UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

MURIELE LOBATO BRITO

Identificação neuroanatômica de áreas cerebrais relacionadas à produção do canto em uma espécie de pássaro Suboscine da amazônia (*Myiozetetes cayanensis*)

SÃO PAULO
2017

MURIELE LOBATO BRITO

Identificação neuroanatômica de áreas cerebrais relacionadas à produção do canto em uma espécie de pássaro Suboscine da amazônia (*Myiozetetes cayanensis*)

Versão original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Prof^{ra}. Dr^{a}. Maria Luisa da Silva.

São Paulo
2017

Nome: BRITO, Muriele Lobato

Título: Identificação neuroanatômica de áreas cerebrais relacionadas à produção do canto em uma espécie de pássaro Suboscine da amazônia (*Myiozetetes cayanensis*).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Comportamento.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

A DEUS e a minha família

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^{ra}. Dr^{a}. Maria Luisa da Silva, pela orientação competente e por toda a confiança depositadas em mim e no nosso trabalho, sem as quais eu não teria finalizado mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fenandes da Costa e à Prof^{ra}. Drª Christina Joselevitch por todo auxílio e orientação nos primeiros anos do meu doutorado. Vocês também foram muito importantes neste processo.

Ao Prof. Dr. Manfred Gahr, pela acolhida no Laboratório de Histologia do Instituto Max-Planck de Ornitologia, em Seewiesen, onde realizei os primeiros experimentos que deram início a este trabalho; pelas discussões sobre a pesquisa e pelas sugestões sempre pertinentes.

À Prof^{ra}. Dr^{a}. Silene Maria Araújo de Lima, por me receber em seu Laboratório, Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Pará, onde finalizei meus experimentos; por todo suporte, incentivo e amizade imprescindíveis na conclusão de mais esta etapa da minha vida acadêmica.

À pesquisadora Dr^{a}. Macarena Faunes da Universidade de Yale, por ter se disponibilizado para me treinar nas técnicas de injeção de traçador neuronal e imunohistoquímica, bem como por todas as sugestões sempre válidas e pertinentes.

À responsável técnica do Laboratório de Hibridização *in situ* radioativa do Instituto Max-Planck de Ornitologia, Cristina Wolf, pela ajuda e orientação no preparo de reagentes e aplicação da técnica de hibridização *in situ*.

Ao Felipe Matheus dos Reis Castro, aluno de iniciação científica da Universidade Federal do Pará, por ter me ajudado com o trabalho de campo sem o qual não seria possível completar a fase final de experimentos para esta pesquisa.

E ao apoio financeiro dos órgãos de Fomento CAPES e *Max-Planck Institute for Ornihtology* sem o qual não teria como subsidiar minha pesquisa.

RESUMO

LOBATO, Muriele Nazareth. Identificação neuroanatômica de áreas cerebrais relacionadas à produção do canto em uma espécie de pássaro Suboscine da amazônia (*Myiozetetes cayanensis*). 2017. 99 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A comunidade científica, ao longo dos anos, comprovou aprendizagem vocal em três ordens de aves (papagaios, beija-flores e passeriformes oscines). Contudo, mais recentemente, estudos feitos em três espécies de Suboscines, *Sayornis Phoebe*, *Procnias tricarunculata* e *Chiroxiphia linearis* revelaram a existência de um sistema rudimentar do canto e/ou extensivas variações vocais quantitativas e qualitativas entre as populações reprodutivas, sugerindo que estas espécies são capazes de aprender o seu canto. Esta evidência incita a investigação de outras espécies de pássaros Suboscines, visto que a distinção entre pássaros aprendizes e não-aprendizes vocais não é tão óbvia quanto se pensava. Uma espécie de pássaro Suboscines amazônica, *Myiozetetes cayanensis, de*sperta o nosso interesse devido à complexidade estrutural do canto em dueto que pode inferir alguma aprendizagem do canto. Com o intuito de identificar as regiões de controle da produção do canto nestes animais nós utilizamos diferentes técnicas de marcação celular coloração de Nissl, hibridização *in situ* radioativa e injeção de traçadores neuronais; ferramentas neuroanatômicas estas que nos forneceram pistas sobre a presença de áreas cerebrais potencialmente envolvidas no sistema de controle do canto. Dos três núcleos envolvidos na produção do canto, conseguimos identificar apenas o núcleo hipoglosso - porção traqueosiringeal (NXIIts) e somente através da injeção do traçador neuronal CTB. Identificamos o NXIIts tanto em macho quanto em fêmeas e ao quantificar os dados verificamos que o volume deste núcleo é 2 vezes maior nos machos do que nas fêmeas, inferindo um possível dimorfismo sexual. Ao compararmos o volume total de NXIIts entre o nosso animal experimental e uma espécie de pássaro Oscine, *Taeniopigia guttata*, verificamos que este núcleo foi quase 2 vezes maior em *Taeniopigia guttata* machos e fêmeas. Não foram identificados núcleos telencefálicos que se assemelhassem ao HVC e ao RA de Oscines por meio de nenhuma das técnicas utilizadas, o que nos leva a concluir que, em *Myiozetetes cayanensis*, não haja sistema de controle do canto e que seu canto seja inato.

Palavras-chave: sistema de controle do canto, produção do canto, Suboscines, NXIIts, CTB.

ABSTRACT

LOBATO, Muriele Nazareth. Neuroanatomical identification of cerebral areas related to the song production in a suboscine amazonian bird (*Myiozetetes cayanensis*). 2017. 99 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Along the years vocal learning has been repeatedly demonstrated in three bird orders (parrots, hummingbirds and the oscine songbirds). But recently some studies developed in three spicies of suboscine birds, *Sayornis Phoebe*, *Procnias tricarunculata* e *Chiroxiphia linearis*, demonstrated the existence of a rudmentary song system and/or extensive qualitative and quantitative vocal variations between reproductives populations suggesting that these species are capable of learning their songs. This evidence instigates the investigation of other suboscine songbirds spieces, since the distinction between learning and non-learning vocal birds is not that clear as thought. An amazon uboscine bird, *Myiozetetes cayanensis*, has attracted our attention due to the structural complexity of its duet song that may imply some vocal learning. Therefore, we tried to identificate the song control regions in this animals by means of different technics: Nissl staining, radioactive in situ hibridization and injections of neural tracers; neuroanatomical tools that provided important clues of cerebral areas implicated in the song system control. We identified only one of the three nuclei involved in the controlling of song production, the NXIIts and only by the injection of the neural tracer CTB. The NXIIts was identified both in males and females. When we quantified the data, we observed that the NXIIts was 2 times larger in males than in females, indicating a possible sexual dimorphism. We also compared the total volume of NXIIts between our experimental animal and a oscine species, *Taeniopygia guttata*. The volume of NXIIts was almost 2 times larger both in males and females of *Taeniopigia guttata*. We didin't identified any nucleus that guards some resemblence to the oscine' HVC or RA through none of the techniques that we tested. Therefore, we can assume that *Myiozetetes cayanensis* have no song control system and that their song are inate.

