Results

The proportion of active neurons increases after hearing onset – Rodents start to hear after 9 to 14 days after birth (Alford & Ruben, 1963; Hack, 1968; Ehret, 1976; Sonntag *et al.*, 2009). In order to establish the precise hearing onset of our mice, we examined mice from P12 to P14 in litters we knew the exact day of birth of the pups. We observed that before P14, mice did not respond with a startle in response to a clap or whistle. Additionally, we detected the opening of the ear canal at P14. ABR recordings in response to clicks (Figure 1A) showed that mice at P12 did not respond to clicks up to 90 dB, while at P13, we observed some response of the wave I near 50 dB (50 ± 18.37 dB; $n=4$). At P14 the waves were more evident and at lower thresholds (Figure 1A), which decreased even further at P18 and P21 (P14: 28.7 ± 1.1 dB; P18: 23.2 ± 1.2 dB; P21 23.8 ± 1 dB; $n = 19, 19$ and 13 respectively. $p = 0.001$, one-way ANOVA; Figure 1B). We then assumed a hearing onset at P14 in our animals.

We performed whole-cell patch-clamp recordings in fusiform neurons from mice across 4 to 21 postnatal days (P4-P21). Neurons from 4-13 days old animals were classified as pre-hearing and animals P14 and above as post-hearing. We found that quiet fusiform neurons were predominant in pre-hearing animals (95.92%, 47 out of 49 cells), and the proportion of active and quiet fusiform neurons is similar after hearing onset (quiet: 51.52%, 16 out of 33 neurons; active 48.48%, 17 out of 33 neurons) as previously reported (Leao *et al.*, 2012; Zugaib *et al.*, 2016). We found that fusiform neurons were all quiet until P11, with some active neurons detected at P12 and P13. After P14, the proportion of active neurons gradually increased, reaching a peak at P19 (Figure 1C). We conclude that the active state of the fusiform neuron is characteristic of the post-hearing phase.

A fundamental difference of active and quiet neurons was a more depolarized resting membrane potential (RMP) of active neurons, which were the main factor responsible for the existence of the two firing modes of fusiform neurons (Leao *et al.*, 2012). We confirmed this observation in our mice when we measured the RMP of active and quiet neurons in the presence of TTX, being the active neurons more depolarized than the quiet neurons (quiet: -67.1 ± 1 mV; active: -62.0 ± 2 mV, $n = 23$ and 7 respectively; $p = 0.02$ unpaired t-test. Figure 1D). The RMP of quiet neurons was not different from pre or post-hearing mice (pre-hearing: -67.2 ± 1.2 mV; post-hearing: -66.7 ± 1.9 mV; $n = 15$ and 8 respectively; $p = 0.8$ unpaired t-test). We confirmed then that active fusiform neurons from our mice have more depolarized RMP than quiet neurons.

Pre-hearing quiet neurons are less excitable than post-hearing neurons – We then compared the action potential firing of pre-hearing and post-hearing neurons. Pre-hearing neurons fire fewer action potentials in response to depolarization currents than active or post-hearing quiet neurons (Figure 2Bi). In response to a 250 pA current pre-hearing quiet neurons fired 41 ± 10 action potentials, while post-hearing active neurons fired 71 ± 26 action potentials and active neurons fired 62 ± 15 action potentials (one-way ANOVA: $p=0.010$, pre- vs. post-quiet: $p=0.008$; pre-quiet vs. active: $p=0.04$; post-quiet vs. active: $p=0.48$; Table 1).

Pre-hearing quiet neurons also need more current to start firing action potentials, as seen by their bigger rheobases (pre-quiet 117 ± 22.94 pA; post-quiet 67.65 ± 18.05 pA; active 55.56 ± 8.05 pA; Figure 3Ci, Table 1). The bigger rheobase could reflect differences in the voltage where the fusiform neuron starts firing spontaneously, the activity threshold (Leao *et al.*, 2012). In fact, pre-hearing quiet neurons had bigger activity thresholds (-67.81 ± 1.63 mV) than post-hearing quiet (-62.25 ± 3.29 mV) and active neurons (-66.20 ± 1.86 mV). In addition, post-hearing quiet neurons also presented a more depolarized activity threshold (one-way ANOVA: $p<0.0001$; pre- vs. post-quiet $p=0.0009$; pre-quiet vs. active $p<0.0001$; post-quiet vs. active $p=0.03$; Figure 2Di, Table 1). We also found a negative correlation between the activity threshold and postnatal days (Pearson $r = -60.66$, Table 2; Figure 2Dii). The difference of the RMP and activity threshold was more negative in pre-hearing neurons (mean diff -10.13 ± 3.08 , $p<0.0001$,

n=15) than in quiet hearing neurons (mean diff -2.62 ± 3.27 , $p=0.14$, $n = 8$) and active neurons (mean diff 6.08 ± 5.5 , $p=0.03$, $n=7$) reflecting the more hyperpolarized RMP and more depolarized activity threshold of pre-hearing quiet fusiform neurons (Figure 2E).

Subthreshold membrane properties of fusiform neurons change during development – Subthreshold properties of neurons affect their response at rest to synaptic inputs and intrinsic conductances that lead to action potential firing. We compared hyperpolarizing VI relationships of pre-hearing and post-hearing fusiform neurons. Measured at the steady-state, the VI relationships were similar in pre-hearing and post-hearing neurons, showing a small rectification below -80 mV (Figure 3Bv). Membrane input resistance was similar in all groups (pre-quiet 94.70 ± 12.79 M Ω ; post-quiet 94.46 ± 13.6 M Ω ; active 104.1 ± 30.8 M Ω ; one-way ANOVA: $p=0.49$; pre- vs. post-quiet vs. active: $p=0.98$ and 0.46 ; post-quiet vs. active: $p=0.53$; Figure 3Bi, Table 1) and no significant correlation was observed with age (Pearson $r = -0.21$, Figure 3Bi', Table 2). However, the VI relationships measured at the peak hyperpolarization showed that pre-hearing neurons did not present a rectification of the response at more hyperpolarizing potentials (Figure 3Bv') and a bigger immediate membrane input resistance (pre-quiet 205.3 ± 20.6 M Ω ; post-quiet 139.8 ± 23.7 M Ω ; active 143.6 ± 30.76 ; one-way ANOVA: $p=0.003$; pre- vs. post-quiet vs. active: $p=0.008$ and 0.01 ; post-quiet vs. active: $p=0.89$, Figure 3Bii, Table 1), and a negative correlation with age (Pearson $r = -0.77$, Figure 3Bii', Table 2). Interestingly, the membrane time constant measured near -70 mV did not show a difference between the groups (pre-quiet 21.63 ± 2.75 ms; post-quiet 24.09 ± 7.5 ms; active 25.98 ± 6.6 , Figure 3Biii, Table 1), possibly because at this potential, the membrane resistance of all groups is similar as can be seen in Figure 3Bii.

The differences between the input resistance measured at the peak and steady-state suggest that the pre-hearing neurons have a more prominent depolarization sag of the membrane produced by the activation of HCN channels (Ceballos *et al.*, 2016). In fact pre-hearing neurons present a more robust depolarization sag than post-hearing neurons (pre-quiet 18.59 ± 3.73 mV; post-quiet 7.55 ± 2.28 mV; active 7.7 ± 1.34 mV; one-way ANOVA: $p<0.0001$; pre- vs. post-quiet vs. active: $p=0.0002$; post-quiet vs. active: $p=0.96$; Figure 3Biv, Table

1) and the sag correlates negatively with age (Pearson $r = -0.86$; Figure 3Biv', Table 2). We conclude that changes in the subthreshold membrane conductances during development can contribute to the establishment of quiet and active mature neurons after hearing.

Action potentials turn progressively faster and bigger during development

– We then compared the action potentials of fusiform neurons during the pre- and post-hearing phases. Figure 4Ai show a comparison of representative action potentials from pre-hearing quiet, post-hearing quiet and active neurons, where we can observe that pre-hearing neurons are smaller and slower. Accordingly, the amplitude was smaller in pre-hearing neurons (pre-quiet 76.47 ± 4.02 mV; post-quiet 90.63 ± 5.13 mV; active 96.96 ± 5.19 mV; one-way ANOVA: $p < 0.0001$; pre- vs. post-quiet: $p = 0.0001$; pre-quiet vs. active: $p < 0.0001$; post-quiet vs. active: $p = 0.135$; Figure 4Aii, Table 1), the half-widths were longer (pre-quiet 0.42 ± 0.067 ms; post quiet 0.21 ± 0.06 ms; active 0.19 ± 0.02 ms; one-way ANOVA: $p < 0.0001$; pre- vs. post-quiet $p = 0.0002$; pre-quiet vs. active $p < 0.0001$; post-quiet vs. active $p = 0.72$; Figure 4Aiii, Table 1) and the maximum ROR was slower (pre-quiet 570.3 ± 75 V.s⁻¹; post-quiet 952.8 ± 90.9 V.s⁻¹; active 1036 ± 129.1 V.s⁻¹; one-way ANOVA: $p < 0.0001$; pre- vs. post-quiet, and vs. active $p < 0.0001$; post-quiet vs. active $p = 0.31$; Figure 4Biii, Table 1). Both amplitude and maximum ROR also correlated positively with post-natal days (Pearson $r = 0.88$, and 0.92 , respectively, Table 2).

The latency of the first action potential is longer in pre-hearing quiet neurons (pre-quiet 0.218 ± 0.08 s; post-quiet 0.055 ± 0.02 s; active 0.043 ± 0.01 s; one-way ANOVA: $p = 0.002$; pre- vs post-quiet $p = 0.007$; pre-quiet vs. active $p = 0.003$; post-quiet vs. active $p = 0.86$; Figure 4Bi, Table 1). Additionally, action potential thresholds are slightly more hyperpolarized in active neurons (pre-quiet -42.65 ± 1.22 mV; post-quiet -43.88 ± 1.99 mV; active -45.76 ± 1.86 mV; one-way ANOVA: $p = 0.02$; pre- vs. post-quiet $p = 0.28$; pre-quiet vs. active $p = 0.006$; post-quiet vs. active $p = 0.17$; Figure 4Bii, Table 1). We also found a smaller fAHP in quiet pre-hearing neurons (pre-quiet 19.62 ± 1.93 mV; post-quiet 25.00 ± 2.76 mV; active 26.88 ± 2.44 mV; one-way ANOVA: $p < 0.0001$; pre- vs. post-quiet $p = 0.002$; pre-quiet vs. active $p < 0.0001$; post-quiet vs. active $p = 0.36$, Figure 4Biv, Table 1) and a positive correlation of this parameter with age (Pearson $r = 0.52$,

Table 2). We conclude that there is a refinement of the action potentials during development to the post-hearing period.

Principal component analysis (PCA) shows distinct patterns of parameter variations before and after hearing – We performed a PCA of the electrophysiological parameters of the fusiform neurons across the development. We found that most of the variation (~72%) is contained in the first three components (Figure 5A), with 95% explained in 8 components. Looking at the variation of the different parameters in all components, we can see that most parameters present variations in the first two components, while some others like membrane time constant, action potential threshold, and fAHP in the other four components (Figure 5B)

PCA of the first two components shows that most parameter variation occurs during the pre-hearing phase (Figure 5C). The subthreshold parameters Rin_{input} (instantly and on the steady-state) and depolarization sag varied in parallel and opposite the near-threshold parameters AP threshold, activity threshold, latency, and rheobase, in the pre-hearing phase. In the post-hearing phase, we observed an almost parallel correlation of the variation of the AP-related parameters amplitude and ROR.

Comparing the PCAs of pre-hearing and post-hearing only, we can identify that several parameters change parallelly in the pre-hearing phase and not after hearing (Figure 6, top). Notably, while immediate and steady-state input resistance showed strong co-variation in the pre-hearing phase, they did not vary enormously in the post-hearing period. Latency and activity thresholds vary in parallel during the pre-hearing phase and in opposite directions in the post-hearing phase. Moreover, fAHP that did not show any significant variation in the two components in the pre-hearing phase presented a substantial variation along ROR in the post-hearing phase. These and other differences show that these parameters evolve differentially in the pre-hearing and post-hearing fusiform neurons.

We then analyze the correlations of the variation of the parameters (Figure 6, bottom). We found stronger correlations in the pre-hearing phase than in the post-hearing phase. We found a stronger negative correlation of AP half-width with ROR and amplitude in the pre-hearing phase than in post-hearing phases.

However, AP amplitude showed a strong positive correlation between both phases. Activity threshold showed a strong positive correlation with rheobase in both phases and moderate correlation with the threshold. As expected, immediate input resistance showed a strong positive correlation with steady-state input resistance in both phases but a strong negative correlation with the sag and a moderate positive correlation with rheobase and activity threshold only in the pre-hearing phase.

The persistent sodium current develops during the post-hearing period and creates the active and quiet states – We found that active fusiform neurons appear majorly two days after hearing onset. Our previous works have shown that the active state depends on the sodium persistent current (I_{NaP}) expression (Leao *et al.*, 2012; Ceballos *et al.*, 2016). The I_{NaP} is responsible for creating the activity threshold that initiates action potential firing in potential below the AP threshold (Leao *et al.*, 2012). Correlation of activity threshold and postnatal days showed a significant negative correlation with age and a strong hyperpolarization of the activity threshold after P14 (Figure 2D). IV relationships of pre-hearing quiet neurons show that pre-hearing neurons have almost no inward deflection above -60 mV, produced by the development of I_{NaP} (Leao *et al.*, 2012; Strazza *et al.*, 2021) (Figure 7Bi). The current at -55 mV is significantly bigger in pre-hearing neurons than in post-hearing quiet and active neurons (pre-quiet 106.33 ± 29.29 pA; post-quiet 39.99 ± 46.31 pA; active -85.35 ± 62.25 pA; one-way ANOVA: $p < 0.0001$; pre- vs. post-quiet vs. active: $p = 0.028$ and < 0.0001 ; post-quiet vs. active: $p = 0.0006$; Figure 7Bii, Table 1). Thus, we hypothesized that I_{NaP} increases its expression after hearing, allowing the separation of active and quiet neurons. We then measured I_{NaP} in voltage-clamp as the persistent inward current sensitive to TTX. We found that I_{NaP} is significantly smaller in pre-hearing quiet neurons than in active neurons and post-hearing quiet neurons but there is no differences between post-hearing quiet and active neurons (pre-quiet -26.16 ± 15.28 pA; post-quiet -86.86 ± 29.24 pA; active -161.4 ± 96 pA; one-way ANOVA: $p = 0.0009$; pre- vs. quiet vs. active: $p = 0.09$ and 0.0002 ; post-quiet vs. active: $p = 0.06$; Figure 7Biv, Table 1). We then conclude that I_{NaP} increases its expression after hearing, creating fusiform neurons' quiet and active firing modes.

Discussion

Several morphological and electrophysiological changes occur during the pre-hearing postnatal development of auditory brainstem neurons to prepare the auditory pathways for the onset of hearing around P12-14. The medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) and its specialized terminal from the globular bushy cells from the aVCN, the calyx of Held, has been extensively studied during the pre-hearing to post-hearing periods of development and has been the source of most of the knowledge about the maturation of the brainstem auditory neurons. Most of these studies about the postnatal development of the electrophysiological and synaptic properties of MNTB principal neurons and the calyx of Held showed that the most changes occur before and near hearing onset (Iwasaki & Takahashi, 1998; Taschenberger & Von Gersdorff, 2000; Taschenberger *et al.*, 2002; Joshi & Wang, 2002; Leão & Von Gersdorff, 2002; Oleskevich & Walmsley, 2002; Awatramani *et al.*, 2005; Youssoufian *et al.*, 2005; Leão *et al.*, 2005a; Nakamura & Takahashi, 2007; Leão & von Gersdorff, 2009; Nakamura & Cramer, 2011). On the other hand, some hearing-dependent changes are observed but, preventing these changes with sound deprivation do not significantly impact the firing and neurotransmission in the MNTB and calyx of Held (Leão *et al.*, 2006; Grande *et al.*, 2014). Thus, it is accepted that the postnatal development of auditory brainstem neurons is concentrated most in the pre-hearing period and is not significantly affected by the acoustic experience. However, it is known that there is a critical period in humans and rodents around hearing onset that is crucial for full maturation of the auditory system function (De Villers-Sidani *et al.*, 2007; Thai-Van *et al.*, 2007; Popescu & Polley, 2010; Sun *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2016; Zhuang *et al.*, 2017; Knipper *et al.*, 2020).

Here we studied the development of the electrophysiological properties of the fusiform neurons of the DCN, the primary output neuron of this nucleus, during the pre-hearing and post-hearing periods. Because hyperactivity of fusiform neurons is associated with the development of tinnitus in animal models (Brozoski *et al.*, 2002; Kaltenbach *et al.*, 2005; Shore *et al.*, 2007; Manzoor *et al.*, 2013) and tinnitus depends on the establishment of hearing, we believe that changes happening after hearing onset could be relevant for the susceptibility of the DCN to changes in auditory input leading to tinnitus. Tinnitus is a common

consequence of deafness, but its development depends on hearing since it is rarely seen in congenitally deaf people (Eggermont & Kral, 2016; Rosing *et al.*, 2016). Our more striking finding is that the development of the active state of the fusiform neuron, where it fires action potentials spontaneously (Leao *et al.*, 2012), develops after hearing onset. We determined hearing onset at P14 in our animals with ABRs tests and observing the startle to a hand clap and the ear canal opening in pups from litters who knew the exact day of birth. Interestingly, we found that the wave I of the ABR appeared at high thresholds at P13, even though the animal did not react to clapping the hands and had the ear canal sealed. Thus, some acoustic perception could be possible at this age but only to loud sounds, and in a very degraded form, due to the lack of the other downstream waves. The threshold decreased more after 14 with an increased definition of the other waves, suggesting an ongoing maturation of the animal's hearing. Therefore, the establishment of hearing is not abrupt and improves after opening the ear canal. We found that few active fusiform neurons were detected in the DCN from animals at P12 and P13 (one on each age). The frequency of active neurons increased progressively after hearing onset, peaking 2 to 3 days later. This is strong evidence that the establishment of active fusiform neurons depends on auditory input, and that the active fusiform neuron is important for the computation performed on the DCN and could be relevant for the development of tinnitus.

What is the conductance (or a mix of conductances) in control of the emergence of the post-hearing active neurons? We found that pre-hearing neurons have an activity threshold more depolarized, which can reflect a small expression of the persistent sodium current (I_{NaP}), which has been shown to lower the threshold for action potential spontaneous firing and is responsible for the existence of the active state (Leão *et al.*, 2012). I_{NaP} is a non-inactivating state of the sodium channels, with a more negative activation than the classic fast inactivating current and is expressed in neurons from many areas of the central nervous system as the hippocampus, thalamus, cerebellum, neocortex, entorhinal cortex, and brainstem regions like cochlear nucleus (Alzheimer *et al.*, 1993; Taylor, 1993; Crill, 1996; Ma *et al.*, 1997; Ceballos *et al.*, 2017a, 2017b; Hsu *et al.*, 2018). Our data suggested that the I_{NaP} expression in the fusiform

neuron increased after hearing. Another study found similar results in hippocampal CA1 neurons (Lunko *et al.*, 2014). In this study, the I_{NaP} density in neurons from young rats (P12-16) was smaller than in adult rats (P60-75). Also, in mesencephalic trigeminal neurons, there is an increase in I_{NaP} density from P0-6 to P14-17 (Enomoto *et al.*, 2018). The expression of the I_{NaP} is related to the expression of auxiliary beta subunits (Qu *et al.*, 2001; Aman *et al.*, 2009; Bant & Raman, 2010), and the expression of these subunits may be increased in fusiform neurons after hearing. Because the presence of I_{NaP} is essential for lowering the threshold for spontaneous action potential firing (Leão *et al.*, 2012), the post-hearing emergence of I_{NaP} is most likely related to the development of the active state of the fusiform neurons.

Besides the emergence of the I_{NaP} , post-hearing neurons presented faster, shorter, and more considerable action potentials, reflected by their more significant amplitudes, shorter half widths, and faster ROR. Additionally, we observed a significant fast afterhyperpolarization (fAHP) in post-hearing neurons. The variation in the amplitude and ROR were more critical in the post-hearing neurons, as detected by the PCA. However, the correlation of the parameters showed a continuous change during development. Additionally, we found that post-hearing neurons fired more action potentials than pre-hearing neurons when depolarized and had lower action potential thresholds. These changes could be related to changes in voltage-dependent sodium and potassium channels expression. The voltage-gated potassium channel type 3 (K_{v3}) is found in different mammalian and avian auditory nuclei areas and mediates the action potential repolarization and modulates fast-spiking neurons. Blockade of K_{v3} channels slows the firing rate of these neurons (Parameshwaran *et al.*, 2001; Chambers *et al.*, 2017; El-Hassar *et al.*, 2019; Choudhury *et al.*, 2020). Thus modulation of the expression of this class of channels can be related to the shorter action potentials and increased firing of fusiform neurons after hearing.

On the other hand, the bigger amplitude and maximum rate of rise of post-hearing neurons could be related to an increase in the density of voltage-gated sodium channels in the initial axon segment. The fAHP is usually related to calcium-activated potassium channels (K_{Ca}) (Louise Faber & Sah, 2003; Adelman

et al., 2012). An increase in fAHP could be correlated with changes in the expression of these channels or with calcium channel coupling with K_{Ca} channels.

Interestingly, subthreshold parameters present more considerable changes before hearing onset. While immediate input resistance was statistically different in pre-hearing neurons, the membrane resistance measured in the steady-state hyperpolarization was not different, in accordance with the more prominent depolarization sag in the pre-hearing neurons. The sag reflects the activation of the h current by opening the HCN channels in hyperpolarized potentials. These channels have been shown to equalize input resistance in quiet and active fusiform neurons (Ceballos *et al.*, 2016) and are probably more prominent in pre-hearing neurons. Interestingly more variation of the immediate input resistance and sag are seen before p10, suggesting that the refinement of these conductances happen earlier in the development. Variations in latency and rheobase are strongly correlated and are more significant in pre-hearing neurons but not in post-hearing neurons. These fluctuations suggest pre-hearing variations of the expression of a low-voltage activated potassium channel that controls latency in fusiform neurons (Kanold & Manis, 1999) but not in post-hearing neurons.

We confirmed that the resting membrane potential of active neurons is more depolarized than pre- or post-hearing quiet neurons. This difference is caused by an increased inwardly rectifying potassium current in quiet neurons (Leao *et al.*, 2012). In active neurons, the more depolarized potential crosses the activity threshold set by I_{NaP} , generating spontaneous firing (Leao *et al.*, 2012; Ceballos *et al.*, 2016). In pre-hearing neurons, the low expression of I_{NaP} increases the difference between RMP and activity threshold, making these neurons very difficult to fire, reflecting in their bigger rheobase comparing to post-hearing neurons. Interestingly, the PCA correlations showed that rheobase has a strong positive correlation with activity threshold in both pre-and post-hearing neurons but a strong negative correlation with input resistance only in pre-hearing neurons. Therefore, variations in membrane conductances impact rheobase more substantially in pre-hearing neurons, probably because the changes in the

subthreshold conductances are less crucial in post-hearing neurons. We did not investigate the subthreshold currents in this work.

Nonetheless, because of the changes in RMP between active and quiet neurons, we believe that changes in I_{Kir} regulate the firing mode as previously described (Leao *et al.*, 2012). However, because the immediate input resistance tends to equalize around P10 we believe that the variations in I_{Kir} are constant in the near-hearing and post-hearing phase and the post-hearing expression of I_{NaP} creates the boundary between both firing states. Nevertheless, voltage-clamp experiments characterizing the subthreshold currents during these phases are necessary to confirm this hypothesis.

The input resistance measured before the peak of sag was more significant in pre-hearing neurons than post-hearing neurons without changes when we measured at steady-state. Probably slower conductances mediated by HCN channels (I_h) modulate these alterations (Ceballos *et al.*, 2016) since we also found a more considerable depolarization sag in pre-hearing neurons. Sag and the instant input resistance are correlated in pre-hearing neurons but not in post-hearing neurons in the PCA, suggesting that, as previously observed, I_h equalizes the membrane resistance (Ceballos *et al.*, 2016). The PCA also showed a strong negative correlation of action potential half-width with amplitude and maximum rate of rise in pre-hearing neurons but not in post-hearing neurons, suggesting regulated expression of voltage-gated sodium channels and voltage-gated potassium channels in younger animals. Overall our PCA data suggest that several changes in the membrane properties of fusiform neurons occurred before hearing onset, but action potential refinement happened mainly after hearing onset.

Conclusion

We found that DCN fusiform neurons mature their electrophysiological properties during postnatal development, with changes occurring before and after hearing. Remarkably, the emergence of I_{NaP} and the active state start after hearing onset, suggesting that auditory input could trigger these changes. Because this period is a critical window for proper hearing and tinnitus development, we believe that early hearing loss could impair these changes and

impact hearing and tinnitus development. This hypothesis will be tested with hearing deprivation models.