Keywords: song system control, song production, suboscines, NXIIts, CTB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore das famílias das aves 19

Figura 2 - Fases e estágios do desenvolvimento do canto 23

Figura 3 - Anatomia da siringe de um *zebra finch* 25

Figura 4 - Desenho esquemático do sistema do canto das aves 26

Figura 5 - Representação simplificada do sistema de controle do canto 28

Figura 6 - Núcleos do sistema do canto em *zebra finch* 32

Figura 7 - Hibridização *in situ* em secções de cérebro de *zebra finch* e canário 33

Figura 8 - Imunofluorescência contra subunidade B da toxina colérica (CTB) no tronco encefálico de um *zebra finch* após injeção do traçador neuronal CTB na porção traqueosiringeal do nervo hipoglosso 34

Figura 9 - Foto do *Myiozetetes cayanensis* 35

Figura 10 - Rede de neblina utilizada para captura das aves utilizando a técnica de *Playback* 39

Figura 11 - Ave posicionada em decúbito lateral esquerdo em mesa cirúrgica durante cirurgia para injeção de traçador neuronal 41

Figura 12 - Fotomicrografia da vista ventrolateral da siringe de um *zebra finch* 42

Figura 13 - Foto do nervo hipoglosso esquerdo de um *Melopsittacus undulatus* durante experimento piloto para teste dos traçadores CTB e Fast DiI 43

Figura 14 - Desenho esquemático mostrando como os cortes seriados foram organizados 46

Figura 15 - Secção corada com tionina 0,1% pelo método de Nissl de um *Myiozetetes cayanensis* 57

Figura 16 - Secção corada com Nissl de um pássaro Oscine (*zebra finch*) macho adulto 57

Figura 17 - Auto-radiografia de um corte sagital do encéfalo de um *Myiozetetes cayanensis* macho que foi submetido à hibridização *in situ* radioativa para marcação de receptores andrógenos 59

Figura 18 - Auto-radiografia de um corte sagital do encéfalo de um pássaro oscine (*Uraeginthus cyanocephalus)* macho de 50 dias que foi submetido à hibridização in situ radioativa para marcação de receptores andrógenos 60

Figura 19 - Fotomicrografia de uma secção transversal da medula de *Myiozetetes cayanensis* contracorada com Nissl 63

Figura 20 - Corte transversal da medula de um *Myiozetetes cayanensis* macho evidenciando a área do NXIIts em maior aumento 65

Figura 21 - Fotomicrografia de uma secção transversal da siringe de um *Myiozetetes cayanensis* 66

Figura 22 - Representação diagramática do volume total da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) de *Myiozetetes cayanensis* machos e fêmeas (valores médios) utilizando a técnica de injeção do traçador neuronal CTB 68

Figura 23 - Representação diagramática dos volumes da porção dorsomedial do NXIIts e do núcleo inteiro (volume total) em *zebra finch* e *Myiozetetes cayanensis* machos e fêmeas (valores médios) 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos traçadores neuronais utilizados nesta pesquisa 40

Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados neste estudo 51

Tabela 3 - Distribuição dos animais estudados conforme sexo e técnica utilizada 56

Tabela 4 - Lista dos animais submetidos à cirurgia de injeção de traçador neuronal distribuídos conforme sexo, traçador neuronal recebido, local da aplicação do traçador e se chegou à fase final do experimento 62

Tabela 5 - Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) de *Myiozetestes cayanensis* machos e fêmeas 67

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) de *Myiozetestes cayanensis* machos e fêmeas. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à injeção de CTB e contracorada com Nissl 67

Tabela 7 - Valores médios do volume do núcleo NXIIts de *Myiozetetes cayanensis* e de *Taeniopygia guttata* machos e fêmeas 69

LISTA DE ABREVIAÇOES E SIGLAS

RA	Núcleo robusto do arcopálio
NXIIts	Núcleo do hipoglosso - porção traqueosiringeal
LMAN	Porção lateral do núcleo magnocelular do nidopálio anterior
DLM	Porção medial do tálamo dorsolateral
RAm	Núcleo retro-ambíguo
PAm	Núcleo para-ambíguo
ISH	Hibridização *in situ*
BDA	Dextrana biotinilada
CTB	Subunidade beta da toxina colérica
NX	Núcleo vago
SSp	Núcleo supraespinhal

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO 18

1.1 – APRENDIZADO VOCAL 18

1.2 – O CANTO 20

1.3 - VIAS DE CONTROLE DO APRENDIZADO VOCAL 26

1.4 – DIMORFISMO SEXUAL NAS ÁREAS QUE CONTROLAM O CANTO E SUA REGULAÇÃO HORMONAL 30

1.5 – MARCADORES DE NÚCLEOS DE CONTROLE DO CANTO 31

1.6 – A ESPÉCIE *MYIOZETETES CAYANENSIS* NO CONTEXTO DESTA INVESTIGAÇÃO 34

1.7 – OBJETIVOS 35

1.7.1 – Objetivo Geral 35

1.7.2 – Objetivos específicos 36

2 – JUSTIFICATIVA 37

3 – MATERIAIS E MÉTODOS 38

3.1 – ANIMAIS 38

3.2 – INJEÇÃO DE TRAÇADOR NEURONAL 39

3.2.1 - Procedimento cirúrgico e pós-cirúrgico 40

3.3 – PERFUSÃO 43

3.4 – REMOÇÃO DOS CÉREBROS 44

3.5 – SECÇÕES SAGITAIS 45

3.6 – SECÇÕES TRANSVERSAIS 46

3.7 – COLORAÇÃO DE NISSL 46

3.7.1 – Protocolo de Coloração 46

3.8 – HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* RADIOATIVA 48

3.8.1 – Introdução à Técnica 48

3.8.2 – Protocolo 49

3.8.2.1 – Hibridização 49

3.8.2.2 – Auto-radiografia 50

3.9 – IMUNOHISTOQUÍMICA 51

3.10 – IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NÚCLEOS CEREBRAIS 52

3.10.1 – Quantificação da Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Corados com Nissl e Marcados através de Traçador Neuronal 52

3.10.2 – Quantificação da Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Submetidos à Hibridização *In Situ* 53

3.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA 53

4 – RESULTADOS 55

4.1 – ANIMAIS 55

4.2 – IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO PELO MÉTODO DE NISSL 56

4.3 – IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO PELO MÉTODO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* RADIOATIVA 58

4.4 – IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO PELO MÉTODO DE TRAÇADOR NEURONAL 60

5 – **DISCUSSÃO** 71

5.1 - COMPARAÇÃO COM ACHADOS PRÉVIOS: CONSIDERAÇÕES DAS TÉCNICAS UTILIZADAS 72

5.2 - DIMORFISMO SEXUAL DA PORÇÃO TRAQUEOSIRINGEAL DO NÚCLEO HIPOGLOSSO (NXIITS) DE MYIOZETETES CAYANENSIS 76

5.3 - EXISTE SISTEMA DO CANTO EM SUBOSCINES? 79

6 - CONCLUSÃO 82

7 – REFERÊNCIAS 83

ANEXOS 94

1 INTRODUÇÃO

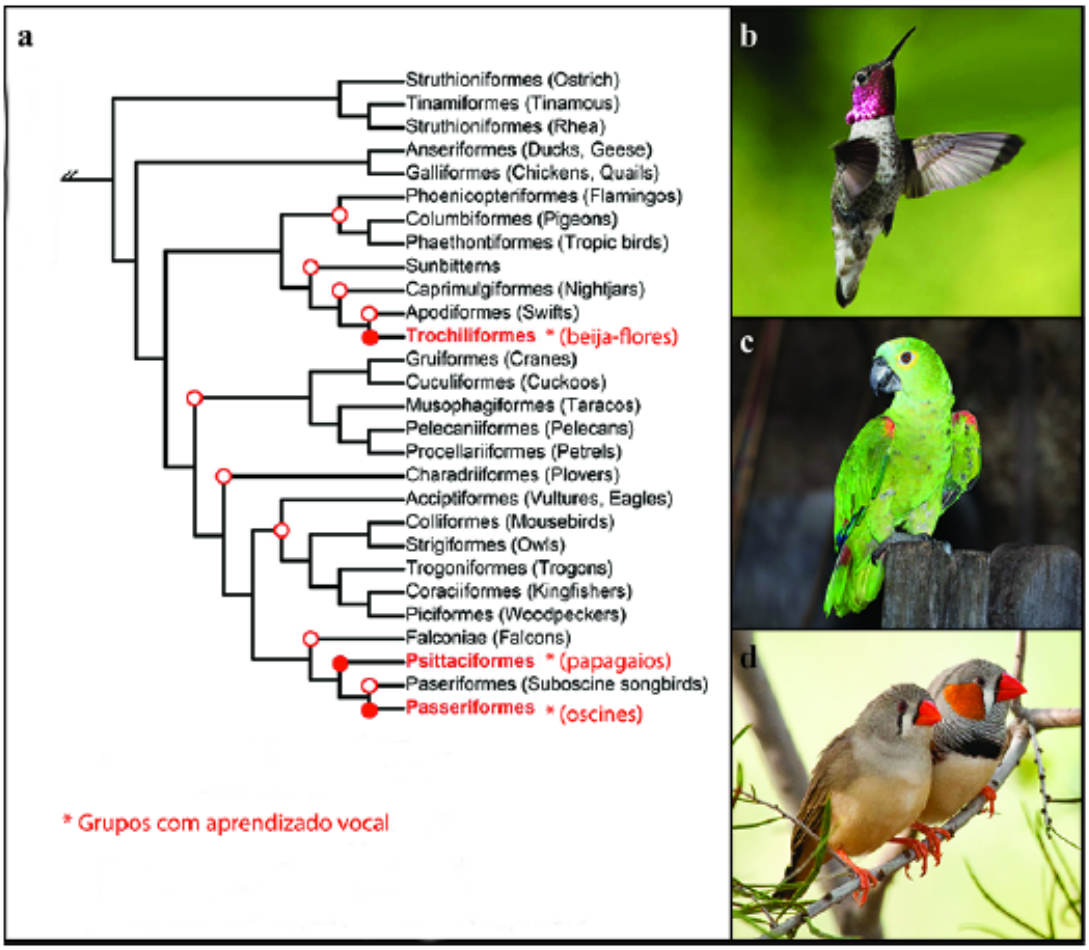
1.1 APRENDIZADO VOCAL

Para que um indivíduo, uma espécie ou um ecossistema sobreviva, é essencial que haja comunicação, sendo esta a base da vida social dos animais. É através da comunicação que os filhotes conseguem alimento de seus pais, que macho e fêmea interagem para reprodução da espécie e que os animais resolvem suas disputas sem contato direto. Para isto faz-se necessária, além da presença de um emissor e de um receptor, a existência de um sinal de comunicação que pode ser de natureza variada, principalmente sonora, visual ou química (DAWKINS, 1989; BRADBURY e VEHRENCAMP, 1998; VIELLIARD, 2005).

A capacidade de ouvir sons e gerar uma resposta comportamental, motora e/ou de vocalização tem sido estudada por décadas em diferentes animais. O fenótipo de aprendizado vocal, como sinônimo de aprendizado de produção vocal, caracteriza-se pela habilidade sensório-motora de memorizar e imitar um modelo auditivo. Sabe-se que tanto seres humanos quanto pássaros canoros são conhecidos como “aprendizes vocais”, pois se criados em isolamento, desenvolvem vocalizações anormais (MARLER e TAMURA, 1964; FROMKIN et al*.,* 1974).

Uma série de experimentos demonstraram evidências de aprendizado vocal em poucos grupos de vertebrados: baleias e golfinhos (Cetacea); focas, morsas e leões-marinhos (Pinípedes); em morcegos (Chriroptera); em primatas não-humanos e em humanos (PAYNE e MCVAY, 1971; RICHARDS et al., 1984; ESSER, 1994; JANIK, 2000; CROCKFORD et al., 2004; COLLEN e CASSEY, 2014); em pássaros Oscines (Passeriformes), beija-flores (Apodiformes) e papagaios (Psittaciformes) (FIGURA 1) (THORPE, 1958; BAPTISTA e SCHUCHMANN, 1990; JARVIS et al., 2000). De todos os animais estudados, os pássaros canoros receberam maior atenção por parte da comunidade acadêmica em virtude da sua grande diversidade de espécies, oferecendo um rico material para estudos comparativos sobre o aprendizado vocal (WILBRECHT e NOTTEBOHM, 2003; POIRIER et al, 2008).