REFERENCES

- Adelman JP, Maylie J & Sah P (2012). Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: Form and function. *Annu Rev Physiol* **74**, 245–269.
- Alford BR & Ruben RJ (1963). XIX Physiological, Behavioral and Anatomical Correlates of the Development of Hearing in the Mouse. *Ann Otol Rhinol & Laryngol* **72**, 237–247.
- Alzheimer C, Schwindt PC & Crill WE (1993). Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J Neurosci* **13**, 660–673.
- Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, Isom LL & Raman IM (2009). Regulation of persistent Na current by interactions between β subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* **29**, 2027–2042.
- Awatramani GB, Turecek R & Trussell LO (2005). Staggered development of GABAergic and glycinergic transmission in the MNTB. *J Neurophysiol* **93**, 819–828.
- Bant JS & Raman IM (2010). Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel β 4 in cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12357–12362.
- Brozoski TJ, Bauer CA & Caspary DM (2002). Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J Neurosci* **22**, 2383–2390.
- Cant NB & Benson CG (2003). Parallel auditory pathways: Projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Res Bull* **60**, 457–474.
- Ceballos CC, Li S, Roque AC, Tzounopoulos T & Leão RM (2016a). Ih equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2016.00249.
- Ceballos CC, Li S, Roque AC, Tzounopoulos T & Leão RM (2016b). Ih equalizes membrane input resistance in a heterogeneous population of fusiform neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2016.00249.
- Ceballos CC, Roque AC & Leão RM (2017a). The role of negative conductances in neuronal subthreshold properties and synaptic integration. *Biophys Rev* **9**, 827–834.
- Ceballos CC, Roque AC & Leão RM (2017b). A Negative Slope Conductance of the Persistent Sodium Current Prolongs Subthreshold Depolarizations. *Biophys J* **113**, 2207–2217.

- Chambers AR, Pilati N, Balaram P, Large CH, Kaczmarek LK & Polley DB (2017). Pharmacological modulation of Kv3.1 mitigates auditory midbrain temporal processing deficits following auditory nerve damage. *Sci Rep* **7**, 1–15.
- Choudhury N, Linley D, Richardson A, Anderson M, Robinson SW, Marra V, Ciampani V, Walter SM, Kopp-Scheinflug C, Steinert JR & Forsythe ID (2020). Kv3.1 and Kv3.3 subunits differentially contribute to Kv3 channels and action potential repolarization in principal neurons of the auditory brainstem. *J Physiol* **598**, 2199–2222.
- Clarkson C, Antunes FM & Rubio ME (2016). Conductive hearing loss has long-lasting structural and molecular effects on pre-synaptic and postsynaptic structures of auditory nerve synapses in the cochlear nucleus. *J Neurosci* **36**, 10214–10227.
- Crill WE (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* **58**, 349–362.
- Eggermont JJ & Kral A (2016). Somatic memory and gain increase as preconditions for tinnitus: Insights from congenital deafness. *Hear Res* **333**, 37–48.
- Ehret G (1976). Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *J Am Audiol Soc* **1**, 179–184.
- El-Hassar L, Song L, Tan WJT, Large CH, Alvaro G, Santos-Sacchi J & Kaczmarek LK (2019). Modulators of Kv3 potassium channels rescue the auditory function of fragile X mice. *J Neurosci* **39**, 4797–4813.
- Enomoto A, Seki S, Tanaka S, Ishihama K, Yamanishi T, Kogo M & Hamada S (2018). Development of resurgent and persistent sodium currents in mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurosci Res* **96**, 305–312.
- Fujino K & Oertel D (2003). Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 265–270.
- Grande G, Negandhi J, Harrison R V. & Wang L-YY (2014a). Remodelling at the calyx of Held-MNTB synapse in mice developing with unilateral conductive hearing loss. *J Physiol* **592**, 1581–1600.
- Grande G, Negandhi J, Harrison R V. & Wang LY (2014b). Remodelling at the calyx of Held-MNTB synapse in mice developing with unilateral conductive hearing loss. *J Physiol* **592**, 1581–1600.
- Hack MH (1968). The developmental Preyer reflex in the sh-1 mouse. *J Aud Res* **8**, 449–457.
- Hsu CL, Zhao X, Milstein AD & Spruston N (2018). Persistent Sodium Current Mediates the Steep Voltage Dependence of Spatial Coding in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Neuron* **99**, 147-162.e8.

- Iwasaki S & Takahashi T (1998). Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol* **509**, 419–423.
- Joshi I & Wang LY (2002). Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem. *J Physiol* **540**, 861–873.
- Kaltenbach JA, Zhang J & Finlayson P (2005). Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* **206**, 200–226.
- Kanold PO & Manis PB (1999). Transient potassium currents regulate the discharge patterns of dorsal cochlear nucleus pyramidal cells. *J Neurosci* **19**, 2195–2208.
- Knipper M, Van Dijk P, Schulze H, Mazurek B, Krauss P, Scheper V, Warnecke A, Schlee W, Schwabe K, Singer W, Braun C, Delano PH, Fallgatter AJ, Ehlis A-C, Searchfield GD, Munk MHJ, Baguley DM & Rüttiger L (2020). The Neural Bases of Tinnitus: Lessons from Deafness and Cochlear Implants. ; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1314-19.2020.
- Leão RM & von Gersdorff H (2009). Synaptic vesicle pool size, release probability and synaptic depression are sensitive to Ca²⁺ buffering capacity in the developing rat calyx of held. *Brazilian J Med Biol Res* **42**, 94–104.
- Leão RM & Von Gersdorff H (2002). Noradrenaline increases high-frequency firing at the calyx of Held synapse during development by inhibiting glutamate release. *J Neurophysiol* **87**, 2297–2306.
- Leão RM, Kushmerick C, Pinaud R, Renden R, Li G-L, Taschenberger H, Spirou G, Levinson SR & Von Gersdorff H (2005a). Pre-synaptic Na⁺ channels: Locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J Neurosci*; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3983-04.2005.
- Leão RM, Kushmerick C, Pinaud R, Renden R, Li GL, Taschenberger H, Spirou G, Levinson SR & Von Gersdorff H (2005b). Pre-synaptic Na⁺ channels: Locus, development, and recovery from inactivation at a high-fidelity synapse. *J Neurosci* **25**, 3724–3738.
- Leao RM, Li S, Doiron B & Tzounopoulos T (2012a). Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **107**, 3008–3019.
- Leao RM, Li S, Doiron B & Tzounopoulos T (2012b). Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **107**, 3008–3019.
- Leao RN, Berntson A, Forsythe ID & Walmsley B (2004). Reduced low-voltage

- activated K⁺ conductances and enhanced central excitability in a congenitally deaf (dn/dn) mouse. *J Physiol* **559**, 25–33.
- Leão RN, Naves MM, Leão KE & Walmsley B (2006). Altered sodium currents in auditory neurons of congenitally deaf mice. *Eur J Neurosci* **24**, 1137–1146.
- Leao RN, Sun H, Svahn K, Berntson A, Youssofian M, Paolini AG, Fyffe REW & Walmsley B (2006). Topographic organization in the auditory brainstem of juvenile mice is disrupted in congenital deafness. *J Physiol* **571**, 563–578.
- Louise Faber ES & Sah P (2003). Calcium-activated potassium channels: Multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* **9**, 181–194. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15065814/> [Accessed August 20, 2021].
- Lunko O, Isaev D, Maximyuk O, Ivanchick G, Sydorenko V, Krishtal O & Isaeva E (2014). Persistent sodium current properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons of young and adult rats. *Neurosci Lett* **559**, 30–33.
- Ma JY, Catterall WA & Scheuer T (1997). Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Neuron* **19**, 443–452.
- Manzoor NF, Gao Y, Licari F & Kaltenbach JA (2013). Comparison and contrast of noise-induced hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus and inferior colliculus. *Hear Res*; DOI: 10.1016/j.heares.2012.04.003.
- May BJ (2000). Role of the dorsal cochlear nucleus in the sound localization behavior of cats. *Hear Res* **148**, 74–87.
- Moody WJ & Bosma MM (2005). Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* **85**, 883–941.
- Nakamura PA & Cramer KS (2011). Formation and maturation of the calyx of Held. *Hear Res* **276**, 70–78.
- Nakamura Y & Takahashi T (2007). Developmental changes in potassium currents at the rat calyx of Held pre-synaptic terminal. *J Physiol* **581**, 1101–1112.
- Oertel D & Young ED (2004). What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci* **27**, 104–110.
- Oleskevich S & Walmsley B (2002). Synaptic transmission in the auditory brainstem of normal and congenitally deaf mice. *J Physiol* **540**, 447–455.
- Parameshwaran S, Carr CE & Perney TM (2001). Expression of the Kv3.1 potassium channel in the avian auditory brainstem. *J Neurosci* **21**, 485–494.
- Pilati N, Ison MJ, Barker M, Mulheran M, Large CH, Forsythe ID, Matthias J &

- Hamann M (2012a). Mechanisms contributing to central excitability changes during hearing loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8292–8297.
- Pilati N, Large C, Forsythe ID & Hamann M (2012b). Acoustic over-exposure triggers burst firing in dorsal cochlear nucleus fusiform cells. *Hear Res* **283**, 98–106.
- Popescu M V. & Polley DB (2010). Monaural Deprivation Disrupts Development of Binaural Selectivity in Auditory Midbrain and Cortex. *Neuron* **65**, 718–731.
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano PS, Silos-Santiago I, Catterall WA & Scheuer T (2001). Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the β 1, β 2, and β 3 subunits. *Mol Cell Neurosci* **18**, 570–580.
- Rosing SN, Schmidt JH, Wedderkopp N & Baguley DM (2016). Prevalence of tinnitus and hyperacusis in children and adolescents: A systematic review. *BMJ Open*; DOI: 10.1136/bmjopen-2015-010596. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27259524/> [Accessed August 14, 2021].
- Sharma M, Bist SS & Kumar S (2016). Age-related maturation of wave V latency of auditory brainstem response in children. *J Audiol Otol* **20**, 97–101.
- Shore S, Zhou J & Koehler S (2007). Neural mechanisms underlying somatic tinnitus. *Prog Brain Res*; DOI: 10.1016/S0079-6123(07)66010-5.
- Shore SE & Zhou J (2006). Somatosensory influence on the cochlear nucleus and beyond. *Hear Res* **216–217**, 90–99.
- Singla S, Dempsey C, Warren R, Enikolopov AG & Sawtell NB (2017). A cerebellum-like circuit in the auditory system cancels responses to self-generated sounds. *Nat Neurosci* **20**, 943–950.
- Sonntag M, Englitz B, Kopp-Scheinpflug C & RübSamen R (2009). Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: An in vivo study in mice. *J Neurosci* **29**, 9510–9520.
- Strazza PS, de Siqueira DVF & Leão RM (2021). ATP-sensitive K⁺ channels control the spontaneous firing of a glycinergic interneuron in the auditory brainstem. *J Physiol* **599**, 1611–1630.
- Sun W, Manohar S, Jayaram A, Kumaraguru A, Fu Q, Li J & Allman B (2011). Early age conductive hearing loss causes audiogenic seizure and hyperacusis behavior. *Hear Res* **282**, 178–183.
- Taschenberger H & Von Gersdorff H (2000). Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: Developmental changes in pre-synaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci* **20**, 9162–9173.
- Taschenberger H, Leão RM, Rowland KC, Spirou GA & Von Gersdorff H (2002).

Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* **36**, 1127–1143.

Taylor CP (1993). Na⁺ currents that fail to inactivate. *Trends Neurosci* **16**, 455–460.

Thai-Van H, Cozma S, Boutitie F, Disant F, Truy E & Collet L (2007). The pattern of auditory brainstem response wave V maturation in cochlear-implanted children. *Clin Neurophysiol* **118**, 676–689.

De Villers-Sidani E, Chang EF, Bao S & Merzenich MM (2007). Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. *J Neurosci* **27**, 180–189.

Yamashita T, Ishikawa T & Takahashi T (2003). Developmental increase in vesicular glutamate content does not cause saturation of AMPA receptors at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* **23**, 3633–3638.

Young ED & Davis KA (2002). Circuitry and Function of the Dorsal Cochlear Nucleus. **21205**, 160–206.

Youssofian M, Oleskevich S & Walmsley B (2005). Development of a robust central auditory synapse in congenital deafness. *J Neurophysiol* **94**, 3168–3180.

Zhou ZJ & Fain GL (1996). Starburst amacrine cells change from spiking to nonspiking neurons during retinal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8057–8062.

Zhuang X, Sun W & Xu-Friedman MA (2017). Changes in properties of auditory nerve synapses following conductive hearing loss. *J Neurosci* **37**, 323–332.

Zugaib J, Ceballos CC & Leão RM (2016a). High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Hear Res* **332**, 188–198.

Zugaib J, Ceballos CC & Leão RM (2016b). High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Hear Res* **332**, 188–198.

Table 1 – ANOVA post-tests data statistics. The n values for variables were 47 of pre-quiet, 17 of post-quiet, and 18 of active. Some n values were different: resting membrane potential, n = 15 of pre-quiet, 8 of post-quiet, and 7 of active; the number of action potentials at 250 of pre-quiet, post-quiet, and active were 37, 11 and 14, respectively; current at -55 mV, n = 39, 15, and 16 for pre-, post-quiet, and active, respectively; I_{NaP} n= 14, 5, and 7 for pre-, post-quiet, and active, respectively. The bold values highlight $\alpha < 0.05$.

	Uncorrected Fisher's LSD	Mean 1	Mean 2	Mean diff.	p-value	95.00% CI of diff.
Activity threshold (mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	-56.96	-62.25	5.297	0.0009	2.248 to 8.347
	Pre-quiet vs. active	-56.96	-66.20 (18)	9.242	<0.0001	6.256 to 12.23
	Post-quiet vs. active	-62.25	-66.20	3.945	0.0342	0.3013 to 7.589
AP Amplitude (Δ mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	76.47	90.63	-14.16	0.0001	-21.13 to -7.192
	Pre-quiet vs. active	76.47	96.94	-20.47	<0.0001	-27.29 to -13.64
	Post-quiet vs. active	90.63	96.94	-6.304	0.1359	-14.63 to 2.025
AP Latency (s)	Pre-quiet vs. post-quiet	0.2180	0.05552	0.1624	0.0073	0.04498 to 0.2799
	Pre-quiet vs. active	0.2180	0.04341	0.1745	0.0034	0.05951 to 0.2896
	Post-quiet vs. active	0.05552	0.04341	0.01211	0.8641	-0.1282 to 0.1525
AP Threshold (mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	-42.65	-43.88	1.229	0.5298	-1.491 to 3.949
	Pre-quiet vs. active	-42.65	-45.76	3.110	0.0180	0.4459 to 5.774
	Post-quiet vs. active	-43.88	-45.76	1.881	0.3550	-1.369 to 5.132
fAHP (Δ mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	19.62	25.00	-5.378	0.0022	-8.768 to -1.989
	Pre-quiet vs. active	19.62	26.88	-7.256	<0.0001	-10.58 to -3.937
	Post-quiet vs. active	25.00	26.88	-1.878	0.3588	-5.928 to 2.172
Current at -55mV	Pre-quiet vs. post-quiet	106.3	39.99	66.34	0.0281	7.361 to 125.3
	Pre-quiet vs. active	106.3	-85.35	191.7	<0.0001	134.0 to 249.3
	Post-quiet vs. active	39.99	-85.35	125.3	0.0006	55.57 to 195.1
Halfwidth (ms)	Pre-quiet vs. post-quiet	0.4249	0.2192	0.2057	0.0002	0.1013 to 0.3101
	Pre-quiet vs. active	0.4249	0.1973	0.2275	<0.0001	0.1253 to 0.3298
	Post-quiet vs. active	0.2192	0.1973	0.02184	0.7284	-0.1029 to 0.1466
I_{NaP} (-55mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	-26.16	-86.86	60.70	0.0941	-11,21 to 132,6
	Pre-quiet vs. active	-26.16	-161.4	135.3	0.0002	71,38 to 199,2
	Post-quiet vs. active	-86.86	-161.4	74.57	0.0688	-6,244 to 155,4
Max. Rate of rise ($V.s^{-1}$)	Pre-quiet vs. post-quiet	570.3	952.8	-382.5	<0.0001	-519.0 to -246.1
	Pre-quiet vs. active	570.3	1036	-465.3	<0.0001	-599.0 to -331.6
	Post-quiet vs. active	952.8	1036	-82.75	0.3156	-245.8 to 80.33
Membrane time constant (τ)	Pre-quiet vs. post-quiet	21.63	24.09	-2.460	0.4818	-9.387 to 4.468
	Pre-quiet vs. active	21.63	25.98	-4.352	0.2054	-11.14 to 2.432
	Post-quiet vs. active	24.09	25.98	-1.893	0.6503	-10.17 to 6.385
N° of action potentials (250 pA)	Pre-quiet vs. post-quiet	41	71	30	0.0076	-52 to -8
	Pre-quiet vs. active	41	62	21	0.0389	-41 to -1
	Post-quiet vs. active	62	71	9	0.4800	-17 to 34
R input instant ($M\Omega$)	Pre-quiet vs. post-quiet	205.3	139.8	65.51	0.0079	17.67 to 113.3
	Pre-quiet vs. active	205.3	143.6	61.75	0.0104	14.90 to 108.6
	Post-quiet vs. active	139.8	143.6	-3.757	0.8962	-60.92 to 53.40
R input steady state ($M\Omega$)	Pre-quiet vs. post-quiet	94.70	94.46	-0.2343	0.9855	-25.87 to 25.40
	Pre-quiet vs. active	94.70	104.1	9.394	0.4586	-15.71 to 34.50
	Post-quiet vs. active	94.46	104.1	9.628	0.5333	-21.00 to 40.26
Resting membrane potential (mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	-67.24	-66.71	-0.534	0.8112	-5.072 to 4.005
	Pre-quiet vs. active	-67.24	-62.01	-5.235	0.0319	-9.980 to -0.4894

	Post-quiet vs. active	-66.71	-62.01	-4.701	0.0834	-10.07 to 0.6643
Rheobase (pA)	Pre-quiet vs. post-quiet	117.0	67.65	49.37	0.0063	14.34 to 84.41
	Pre-quiet vs. active	117.0	55.56	61.47	0.0006	27.15 to 95.78
	Post-quiet vs. active	67.65	55.56	12.09	0.5670	-29.77 to 53.96
Sag (Δ mV)	Pre-quiet vs. post-quiet	18.59	7.546	11.04	0.0002	5.422 to 16.66
	Pre-quiet vs. active	18.59	7.706	10.88	0.0002	5.379 to 16.39
	Post-quiet vs. active	7.546	7.706	-0.1591	0.9625	-6.875 to 6.557

Table 2 - correlation data statistics. The n =47 of pre-quiet, 17 of post-quiet, and 18 of active. Bold values highlight Person r between 0.5 and 1 or -0.5 and -1.

	Intrinsic states	Pearson r	R ²	p value	95% confidence interval
Activity threshold (mV)	Pre-quiet	0.1375	0.0189	0.7242	-0.5795 to 0.7346
	Post-quiet	-0.1606	0.0258	0.7309	-0.8151 to 0.6740
	Active	-0.6687	0.4471	0.0698	-0.9335 to 0.06805
	All data	-0.6063	0.3676	0.0128	-0.8473 to -0.1581
AP Amplitude (Δ mV)	Pre-quiet	0.7911	0.6258	0.0111	0.2674 to 0.9540
	Post-quiet	-0.1092	0.0119	0.8157	-0.7967 to 0.7016
	Active	0.3940	0.1552	0.3342	-0.4301 to 0.8599
	All data	0.8761	0.7676	<0.0001	0.6725 to 0.9565
AP Latency (s)	Pre-quiet	0.2348	0.0551	0.5430	-0.5086 to 0.7777
	Post-quiet	0.4414	0.1948	0.3215	-0.4669 to 0.8965
	Active	0.4061	0.1649	0.3182	-0.4183 to 0.8636
	All data	-0.3137	0.0984	0.2368	-0.7005 to 0.2156
AP Threshold (mV)	Pre-quiet	-0.2515	0.0632	0.5139	-0.7846 to 0.4954
	Post-quiet	-0.0919	0.0084	0.8446	-0.7903 to 0.7103
	Active	0.0467	0.0022	0.9126	-0.6804 to 0.7274
	All data	-0.4223	0.1783	0.1032	-0.7591 to 0.09283
fAHP (Δ mV)	Pre-quiet	-0.5289	0.2798	0.0716	-0.8829 to 0.2084
	Post-quiet	0.3622	0.1312	0.2123	-0.5375 to 0.8763
	Active	0.5595	0.3131	0.0746	-0.2396 to 0.9067
	All data	0.5205	0.2710	0.0194	0.03348 to 0.8078
Halfwidth (ms)	Pre-quiet	-0.8969	0.8045	0.0010	-0.9783 to -0.5758
	Post-quiet	-0.5098	0.2599	0.2425	-0.9125 to 0.3948
	Active	-0.3377	0.1140	0.4134	-0.8420 to 0.4816
	All data	-0.8695	0.7561	<0.0001	-0.9540 to -0.6571
Max. Rate of rise (V.s⁻¹)	Pre-quiet	0.8859	0.7848	0.0015	0.5387 to 0.9759
	Post-quiet	0.1997	0.0399	0.6677	-0.6513 to 0.8282
	Active	0.5185	0.2688	0.1880	-0.2934 to 0.8958
	All data	0.9241	0.8539	<0.0001	0.7905 to 0.9737
Membrane time constant (τ)	Pre-quiet	-0.0532	0.0028	0.8919	-0.6928 to 0.6333
	Post-quiet	0.2650	0.0702	0.5657	-0.6097 to 0.8487
	Active	0.0975	0.0095	0.8183	-0.6520 to 0.7506
	All data	0.4400	0.1936	0.0881	-0.07119 to 0.7682

R input instant (MΩ)	Pre-quiet	-0.8145	0.6635	0.0075	-0.9596 to -0.3277
	Post-quiet	-0.6513	0.4242	0.1130	-0.9422 to 0.1997
	Active	-0.2913	0.0848	0.4840	-0.8263 to 0.5202
	All data	-0.7723	0.5964	0.0005	-0.9169 to -0.4481
R input steady state (MΩ)	Pre-quiet	-0.5331	0.2842	0.1395	-0.8842 to 0.2029
	Post-quiet	-0.5860	0.3434	0.1668	-0.9291 to 0.2990
	Active	-0.1784	0.0318	0.6726	-0.7845 to 0.6020
	All data	-0.2109	0.0445	0.4329	-0.6397 to 0.3180
Rheobase (pA)	Pre-quiet	0.3893	0.1516	0.3003	-0.3706 to 0.8370
	Post-quiet	-0.4137	0.1711	0.3563	-0.8896 to 0.4930
	Active	-0.0278	0.0008	0.9478	-0.7184 to 0.6904
	All data	-0.3470	0.1204	0.1879	-0.7190 to 0.1796
Sag (Δ mV)	Pre-quiet	-0.8261	0.6825	0.0061	-0.9623 to -0.3590
	Post-quiet	-0.2521	0.0636	0.5854	-0.8448 to 0.6183
	Active	-0.3042	0.0925	0.4638	-0.8308 to 0.5097
	All data	-0.8666	0.7509	<0.0001	-0.9529 to -0.6501

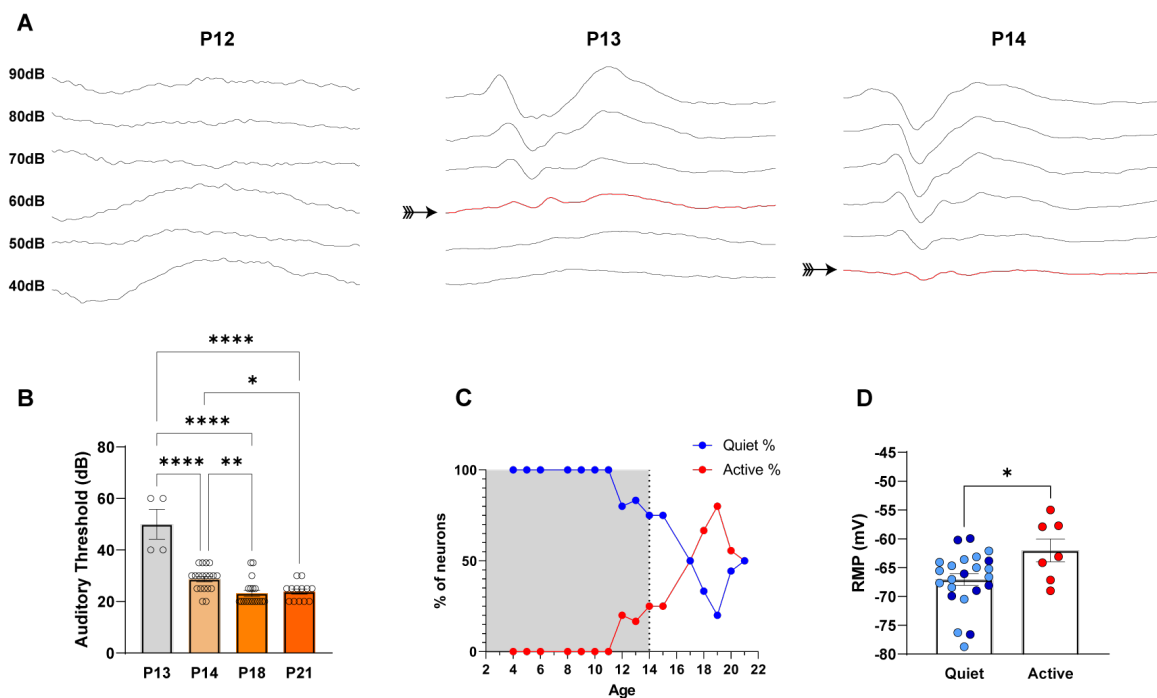


Figure 1 – Determination of hearing onset. **A**. Auditory brainstem responses of a P12, P13, and P14 mice. The arrow shows the hearing threshold. **B**. Hearing thresholds at different ages **C**. Proportion between quiet and active neurons across ages. The grey box represents the pre-hearing phase **D**. RMP in the presence of TTX light blue circles are data from pre-hearing neurons and dark circles from post-hearing neurons. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

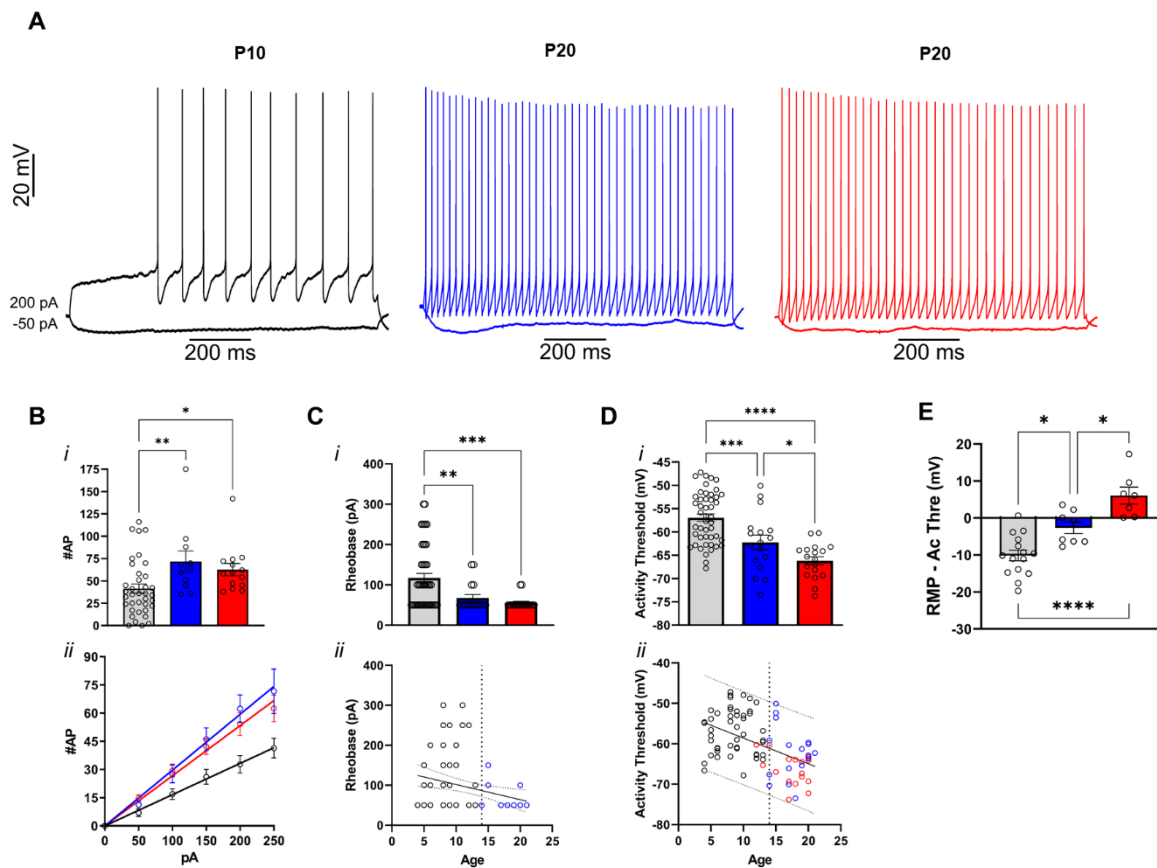


Figure 2 – Excitability of fusiform neurons across ages. Gray or black represents pre-hearing quiet neurons, blue post-quiet neurons, and red active neurons. **A.** Representative traces of a quiet neuron from a P10 mouse, a quiet neuron (blue) from a P20 mouse and an active neuron (red) from a mouse of the same age. **Bi.** Number of action potential fired at 250 pA. **Bii.** Number of action potentials fired in response to current injection. **Ci.** Rheobase in pre- and post-hearing neurons and correlation with age (**Cii**). **Di.** The activity threshold and the correlation across age (**Dii**). **E.** Difference between RMP and act. threshold. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

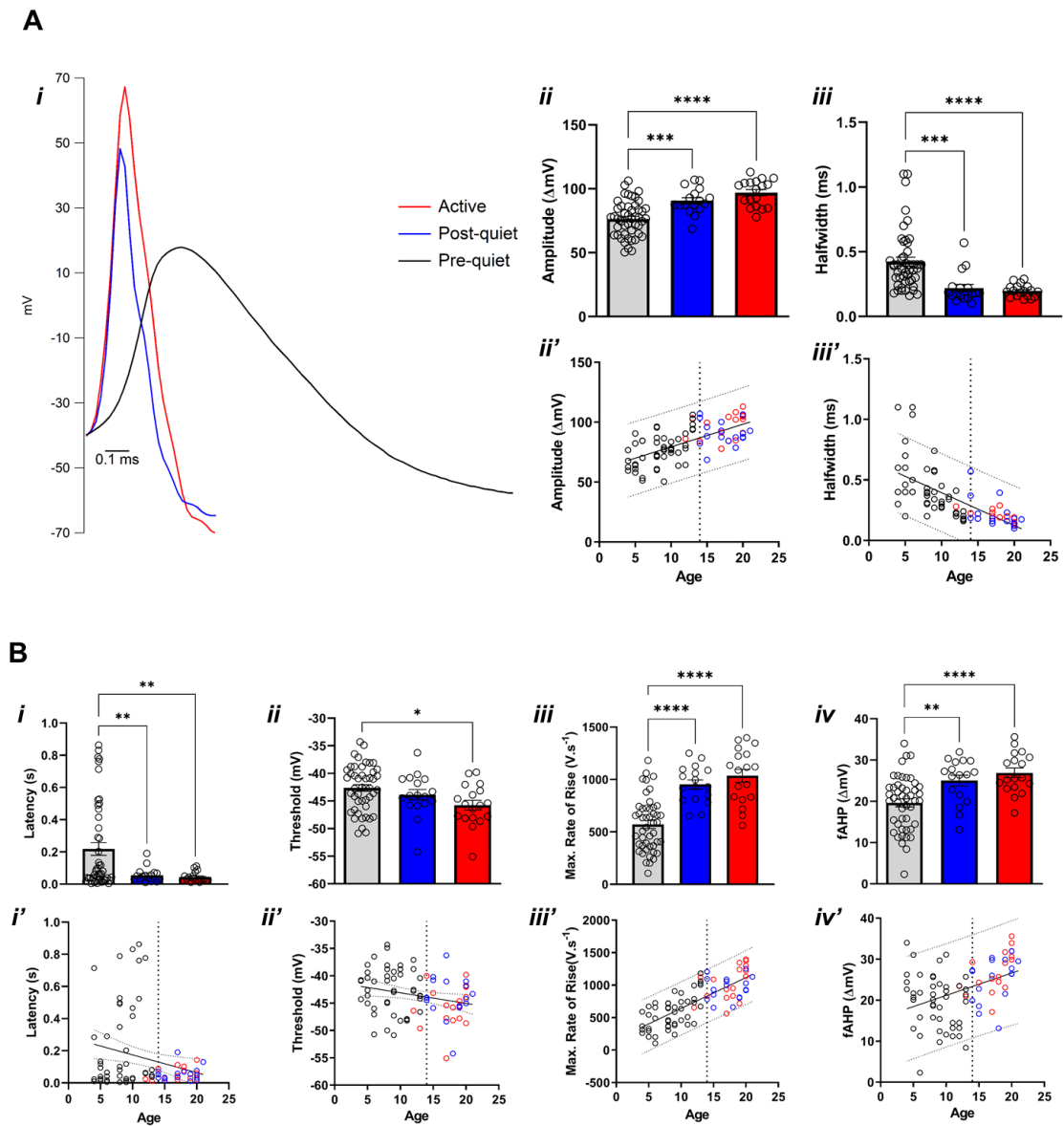


Figure 4 – Action potential parameters across ages. Gray or black represents pre-hearing quiet neurons, blue post-quiet neurons, and red active neurons. **A - i.** representative waveforms of action potentials. **ii.** action potential amplitude and the correlation with **(ii')**. **iii.** Half width and correlation with age **(iii')**. **B - i.** Action potential latency and the correlation with age **(i')**. **ii.** Action potential threshold and the correlation with age **(ii')**. **iii.** Maximum rate of rise and correlation with age **(iii')**. **iv.** fAHP and correlation with age **(iv')**. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

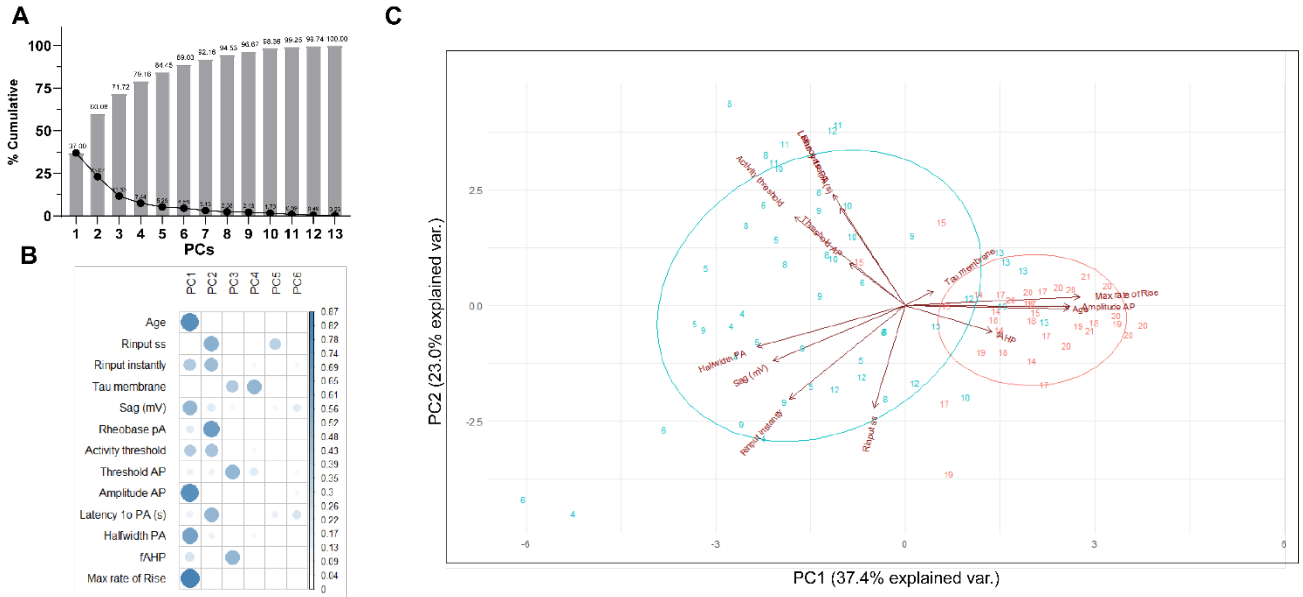


Figure 5 – Principal component analysis (PCA) from all data. **A.** The cumulative (bars) and individual (black line) percentage of each principal component (PC). **B.** Contribution of the variables with different PC. **C.** Graph of PC1 vs PC2. The red ellipse represents post-hearing neurons and blue the pre-hearing neurons. Labeled numbers represents animal’s age.

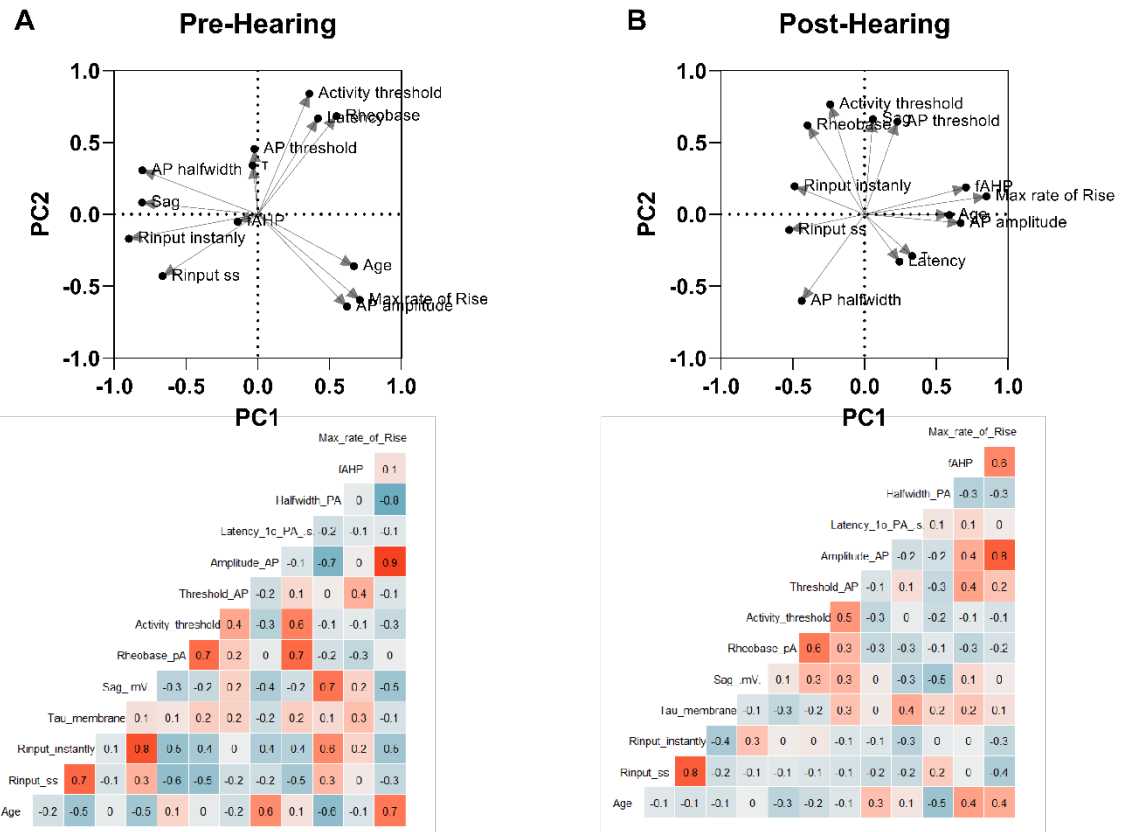


Figure 6 – Principal component analysis of pre- and post-hearing neurons. **A.** PC1 vs. PC2 graph from pre-hearing neurons (top) and respective correlogram (bottom). Color intensity represents a degree of correlation. **B.** PC1 vs. PC2 graph from post-hearing neurons (top) and respective correlogram (bottom).

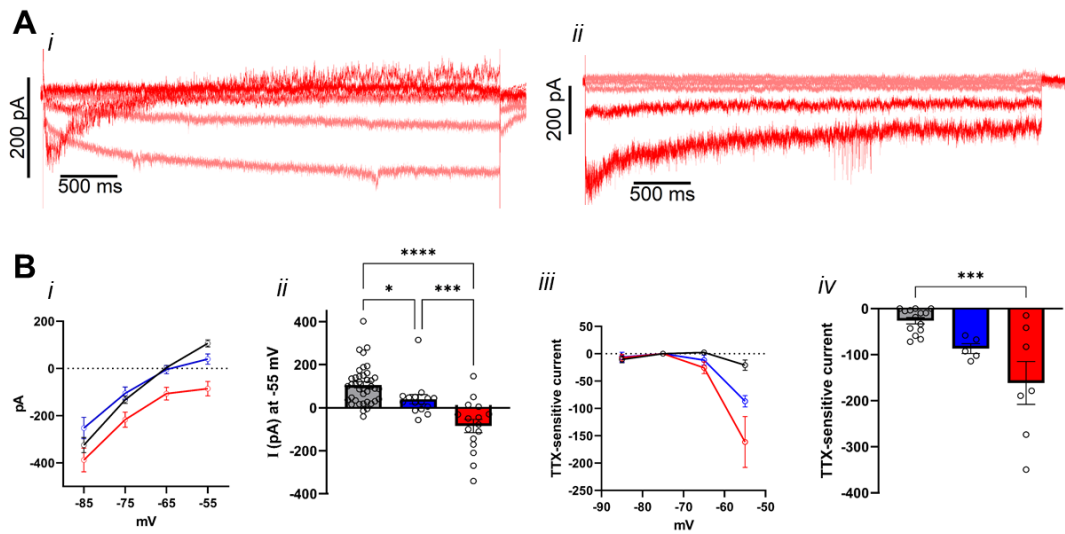
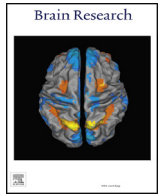


Figure 7 – The I_{NaP} in the fusiform neurons during development. Gray or black represents pre-hearing quiet neurons, blue post-quiet neurons, and red active neurons. **A - i.** Representative traces in response to progressive depolarization from -85 mV to -55 mV of an active fusiform neuron. **ii.** TTX-sensitive current from the trace on the left. **B – i.** IV relationships -85 mV to -55 mV. **ii.** Current at -55 mV **iii.** IV relationship of the TTX sensitive current **iv.** TTX-sensitive current at -55 mV. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

**ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS NÃO
RELACIONADOS À TESE**



Research report

Alterations in brainstem auditory processing, the acoustic startle response and sensorimotor gating of startle in Wistar audiogenic rats (WAR), an animal model of reflex epilepsies



Alexandra Olimpio Siqueira Cunha^{a,*}, Marzieh Moradi^{a,b}, Junia Lara de Deus^a, Cesar Celis Ceballos^a, Nikollas Moreira Benites^a, Procópio Cleber Gama de Barcellos Filho^a, José Antonio Cortes de Oliveira^a, Norberto Garcia-Cairasco^a, Ricardo Leão^a

^a Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Audiogenic rats have similar hearing thresholds for clicks, but not for tones.
- WARs have larger amplitudes for ABR wave II in response to 16-kHz tones.
- Audiogenic seizures severity does not correlate with ABR amplitudes.
- WARs have smaller startle reflex and increased sensitivity to pre-pulse inhibition.
- Alterations in PPI do not correlate with seizure severity or frequency.

ARTICLE INFO

Keywords:

Audiogenic seizures
Wistar audiogenic rats
Auditory brainstem response
Pre-pulse inhibition

ABSTRACT

While acute audiogenic seizures in response to acoustic stimulus appear as an alteration in sensory-motor processing in the brainstem, the repetition of the stimulus leads to the spread of epileptic activity to limbic structures. Here, we investigated whether animals of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain, genetically selected by inbreeding for seizure susceptibility, would have alterations in their auditory response, assessed by the auditory brainstem responses (ABR) and sensory-motor gating, measured as pre-pulse inhibition (PPI), which could be related to their audiogenic seizures susceptibility or severity. We did not find differences between the amplitudes and latencies of ABR waves in response to clicks for WARs when compared to Wistars. Auditory gain and symmetry between ears were also similar. However, hearing thresholds in response to some tones were lower and amplitudes of wave II were larger in WARs. WARs had smaller acoustic startle reflex amplitudes and the percentages of startle inhibited by an acoustic prepulse were higher for WARs than for Wistars. However, no correlation was found between these alterations and brainstem-dependent seizure severity or limbic seizure frequency during audiogenic kindling. Our data show that while WARs present moderate alterations in primary auditory processing, the sensory motor gating measured in startle/PPI tests appears to be more drastically altered. The observed changes might be correlated with audiogenic seizure susceptibility but not seizures severity.

1. Introduction

Audiogenic seizures (AS) are reflex seizures in response to a high-intensity sound stimulus (> 100 dB) caused by the hyperactivation of brainstem auditory structures and disruption of sensory-motor integration (Garcia-Cairasco, 2002). This phenomenon is more commonly observed in rodents (Garcia-Cairasco, 2002; Ross and Coleman, 2000),

but can be observed also in cats, dogs and more rarely in humans (Ramani, 1991; Lowrie et al., 2015). In the AS model of epilepsy, strains of rodents genetically inbred for audiogenic susceptibility present seizures that are triggered by exposure to a high-intensity sound that can be a pure tone (8–16 kHz), a broad-band noise (e.g. a bell ring) or white noise (Ross and Coleman, 2000). Data from audiogenic strains indicate the participation of primary auditory midbrain structures in the onset

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.
E-mail address: alecunha@usp.br (A.O.S. Cunha).

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146570>

Received 18 June 2019; Received in revised form 5 November 2019; Accepted 23 November 2019

Available online 05 December 2019

0006-8993/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and maintenance of AS, more remarkably, the inferior colliculus (IC) (Garcia-Cairasco, 2002; N'Gouemo and Faingold, 1996). Moreover, non-auditory regions are also involved in the behavioral expression of AS, such as the deep layers of the superior colliculus, periaqueductal gray matter, *substantia nigra* and the brainstem reticular formation (Garcia-Cairasco, 2002; N'Gouemo et al., 2014; Garcia-Cairasco et al., 2017).

Regardless of some variations among audiogenic strains, AS generally start with a brief startle response, followed by a wild running episode, tonic-clonic seizures and a post-ictal phase (Faingold, 1988; Garcia-Cairasco et al., 1996; Poletaeva et al., 2017). In most cases, the latency to seizures is inversely proportional to seizure severity, occurring with a mean latency of 15 s (Doretto et al., 2003). Acute AS involve behavioral responses associated with the activation of primary auditory areas and fugal pathways (Faingold et al., 1990; Garcia-Cairasco et al., 1996; Dutra Moraes et al., 2000). However, upon repetition of high-intensity sound, susceptible animals may exhibit a change in the behavioral repertoire, together with the appearance of epileptiform discharges in forebrain and limbic areas, such as the cortex, the amygdala and the hippocampus, a phenomenon referred to as audiogenic kindling (AuK). Behavioral repertoire of audiogenic kindled seizures include myoclonus, limbic elevation and loss of posture, similarly to those observed in amygdala kindling and other models of temporal lobe epilepsy (Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Dutra Moraes et al., 2000; Vinogradova et al., 2006). Hence, studies with AS strains may provide information on the neuronal sites where AS initiates, maintain and spread. Moreover, genetic animal models of epilepsy have the advantage of an innate seizure phenotype regulated by a group of genes that can resemble many types of epileptic disorders (Poletaeva et al., 2017; Garcia-Cairasco et al., 2017), in comparison to pharmacological models of epilepsy.

The Wistar Audiogenic Rat (WAR) is a strain of seizure-prone rats that has been inbred since the 90's based on the phenotype for susceptibility to seizures upon high-intensity sound stimulus (broad-band noise, 110 dB) (Doretto et al., 2003). Animals have been inbred at the animal housing facilities of Ribeirão Preto Medical School for > 65 generations and all the AS have been monitored since then. Here we are interested in the analysis of auditory brainstem responses (ABR) of the WARs. Our aim is to know to what extent ABR could be predictive of susceptibility to audiogenic seizures or correlated with seizure severity. We also investigated the acoustic startle reflex (ASR) and prepulse inhibition (PPI), which measures the sensorimotor gating in humans and experimental animal models. Our hypothesis is that alterations in auditory and/or sensory-motor processing participate in the onset and maintenance of acute seizures, and the spread of seizures to forebrain networks during AuK (Faingold et al., 1990; Coleman et al., 1999; Charizopoulou et al., 2011).

2. Results

2.1. Audiogenic susceptible rats and controls have similar ABR in response to clicks

In Fig. 1A we show the representative waveforms recorded for clicks at different sound intensities for Wistar and WARs. Threshold for clicks did not differ between strains or ears [$F(3, 24) = 1.06$; $p = 0.38$, One-way ANOVA]. We identified 5 waves that correspond to the electrophysiological responses (evoked potentials) of the multiple synapses of the acoustic pathway: I, cochlear nerve, II, cochlear nucleus, III, superior olivary complex, IV, lateral lemniscus and V, inferior colliculus (Parham et al., 2001; Benichoux et al., 2018). Two-way ANOVAs showed that peak amplitudes wave I-V increased significantly with the intensity of stimulus [$F(5, 120) > 50$; $p < 0.001$, for all waves]. However, we did not observe differences between strains or ears [$F(3, 24) < 2$; $p > 0.5$, for all waves], or interaction between strain and stimulus intensity [$F(15, 120) < 1.5$; $p < 0.2$, for all waves] (Fig. 1B).