Figura 1 – Árvore das famílias das aves



FONTE: Figura adaptada de JARVIS e PETKOV (2012) e http://www.birdforum.net/.
Legenda: (a) Árvore das famílias de aves, evidenciando com asteriscos os grupos com aprendizado vocal. Representantes dos grupos de aves com aprendizado vocal: (b) beija-flores, *Calypte anna*; (c) papagaios, *Amazona aestiva*; (d*) zebra finch*, *Taeniopygia guttata* (oscines).

A aquisição de um aprendizado vocal em humanos e pássaros canoros requereu o desenvolvimento de um complexo sistema de hierarquia entre áreas neurais encefálicas, no qual os centros motor e auditivo interagem mutuamente para produção do som (DOUPE e KUHL, 1999; WILBRECHT e NOTTEBOHM, 2003; JARVIS, 2004; MONEY, 2009; AKUTAGAWA e KONISHI, 2010).

O aprendizado do canto por pássaros canoros exerce, até certo grau, um paralelo com o aprendizado da fala em humanos (MARLER, 1970; DOUPE e KUHL, 1999) e por esta razão é um campo de estudo da neurociência em vasto crescimento. Os principais centros neuronais envolvidos no aprendizado e na produção do canto

têm sido identificados e caracterizados fisiologica e histologicamente durante as últimas cinco décadas. Brenowitz e colaboradores (1997) destacam as vantagens de se estudar o sistema do canto de pássaros como modelo para identificação de mecanismos neurais que fazem parte de comportamentos biologicamente relevantes:

- O canto é um comportamento aprendido e controlado por circuitos neurais discretos;

- Há distintas fases no desenvolvimento do canto, com janelas sensoriais bem definidas;

- O canto é o produto de sistemas motores estereotipados, com núcleos pré-motores e motores organizados hierarquicamente;

- O comportamento do canto, bem como os circuitos neurais envolvidos para sua produção, são sexualmente dimórficos na maioria das espécies;

- Hormônios esteroides têm grande efeito no desenvolvimento e função dos circuitos neurais, bem como no dimorfismo do canto;

- Ocorre plasticidade do sistema do canto em animais adultos, incluindo neurogênese e mudanças sazonais de morfologia.

1.2 O CANTO

O canto das aves é definido como um sinal de comunicação sonora que contém a informação de reconhecimento específico (VIELLIARD, 1987). Na maioria das espécies o pico de atividade do canto está associado à reprodução. Durante este período, os machos, principalmente, costumam cantar por horas na tentativa de atrair fêmeas para o seu território; outra função importante do canto é a aquisição e defesa do território contra um invasor (CAREW, 2000; NOWICKI e SEARCY, 2004;

BEECHER e BRENOWITZ, 2005; CATCHPOLE e SLATER, 2008; CLAYTON et al., 2009).

O canto determinado geneticamente (inato) apresenta sinais simples e estereotipados. Este tipo de canto é fixo e mantido desta forma garante a especificidade da mensagem e sua transmissão de uma geração a outra. Estudos demonstram que a transmissão do sinal sonoro é realizada mesmo na ausência de um modelo, como se verifica em experimentos de criação de espécies que foram mantidas em isolamento acústico e que desenvolveram um canto normal. Este é o caso das aves das famílias *Columbidae* (pombas, rolas e juritis), *Tinamidae* (macucos e inhambus) e talvez da maioria dos pássaros não-Passeriformes (tucanos e garças, por exemplo) e dos Passeriformes Suboscines (bentivizinho-de-asa-ferrugínea, chocas e cricrió, por exemplo) (SILVA, 1995; VIELLIARD, 1997; VIELLIARD, 2005).

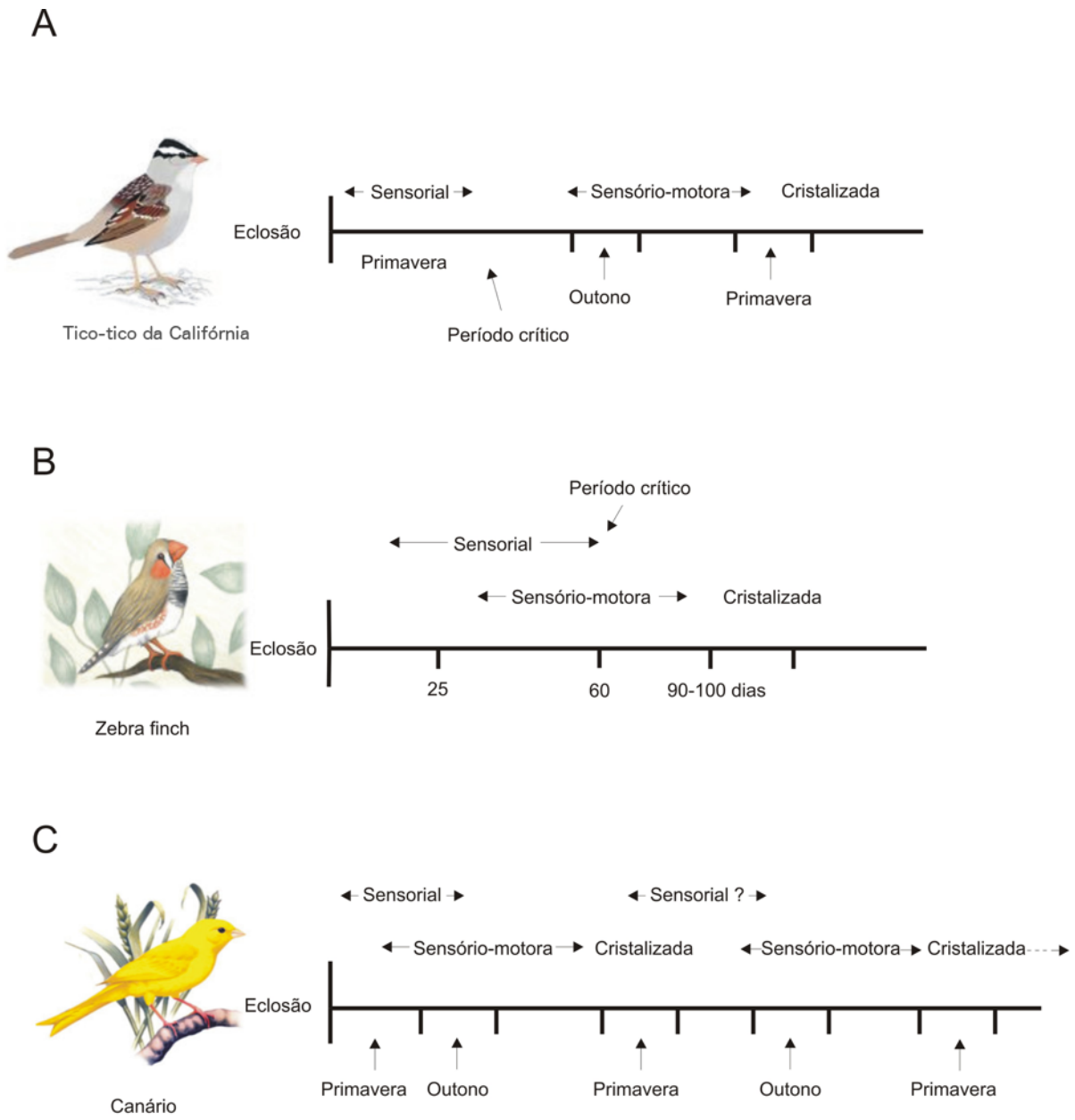
Em diversas aves, somente o canto determinado geneticamente não é suficiente para tornar o canto funcional, sendo necessária a complementação do canto inato com o canto aprendido. Em outras palavras, para que o canto de certas aves seja funcional, isto é, para que haja reconhecimento interespecífico, é necessário que o filhote, em sua fase receptiva, escute o canto correto para que, na fase adulta, possa emitir sons reconhecíveis por seus congêneres. Caso isto não ocorra, ele será socialmente eliminado por ser incapaz de defender um território ou atrair um parceiro sexual (VIELLIARD, 1987; JARVIS et al., 2000).