We also found that latencies were significantly shorter with the increment of the intensity [$F(5, 120) > 15$; $p < 0.001$, for all waves], but with no difference between strains or ears [$F(3, 24) < 2.7$; $p > 0.07$, for all waves] or interaction strain versus ear [$F(15, 120) < 1.5$; $p > 0.09$, for all waves]. Finally, the auditory gain measured as the ratio of the amplitudes of wave V/wave I was similar in all intensities [$F(5, 120) = 1.2$; $p = 0.3$] for Wistar and WARs and left and right ears [$F(3, 24) = 2.55$; $p = 0.08$] and no interaction between strain and intensities was observed [$F(15, 120) = 1.2$; $p = 0.25$] (Fig. 1C). These results show that both strains display symmetry in their audiograms and similar hearing sensitivity in response to clicks.

2.2. ABR response to specific tones is altered in audiogenic susceptible rats

Next, we analyzed ABR responses to specific tones. We found a strongly significant influence of sound frequency in the hearing threshold [$F(2.66, 63.46) = 29.7$; $p < 0.0001$, two-way ANOVA], with higher hearing thresholds for higher frequencies. Also, we detected a strong difference in the hearing thresholds between strains [$F(3, 24) = 6.42$; $p = 0.0024$, two-way ANOVA], and an effect on the interaction of frequency versus strain [$F(12, 96) = 2.67$; $p = 0.0039$, two-way ANOVA]. Post hoc analysis indicated a significant lower threshold for WARs in response to 16 and 24 kHz tones ($p = 0.03$ and $p = 0.04$, respectively) (Fig. 2).

Fig. 3 shows the amplitude and latencies of each wave for all frequencies tested at 90 dB. We found that in all cases, frequency strongly influenced the amplitude of waves [$F(4, 96) > 10$; $p < 0.0001$, two-way ANOVA]. The amplitude of wave I was similar for Wistar and WARs [$F(3,24) = 0.54$; $p = 0.65$] and the strain versus frequency interaction was not significant [$F(12,96) = 0.94$; $p = 0.507$]. WARs presented larger wave II amplitudes in response to a 90 dB-tone [$F(3,24) = 11.55$; $p < 0.0001$] but the interaction strain versus frequency was not significant [$F(12,96) = 0.84$; $p = 0.61$] (Fig. 3B). We also found a significant influence of strain in the amplitude of wave III [$F(3,24) = 6.7$; $p = 0.002$] and strain versus frequency interaction [$F(12,96) = 1.8$; $p = 0.047$] but the post hoc analysis did not show differences between amplitudes of wave III in none of the analyzed frequencies ($p > 0.99$, in call comparisons). The amplitude of wave IV was similar between groups [$F(3,24) = 1.3$; $p = 0.29$] and the interaction strain versus frequency was also not significant [$F(12,96) = 1.21$; $p = 0.28$]. The amplitude of wave V was also similar between Wistar and WARs [$F(3,24) = 0.87$; $p = 0.47$] as the interaction strain versus frequency [$F(12,96) = 0.88$; $p = 0.57$]. Finally, the analysis of auditory gain showed that frequency did not influence this parameter [$F(4,96) = 2.05$; $p = 0.14$] and no differences were observed between strains [$F(3,24) = 1.47$; $p = 0.24$] or strain versus frequency interaction [$F(12,96) = 1.02$; $p = 0.43$] (Fig. 3F).

The analysis of latencies to peak for each wave show that in all waves, frequency strongly influenced the latency to peak [$F(4, 96) > 15$; $p < 0.0001$, two-way ANOVA]. The latencies of waves I-V were similar for Wistar and WARs [$F(3,24) < 1.5$; $p > 0.3$] and the strain versus frequency interactions were not significant [$F(12,96) < 1.0$; $p > 0.3$] in all tested frequencies for all waves.

Finally, we tested if the amplitude of wave II in response to a 16 kHz tone was different in other sound intensities (Fig. 3G). We found consistently larger waves in response to 90, 80, 70 and 60 dB, with significant differences in 90 and 80 dB [$F(1, 12) = 31.69$; $p = 0.0001$, two-way ANOVA] (Fig. 3G).

2.3. ASR is attenuated in audiogenic rats

ASR is an abrupt and transient motor response to a high intensity sound stimulus and reflects the animal's ability to respond to intense or unexpected sounds (Willot et al., 2003; Fig. 4 A). In our experiments, we monitored the animals during ASR and PPI experiments in order to

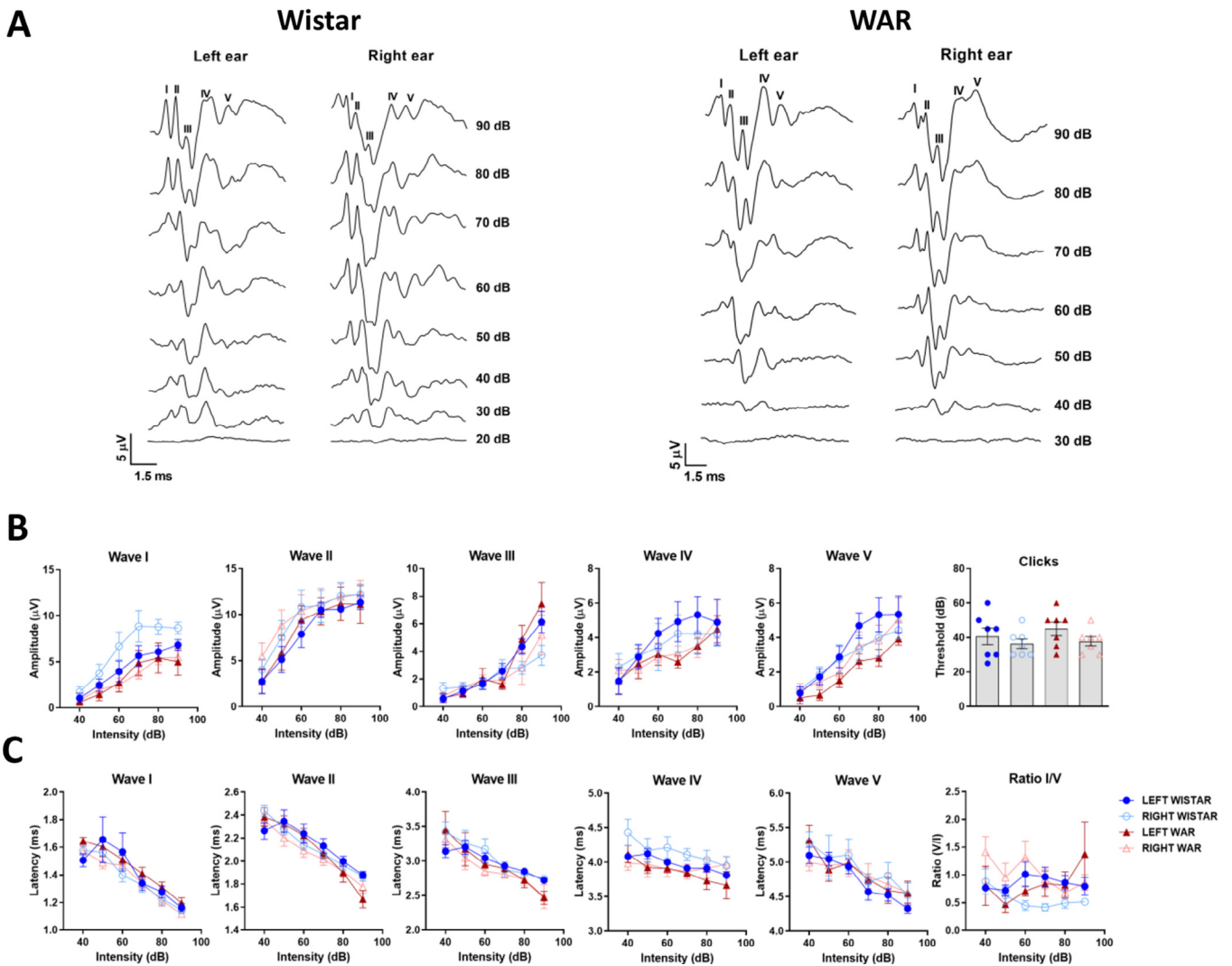


Fig. 1. Auditory brainstem response to clicks for each ear in audiogenic and control rats. (A). Representative traces of recorded waves. (B). Amplitude of evoked potentials as a function of sound intensity (dB) for waves I-V and hearing threshold for each ear of both strains. (C). Latencies to peak of waves I-V and auditory gain as a function of sound intensity. Data are demonstrated as mean ± SEM.

check if the stimulus would evoke abnormal motor responses, such as audiogenic seizures. Typical accelerometer reads are shown in Fig. S1. We found that WARs had significantly smaller startle responses than control Wistar rats (Wistar = 1057 ± 234 mV and WAR = 340 ± 86 mV, $p = 0.01$, $t = 2.87$, $df = 12$, Unpaired t -test) (Fig. 4B). Moreover, we did not observe any differences between the latencies of

ASR in WARs when compared to Wistars (Unpaired t -test $p > 0.1$) (Fig. 4C). Animals had similar ages (60–70 days) and weights (Wistar: 152 ± 11; WAR: 163 ± 9, $t = 1.6$, $df = 12$, $p = 0.15$).

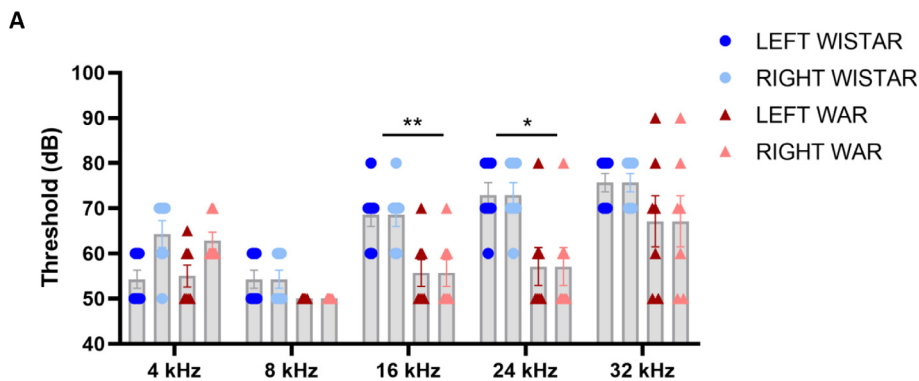


Fig. 2. Auditory brainstem response to pure tones each ear in audiogenic and control rats. Hearing threshold for both strains at different tone burst frequencies. Data are depicted as mean ± SEM. * $p < 0.05$.

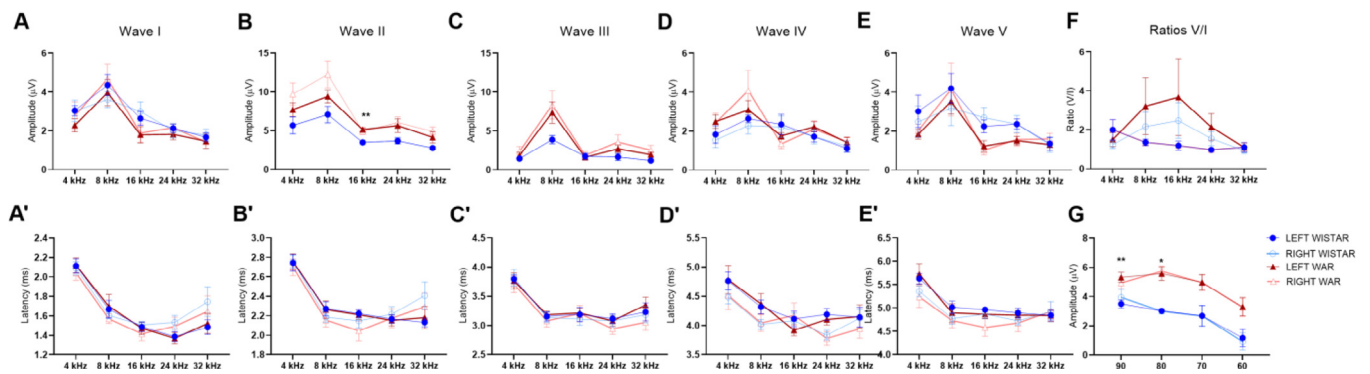


Fig. 3. Auditory brainstem response amplitudes and latencies to pure tones for each ear in audiogenic and control rats. A–E. Mean amplitude of waves I–V upon 90 dB stimuli at different frequencies A’–E’. Latencies to peak of waves I–V. F. Ratio between waves V/I as a function of frequency. G. Wave II amplitude at different stimulus intensity. Data are depicted as mean ± SEM. *p < 0.05 and ** p < 0.01.

2.4. Wars have augmented pre-pulse inhibition

In the PPI test (Fig. 5A), the sensory-motor integration is measured as the percentage of inhibition of the startle response due to the presentation of a prepulse stimulus (Valsamis and Schmid, 2011). We found that frequency strongly influenced the percentage of ASR inhibited by the prepulse (PPI%) [F(4, 48) = 9.4; p < 0.0001, two-way ANOVA] in the same manner for both strains [F(4, 48) = 0.7; p = 0.5]. However, we observed significant differences in PPI% for Wistars and WARs [F(1, 12) = 14.3; p = 0.002] (Fig. 5B). The post-tests showed that WARs had significantly higher percentages of inhibition than Wistars for prepulses of 4 kHz (Wistar = 21.05 ± 2.45% and WAR = 45 ± 6.5%; p = 0.04) and 8 kHz (Wistar = 23 ± 4.6% and WAR = 52% ± 5.4; p = 0.007). No difference was found for 16 kHz (Wistar = 29 ± 5.8 and WAR = 47 ± 4.1; p = 0.1), 24 kHz (Wistar = 33 ± 7.2 and WAR = 53 ± 7.3; p = 0.3) or white noise (Wistar = 55 ± 6.6 and WAR = 66 ± 6.4; p = 0.7). Our results show that PPI is augmented in WARs when compared to Wistar controls in response to specific frequencies.

2.5. Audiogenic seizures severity do not correlate with ABR amplitudes or ASR/PPI findings

All WARs presented brainstem seizures of different severity scores in the first stimulus session, with a mean score of 5.4 ± 0.5 and a mean latency of 27 ± 7 s for the first seizure. As we proceeded with the AuK protocol, seizures first increased and then decreased in severity (Fig. 6A). We first asked whether seizure severity correlates with ABR or ASR/PPI parameters which presented differences in the WARs. For that, we used the mean score of the three brainstem seizures to avoid the effects of kindling progression and plotted it as a function of wave II amplitude in response to 16-kHz tones. Our findings point to no correlations between mesencephalic seizure severity and wave II amplitude (r = -0.4; p = 0.4) (Fig. 6B), ASR (r = 0.1; p = 0.8) or PPI% (r = 0.1; p = 0.8 for 4 kHz and r = -0.03; p = 0.9 for 8 kHz) (Fig. 6C–E).

As previously reported, the first limbic seizure was observed approximately after 7 sessions, initially with low severity scores that gradually increased (Fig. 7A). All the animals had at least one class 5 seizure, which is the most severe type of limbic seizure. Limbic seizures

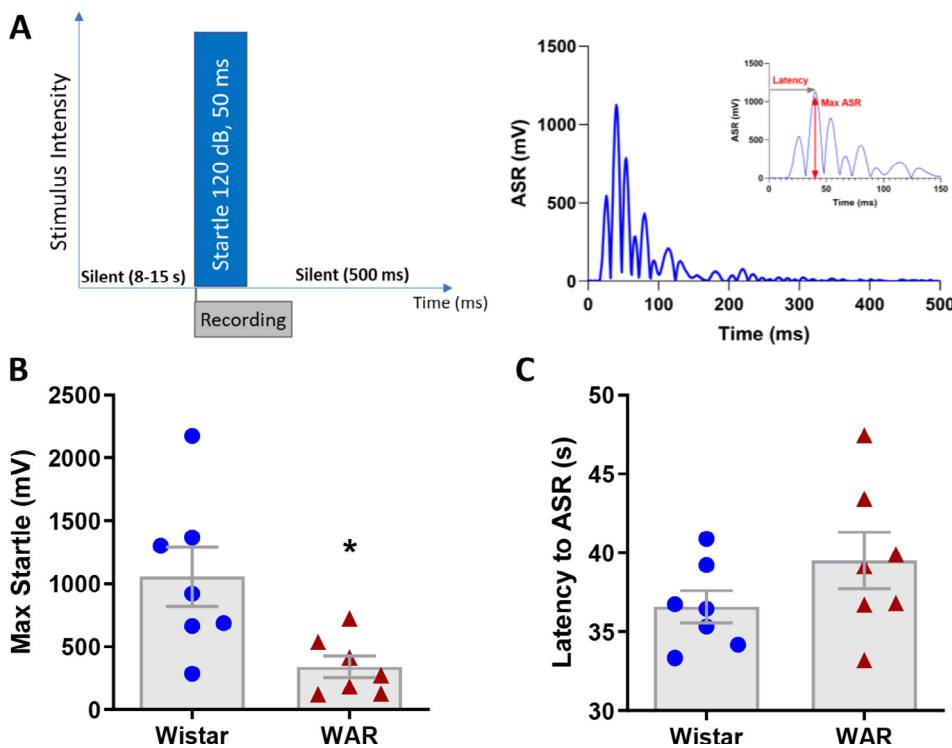


Fig. 4. Startle reflex response in audiogenic and control rats. A. Schematic representation of the stimulation pulse (110 dB) and the startle response measured by a piezoelectric detector. B. Mean amplitude of startle reflex of all 15 trials for each animal. C. Mean latencies in seconds to startle response of all 15 trials for each animal. Data are depicted as mean ± SEM. *p < 0.05.

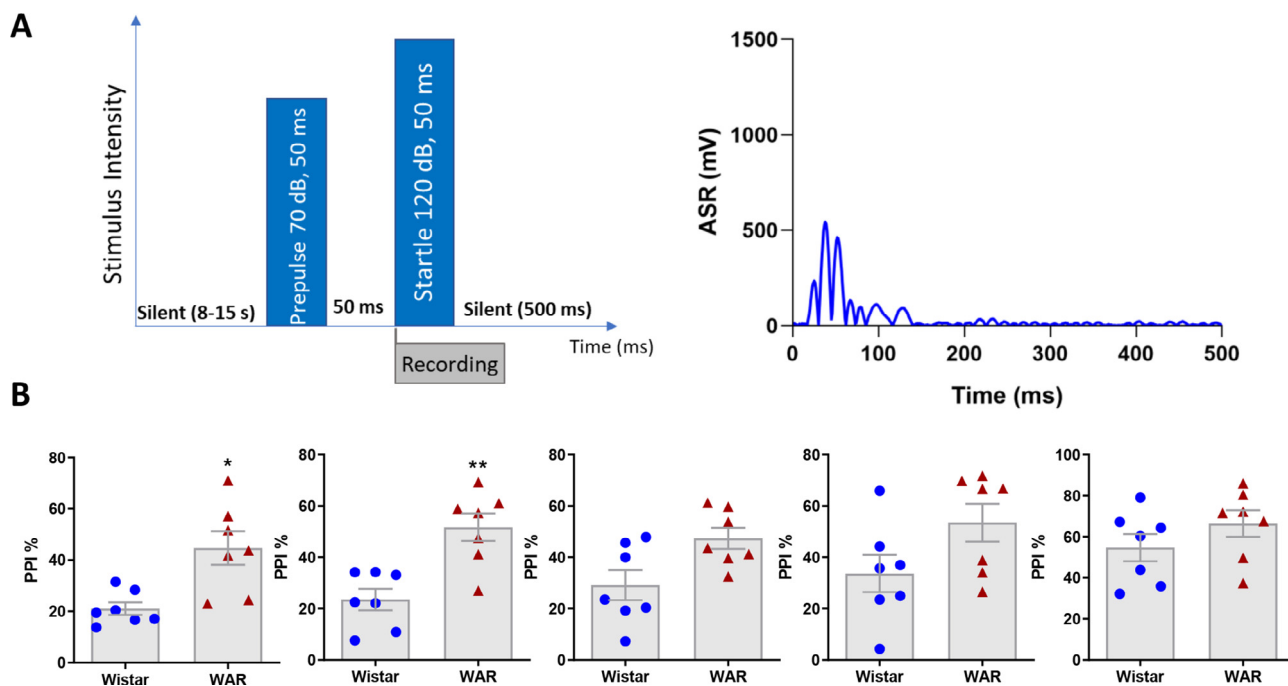


Fig. 5. Startle reflex response in audiogenic and control rats with a previous presentation of a prepulse. A. Schematic representation of the stimulation protocol with a prepulse (70 dB) and a pulse (110 dB) and the startle response measured by a piezoelectric detector. B. Mean amplitude of startle reflex for tone bursts at 4, 8, 16 and 24 kHz, as well as White Noise (WN). Data are depicted as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

usually appeared after an episode of running (mean latency = 22 ± 2 s).

Since the scores increase gradually with the progression of the audiogenic kindling, we chose not to use neither the score of first seizure nor the mean seizure score, because they do not represent the progression of seizures. In this case, we used the frequency of seizures since it is a reliable measure of disease severity in other models of temporal lobe epilepsy (Löschner, 2011). Like brainstem seizures, no correlations were observed between limbic seizure frequency and wave II amplitude ($r = 0.2$; $p = 0.64$), ASR ($r = 0.4$; $p = 0.37$) or PPI%

($r = 0.2$; $p = 0.58$ for 4 kHz and $r = -0.38$; $p = 0.39$ for 8 kHz). (Fig. 7B–E).

3. Discussion

In this study, we analyzed ABRs, ASR and PPI of WARs, an audiogenic rat strain, in comparison to the parental strain, the Wistar rat. In ABR experiments we used the closed field configuration, measuring responses of each ear to check for asymmetries. Our results showed similar and symmetric thresholds, wave amplitudes and latencies

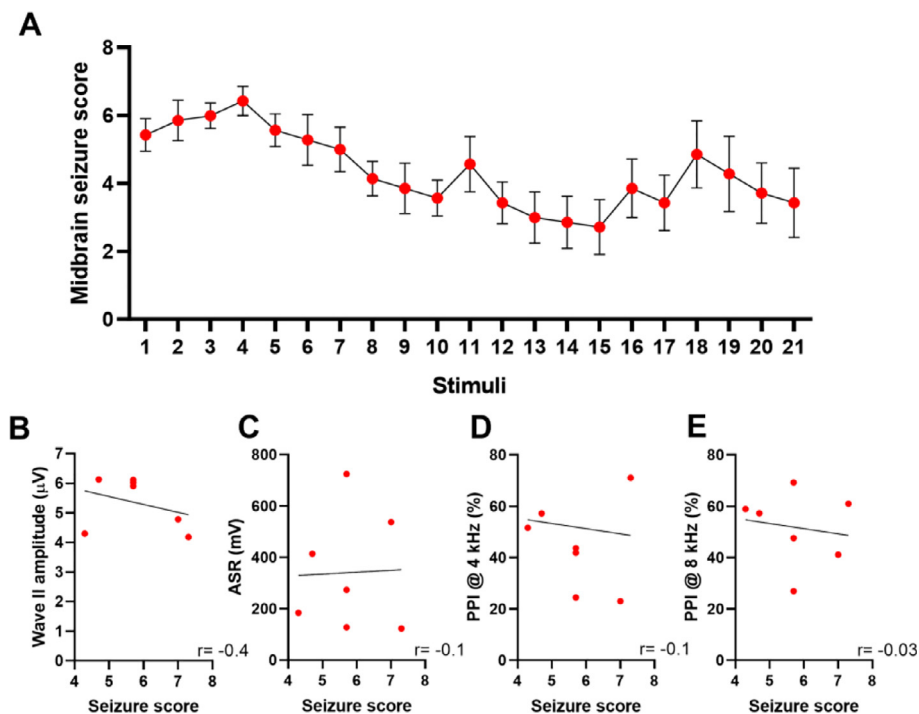


Fig. 6. Progression of midbrain seizure during audiogenic kindling. A. Mean midbrain seizure severity score along 21 stimulations. B. Midbrain seizure severity score as a function of Wave II amplitude at 16 kHz (90 dB) (B), mean ASR (C), PPI% at 4 (D) and 8 kHz (E). Seizure scores are represented as mean \pm SEM. Pearson r -values are shown in the figure.

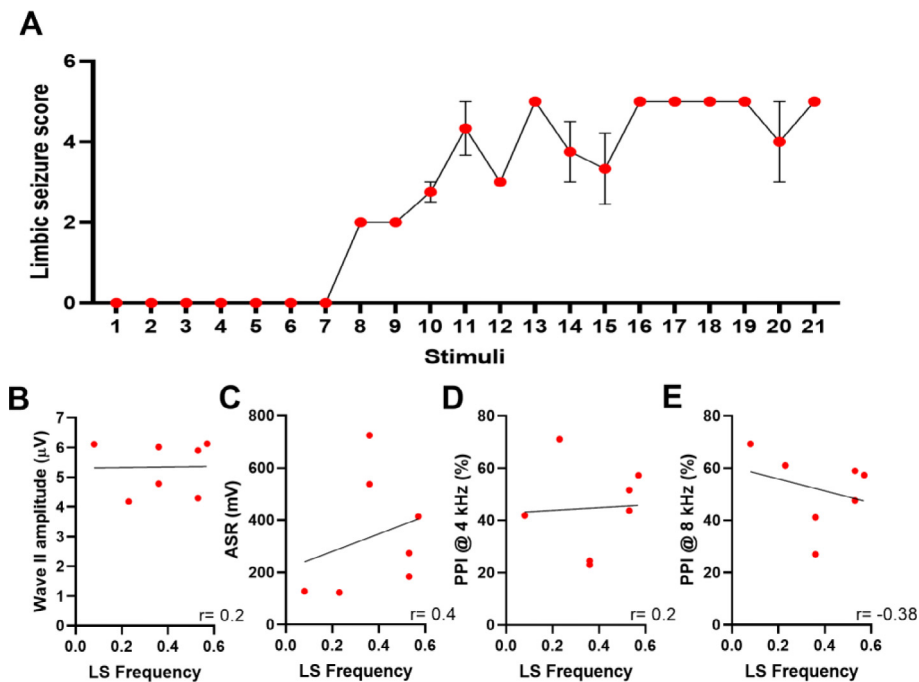


Fig. 7. Progression of limbic seizures and limbic re-cruitment during audiogenic kindling. A. Mean limbic seizure severity scores along 21 stimulations. B. Seizure frequency is plotted as a function of Wave II amplitude at 16 kHz (90 dB) (B), mean ASR (C), PPI% at 4 (D) and 8 kHz (E). Seizure scores are represented as mean \pm SEM. Pearson r-values are shown in the figure.

between WARs and Wistars for clicks. However, we found discrete alterations in ABR recorded for tones. We also described smaller startle responses and increased PPIs for pure tones in WARs.

The ABR reflects activity in only a subset of brainstem neuronal populations that are highly synchronized in their responses to specific sounds (Melcher and Kiang, 1996). As it is widely recognized, sound information is transmitted in a tonotopic manner through auditory structures in the central nervous system. Therefore, whereas responses to tones represent the firing of neurons whose characteristic frequency, a frequency for which a neuron has its lowest excitatory threshold, corresponds to that tone, responses to clicks represent firing of several neuronal populations responding to a wide range of frequencies. We thus hypothesize, based on our data, that WARs might have alterations in specific neuronal populations. But this hypothesis needs further investigation.

Wave II is often recognized as the sound-evoked potentials from the cochlear nuclei of the rat and humans, which is the first site of auditory processing in the central nervous system (Parham et al., 2001; Young and Oertel, 2003). The participation of cochlear nuclei in the onset of audiogenic seizures has not been fully elucidated, but after acute seizures, moderate c-Fos labelling was observed in the cochlear nuclei of Wistar Audiogenic rats from Strasbourg (WAS) (Simler et al., 1994). Cochlear nuclei send projections directly and indirectly to the inferior colliculus which is the key structure in the generation of audiogenic seizures. Studies have shown that upon a high intensity sound stimulus, neurons from the inferior colliculus increase firing, which precedes generalized tonic-clonic seizures, along with hyperexcitability of mid-brain sensorimotor circuits (Dutra Moraes et al., 2000; Moraes et al., 2005; Faingold 2012). Therefore, the increased reactivity of cochlear nuclei could lead to hyperactivation of collicular circuits and the triggering of audiogenic seizures during a prolonged high intensity sound stimulus. In our study, during the short stimuli for ABR recordings, we did not find differences in wave V (which corresponds to the IC) in WAR animals, and they even tended to be smaller, compared to Wistar controls.

The relationship between alterations in primary auditory areas and the expression of audiogenic seizures has been long analyzed (Saunders et al., 1972; Glenn et al., 1980; Faingold et al., 1990). Data from the Genetic Epilepsy Prone Rats (GEPRs) showed that these animals present higher thresholds for clicks as compared to their parental strain,

Sprague-Dawley and latencies to wave I, II and IV significantly longer, pointing to auditory deficits (Faingold et al., 1990; Ross and Coleman, 2000). Also, GEPRs with moderate hearing loss are more likely to exhibit more severe seizures.

Coleman et al. (1999) demonstrated that Long Evans rats submitted to a single high-intensity sound stimulus during development (P14) show shorter inter wave intervals between waves I - V, and III - V evoked by pure tones, as well as cochlear lesions associated with audiogenic seizures. Like GEPRs, Genetic Audiogenic Seizure Hamster from Salamanca (GASH-Sal) have higher thresholds for clicks and pure tones as compared to control hamsters and latencies to wave peaks were also longer in audiogenic animals (Muñoz et al., 2017). Finally, mice and humans with mutations on the gene *Gipc3*, expressed in inner cells of the cochlea, exhibit progressive hearing loss and in mice, audiogenic seizures. Charizopoulou et al. (2011) demonstrated that the amplitude of wave I is larger in animals susceptible to audiogenic seizures and the amplitude of the wave I correlated with latency to tonic-clonic seizures. In these animals, seizures progressively disappear as animals become deaf. However, differently from what is observed in the above cited studies, we did not observe signs of hearing loss in WARs since hearing thresholds were like non-audiogenic controls. We also did not find any differences in latencies of waves indicating that WARs do not present hearing impairments. However, we observed a small increase in the hearing threshold for 16 and 24 kHz frequencies which are suggestive of some small auditory impairment. Thus, it seems that there is no common deficit in the brainstem auditory processing in the different audiogenic lineages that could account for seizure susceptibility.

Recent studies have tried to establish correlations between ABR wave amplitude and pathologies such as tinnitus and hyperacusis in a growing effort to find objective markers for these diseases (Lowe and Walton, 2015). In a recent review, Auerbach et al. (2014) analyzed the role of auditory gain in tinnitus and hyperacusis, as a measure of the ratio between waves I and V indicating the amount of sensory information that is transmitted to rostral regions, such as the auditory cortex (Schrode et al., 2018). In audiogenic mice, the auditory gain is somehow enhanced and adapts to high-intensity noise exposure leading to the increase in neuronal activity in auditory processors (Auerbach et al., 2014; Milloy et al., 2017). However, in our study we did not find differences in the auditory gain.

Considering that audiogenic seizure circuitry includes structures

that mediate sensorimotor gating in the brainstem, such as the inferior and superior colliculus, we also checked whether ASR and PPI were different in WARs. Our results show that WARs have smaller ASR and increased sensitivity to prepulse inhibition of the ASR. These findings contrast with previous data observed for Wistar Albino Glaxo/Rij-rat (WAG/Rij), a model of absence and audiogenic seizures, as well as data obtained from GEPR-3 where PPI is impaired (Celikyurt et al., 2012; Aguilar et al., 2018), but agree with data obtained for Fragile-X mice which are highly responsive to PPI (Chen and Toth, 2001). Fragile-X mice are transgenic mice with a deletion of the gene *fmr-1* that leads to fragile-X syndrome and audiogenic seizures. Like WARs, these animals have decreased acoustic startle reflex and have increased PPI (Chen and Toth, 2001). Interestingly, the expression of the non-coding RNA sequence of the gene *fmr-1*, BC1, is decreased in the hippocampus of WARs after audiogenic kindling, but not in naïve animals (Gitaí et al., 2011). Since BC1 is a suppressor of the FMRP, it is possible that AuK-induced decrease in the expression of this protein, turns WARs in some respects similar to the fragile-X mice.

Audiogenic kindling refers to the change in behavioral and electroencephalographic patterns of audiogenic seizures due to the spread of epileptiform activity to limbic areas during the repetition of audiogenic stimulus (Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Garcia-Cairasco et al., 1996; Dutra Moraes et al., 2000; Romcy-Pereira and Garcia-Cairasco, 2003; Galvis-Alonso et al., 2004; Vinogradova, 2015). In this case, limbic structures such as the amygdala and the hippocampus become more and more hyperactivated due to the massive inputs from auditory pathways. Audiogenic kindling is not yet fully understood, but some reports reveal alterations in amygdala, hippocampus and auditory cortex (Evans et al., 1994; Garcia-Cairasco et al., 1996; Simler et al., 1999; Cunha et al., 2018), as well as in the inferior colliculus (N'Gouemo and Faingold, 1996). The circuits involved in PPI include not only midbrain but also forebrain structures, most remarkably the auditory cortex. In fact, knockout mice for *fmr-1* gene, as well as humans with fragile-X syndrome show excessive neuronal activity in the auditory cortex (Contractor et al., 2015). Interestingly, while *fmr-1* mice are hyperresponsive to PPI, fragile-X patients are hyporesponsive to PPI (Frankland et al., 2004). It is thought that the inhibition of ASR in the PPI paradigm, starts as prepulse triggers sensory processing in forebrain structures, which consequently inhibit reticulo-pontine pathways that mediate the ASR (Chen and Toth, 2001). Therefore, PPI is a reliable measurement or reactivity of forebrain auditory processors.

Several studies on auditory research use male and female rodents. We used female individuals due to the more restricted availability of males and because audiogenic seizures severity in male and female WARs are similar in our experiments and elsewhere (Doretto et al., 2003; Guedes et al., 2005). In a study using 40 strains of mice, only two strains showed sex differences in PPI, C57 BR/cdJ and SPRET/Ej with stronger startle responses observed for females (Williot et al., 2003). Nevertheless, we decided to monitor the estrous cycle in our experimental groups in order to know if there is a relationship between estrogenic phases and seizures, but we found no differences for any of the analyzed parameters that could be related to the estrous cycle phases (S2).

Our findings show that WARs have alterations in the hearing threshold and ABR waves that could be related to the susceptibility to audiogenic seizures in this strain, despite different alterations have been reported in other audiogenic strains. WARs also have differences in sensory motor gating, measured as an increased PPI in comparison with seizure-resistant animals which are similar with the *fmrp*^{-/-} mice. However, brainstem seizure severity or seizure spread during the limbic recruitment of audiogenic kindling do not appear to be correlated to these alterations. In this point, it should be noted that we cannot rule out the effect of a small number of animals in our correlation analysis.

Since the audiogenic phenotype depends on hyperexcitable circuits

that occur in many different species of animals, we can consider these models as a real representation of epileptic circuits (Forcelli and Gale, 2014). Consequently, more and more studies that focus on the investigation of behavioral, electrophysiological, cellular and molecular integrated alterations that are present in genetic models with epileptic phenotypes, should help in the understanding of complex epilepsy mechanisms and would certainly aid in the search for treatment strategies and tools, to provide a better quality of life for millions of patients with epilepsy worldwide.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA-FMRP-USP; protocol #103/2018) following the rules of the Brazilian National Council for Animal Experimentation (CONCEA). Animals were inbred and raised in the Central Animal Housing Facility at the University of São Paulo in Ribeirão Preto.

WAR colony is managed according to Doretto et al., (2003). Briefly, animals are continuously screened for audiogenic susceptibility in response to three broadband (1–16 kHz) high-intensity sound stimulus (110 dB), for one minute or until tonic clonic seizures. Only animals with high seizure scores are used to mate. In this study, we used only female WARs (n = 7, 60–80 days) due to the small number of animals in the colony. As controls, we used seizure resistant Wistar females (n = 7, 60–80 days, for both strains). Rats were kept in Plexiglas cages (2–3 animals per cage), food and water ad libitum, 12-h dark/light cycle (lights on at 7:00 a. m.) and controlled temperature (22 °C). We used the same rats in all experiments. Although there is an increasing number of articles showing that variability in females is not as high as it was assumed (Shansky, 2019), we monitored estrous cycle during the experiments.

4.2. Auditory brainstem responses – ABR

Before experiments, system was calibrated in the closed field configuration. Briefly, we connected one end of a 10-cm PVC tube (1/8" outside diameter) to the Multi-Field Magnetic Speaker (Tucker Davis Technology, USA) and the other end of the tube to a 1/4" free-field, polarized 377C01 microphone and 426B03 preamplifier (PCB Piezotronics, USA) using an ear insert adapter as coupler. The microphone was connected to a sensor signal conditioner (PCB Piezotronics, USA) which in turn was connected to the RZ6 multi-processor (Tucker Davis Technology, USA). Stimulus levels were calibrated from 3 kHz to 33 kHz. We used an inline filter connected to the speaker in order to reduce the high speaker's output at low frequencies.

On the day of the experiments, animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (60 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, i.p.). Ears were previously examined for signs of inflammation and infection and only healthy animals were used. The animals were laid on a heating pad placed inside an acoustically and electrically isolated stimulation chamber. The PVC tube was inserted inside each ear using an ear insert adapter, and the other end was connected to the speaker. Three subcutaneous needle electrodes (impedance ≈ 1 kΩ) were placed in the head of the animals as follows: a reference electrode, at the earlobe ipsilateral to stimulus; a ground electrode at the earlobe contralateral to stimulus; a recording electrode at the vertex of the head. Electrodes were connected to the RA4PA Medusa preamplifier (Tucker Davis Technology, USA) which in turn was connected to the RZ6 multi-processor via an optic fiber (Tucker Davis Technology, USA). Data were acquired with the aid of BioSigRZ software (sampling rate 25 kHz) (Tucker Davis Technology, USA) run by a high-performance computer workstation (Tucker Davis Technology, USA).

A 0.1 ms, single-channel mono-phasic click was presented at a rate

of 21/s with decreasing amplitudes (from 90 to 20 dB SPL, steps of 10 dB). Next, we delivered five millisecond, single-channel cosine-squared gated tones (2 ms rise/fall time) presented at 21 Hz in the following frequencies: 4 Hz, 8 Hz, 16, 24 and 32 kHz. For each frequency, the tone level varied from 90 dB SPL to 30 dB SPL in 10 dB decrements. With each successive presentation, the tone phase was alternated from 90 to 270 degrees to reduce artifacts.

For both, clicks and tones, software averaged 512 neural responses to each stimulus presentation. Gain was set in 20 and data was band-pass filtered from 0.3 to 3 kHz and stored for offline analysis. The amplitude and the latency to peak were measured manually. The auditory gain was estimated as the ratio of the amplitudes of wave I/wave V. The waves were identified reflecting the evoked potential in auditory brain structures according to Alvarado et al. (2012). Hearing threshold was considered as the lowest intensity level at which sound stimulus was presented and any wave peak could be recognized by two experimenters. The peak-to-valley amplitude and the latency to peak for each wave (I–V) were measured manually by two experimenters. The inter-rater reliability was calculated with a Person correlation between values for amplitudes and latency scored by experimenters. In this case, we found high Pearson correlation coefficients for amplitude ($r > 0.93$; $p > 0.0001$) and for frequency ($r > 0.96$; $p < 0.0001$) between data obtained for experimenters. Finally, the auditory gain was estimated as the ratio of the amplitudes of wave V/wave I (Schaette and McAlpine, 2011; Mehraei et al., 2016).

4.3. Acoustic startle reflex (ASR) and Pre-pulse inhibition

For ASR, rats were placed into a ventilated chamber containing a cylindrical animal enclosure mounted on a plexiglass base under which it was a piezoelectric accelerometer that transduce body startle responses into changes in electrical potential, reported in millivolts (0–5000 mV) (SR-Lab Startle Reflex System; San Diego Instruments, USA). Each day, the system was calibrated using a standardization unit attached to the animal enclosure to assure that movement baseline response was the same for all animals. The pre-pulse noise burst, and the acoustic startle stimuli were generated by Tapaze AM10 integrated amplifier (Cambridge Audio, England) and presented by a speaker 20 cm above the animal. The sound pressure levels were calibrated using a sound level meter (Extech instrument) with a condenser microphone placed at the position where the enclosure would be during the test.

Immediately before experiments, we weighted the animals to avoid bias to the ASR measurements and since we did not find any differences between groups, we did not correct ASR by weight (Wistar = 152 ± 5.5 ; WAR = 164 ± 4.7 , $p = 0.15$; Unpaired *t*-test $t = 1.6$, $df = 12$). On the first day, we placed the animals in the silent chamber for a habituation period of 20 min. In the following days, animals were placed in the chamber and after a 5 min acclimation period, 30 trials of the ASR and PPI for each frequency were presented randomly. The inter-trial intervals were randomly set to 8–15 s for each trial. The startle stimulus consisted of a white noise burst with the duration of 50 ms at 120 dB SPL. The background noise inside the box was around 50 dB. For PPI trials, the pre-pulse stimulus consisted of a narrowband white noise, with a duration of 50 ms, centered at 4, 8, 16, 24 kHz (1 kHz bandwidth for each frequency) or white noise at 70 dB which were presented 50 ms before the startle stimulus. We repeated this protocol twice after the 2 days resting period. The maximum peak of the piezoelectric accelerometer output in a 500 ms window from the onset of the startle stimulus was considered the startle amplitude. We measured the latency and amplitude of the maximum peak of the startle response in ASR. PPI responses were calculated considering the initial startle of each animal to avoid interference of individual ASR values. Responses were calculated as $PPI\% = 100 - (100 * ASR_{prepulse} / ASR_{startle\ alone})$, for each animal in order to correct for individual differences in ASR. We also compared the latencies to the maximum

peak of the startle response in WAR and control Wistar rats.

4.4. Audiogenic seizures

After finishing behavioral experiments, we started the audiogenic kindling. Audiogenic seizures were evoked by a high-intensity sound stimulus (broad-band noise from 1 to 16 kHz, at 110 dB) according to Dutra Moraes et al. (2000). We placed the animals in a transparent, sound-proof arena (height: 32 cm; diameter: 30 cm) located inside a sound-proof box with two loudspeakers placed on the top of the arena. After 1 min of acclimation, the sound stimulus was delivered to the animals. The stimulus lasted a maximum of 1 min or it was interrupted in case the animal presented tonic-clonic seizures. After stimulation, we allowed the animals to recover from seizures and returned them to their home cages. We repeated this procedure 21 times, twice a day (from 8 to 10 am and from 16 to 18 pm) in a total of 11 days. All sessions were recorded for offline analysis. Seizures were analyzed and divided in two groups; Brainstem and limbic seizures as previously observed (Garcia-Cairasco et al., 1996; Galvis-Alonso et al., 2004).

Brainstem seizures were scored according to Garcia-Cairasco et al. (1996), with modifications (Rossetti et al., 2006) and limbic seizures were scored according to Racine (1972) (Tables S1 and S2, Supplementary Material). We also estimated the limbic seizure frequency. In this case, we divided the number of sessions when seizures were observed by total stimulation sessions (21 stimuli) minus the session in which we observed the first limbic seizure. The animals were considered kindled when at least three limbic seizures were observed. We used as controls, Wistar females that received the same protocol of high-intensity sound stimulus but did not exhibit seizures. After the end of kindling, animals were euthanized, and brains collected for further analysis.

4.5. Data analysis

Data were compared using *t*-test and repeated measures two-way ANOVAs with adjustments for multiple comparisons with Bonferroni post-test. Additionally, we used Pearson multiple correlations corrected for multiple comparisons with Sidak-Bonferroni. All analyses of variance were performed with GraphPad Prism 8.0 (San Diego, US).

We also performed a power analysis to estimate the effect size, power and minimum number of animals required in each experiment with G*Power software (Faul et al., 2007). In our two-way ANOVAs with 5 repetitions, with $N = 7$ (each group) and power ($1 - \beta$) set to 0.8, we estimated 0.38 for effect size and 1.05 for critical F. For *t*-tests, same N and power we found an effect size of 1.4, which is considered high (Cohen, 1988). For a size effect of 0.5 (medium), we would need 51 animals per group.

Finally, our correlations had power of 0.8 and effect size of 0.85. In this case, Power analysis showed that the required minimum value for 0.8 power and effect size 0.5, would be 23 animals. Although we are aware of limitations, we show the dispersion of data and correlations as it illustrates how variables are related.

Acknowledgement

Authors thank Mr. J. Fernando Aguiar for the excellent technical support.

Funding

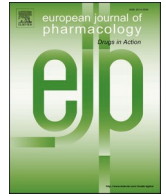
Fundings from FAPESP: grant # 2015/22327-7 (A.O.S.C.) grant # 2016/01607-4 (R.M.L.); grant # 2007/50261-4 and INCT-Translational Medicine grant #2007/50261-4 (N.G.C.). N.M.B. and M.M. hold CNPq PhD student Fellowship. N.G.C., holds a CNPq Research Fellowship. A.O.S.C. holds FAPESP Research Fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146570>.