O canto aprendido pode atingir uma enorme complexidade, podendo apresentar possibilidades ilimitadas de variação pela incorporação de sons imitativos (imitação) ou pelo sequenciamento diversificado dos elementos sonoros (versatilidade) (VIELLIARD, 1997; SILVA, 2001). Apesar do canto, na maioria das espécies, ser uma característica restrita dos machos, há evidências de que as fêmeas de muitas espécies, principalmente nos trópicos, também cantem de forma sincronizada ou não com os machos por diversos motivos, tais como defesa territorial e coordenação de atividades reprodutivas (SLATER e MANN, 2004; BEECHER e BRENOWITZ, 2005; RIEBEL et al., 2005; GEBERZAHN e GAHR, 2011; GEBERZAHN

e GAHR, 2013; LOBATO et al, 2015).

A ontogênese do canto aprendido é dividida em três fases. Na fase inicial, sensorial, o pássaro jovem deve ouvir, normalmente, o canto de outros machos da mesma espécie, para que a memória auditiva do canto seja estabelecida; não ocorrendo prática vocal durante este período. A segunda fase é a sensório-motora, caracterizada pela tentativa de conversão da memória auditiva em padrão motor, isto é, o pássaro jovem passa a praticar o canto e tenta ajustar o que vocaliza com o canto que fora memorizado na fase anterior (*feedback* auditivo). Finalmente, a terceira fase denomina-se cristalização e corresponde à transição da fase sensório-motora para o canto cristalizado (versão estereotipada do modelo sensorial ao qual foi exposto na primeira fase), possibilitando o reconhecimento interespecífico (KONISHI, 1985; CAREW, 2000) (FIGURA 2).

Figura 2 - Fases e estágios do desenvolvimento do canto



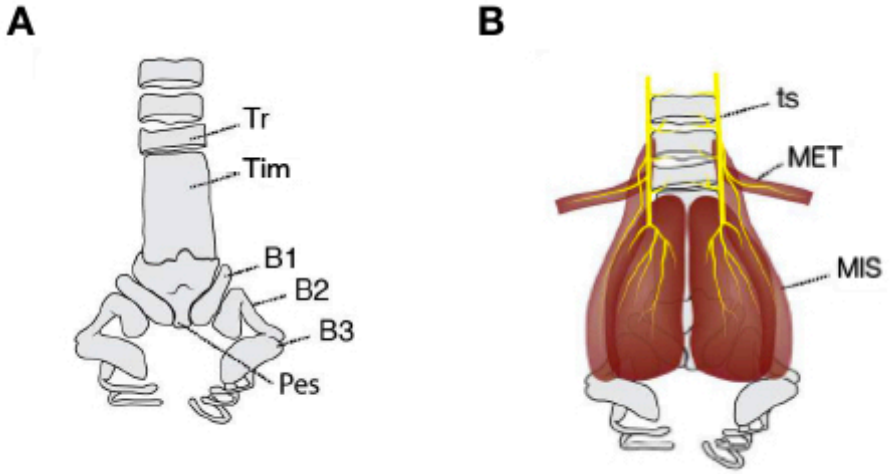
FONTE: LOBATO, 2011.

Legenda: (A) Tico-ticos da Califórnia, tipicamente, apresentam duas fases bem definidas, sensorial e sensório-motora, que levam à cristalização do canto; para esses pássaros o período crítico determina o fim da fase sensorial. (B) em *zebra finches*; as fases sensorial e sensório-motora se sobrepõem até o período crítico (60 dias), quando o canto começa a se cristalizar. (C) em pássaros que são capazes de aprender durante toda a vida, como os canários, há uma sobreposição significativa das fases sensorial e sensório-motora e o canto se cristaliza durante a primavera, período reprodutivo.

Outra característica interessante relacionada ao canto refere-se ao fato de entender como as aves usam o ar para a respiração e para a vocalização. O ato de cantar deve ser precisamente coordenado com a respiração. Essa coordenação é promovida por centros superiores e é essencial, pois a produção sonora só ocorre durante a expiração (CAREW, 2000).

O órgão vocal das aves é a siringe, a qual é uma especialização da junção entre a traqueia e os brônquios primários. Sua estrutura anatômica é altamente variável entre as espécies e por este motivo tem sido bastante utilizada como característica para diferenciação de espécies em análise filogenéticas (KING, 1989; PRUM, 1992). A porção luminal do esqueleto da siringe é coberta por tecidos ricos em fibras de colágeno e elastina e por glicosaminoglicanos (RIEDE e GOLLER, 2010). Esses tecidos formam, em nível dos semi-anéis brônquicos, a membrana *timpaniformis* interna, cuja vibração durante o fluxo expiratório produz o som (CATCHPOLE e SLATER, 2008; RODERICK e ZOLLINGER, 2008) (FIGURA 3).