References

- Aguilar, B.L., Malkova, L., N'Gouemo, P., Forcelli, P.A., 2018. Genetically Epilepsy-Prone Rats Display Anxiety-Like Behaviors and Neuropsychiatric Comorbidities of Epilepsy. *Front. Neurol.*, 27 June 2018.
- Alvarado, J.C., Fuentes-Santamaría, V., Jareño-Flores, T., Blanco, J.L., Juiz, J.M., 2012. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci. Res.* 73 (4), 302–311.
- Auerbach, B., Salvi, R.J., Vianey, P., 2014. Central gain control tinnitus and hyperacusis. *Front. Neurol.* 5 (206), 206.
- Benichou, V., Ferber, A., Hunt, S., Hughes, E., Tollin, D., 2018. Across Species “Natural Ablation” Reveals the Brainstem Source of a Noninvasive Biomarker of Binaural Hearing. *J. Neurosci.* 2018 Oct 3;38(40):8563–8573.
- Celikyurt, I.K., Ulak, G., Mutlu, O., Akar, F.Y., Erden, F., Komsuoglu, S.S., 2012. Lamotrigine effects sensorimotor gating in WAG/Rij rats. *J. Neurosci. Rural Prac.* 3 (2), 126–130.
- Charizopoulou, N., Lelli, A., Schraders, M., Ray, K., Hildebrand, M.S., Ramesh, A., Srisaialapathy, C.R.S., Oostrik, J., Admiraal, R.J.C., Neely, H.R., Latoche, J.R., Smith, R.J.H., Northup, J.K., Kremer, H., Holt, J.R., Noben-Trauth, K., 2011. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nat. Commun.* 15 (2), 201.
- Chen, L., Toth, M., 2001. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. *Neuroscience* 103 (4), 1043–1050.
- Cohen, J., 1988. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Routledge Academic, New York, NY.
- Coleman, J.R., Ross, K.C., Mullaney, M.M., Cooper, W.A., 1999. Latency alterations of the auditory brainstem response in audiogenic seizure-prone long-evans rats. *Epilepsy Res.* 33, 31–38.
- Contractor, A., Klyachko, V.A., Portera-Cailliau, C., 2015. Altered neuronal and circuit excitability in fragile X syndrome. *Neuron* 87 (4), 699–715.
- Cunha, A.O.S., Ceballos, C.C., de Deus, J.L., Pena, R.F.O., Oliveira, J.A.C., Roque, A.C., Garcia-Cairasco, N., Leão, R.M., 2018. Intrinsic and synaptic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons of the wistar audiogenic rat (WAR) strain, a genetic model of epilepsy. *Sci. Rep.* 8, 10412.
- Doretto, M.C., Fonseca, C.G., Lôbo, R.B., Terra, V.C., Oliveira, J.A.C., Garcia-Cairasco, N., 2003. Quantitative study of the response to genetic selection of the wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav. Genet.* 33, 33–42.
- Dutra Moraes, M.F., Galvis-Alonso, O., Garcia-Cairasco, N., 2000. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res.* 39, 251–259.
- Evans, M.S., Viola-McCabe, K.E., Caspary, D.M., Faingold, C.L., 1994. Loss of synaptic inhibition during repetitive stimulation in genetically epilepsy-prone rats (GEPR). *Epilepsy Res.* 18, 97–105.
- Faingold, C.L., 1988. The genetically epilepsy-prone rat. *Gen. Pharmacol.* 16, 91–99.
- Faingold, C.L., Walsh, E.J., Maxwell, J.K., Randall, M.E., 1990. Audiogenic seizure severity and hearing deficits in the Genetically Epilepsy-Prone Rat. *Exp. Neurol.* 108, 55–60.
- Faingold, C.L., 2012. Reticulo-Cortical synchronization in generalized convulsive seizures. *Jasper's Basic Mechanisms of the epilepsies*. 4th Edition 2012.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., Buchner, A., 2007. *G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences*. *Behav. Res. Methods* 39 (2), 175–191.
- Forcelli, P.A. & Gale, K., 2014. Brain Circuits Responsible for Seizure Generation, Propagation, and Control: Insights from Preclinical Research. In book: *Epilepsy Topics*. doi: 10.5772/58584.
- Frankland, P.W., Wang, Y., Rosner, B., Shimizu, T., Balleine, B.W., Dykens, E.M., Ornitz, E.M., Silva, A.J., 2004. Sensorimotor gating abnormalities in young males with fragile X syndrome and Fmr1-knockout mice. *Mol. Psychiatry* 9, 417–425.
- Galvis-Alonso, O.Y., Cortes De Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N., 2004. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 125, 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.042>.
- Garcia-Cairasco, N., Wakamatsu, H., Oliveira, J.A.C., Gomes, E.L.T., Del Bel, E.A., Mello, L.E.A.M., 1996. 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.
- Garcia-Cairasco, N., 2002. 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.
- Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E.H.L., Cortes de Oliveira, J.A., 2017. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: history and perspectives. *Epilepsy Behav.* 71, 250–273.
- Gitaf, D.L., Fachin, A.L., Mello, S.S., Elias, C.F., Bittencourt, J.C., Leite, J.P., Passos, G.A., Garcia-Cairasco, N., Paçó-Larson, M.L., 2011. The non-coding RNA BC1 is down-regulated in the hippocampus of Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain after audiogenic kindling. *Brain Res.* 1367, 114–121.
- Glenn, D.W., Brown, R.D., Jobe, P.C., Penny, J.E., 1980. A comparison of cochlear microphonics and N1 in audiogenic-seizure-susceptible and control rats. *Neurol. Res.* 2, 85–100.
- Guedes, R.C.A., Oliveira, J.A.C., Amâncio-dos-Santos, A., Garcia-Cairasco, N., 2005. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). *Epilepsy Res.* 83, 207–214.
- Löscher, W., 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20 (5), 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>.
- Lowe, A.S., Walton, J.P., 2015. Alterations in peripheral and central components of the auditory brainstem response: a neural assay of tinnitus. *Plos One* 10 (2), e0117228.
- Lowrie, M., Bessant, C., Harvey, R.J., Sparkes, A., Garosi, L., 2015. Audiogenic reflex seizures in cats. *J. Feline Med. Surg.* 1–9.
- Marescaux, C., Vergnes, M., Kiesmann, M., Depaulis, A., Micheletti, G., Warter, J.M., 1987. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. *Exp. Neurol.* 97 (1), 160–168.
- Mehraei, G., Hickox, A.E., Bharadwaj, H.M., Goldberg, H., Verhulst, S., Liberman, M.C., Shinn-Cunningham, B.G., 2016. Auditory Brainstem Response Latency in Noise as a Marker of Cochlear Synaptopathy. *J. Neurosci.* 36 (13), 3755–3764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4460-15.2016>.
- Melcher, J.R., Kiang, N.Y., 1996. Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. III: Identified cell populations. *Hear. Res.* 93 (1–2), 52–71.
- Milloy, V., Fournier, P., Benoit, D., Noreña, A., Koravand, A., 2017. Auditory brainstem responses in tinnitus: a review of who, how, and what? *Front. Aging Neurosci.* 9, 237.
- Moraes, M.F.D., Chavali, M., Mishra, P.K., Jobe, P.C., Garcia-Cairasco, N., 2005. A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures in GEPR-9s. *Brain Res.* 1033, 1–12.
- Muñoz, L.J., Carballosa-Gautam, M.M., Yanowsky, K., García-Atarés, N., López, D.E., 2017. The genetic audiogenic seizure hamster from salamanca: the GASH: sal. *Epilepsy Behav.* 71 (Pt B), 181–192.
- Naritoku, D.K., Mecozzi, L.B., Aiello, M.T., Faingold, C.L., 1992. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp. Neurol.* 115 (3), 317–324.
- N'Gouemo, P., Faingold, C.L., 1996. Repetitive audiogenic seizures cause an increased acoustic response in inferior colliculus neurons and additional convulsive behaviors in the genetically-epilepsy prone rat. *Brain Res.* 710, 92–96.
- N'Gouemo, P., Garcia-Cairasco, N., Faingold, C.L., 2014. Physiological and Pathophysiological Expansion of Neuronal Networks. *Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics*, first ed. Elsevier, London, pp. 375–385.
- Parham, K., Sun, X-M., Kim, D.O., 2001. Noninvasive assessment of auditory function in mice: Auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emission. *Handbook of Mouse Auditory Research: From Behavior to Molecular Biology*: pp. 37–58.
- Poletaeva, I.I., Surina, N.M., Kostina, Z.A., Perepelkina, O.V., Fedotova, I.B., 2017. The Krushinsky-Molodkina rat strain: the study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav.* 71, 130–141.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32 (3), 281–294.
- Ramani, V., 1991. Audiogenic epilepsy induced by a specific television performer. *N. Engl. J. Med.* 325, 134–135.
- 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 (2), 533–546.
- Ross, K.C., Coleman, J.R., 2000. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 639–653.
- Rossetti, F., Rodrigues, M.C.A., Oliveira, J.A.C., Garcia-Cairasco, N., 2006. EEG wavelet analyses of the striatum–substantia nigra pars reticulata–superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 72 (2–3), 192–208.
- Saunders, J.C., Bock, G.R., Chen, C., Gates, R., 1972. The effects of priming behavioral for audiogenic responses seizures in BALB/c on mice cochlear. *Exp. Neurol.* 36, 426–436.
- Schaette, R., McAlpine, D., 2011. Tinnitus with a normal audiogram: physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J. Neurosci.* 31 (38), 13452–13457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2156-11.2011>.
- Schrode, K.M., Muniak, M.A., Kim, Y.H., Lauer, A.M., 2018. Central Compensation in Auditory Brainstem after Damaging Noise Exposure. *eNeuro.* 17;5(4) ENEURO.0250-18.2018.
- Shansky, R.M., 2019. Are hormones “a female problem” for animal research? *Science* 364 (6443), 825–826.
- Simler, S., Hirsch, E., Danober, L., Motte, J., Vergnes, M., Marescaux, C., 1994. C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* 175, 58–62.
- Simler, S., Vergnes, M., Marescaux, C., 1999. Spatial and temporal relationships between C-Fos expression and kindling of audiogenic seizures in Wistar rats. *Exp. Neurol.* 157, 106–119.
- Valsamis, B., Schmid, S., 2011. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. *J. Vis. Exp.* 55, e3446.
- Vinogradova, L.V., Vinogradov, V.Y., Kuznetsova, G.D., 2006. Unilateral cortical spreading depression is an early marker of audiogenic kindling in awake rats. *Epilepsy Res.* 71 (1), 64–75.
- Vinogradova, L.V., 2015. Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *Epilepsy Behav.* 71 (Pt B), 142–153.
- Williot, J.F., Tanner, L., O'Steen, J., Johnson, K.R., Bogue, M.A., Gangnon, L., 2003. Acoustic startle and prepulse inhibition in 40 inbred strains of mice. *Behav. Neurosci.* 117 (4), 716–727.
- Young, E.D., Oertel, D., 2003. The Cochlear Nucleus. In: *Synaptic Organization of the Brain*, GM Shepherd editor, Oxford University Press, NY, Chapter 4, pp. 125–163.



Salicylate activates K_{ATP} channels and reduces spontaneous firing in glycinergic cartwheel neurons in the dorsal cochlear nucleus of rats

Daniela Vanessa F. de Siqueira, Paulo S. Strazza Jr.¹, Nikollas M. Benites, Ricardo M. Leão*

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Salicylate
 K_{ATP} channels
 Dorsal cochlear nucleus
 Glycinergic neuron
 Tinnitus

ABSTRACT

High doses of salicylate induce tinnitus in humans and experimental animals. The Dorsal Cochlear Nucleus is implicated with the genesis of tinnitus, and increased activity in this nucleus is seen in animal models of tinnitus. Incubation of brainstem slices containing the DCN with millimolar salicylate reduces the spontaneous firing of glycinergic cartwheel neurons and glycinergic neurotransmission on fusiform neurons, the principal neuron of this nucleus. However, the mechanism of salicylate mediating this effect is not known. Recently, we have shown that K_{ATP} channels strongly modulate the spontaneous firing of cartwheel neurons. We tested if K_{ATP} channels could mediate the effects of salicylate on cartwheel neurons. Perfusion of 1.4 mM salicylate hyperpolarizes the membrane of cartwheel neurons and stops firing. Salicylate produces an outward current similar to the K_{ATP} current seen in quiet cartwheel neurons. Activation of this current is occluded by the K_{ATP} agonist diazoxide, which is produced by the opening of K_{ATP} channels. The antagonist of AMP-kinase (AMPK), dorsomorphin, inhibited salicylate effects, suggesting that they could be mediated by activation of this kinase. Still, the AMPK agonist, AICAR, did not reproduce salicylate effects but occluded them. Additionally, inhibiting mitochondrial ATP synthesis with the protonophore CCCP reproduced, albeit with less efficacy, and inhibited the effects of salicylate. We concluded that salicylate in millimolar concentrations opens K_{ATP} channels in DCN cartwheel neurons, inhibiting spontaneous firing of these neurons, probably by activating AMPK and reducing mitochondrial ATP synthesis.

1. Introduction

Tinnitus is the perception of a non-existent sound in the form of constant noise. Its most prevalent cause is hearing loss, but pharmacological agents also can induce tinnitus (Eggermont and Roberts, 2004). High doses of sodium salicylate have been used as a practical model of rapidly generating tinnitus in experimental animals (Eggermont and Roberts, 2004; Hayes et al., 2014; Stolzberg et al., 2012). It is postulated that salicylate induces tinnitus mainly by acting on central auditory structures like the dorsal cochlear nucleus (DCN), inferior colliculus (IC), auditory cortex (AC), and medial genicular body (Holt et al., 2010; Jastreboff and Sasaki, 1986; Namikawa et al., 2017; Santos et al., 2017; Stolzberg et al., 2012; Su et al., 2012; Zhang et al., 2011).

The dorsal cochlear nucleus is one of the subdivisions of the cochlear nucleus implicated in detecting the vertical source of the sound (Oertel and Young, 2004). Notably, the DCN is implicated with the genesis of tinnitus. Bilateral ablation of the DCN in mice prevented the

development of tinnitus following acoustic trauma without influencing already established tinnitus (Brozoski et al., 2012; Brozoski and Bauer, 2005). In animal models of tinnitus, the *in vivo* firing of the primary excitatory neuron of the DCN, the fusiform neuron, is increased (Brozoski et al., 2002; Gao et al., 2016), and this hyperactivity is correlated with tinnitus (Eggermont and Roberts, 2004; Kaltenbach and Godfrey, 2008). Incubation of millimolar concentrations of salicylate to brainstem slices does not affect the firing of the fusiform neuron but decreases the spontaneous inhibitory neurotransmission on the fusiform neurons and reduces the spontaneous firing of the cartwheel (CW) neuron, a glycinergic interneuron of the DCN (Zugaib et al., 2016), which is the primary inhibitory source of the fusiform neuron (Oertel and Young, 2004). However, the mechanisms of salicylate in inhibiting the firing of CW neurons are not known.

Most CW neurons present spontaneous firing (Kim and Trussell, 2007; Strazza et al., 2021). We recently have shown that ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels control the membrane potential of CW

* Corresponding author. Departamento de Fisiologia, FMRP-USP, Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil.

E-mail address: leor@fmrp.usp.br (R.M. Leão).

¹ Present address: Vollum Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR.

neurons. CW neurons that do not fire spontaneously have open K_{ATP} channels and start firing spontaneously when the K_{ATP} channels are inhibited by channel antagonist, tolbutamide (Strazza et al., 2021). Moreover, inhibition of K_{ATP} channels increases spontaneous glycinergic IPSCs on fusiform neurons, while activation of these channels by diazoxide inhibits it (Strazza et al., 2021).

Because millimolar concentrations of salicylate uncouple the production of ATP by the mitochondria (Smith et al., 2016) and activate the AMP-kinase (AMPK) (Steinberg et al., 2013), which can activate K_{ATP} channels (Lang and Föllner, 2014; Wu et al., 2017), we hypothesized that salicylate is decreasing the spontaneous firing of cartwheel neurons by activating K_{ATP} channels, and thus reducing inhibition on fusiform neurons. To this end, we incubated and perfused brainstem slices containing the DCN with millimolar concentrations of salicylate and found that it strongly hyperpolarizes CW neurons by opening K_{ATP} channels, probably by uncoupling mitochondrial ATP production and activating AMPK.

2. Methods

2.1. Animals and preparation of slices

Male Wistar rats (p18-22) were obtained from the Central Animal Facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto. All protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA) under protocol 007/2021. Animals were maintained in the rat facility of the Department of Physiology of the School of Medicine of Ribeirão Preto in an acclimatized room (21–22 °C) with a dark/light cycle of 12 h and water and food *ad libitum*. We used 46 animals, with an average of 4.6 animals per group, ranging from 3 to 12 animals per group (median of 4 animals per group).

Rats were killed by decapitation after isoflurane anesthesia. The brainstems removed and placed in ice-cold solution whose composition in mM was: NaCl (87), NaHCO_3 (25), KCl (2.5), NaH_2PO_4 (1.25), CaCl_2 (0.5), MgCl_2 (7), glucose (25), sucrose (75), 335 mosm/kg H_2O , pH 7.4 when bubbled with a carbogenic mixture (95% O_2 and 5% CO_2). Before removing the brainstem, the vestibulocochlear nerve (VIII cranial nerve) was cut to prevent damage to the DCN. Coronal slices (200 μm thick) were obtained on a Compressome (V300-AZ, Precisionary Instruments) and incubated at 35 °C for 45 min and subsequently at room temperature in recording solution (artificial cerebrospinal fluid - aCSF), whose composition in mM was: NaCl (125), KCl (2.5), NaHCO_3 (25), NaH_2PO_4 (1.25), glucose (10), CaCl_2 (2), MgCl_2 (1), 305 mOsm/kg H_2O , pH 7.4 when bubbled with a carbogenic mixture (95% O_2 and 5% CO_2). Neurons were visualized on a microscope (Olympus BX51WI) equipped with IR-DIC optics and an infrared-sensitive camera (Retiga, 2000R, QImaging). The slices were continuously perfused (1 ml/min) with recording aCSF (kept at 33–35 °C with an inline heater (Warner Instruments)).

2.2. Electrophysiology

Electrophysiological recordings were performed in whole-cell patch-clamp using an EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik) or with a Multi-clamp700B connected to a Digidata 1440A AD/DA converter board (Molecular Devices), in voltage-clamp and current-clamp mode. Borosilicate recording electrodes (BF-150-86-10, Sutter Instruments) were pulled with a horizontal puller (P87-Sutter instruments) and backfilled with an internal solution containing (in mM): potassium gluconate (130), EGTA (0.1), HEPES (10), KCl (20), ATP-Mg (2), GTP-Na (0.2), phosphocreatine-Na (10); 305–310 mOsm/kg H_2O , pH 7.3 adjusted with KOH, resulting in a tip resistance of 3–6 M Ω . CW neurons were identified by their location in the molecular layer and by the presence of compound action potentials (complex spikes) (Kim and Trussell, 2007). Only cells that presented at least one complex spike during a train of action potentials were classified as CW cells.

Voltage-current (VI) relationships were performed by injecting 1000

ms current steps ranging from –300 to 400 pA with 50 pA increments from a membrane potential adjusted to around –80 mV (by applying current as necessary), with intervals between stimuli of 1.5 s. In voltage-clamp experiments, neurons were held at a potential of –65 mV. For IV relationships, 4 s voltage steps from –115 mV to –25 mV were applied in 10 mV increments with an interval of 1.5 s between them.

Uncompensated series resistance was <20 M Ω , and compensation was 50–70%. Data were low-passed (Bessel 8-pole) at 3 kHz and digitized at 10 kHz. A –10 mV junction potential was off-line subtracted.

2.3. Chemicals

All salts were of ACS grade, and all solutions were prepared with ultrapure water. 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX), picrotoxin, strychnine, sodium salicylate, dorsomorphin, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), tolbutamide and diazoxide were from Sigma (St. Louis, MO), carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) and valdecoxib from Tocris (Bristol, UK).

The concentration of salicylate used was 1.4 mM, unless noticed. This concentration is found in the CSF of animals treated with a dose of salicylate efficient in inducing tinnitus in rats (460 mg/kg)(Jastreboff and Sasaki, 1986). For testing the effect of salicylate, sodium salicylate (1.4 mM) was perfused in the slice during the experiment (~1 ml/min). In the experiments shown in Fig. 1, salicylate was incubated with the slices after cutting and in the perfusion solution, being present throughout the whole experiment, as in (Zugaib et al., 2016).

2.4. Data analysis and statistics

Data were analyzed as described in (Strazza et al., 2021) using Igor Pro (WaveMetrics), Clampfit, Microsoft Excel, and Prism 9.0 (Graph-Pad). Data are shown as the mean \pm SEM. Means were compared using two-tailed paired and unpaired Student's t-tests and one-way ANOVA with Fisher's LSD test. Action potential firing was compared with 2-WAY ANOVA with Fisher's LSD test. Proportions were compared with two-sided Fisher's exact test. We used Prism 9.0 for statistical analysis and graphs. Significance levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Incubation with millimolar concentrations of salicylate increase the proportion of quiet CW neurons

We previously have shown that incubation of DCN slices with high doses of salicylate decreased the spontaneous firing of CW neurons, increasing the number of quiet CW neurons (Zugaib et al., 2016). To know the ionic mechanisms underlying this effect, we recorded quiet and active neurons in DCN slices incubated and recorded in the presence of 1.4 mM sodium salicylate as in (Zugaib et al., 2016) and compared their properties with quiet and active neurons in control aCSF solution (control data from Strazza et al., 2021). As seen in (Zugaib et al., 2016), we found an increased proportion of quiet CW neurons in the presence of salicylate (quiet: 44%; active 56%; $n = 50$). This proportion is significantly different compared with previously recorded neurons in control aCSF from our previous report (Strazza et al., 2021)(18.5% quiet and 81.5% active; $n = 135$, $p = 0.0004$; Fig. 1A). The membrane properties of active and quiet neurons in the presence of salicylate were similar to that of control quiet and active neurons in control aCSF (Table 1).

Previously we found that quiet CW neurons were distinguished from spontaneously firing (active) CW neurons by the presence of open K_{ATP} channels (Strazza et al., 2021) and were depolarized by applying the K_{ATP} channel antagonist tolbutamide, which induced spontaneous action potential firing. We then tested if the membrane potential of quiet neurons in the presence of salicylate was sensitive to tolbutamide. We found that the application of tolbutamide depolarized the membrane of

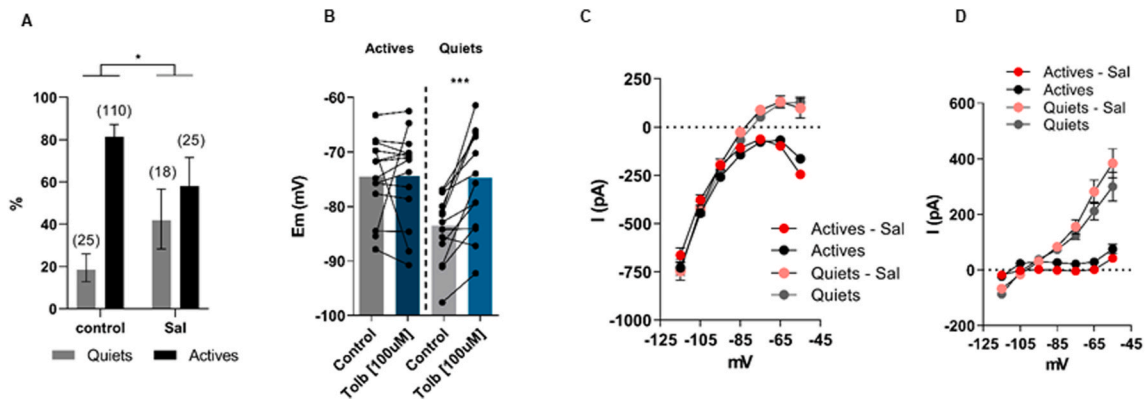


Fig. 1. Salicylate increases the number of quiet neurons by opening K_{ATP} channels. A. proportion of quiet and active cartwheel neurons in control aCSF and in the presence of 1.4 mM sodium salicylate (sample size in parenthesis). B. Membrane potential of active and quiet cartwheel neurons in aCSF in the presence of 1.4 mM sodium salicylate before and after application of tolbutamide. C. IV relationships of quiet and active cartwheel neurons in control aCSF and in aCSF in the presence of 1.4 mM sodium salicylate (same cells as in A). D. Tolbutamide-sensitive currents of quiet and active cartwheel neurons in control aCSF (actives: $n = 15$, quiet: $n = 9$) and in aCSF in the presence of 1.4 mM sodium salicylate (same cells as in B). Data from control neurons (no salicylate) is from [Strazza et al. \(2021\)](#).

Table 1

Membrane properties of quiet and active CW neurons in control conditions and in the presence of salicylate 1.4 mM incubated for at least 1 h. R_{input} = membrane input resistance; mp = membrane potential; AT = activity threshold; tau = membrane time constant; sag = depolarization sag. All parameters were significantly different from active and quiet neurons, but not between control and salicylate neurons. Control data from [\(Strazza et al., 2021\)](#).

	Active		Quiet	
	Control	Salicylate	Control	Salicylate
R_{input} (M Ω)	116.3 \pm 2 (123)	112.4 \pm 3 (28)	86.5 \pm 12(52)	79.25 \pm 3 (22)
mp (mV)	-72.5 \pm 1 (133)	-72.3 \pm 1(28)	-82.9 \pm 0.7 (52)	-84.1 \pm 1 (22)
AT (mV)	-79.9 \pm 0.4 (124)	-82.8 \pm 0.9 (28)	-75.9 \pm 1 (52)	-74.8 \pm 2 (22)
tau (ms)	21.6 \pm 0.5 (121)	20.7 \pm 1 (28)	13.1 \pm 0.5 (52)	11.7 \pm 0.7 (22)
sag (mV)	2.1 \pm 0.1 (120)	2.2 \pm 0.3 (28)	1.3 \pm 0.1 (52)	1.3 \pm 0.1 (22)

most quiet CW neurons (14 out of 17, 82%) (sal: -83.5 ± 1.7 mV, sal + tol: -74.7 ± 2.7 mV, $n = 14$, $p = 0.0002$, 2-way ANOVA, [Fig. 1B](#)), which started firing spontaneously. On the other hand, the active neurons recorded in the presence of salicylate were unaffected by tolbutamide (sal: -74.6 ± 1.9 mV, sal + tol: -74.4 ± 2.3 mV, $n = 14$, $p = 0.9951$, 2-way ANOVA, [Fig. 1B](#)), as active neurons in control aCSF.

We then examined the IV relationships of active and quiet neurons in the presence of salicylate. The IV profile of quiet and active neurons in salicylate was similar to the IV of CW neurons in control aCSF ([Fig. 1C](#)). Our previous work showed that applying tolbutamide in quiet neurons inhibits an outward current similar to currents mediated by K_{ATP} channels ([Strazza et al., 2021](#)). We found that applying tolbutamide in quiet CW neurons incubated with salicylate inhibited a similar outward current than in quiet neurons without salicylate ([Fig. 1D](#)). Also, similar to what we observed in control aCSF, tolbutamide had no effect on active CW neurons from salicylate incubated slices ([Fig. 1D](#)). Our data suggest that incubation with millimolar doses of salicylate increases the proportion of quiet CW neurons by increasing the opening of K_{ATP} channels.

3.2. Perfusion of slices with millimolar salicylate hyperpolarizes active CW neurons and stops spontaneous firing

To better understand the mechanisms of salicylate, we then tested if fast perfusion of salicylate can hyperpolarize the membrane potential of

CW neurons. We found that slice perfusion of aCSF containing 1.4 mM of salicylate stopped spontaneous firing in all 15 active neurons tested (from 11.4 ± 2 Hz to 0.0 ± 0 Hz; $p < 0.001$). The modal membrane potential hyperpolarized -11.9 ± 1.6 mV ($n = 15$, $p < 0.0001$) after salicylate. In 2 quiet neurons, salicylate did not change resting membrane potential (not shown). Salicylate significantly decreased membrane input resistance (201 ± 20 M Ω to 147 ± 13 M Ω , $n = 14$; $p = 0.05$) and reduced membrane time constant of CW neurons (23 ± 2 ms to 15 ± 1 ms, $n = 14$; $p = 0.007$, [Fig. 2C](#) and [D](#)).

Salicylate also reduced firing elicited by depolarizing steps, as shown in [Fig. 3A](#) ($p < 0.0001$; 2-way ANOVA, $n = 14$). Salicylate decreased action potential firing in all current steps, including at rest (0 pA) ($p < 0.001$ for 0 pA and < 0.0001 for all other currents). Accordingly, active CW neurons after salicylate increased their rheobase ([Fig. 3B](#)) and now need injected current to start to fire action potentials. Another parameter related to the firing of action potentials is the activity threshold, which is the potential that needs to be crossed for the start of spontaneous firing and is created by the expression of a sodium persistent current ([Leao et al., 2012](#); [Strazza et al., 2021](#)). Salicylate also increased the activity threshold from -64 ± 1 mV to -58 ± 2 mV ($p = 0.01$; $n = 14$), ([Fig. 3C](#)).