Figura 3 - Anatomia da siringe de um *zebra finch*.



FONTE: Figura adaptada de FAUNES et al (2017).
Legenda: a siringe é uma estrutura bipartida com dois geradores de som controlados independentemente. (A) Representação esquemática dos elementos ósseos da siringe. (B) Representação esquemática da musculatura siringeal e sua inervação. Nomes anatômicos: Tr, traqueia; Tim, tímpano (fusão da traqueia com os anéis de cartilagem brônquica); B1, B2, B3, semi-anéis brônquicos 1, 2 e 3; Pes, pessulo; ts, porção traqueosiringeal do nervo hipoglosso; MET, músculo esternotraqueal; MIS, músculo intrínseco da siringe.

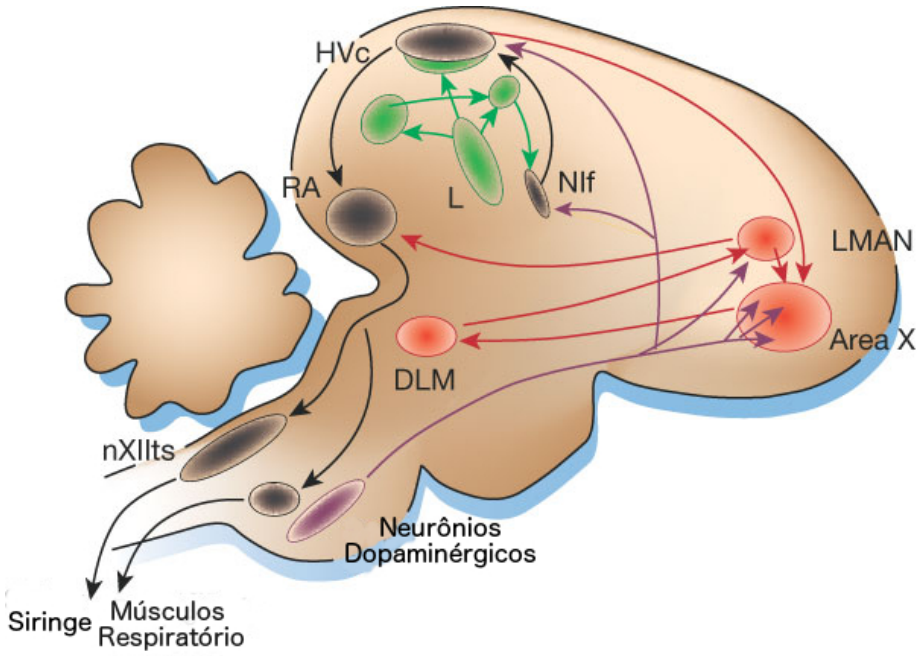
Na parte externa do esqueleto da siringe existem vários pares de músculos que podem se originar ou se inserir na traqueia, semi-anéis brônquicos ou cartilagem brônquica e que são capazes de modificar a tensão e o grau de adução da membrana timpaniformis, modulando, portanto, as frequências acústicas produzidas. Ainda existem os músculos siringeais intrínsecos, com origem e inserção na siringe (KING, 1989) e os músculos siringeais extrínsecos, que conectam a siringe a outras estruturas, como o esterno. Em pássaros canoros, acredita-se que estes dois grupos musculares sejam responsáveis por estabilizar a siringe durante a produção do canto (GOLLER e SUTHERS, 1996; DÜRING et al., 2013; FAUNES et al, 2017).

A siringe é uma estrutura altamente inervada. O nervo traqueosiringeal se projeta rostro-caudalmente ao longo de ambos os lados da traqueia, e ao atingir a siringe, origina vários ramos que invadem os músculos siringeais (FIGURA 3).

1.3 VIAS DE CONTROLE DO APRENDIZADO VOCAL

Em pássaros com aprendizado vocal, memorização e produção do canto são controladas pelo sistema de controle do canto. Este sistema é constituído por estruturas neurais interconectadas envolvidas em dois circuitos principais: via vocal posterior (SMP, *song motor pathway*) ou motora relacionada à produção do canto e via vocal anterior (AFP, *anterior forebrain pathway*) necessária ao aprendizado vocal e plasticidade (KONISHI, 1985; CAREW, 2000; NOTTEBOHM, 2005; CLAYTON et al., 2009; MONEY, 2009; WANG et al., 2009; AKUTAGAWA e KONISHI, 2010) (FIGURA 4).

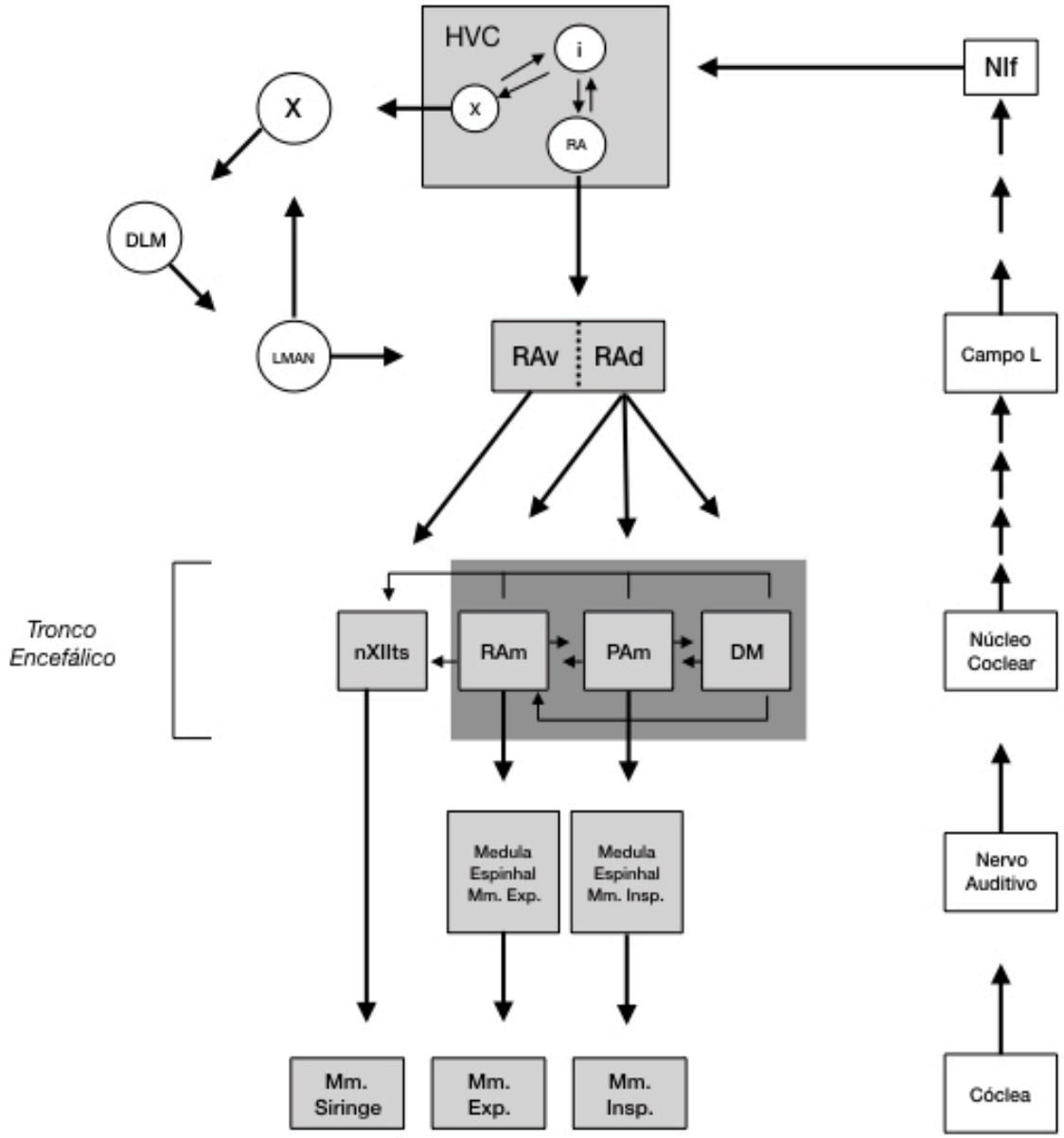
Figura 4 - Desenho esquemático do sistema do canto das aves.



FONTE: Figura adaptada de BRAINARD e DOUPE (2002).
Legenda: Via de produção do canto (setas em preto); via de aprendizagem vocal (setas em vermelho); via auditiva (setas em verde).

A via motora é responsável pela produção do canto e é formada por três núcleos cerebrais maiores com representações bilaterais: núcleo HVC (nome próprio), núcleo robusto do arcopalio (RA) e a porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (nXIIts). O HVC se projeta para o RA, que envia projeções para o nXIIts, e que, por sua vez, manda seus axônios para os músculos da siringe. A atividade neuronal do HVC e do RA são sincronizadas com a produção do som pela siringe (VICARIO, 1991; MARGOLIASH, 1997). O RA também envia conexões para o núcleo retro e para-ambíguo (RAm/PAm), no tronco encefálico, responsável pela respiração, havendo assim, um perfeito sincronismo entre vocalização e respiração (FIGURA 5).

Figura 5 – Representação simplificada do sistema de controle do canto.



FONTE: figura adaptada de SCHMIDT e ASHMORE (2008).

Legenda: o controle vocal é coordenado por um circuito especializado chamado de "via descendente motora do canto" (mostrada em cinza claro). O núcleo HVC (usado como nome próprio) encontra-se no topo deste circuito e se projeta para o núcleo RA (núcleo robusto do arcopalio), o qual é funcionalmente dividido em duas partes: a proção ventral (RAv) que projeta para a porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (nXIIts) no tronco encefálico; e a porção dorsal (RAd) que envia conexões para os núcleos do tronco encefálico que fazem parte da rede vocal-respiratória (RAm, PAm e DM) (mostrada em cinza escuro). O nXIIts contem motoneurônios que inervam a siringe. O RAm projeta para os motoneurônios expiratórios nas regiões torácia inferior e lombar superior da medula espinhal, enquanto que o PAm projeta para os motoneurônios inspiratórios nas regiões braquial inferior e torácica superior da medula espinhal. Além de ser parte formadora da via descendente motora, o HVC, que é composto por três diferentes tipos de células (X, I e RA), também projeta para a via vocal

anterior e recebe *input* auditivo do núcleo NIf. A via vocal anterior, composta pelos núcleos Area X, DLM e LMAN, não é necessária para a produção do canto, contudo desempenha um papel importante no aprendizado e manutenção do canto. Note que enquanto o HVC está a apenas 3 a 4 sinapses distante da musculatura de produção do canto, ele está a pelo menos 8 ou 9 sinapses distante da cóclea (representado pelas setas na via auditiva ascendente). Nomes anatômicos: DLM, porção medial do núcleo talâmico dorsolateral; LMAN, núcleo magnocelular lateral do nidopalio anterior; Campo L é a primeira estrutura auditiva do telencéfalo em pássaros; Área X, área X do estriato medial; NIf, núcleo interfacial do nidopalio; RAm, núcleo retro-ambíguo; PAm, núcleo para-ambíguo; DM, núcleo dorsomedial do complexo intercolicular.

A via motora foi descrita no estudo inaugural de Nottebohm e colaboradores (1976), em que foram feitas lesões nos três núcleos participantes deste circuito (HVC, RA e NXIIts) causando deterioração do canto em pássaros adultos; no HVC, por exemplo, lesões tanto no hemisfério direito quanto no hemisfério esquerdo alteravam a amplitude das notas, além de diminuir o tamanho do repertório do canto da ave testada. Em experimento controle lesões foram feitas em qualquer outro núcleo, sem alterar o canto.

Já a via vocal anterior, por sua vez, compreende um conjunto de conexões entre um núcleo vocal no nidopálio, núcleo magnocelular lateral do nidopálio anterior (LMAN), um núcleo vocal no estriato, área X, ambos localizados rostralmente no telencéfalo, e a porção medial do núcleo talâmico dorsolateral (DLM) no tálamo. A área X recebe conexões do HVC e se projeta para o DLM, que por sua vez, projeta-se para o LMAN; este, por fim, converge à via motora através do núcleo RA. Esta via desempenha um papel fundamental na aprendizagem sensorial e no *feedback* auditivo. (KONISHI, 1985; BRENOWITZ et al, 1997; CAREW, 2000; NOTTEBOHM, 2005; CLAYTON et al, 2009; WANG et al, 2009) (FIGURAS 4 e 5).