3.3. Perfusion of micromolar concentrations of salicylate or the cyclooxygenase-2 antagonist valdecoxib does not reproduce the effect of salicylate

The effects of salicylate in inducing tinnitus are observed with high doses producing millimolar concentrations in the CSF of experimental animals ([Jastreboff and Sasaki, 1986](#)). Besides, the effects of salicylate on the depolarization suppression of excitation in CW neurons are seen only with millimolar concentrations of salicylate ([Zugaib and Leao, 2018](#)). We then tested if perfusion of micromolar concentrations of salicylate would reproduce the effects of 1.4 mM salicylate. We found that salicylate at $140 \mu\text{M}$ failed to hyperpolarize CW neurons (control: -54.6 ± 2.9 mV; salicylate: -54.9 ± 2.2 mV; $n = 7$; $p = 0.94$) and to stop spontaneous firing (control: 18.3 ± 3.7 Hz; salicylate: 15.4 ± 3.1 Hz; $n = 7$; $p = 0.2$) ([Fig. 4A](#) and [B](#)) showing that this drug is effective in hyperpolarizing CW neurons only in millimolar concentrations. Interestingly, micromolar salicylate inhibited evoked action potential firing of CW neurons, but only in response to 80 pA current or more ($p < 0.001$; [Fig. 4C](#)).

This lack of effectiveness of micromolar concentrations suggests that salicylate is not acting via its traditional mechanisms, inhibiting the enzyme cyclooxygenase-2 ([Higgs et al., 1987](#)). We then applied the specific cyclooxygenase-2 valdecoxib ($10 \mu\text{M}$) to test this hypothesis.

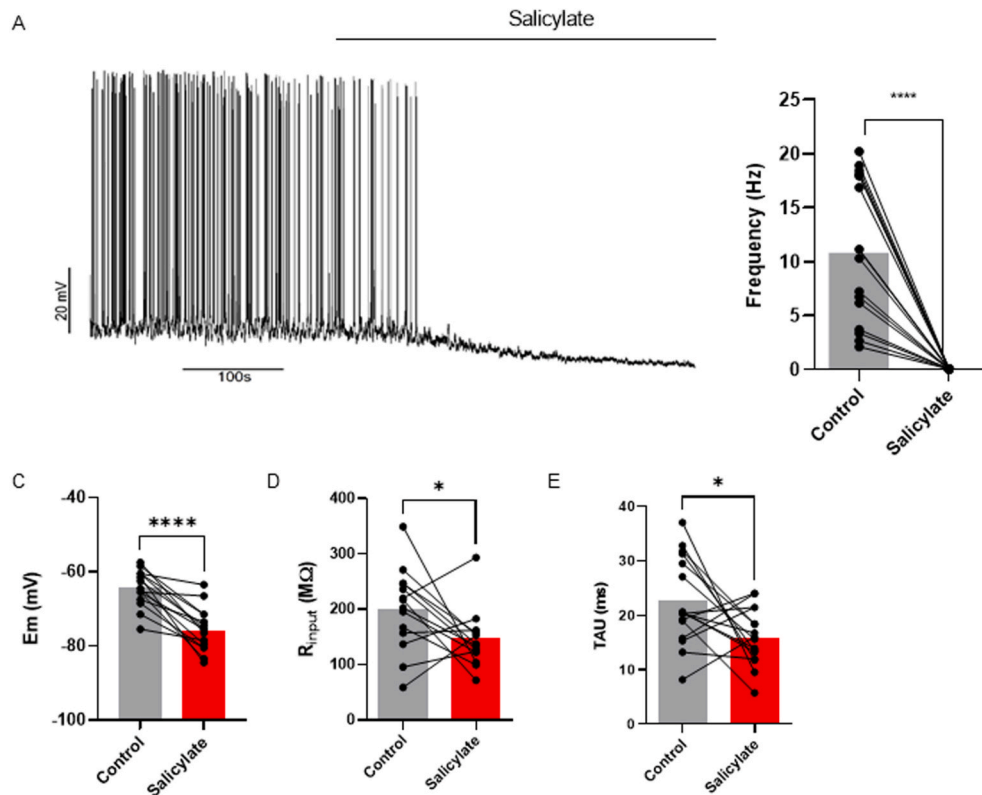


Fig. 2. Effect of perfusion of salicylate. A. Representative recording of spontaneous action potential firing from a cartwheel neuron before and during perfusion of sodium salicylate 1.4 mM. B. Summary of the effect of salicylate on spontaneous firing. C. Summary of the effect of salicylate on the modal membrane potential. D. Summary of the effect of salicylate on the membrane input resistance. E. Summary of the effect of salicylate on the membrane time constant.

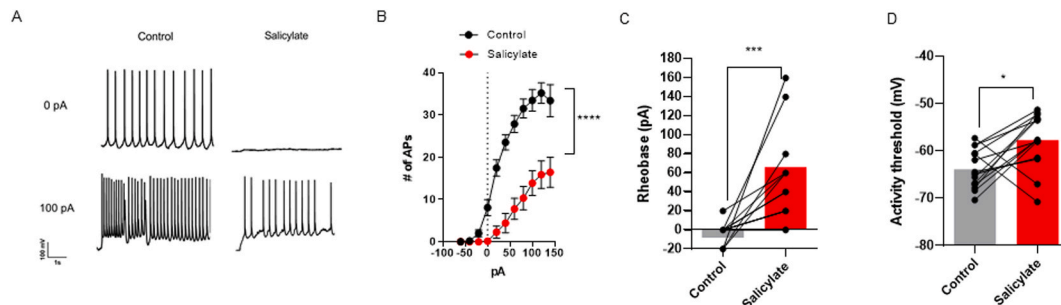


Fig. 3. Effects of salicylate on evoked firing. A. Examples of action potential firing in response to 0 and 100 pA current injection in a cartwheel neuron before and after perfusion of sodium salicylate. B. Firing curve of cartwheel neurons before and after perfusion of salicylate. C. Rheobase before and after salicylate. D. Activity threshold before and after salicylate.

Perfusion of valdecoxib did not inhibit spontaneous firing (control: 5.9 ± 1.4 Hz; valdecoxib: 5.9 ± 1.7 Hz; $n = 7$; $p = 0.9$) but depolarized the median membrane potential (from -72.7 ± 2.7 mV to -67.9 ± 2.5 mV; $p = 0.006$; $n = 7$; Fig. 4D and E) and slightly decreased firing in response to depolarizing currents (Fig. 4F; $p = 0.02$). We conclude that salicylate is not acting by inhibiting cyclooxygenase-2, and it is effective in hyperpolarizing CW neurons only in millimolar concentrations.

3.4. Perfusion of slices with millimolar salicylate activates K_{ATP} channels in active CW neurons

We then tested if the activation of K_{ATP} channels caused the effect of salicylate. Application of 1.4 mM salicylate induced an outward current above the reversal potential of potassium in active CW neurons (Fig. 5A and B) (I at -55 mV: control: -80 ± 33 pA; salicylate: 112 ± 25 pA, $p < 0.0001$, $n = 13$; Fig. 5C), an effect similar to the previously observed

effect of diazoxide, a K_{ATP} channel agonist (Strazza et al., 2021).

We previously perfused the slices with diazoxide and then salicylate to test the hypothesis that salicylate is activating K_{ATP} channels. Accordingly, diazoxide hyperpolarized the membrane potential, decreased membrane input resistance and time constant, and inhibited spontaneous firing. Salicylate after diazoxide did not hyperpolarize further the membrane potential and even slightly depolarized it, but the membrane potential was still significantly more hyperpolarized than in the control situation (Control: -65 ± 1 mV; Diazoxide: -81 ± 2 mV; Diaz + Sal: -74 ± 2 mV; $n = 8$, $p < 0.0001$; Fig. 6A). Membrane input resistance (Control: 276 ± 40 M Ω ; Diazoxide: 140 ± 8 M Ω ; Diaz + Sal: 170 ± 20 M Ω , $n = 8$; $p = 0.004$; Fig. 6B) and membrane time constant were not affected by salicylate after diazoxide (Control: 22 ± 2 ms; Diazoxide: 13 ± 1 ms; Diaz + Sal: 15 ± 2 ms; $n = 8$; $p = 0.04$; Fig. 6C), neither spontaneous firing (Fig. 6D: $n = 8$; $p = 0.002$). Additionally, diazoxide reduced evoked firing of CW neurons but occluded the effect

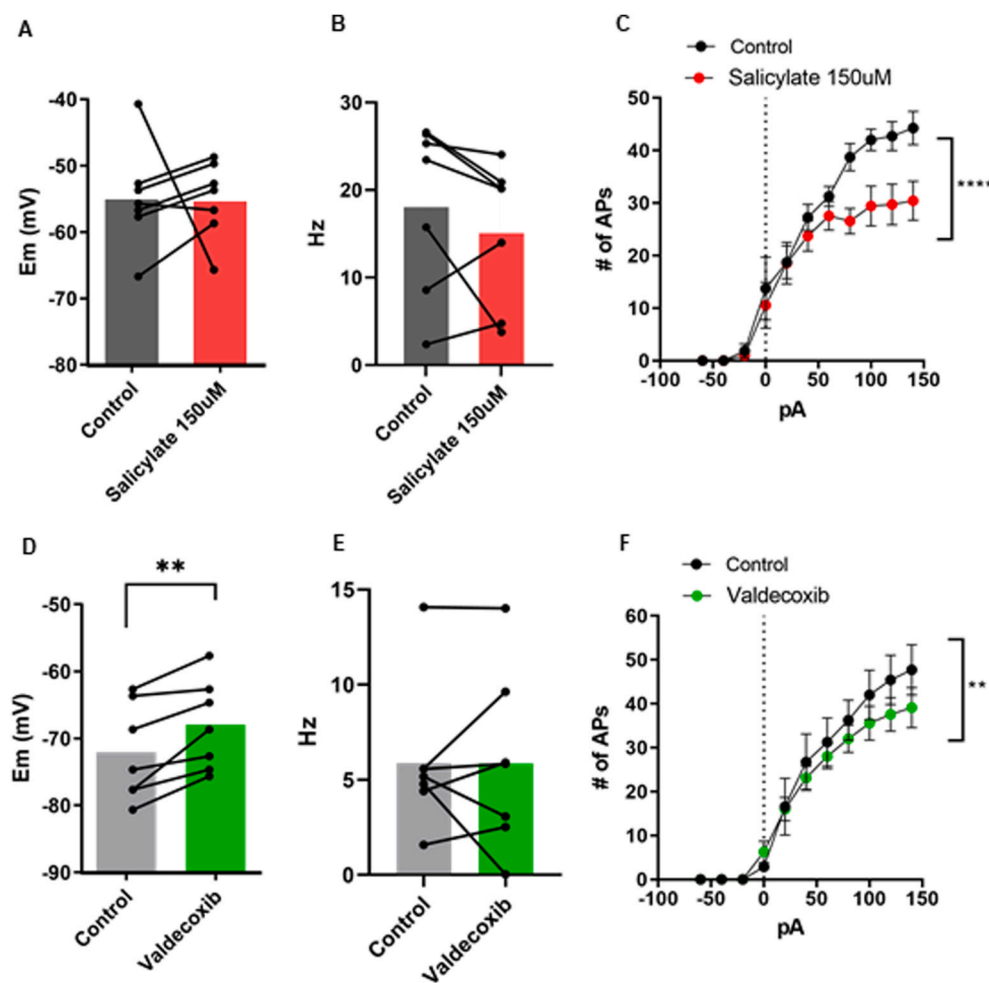


Fig. 4. Micromolar salicylate and valdecoxib do not mimic the effects of millimolar salicylate. A. Summary of the effect of 150 μ M salicylate on the modal membrane potential. B. Summary of the effect of 150 μ M salicylate on spontaneous firing. C. Firing curve of cartwheel neurons before and after perfusion of 150 μ M salicylate. D. Summary of the effect of 10 μ M of valdecoxib on the modal membrane potential. E. Summary of the effect of 10 μ M of valdecoxib on spontaneous firing. F. Firing curve of cartwheel neurons before and after perfusion of valdecoxib.

of salicylate (Fig. 6E).

Comparing the IV relationships of the CW neurons, we found that, accordingly to previous observation (Strazza et al., 2021), diazoxide induced an outward current above the reversal potential of potassium, similar to the current induced by salicylate. Perfusion of salicylate on top of diazoxide did not change the IV relationship (Fig. 6E). The current at -55 mV changed to an outward current after diazoxide, but the further application of salicylate did not change this current (Fig. 6F). These results strongly suggest that millimolar salicylate activates K_{ATP} channels in CW neurons.

3.5. AMPK inhibition blocks salicylate effects, but activation of AMPK does not reproduce salicylate effects

Salicylate in millimolar concentrations is an inhibitor of AMPK. We tested if salicylate is activating K_{ATP} channels by activating AMPK by applying salicylate after the perfusion of AMPK antagonist dorsomorphin (20 μ M) (Zhou et al., 2001). In the presence of dorsomorphin, salicylate did not hyperpolarize membrane potential (-63 ± 2 mV to -61 ± 3 mV, $n = 6$; $p = 0.2$, Fig. 7A) and did not reduce spontaneous firing (13.2 ± 3.2 Hz to 20 ± 9.8 Hz; $n = 6$; $p = 0.2$; Fig. 7B). Additionally, after AMPK inhibition, salicylate did not increase activity threshold (-68 ± 2 mV to -62 ± 1 mV; $n = 6$; $p = 0.2$; Fig. 7C). After dorsomorphin, salicylate did not induce any outward current (Fig. 7D). These results suggest that salicylate is acting by activating AMPK on CW neurons.

We then perfused the AMPK agonist AICAR (400 μ M) on active CW neurons to further explore this hypothesis. If salicylate acts by activating

AMPK in CW neurons, the application of AICAR should reproduce the effects of salicylate. We found that AICAR hyperpolarized the membrane potential at -10 mV (from -59 ± 3 to -69 ± 3 mV, $n = 5$), but the effect was not considered significant ($p = 0.08$; Fig. 8A). AICAR also reduced spontaneous firing from 20.0 ± 4.4 Hz to 9.5 ± 3.1 Hz. ($n = 5$, $p = 0.07$; Fig. 8B). AICAR has similar but weaker effects than salicylate on membrane potential and spontaneous firing. But interestingly, the application of salicylate on top of AICAR did not produce further hyperpolarization (from 69 ± 3 mV to -73 ± 3 mV, $n = 5$; $p = 0.08$; Fig. 8A), but the membrane potential in the presence of salicylate and AICAR was significantly more hyperpolarized than without the drugs ($p = 0.02$). Additionally, salicylate did not reduce the spontaneous firing when applied in the presence of AICAR (from 9.5 ± 3.1 Hz to 8.7 ± 1.6 Hz, $n = 5$; $p = 0.07$; Fig. 8B). AICAR did not affect activity threshold (from -67.2 ± 1.2 mV to -65.6 ± 2.5 mV, $n = 5$, $p = 0.8$; Fig. 8C) but inhibited the effect of salicylate in increasing the activity threshold (activity threshold in salicylate -66.7 ± 3.2 mV; $n = 5$ $p = 0.8$).

Additionally, AICAR did not induce an outward current at -55 mV in CW neurons (control: -88 ± 45 pA; AICAR: -142 ± 28 pA; $p = 0.16$), but it inhibited the effect of salicylate in inducing this current (AICAR + sal: -133 ± 32 pA; $p = 0.6$; Fig. 8D). Our results suggest that salicylate is likely acting by activating AMPK or that they share the same molecular targets regulating K_{ATP} channel activity.

3.6. A mitochondrial uncoupler opens K_{ATP} channels in CW neurons and has similar but weaker effects than salicylate

Another possible mechanism of salicylate is a mitochondrial

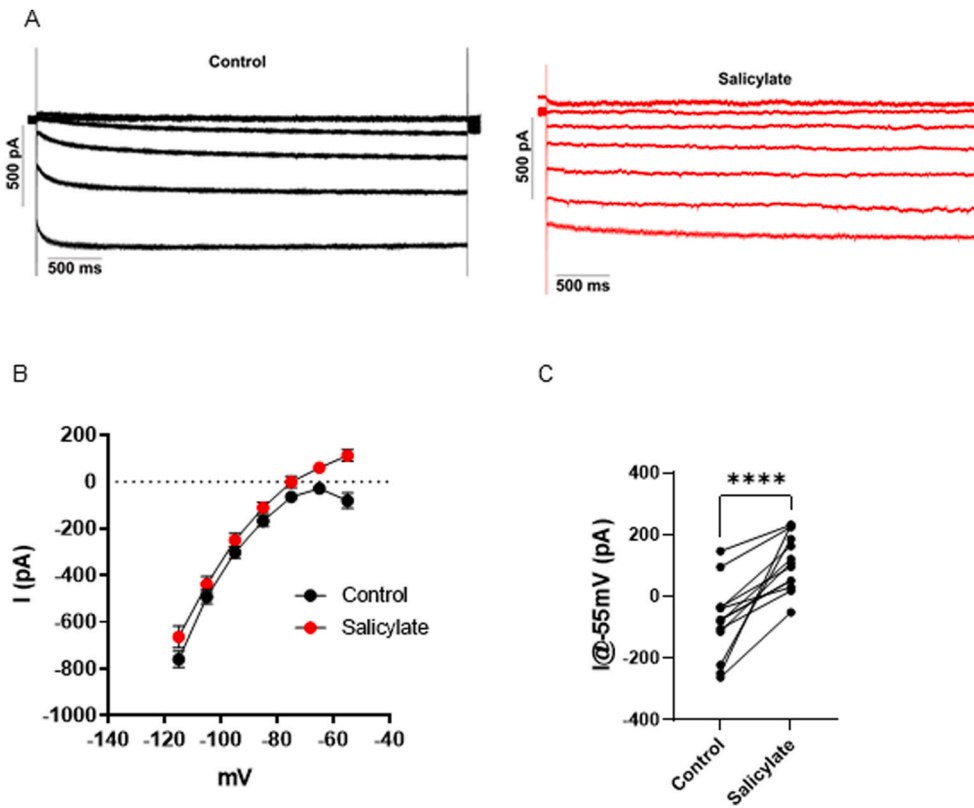


Fig. 5. Effect of salicylate on the membrane currents from cartwheel neurons. A. Representative recordings of membrane currents from cartwheel neurons before and after perfusion of salicylate. B. IV relationship of cartwheel neurons before and after salicylate. C. membrane currents at -55 mV before and after salicylate.

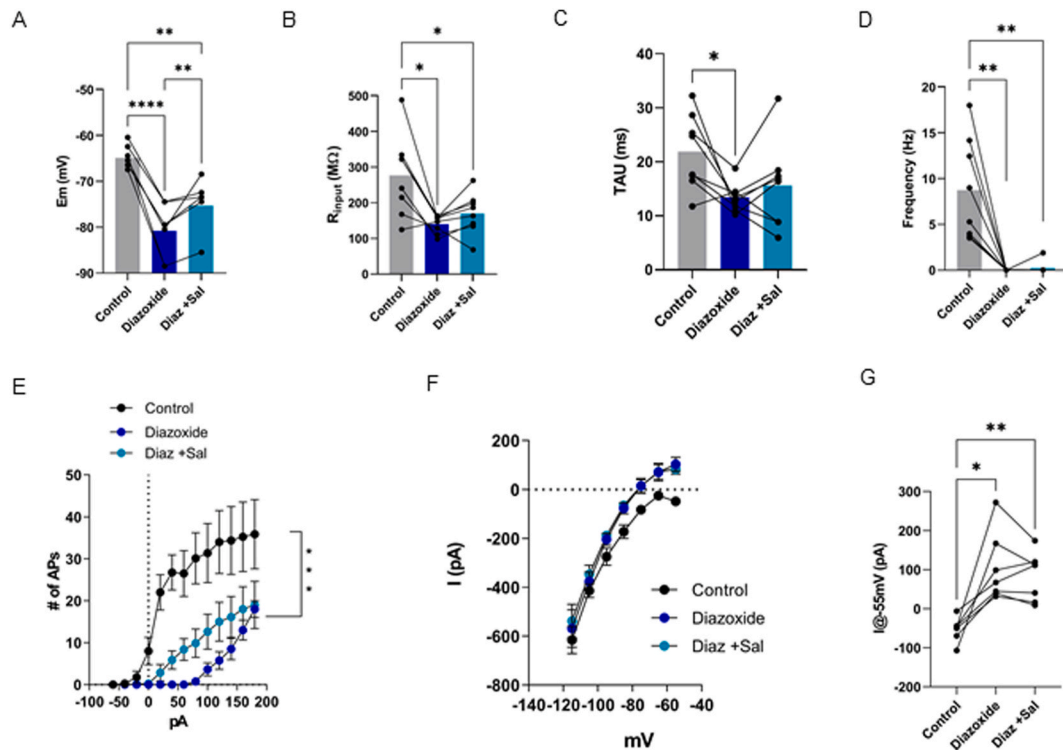


Fig. 6. Diazoxide mimics and occludes the effect of salicylate. A. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the modal membrane potential. B. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the membrane input resistance. C. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the membrane time constant. D. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the spontaneous action potential firing. E. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the firing curve. F. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the current-voltage relationship. G. Summary of the effect of diazoxide and salicylate on the membrane current at -55 mV.

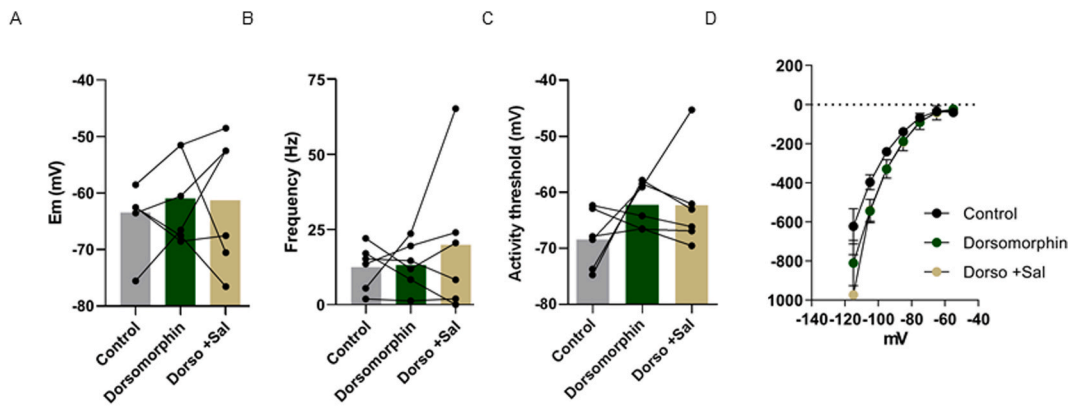


Fig. 7. Dorsomorphin occludes the effect of salicylate. A. Summary of the effect of dorsomorphin and salicylate on the modal membrane potential. B. Summary of the effect of dorsomorphin and salicylate spontaneous action potential firing. C. Summary of the effect of dorsomorphin and salicylate on the activity threshold. D. Effect of dorsomorphin and salicylate on the current-voltage relationship.

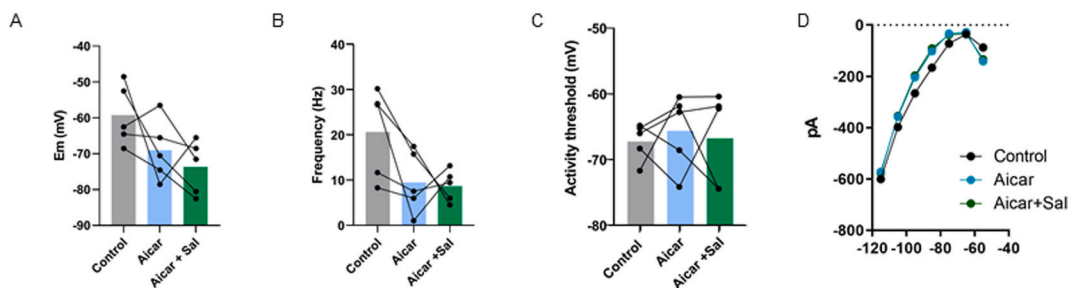


Fig. 8. AICAR does not reproduce but occludes the effect of salicylate. A. Summary of the effect of AICAR and salicylate on the modal membrane potential. B. Summary of the effect of AICAR and salicylate spontaneous action potential firing. C. Summary of the effect of AICAR and salicylate on the activity threshold. D. Effect of AICAR and salicylate on the current-voltage relationship.

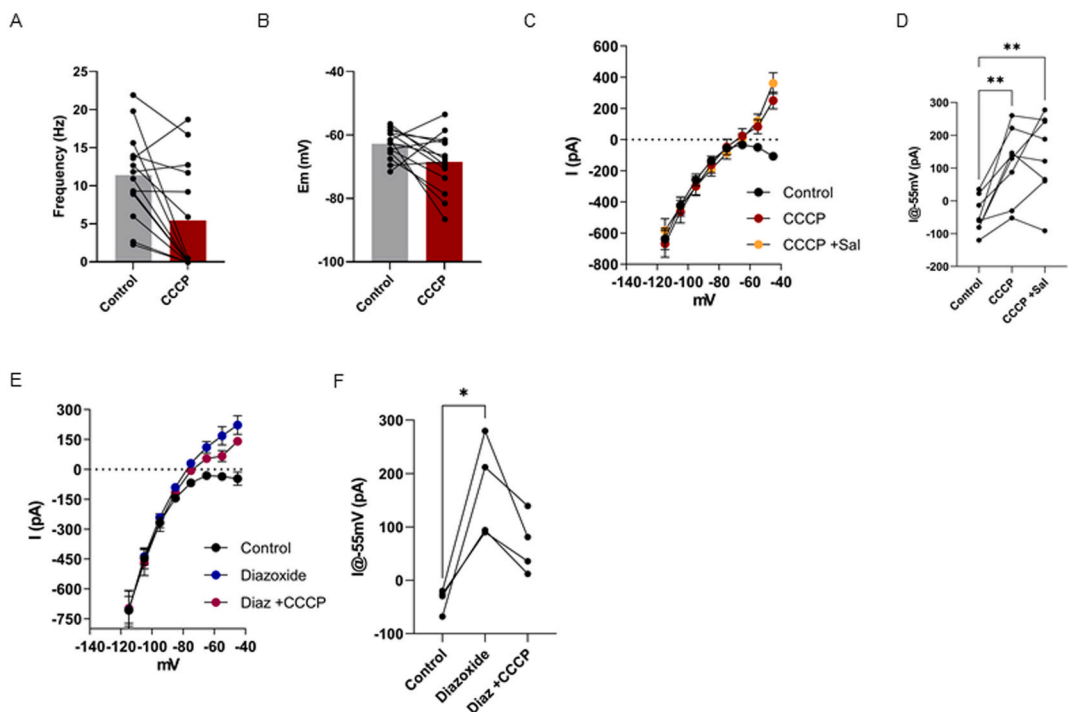


Fig. 9. CCCP has similar but weaker effects than salicylate. A. Summary of the effect of CCCP on spontaneous action potential firing. B. Summary of the effect of CCCP on the modal membrane potential. C. IV relationship of cartwheel neurons after CCCP and salicylate. D. Summary of the effect of CCCP and salicylate on the membrane current at -55 mV. E. IV relationship of cartwheel neurons after diazoxide and CCCP. F. Summary of the effect of diazoxide and CCCP on the membrane current at -55 mV.

uncoupler (Smith et al., 2016). Reducing ATP production by uncoupling the proton gradient from mitochondria could reduce the ATP/ADP levels in the CW neuron and activate the K_{ATP} channels. We then compare the effects of the mitochondrial uncoupling agent CCCP (0.5–1 μ M) in activating the K_{ATP} channel in CW neurons. Application of CCCP inhibited completely spontaneous firing in most neurons (8 out of 14) and had a weak effect on the remaining 6 neurons. On average CCCP reduced firing from 11.3 ± 1.5 Hz to 5.5 ± 1.9 Hz. ($p = 0.006$; Fig. 8A). Accordingly, CCCP had variable effects on membrane potential, hyperpolarizing 9 neurons, and depolarizing 4 (an average hyperpolarization of -5.3 ± 2.8 mV, $p = 0.09$; Fig. 8B).

However, CCCP is induced in an outward current similar to the K_{ATP} current (Fig. 9C; $n = 14$). CCCP produced an outward current of 168 ± 34 pA ($p = 0.0004$). We then applied salicylate after CCCP, and salicylate was not able to induce K_{ATP} currents after CCCP ($I_{@-55\text{mV}}$: CCCP: 113 ± 39 pA; CCCP + sal: 139 ± 44 pA; $p = 0.45$; $n = 8$; Fig. 9D and E). Additionally, the application of salicylate after CCCP abolished firing in 3 neurons that were not affected by CCCP (not shown).

We then tested if the current developed by CCCP was the K_{ATP} current by applying CCCP after diazoxide. Application of CCCP after diazoxide did not produce any further outward current than the current produced by diazoxide ($I_{@-55\text{mV}}$: Diaz. 170 ± 46 pA; +CCCP: 67 ± 28 pA $n = 4$; $p = 0.05$; Fig. 9E and F), suggesting that K_{ATP} channels mediate the outward current produced by CCCP. Thus, these results suggest that inhibition of mitochondrial ATP production can open K_{ATP} channels, which could be one of the mechanisms of salicylate in activating K_{ATP} channels in CW neurons. However, because salicylate is more effective than CCCP in stopping spontaneous firing and hyperpolarizing the membrane potential, mitochondrial uncoupling is not likely to be the sole mechanism of action of salicylate hyperpolarizing CW neurons.

4. Discussion

It is well-known that intoxication by high doses of salicylate causes tinnitus and temporary elevation of the auditory thresholds (Cazals, 2000). However, there is no defined mechanism of action of salicylate. Although it has been shown that millimolar salicylate acts on NMDA receptors increasing cochlear activity (Guitton et al., 2003; Guitton and Dudai, 2007) it is proposed that salicylate acts centrally because DCN hyperactivity and behavioral evidence of tinnitus are seen in doses lower than necessary to produce increased auditory nerve firing (Müller et al., 2003). Administration of salicylate increases *c-fos* expression in selected auditory areas, DCN, inferior colliculus, medial geniculate body, and auditory cortex (Santos et al., 2017; Wallhäusser-Franke et al., 2003a, 2003b; Wu et al., 2003), suggesting activation of neurons from these regions by salicylate. Experiments using manganese-MRI showed increased activity in the inferior colliculus and DCN after salicylate treatment (Holt et al., 2010), but interestingly not in the VCN, suggesting that the main effect of salicylate is on specific brain regions and not on the cochlea or auditory nerve.

The DCN is a fundamental region of the induction of tinnitus by sound trauma (Brozowski et al., 2012), and hyperactivity of DCN principal neurons is seen in animal models of tinnitus induced by loud sound (Kaltenbach and Afman, 2000; Kaltenbach and Godfrey, 2008; Pilati et al., 2012; Zhang and Kaltenbach, 1998), but if salicylate induces increased spontaneous or sound-evoked firing on DCN fusiform neurons is not known (Stolzberg et al., 2012). Experiments in brainstem slices containing the DCN have not detected an increase in the firing of fusiform neurons after superfusion of millimolar concentrations of salicylate (Basta et al., 2008; Wei et al., 2010; Zugaib et al., 2016). However, when incubated slices, millimolar salicylate decreases the spontaneous firing of the glycinergic CW interneuron and glycinergic inhibition of the fusiform neuron (Zugaib et al., 2016). We recently demonstrated that a fraction of CW neurons that do not fire spontaneously is due to the presence of open K_{ATP} channels in these cells (Strazza et al., 2021). That

activation of K_{ATP} channels by its agonist diazoxide stops the spontaneous firing in the other fraction of CW neurons. K_{ATP} channels are present in several central neurons (Zhou et al., 1999, 2012) and belong to the inwardly rectifying potassium channels family, expressed by the Kir6.2 and Kir2.2 subunits. They are known to couple the cell's metabolic status with membrane excitability (Nichols, 2006) and control membrane potential in neurons related to metabolic and glycemic control (Ashford et al., 1990; Dadak et al., 2017; De Bernardis Murat and Leão, 2019). We then postulated that salicylate could be affecting K_{ATP} channels in CW neurons, increasing the proportion of quiet CW neurons.

Here we confirmed that incubation of CW neurons with 1.4 mM of salicylate reduced the proportion of active CW neurons as previously described (Zugaib et al., 2016). The quiet CW neurons incubated with salicylate presented the exact profile of quiet CW neurons in control aCSF, expressing a tolbutamide-sensitive current, suggesting that salicylate is activating K_{ATP} channels hyperpolarizing the membrane and stopping spontaneous firing. To investigate the mechanisms of action of salicylate, we perfused the drug on the aCSF during recording. We observed a fast and robust hyperpolarization of the membrane potential of CW neurons that stopped spontaneous firing. This effect was caused by activating an outward current mediated by K_{ATP} channels since it was mimicked and blocked by the previous application of diazoxide.

Additionally, this effect is observed only with millimolar concentrations of salicylate, according to the concentrations seen in animals with salicylate-induced tinnitus (Jastreboff and Sasaki, 1986). Moreover, valdecoxib, an inhibitor of cyclooxygenase-2, did not reproduce the effects of salicylate, except by the reduction of evoked AP firing, which was also reduced by micromolar salicylate. These results strongly suggest that the main action of salicylate on the firing of CW cells is on the activation of K_{ATP} channels. It is only seen in high doses and is not related to the inhibitory effects of salicylate on cyclooxygenase-2. However, the reduction in evoked AP firing could be caused at least partially caused by the inhibitory effects on cyclooxygenase-2.

We tested two possible mechanisms of the action of salicylate: AMPK activation and inhibition of ATP synthesis. K_{ATP} channels can be opened by AMPK activation (Beall et al., 2013; Shen et al., 2016; Wu et al., 2017), which targets salicylate (Steinberg et al., 2013). We first antagonized the action of AMPK using its antagonist dorsomorphin (compound C) (Zhou et al., 2001), and it inhibited the effects of salicylate on the CW neuron. However, the agonist of AMPK, AICAR (Corton et al., 1995), did not reproduce the effects of salicylate but antagonized its actions. At first, the results with the antagonist dorsomorphin suggested that salicylate activates K_{ATP} channels via AMPK. However, results of experiments aimed to inhibit AMPK with dorsomorphin should be taken with care because this drug at concentrations lower (1–10 μ M) than used to antagonize AMPK (20–50 μ M) can inhibit several other kinases (Dasgupta and Seibel, 2018). On the other hand, the lack of effect of AICAR in mimicking the effect of salicylate goes against this hypothesis. However, AICAR impedes the action of salicylate on K_{ATP} channels, suggesting the participation of AMPK or downstream targets on the effect of salicylate. AICAR [5-amino-4-imidazolecarboxamide (AICA) ribonucleoside] is a cell-permeant analog of adenosine which is phosphorylated intracellularly by adenosine kinase resulting in AICA ribotide (ZMP), which is an allosteric activator of AMPK although with less potency than AMP itself (Corton et al., 1995). However, it can accumulate to millimolar levels in the cytoplasm. In concentrations above 10 mM, it can inhibit AMPK (Corton et al., 1995), a possible explanation for the lack of effect of AICAR in mimicking the effect of salicylate. Moreover, AICAR also presents metabolic effects not related to AMPK because they were observed in AMPK knockout mice lines (Višnjić et al., 2021). Thus, our data, although still not conclusive, suggests that AMPK is a likely mediator of the salicylate activation of K_{ATP} channels in CW neurons or that AMPK and salicylate could share the same targets acting on K_{ATP} channels.

On the other hand, as a mitochondrial uncoupler, salicylate could decrease the production of ATP and increase the ADP:ATP levels,

leading to the opening of K_{ATP} channels (Smith et al., 2016). To determine the plausibility of this mechanism, we used the protonophore CCCP, which acts on the inner mitochondrial membrane dissipating the proton gradient across the mitochondrial membrane and ATP production by the F_0/F_1 -ATPase. At the concentrations of 0.5- to 1 μ M CCCP induced K_{ATP} opening and abolished spontaneous firing in most neurons. However, the effects of CCCP on spontaneous firing and membrane hyperpolarization were not as consistent as the effect of salicylate. In the neurons where CCCP did not abolish firing, salicylate was able to stop firing entirely or almost completely, suggesting that CCCP is not as effective as salicylate in these concentrations. However, when we tested a higher concentration of CCCP (5 μ M), we observed a strong membrane depolarization leading to a depolarization block of action potential firing (not shown), probably caused by dissipation ionic gradient across the membrane. The variation of the effect of CCCP could be the result of a balance of the depolarization caused by disruption of ionic gradients and hyperpolarization by K_{ATP} channels opening. Thus although it is conceivable that salicylate can act by its effect uncoupling ATP production by mitochondria since CCCP can open K_{ATP} channels in CW neurons, the effect less consistent of CCCP in comparison with salicylate suggests this is not the only mechanism of action of salicylate, which could be mainly by AMPK activation or another unknown mechanism. However, it is conceivable that mitochondrial uncoupling can be partially responsible for activating K_{ATP} channels by salicylate in CW neurons.

Finally, we observed that fast perfusion of salicylate was very effective in inhibiting spontaneous firing in all CW neurons, tested while in slices incubated with salicylate half of the CW neurons were still active and did not have open K_{ATP} channels. This discrepancy suggests that the effects of salicylate can desensitize over time. However, even after a reduction in the effectiveness of salicylate, it still can open K_{ATP} channels in almost half of CW neurons, reducing the inhibition of fusiform cells substantially, as seen in (Zugaib et al., 2016). Interestingly, the enhancement of the depolarization-induced suppression of excitation by salicylate in CW neurons is seen only after incubation of millimolar salicylate and not after fast perfusion (Zugaib and Leão, 2017, 2018).

5. Conclusion

We conclude that salicylate in millimolar concentrations opens K_{ATP} channels in CW neurons, strongly reducing spontaneous action potential firing and consequently reducing the inhibition of fusiform neurons. This effect could be an essential contributor to salicylate-induced tinnitus. We found evidence that salicylate could open K_{ATP} channels by activation of AMPK, decrease mitochondrial ATP production, or both, but the exact mechanisms need to be further investigated. Finally, we postulate that disturbances in the energetic metabolism of CW neurons can lead to K_{ATP} channel opening and reduced inhibition on the DCN and could be potentially relevant for tinnitus and other hearing disorders.

CRediT authorship contribution statement

Daniela Vanessa F. de Siqueira: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Paulo S. Strazza:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Roles, Writing – original draft. **Nikollas M. Benites:** Formal analysis, Investigation, Methodology. **Ricardo M. Leão:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Roles, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Acknowledgments

We thank Mr. J. Fernando Aguiar for technical support and Dr. C. Kushmerick for reviewing the article. Work supported by a FAPESP

grant (2019/13458–1). DVFS and NMB were supported by PhD. Scholarships from CNPq. RML is a CNPq research productivity fellow.

References

- Ashford, M.L.J., Boden, P.R., Treherne, J.M., 1990. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K^+ channels. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 415, 479–483. <https://doi.org/10.1007/BF00373626>.
- Basta, D., Goetze, R., Ernst, A., 2008. Effects of salicylate application on the spontaneous activity in brain slices of the mouse cochlear nucleus, medial geniculate body and primary auditory cortex. *Hear. Res.* 240, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.02.005>.
- Beall, C., Watterson, K.R., McCrimmon, R.J., Ashford, M.L.J., 2013. AMPK modulates glucose-sensing in insulin-secreting cells by altered phosphotransfer to K_{ATP} channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 45, 229–241. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9509-9>.
- Brozowski, T.J., Bauer, C.A., 2005. The effect of dorsal cochlear nucleus ablation on tinnitus in rats. *Hear. Res.* 206, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.12.013>.
- Brozowski, T.J., Bauer, C.A., Caspary, D.M., 2002. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J. Neurosci.* 22, 2383–2390. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-06-02383.2002>.
- Brozowski, T.J., Wisner, K.W., Sybert, L.T., Bauer, C.A., 2012. Bilateral dorsal cochlear nucleus lesions prevent acoustic-trauma induced tinnitus in an animal model. *JARO J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 13, 55–66. <https://doi.org/10.1007/s10162-011-0290-3>.
- Cazals, Y., 2000. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog. Neurobiol.* 62 (6), 583–631. [https://doi.org/10.1016/S0304-0002\(00\)0027-7](https://doi.org/10.1016/S0304-0002(00)0027-7).
- Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., Hardie, D.G., 1995. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide ribonucleoside: a specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* 229, 558–565. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb0498.x>.
- Dadak, S., Beall, C., Vlachaki Walker, J.M., Soutar, M.P.M., McCrimmon, R.J., Ashford, M.L.J., 2017. Oleate induces K_{ATP} channel-dependent hyperpolarization in mouse hypothalamic glucose-excited neurons without altering cellular energy charge. *Neuroscience* 346, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.053>.
- Dasgupta, B., Seibel, W., 2018. Compound C/Dorsomorphin: its use and misuse as an AMPK inhibitor. In: *Methods in Molecular Biology. Methods Mol Biol*, pp. 195–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3_12.
- De Bernardis Murat, C., Leão, R.M., 2019. A voltage-dependent depolarization induced by low external glucose in neurons of the nucleus of the tractus solitarius: interaction with K_{ATP} channels. *J. Physiol.* 597, 2515–2532. <https://doi.org/10.1113/JP277729>.
- Eggermont, J.J., Roberts, L.E., 2004. The neuroscience of tinnitus. *Trends Neurosci.* 27, 676–682. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.010>.
- Gao, Y., Manzoor, N., Kaltenbach, J.A., 2016. Evidence of activity-dependent plasticity in the dorsal cochlear nucleus, in vivo, induced by brief sound exposure. *Hear. Res.* 341, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.07.011>.
- Guitton, M.J., Caston, J., Ruel, J., Johnson, R.M., Pujol, R., Puel, J.-L., 2003. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J. Neurosci.* 23, 3944–3952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03944.2003>.
- Guitton, M.J., Dudai, Y., 2007. Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma. *Neural Plast.* <https://doi.org/10.1155/2007/80904>, 2007.
- Hayes, S.H., Radziwon, K.E., Stolzberg, D.J., Salvi, R.J., 2014. Behavioral models of tinnitus and hyperacusis in animals. *Front. Neurol.* 5 <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00179>.
- Higgs, G.A., Salmon, J.A., Henderson, B., Vane, J.R., 1987. Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and anti-inflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1417–1420. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1417>.
- Holt, A.G., Bissig, D., Mirza, N., Rajah, G., Berkowitz, B., 2010. Evidence of key tinnitus-related brain regions documented by a unique combination of manganese-enhanced MRI and acoustic startle reflex testing. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014260>.
- Jastreboff, P.J., Sasaki, C.T., 1986. Salicylate-induced changes in spontaneous activity of single units in the inferior colliculus of the Guinea pig. *J. Acoust. Soc. Am.* 80, 1384–1391. <https://doi.org/10.1121/1.394391>.
- Kaltenbach, J.A., Afman, C.E., 2000. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear. Res.* 140 [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00197-5).
- Kaltenbach, J.A., Godfrey, D.A., 2008. Dorsal cochlear nucleus hyperactivity and tinnitus: are they related? *Am. J. Audiol.* 17, 148–162. [https://doi.org/10.1044/1059-0889\(2008\)08-0004](https://doi.org/10.1044/1059-0889(2008)08-0004).
- Kim, Y., Trussell, L.O., 2007. Ion channels generating complex spikes in cartwheel cells of the dorsal cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 97, 1705–1725. <https://doi.org/10.1152/jn.00536.2006>.
- Lang, F., Föllner, M., 2014. Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). *Channels* 8, 20–28. <https://doi.org/10.4161/chan.27423>.
- Leao, R.M., Li, S., Doiron, B., Tzounopoulos, T., 2012. Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 107, 3008–3019. <https://doi.org/10.1152/jn.00660.2011>.

- Müller, M., Klinke, R., Arnold, W., Oestreicher, E., 2003. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited. *Hear. Res.* 183, 37–43. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00217-X).
- Namikawa, M., Sano, A., Tateno, T., 2017. Salicylate-induced suppression of electrically driven activity in brain slices from the auditory cortex of aging mice. *Front. Aging Neurosci.* 9 <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00395>.
- Nichols, C.G., 2006. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470–476. <https://doi.org/10.1038/nature04711>.
- Oertel, D., Young, E.D., 2004. What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci.* 27, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.12.001>.
- Pilati, N., Large, C., Forsythe, I.D., Hamann, M., 2012. Acoustic over-exposure triggers burst firing in dorsal cochlear nucleus fusiform cells. *Hear. Res.* 283, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.10.008>.
- Santos, P., da Silva, L.E.C.M., Leão, R.M., 2017. Specific immediate early gene expression induced by high doses of salicylate in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 83 <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.02.011>.
- Shen, K.Z., Wu, Y.N., Munhall, A.C., Johnson, S.W., 2016. AMP kinase regulates ligand-gated K-ATP channels in substantia nigra dopamine neurons. *Neuroscience* 330, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.001>.
- Smith, B.K., Ford, R.J., Desjardins, E.M., Green, A.E., Hughes, M.C., Houde, V.P., Day, E. A., Marcinko, K., Crane, J.D., Mottillo, E.P., Perry, C.G.R., Kemp, B.E., Tarnopolsky, M.A., Steinberg, G.R., 2016. Salsalate (salicylate) uncouples mitochondria, improves glucose homeostasis, and reduces liver lipids independent of ampk- β 1. *Diabetes* 65, 3352–3361. <https://doi.org/10.2337/db16-0564>.
- Steinberg, G.R., Dandapani, M., Hardie, D.G., 2013. AMPK: mediating the metabolic effects of salicylate-based drugs? *Trends Endocrinol. Metabol.* 24, 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.06.002>.
- Stolzberg, D., Salvi, R.J., Allman, B.L., 2012. Salicylate toxicity model of tinnitus. *Front. Syst. Neurosci.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2012.00028>.
- Strazza, P.S., de Siqueira, D.V.F., Leão, R.M., 2021. ATP-sensitive K⁺ channels control the spontaneous firing of a glycinergic interneuron in the auditory brainstem. *J. Physiol.* 599, 1611–1630. <https://doi.org/10.1113/JP280233>.
- Su, Y.Y., Luo, B., Jin, Y., Wu, S.H., Lobarinas, E., Salvi, R.J., Chen, L., 2012. Altered neuronal intrinsic properties and reduced synaptic transmission of the rat's medial geniculate body in salicylate-induced tinnitus. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046969>.
- Višnjić, D., Lalić, H., Dembitz, V., Tomić, B., Smoljo, T., 2021. AICAR, a widely used AMPK activator with important AMPK-independent effects: a systematic review. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/CELLS10051095>, 10.
- Wallhäusser-Franke, E., Mahlke, C., Oliva, R., Braun, S., Wenz, G., Langner, G., 2003a. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp. Brain Res.* 153, 649–654. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1614-2>.
- Wallhäusser-Franke, E., Mahlke, C., Oliva, R., Braun, S., Wenz, G., Langner, G., 2003b. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp. Brain Res.* 649–654. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1614-2>, 2003 1534 153.
- Wei, L., Ding, D., Sun, W., Xu-Friedman, M.A., Salvi, R., 2010. Effects of sodium salicylate on spontaneous and evoked spike rate in the dorsal cochlear nucleus. *Hear. Res.* 267, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.03.088>.
- Wu, J.L., Chiu, T.W., Poon, P.W.F., 2003. Differential changes in Fos-immunoreactivity at the auditory brainstem after chronic injections of salicylate in rats. *Hear. Res.* 176, 80–93. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00747-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00747-5).
- Wu, Y.N., Shen, K.Z., Johnson, S.W., 2017. Differential actions of AMP kinase on ATP-sensitive K⁺ currents in ventral tegmental area and substantia nigra zona compacta neurons. *Eur. J. Neurosci.* 46, 2746–2753. <https://doi.org/10.1111/ejn.13756>.
- Zhang, J.S., Kaltenbach, J.A., 1998. Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus of the rat following exposure to high-intensity sound. *Neurosci. Lett.* 250 [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00482-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00482-0).
- Zhang, X., Yang, P., Cao, Y., Qin, L., Sato, Y., 2011. Salicylate induced neural changes in the primary auditory cortex of awake cats. *Neuroscience* 172, 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.073>.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>.
- Zhou, M., He, H.J., Tanaka, O., Sekiguchi, M., Kawahara, K., Abe, H., 2012. Localization of the ATP-sensitive K⁺ channel regulatory subunits SUR2A and SUR2B in the rat brain. *Neurosci. Res.* 74, 91–105. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2012.08.005>.
- Zhou, M., Tanaka, O., Sekiguchi, M., Sakabe, K., Anzai, M., Izumida, I., Inoue, T., Kawahara, K., Abe, H., 1999. Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/UK(ATP)-1) in rat brain. *Mol. Brain Res.* 74, 15–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00232-6).
- Zugaib, J., Ceballos, C.C., Leão, R.M., 2016. High doses of salicylate reduces glycinergic inhibition in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Hear. Res.* 332, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2015.10.008>.
- Zugaib, J., Leão, R.M., 2018. Enhancement of endocannabinoid-dependent depolarization-induced suppression of excitation in glycinergic neurons by prolonged exposure to high doses of salicylate. *Neuroscience* 376, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.016>.
- Zugaib, J., Leão, R.M., 2017. Inhibitors of oxidative and hydrolytic endocannabinoid degradation do not enhance depolarization-induced suppression of excitation on dorsal cochlear nucleus glycinergic neurons. *Synapse* 71. <https://doi.org/10.1002/syn.21954>.