Um dos trabalhos pioneiros a respeito da função da via prosencefálica anterior foi o desenvolvido por Sara Bottjer e colaboradores (1984), que descobriram que lesões no LMAN em *zebra finches* jovens alteravam significativamente o canto destes animais na fase adulta, os quais passavam a reproduzir apenas uma ou duas notas extremamente anormais, em baixa amplitude e sem modulação de frequência; e que o tamanho deste núcleo era maior quando os animais estavam aprendendo a cantar, quando comparado ao período em que o canto destes animais começava a se cristalizar; porém, as mesmas lesões em adultos, não alterava o canto de modo

significativo. Através destes resultados, pode-se concluir que o LMAN é responsável por transmitir o *feedback* auditivo necessário para a aprendizagem do canto e por manter a plasticidade no RA, sendo, portanto, essencial para o aprendizado do canto, mas não para sua manutenção. Estudos subsequentes mostraram que lesões na área X e DLM também causavam o mesmo efeito (CAREW, 2000).

Há ainda um terceiro circuito, a via auditiva, responsável pelo processamento auditivo, importante para o reconhecimento do canto (PRATHER e MOONEY, 2004) (FIGURAS 4 e 5). Nesta pesquisa será dada ênfase ao primeiro circuito, pois seus núcleos são objetos de estudo deste trabalho.

1.4 DIMORFISMO SEXUAL NAS ÁREAS NEURAIS QUE CONTROLAM O CANTO E SUA REGULAÇÃO HORMONAL

Dimorfismos sexuais nas áreas neurais que controlam o canto são correlacionadas com o volume dos núcleos que compõem o sistema do canto e envolvem estímulos hormonais (CAREW, 2000; SMALL et al., 2015).

Vários estudos foram realizados em *zebra finches* e em outras espécies da ordem Oscines, em que apenas o macho canta, e foi observado que vários núcleos do sistema do canto, como HVC, RA, nXIIts, e LMAN, possuem maior volume em machos do que em fêmeas. A maior diferença dá-se no HVC, que é aproximadamente seis vezes maior em machos. Todos estes núcleos já podem ser identificados por microscopia óptica aos 10 dias de vida. Em machos, o HVC, o RA e a área X começam a crescer durante a primeira semana pós-eclosão, enquanto o LMAN decresce por volta dos 20 dias em machos e 30 dias nas fêmeas (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; KONISHI e AKUTAGAWA, 1985; BOTTJER *et al.*, 1985; WILLIAMS, 1985; NORDEEN e NORDEEN, 1988; NIXDORF-BERGWEILER, 1996; CAREW, 2000; LOBATO et al, 2015).

Em Oscines, níveis altos de testosterona, além de regularem parcialmente o comportamento de canto por meio da ativação dos núcleos do sistema do canto,

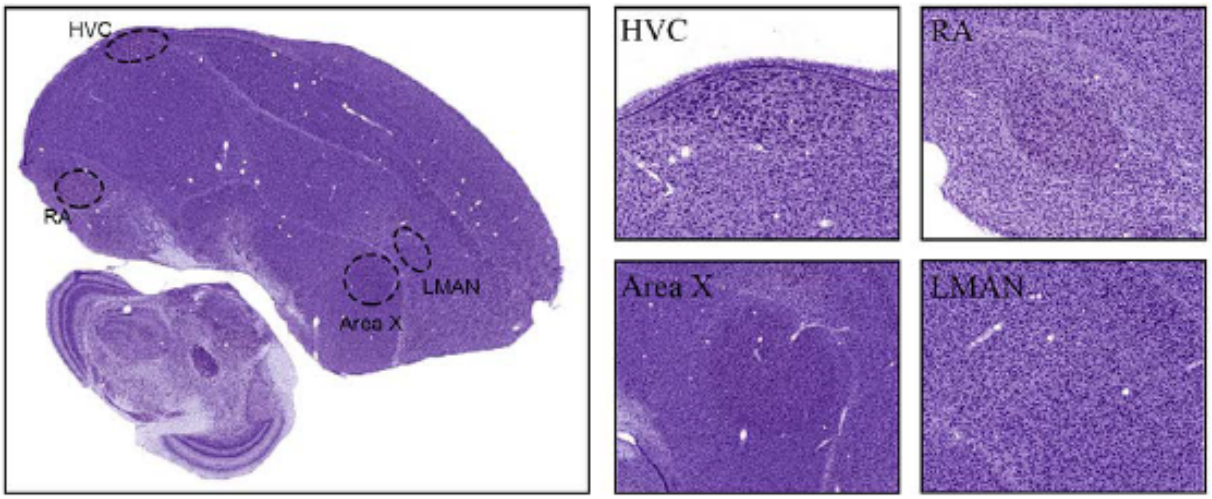
também regulam a sazonalidade do canto e contribuem para o processo de aprendizagem vocal. Assim, pode-se afirmar que, nessas aves, o sistema de controle do canto é uma rede especializada sensitiva a esteroides, com a maioria dos seus núcleos expressando receptores andrógenos, sendo que HVC, RA e Área X também expressam receptores estrógenos (METZDORF et al, 1999; GAHR, 2001; FUSANI et al., 2003; SMALL et al., 2015). Quando estimulado por testosterona, o HVC cresce rapidamente devido principalmente ao aumento da quantidade de neurônios que migram e que são incorporados ou que tem maior sobrevivência na região deste núcleo (RASIKA et al., 1994; YAMAMURA et al., 2011). O crescimento do RA, embora menor e mais lento do que do HVC, é devido ao aumento do tamanho dos neurônios, com taxa de recrutamento constantes e possivelmente proliferação celular induzida por testosterona (THONPSON e BRENOWITZ, 2005; BARKER et al., 2014).

A expressão desses receptores é semelhante em ambos os sexos, com exceção das espécies cujas fêmeas não cantam, pois estas apresentam pouca ou nenhuma expressão de receptores hormonais (GAHR, 2001; METZDORF et al, 1999). Um estudo de Gurney e Konishi (1980) demonstrou que uma fêmea de *zebra finch*, que normalmente não canta passou cantar ao ser tratada com testosterona e seus núcleos tornaram-se maiores quando comparados com os das fêmeas não tratadas, provando que há mecanismos hormonais envolvidos na produção do canto e que a via de esteroides é o mecanismo primário que medeia o crescimento dos núcleos (BRENOWITIZ, 2004).

1.5 MARCADORES DE NÚCLEOS DE CONTROLE DO CANTO

Os núcleos cerebrais de controle do canto podem ser visualizados por técnicas histológicas como Nissl (FIGURA 6)

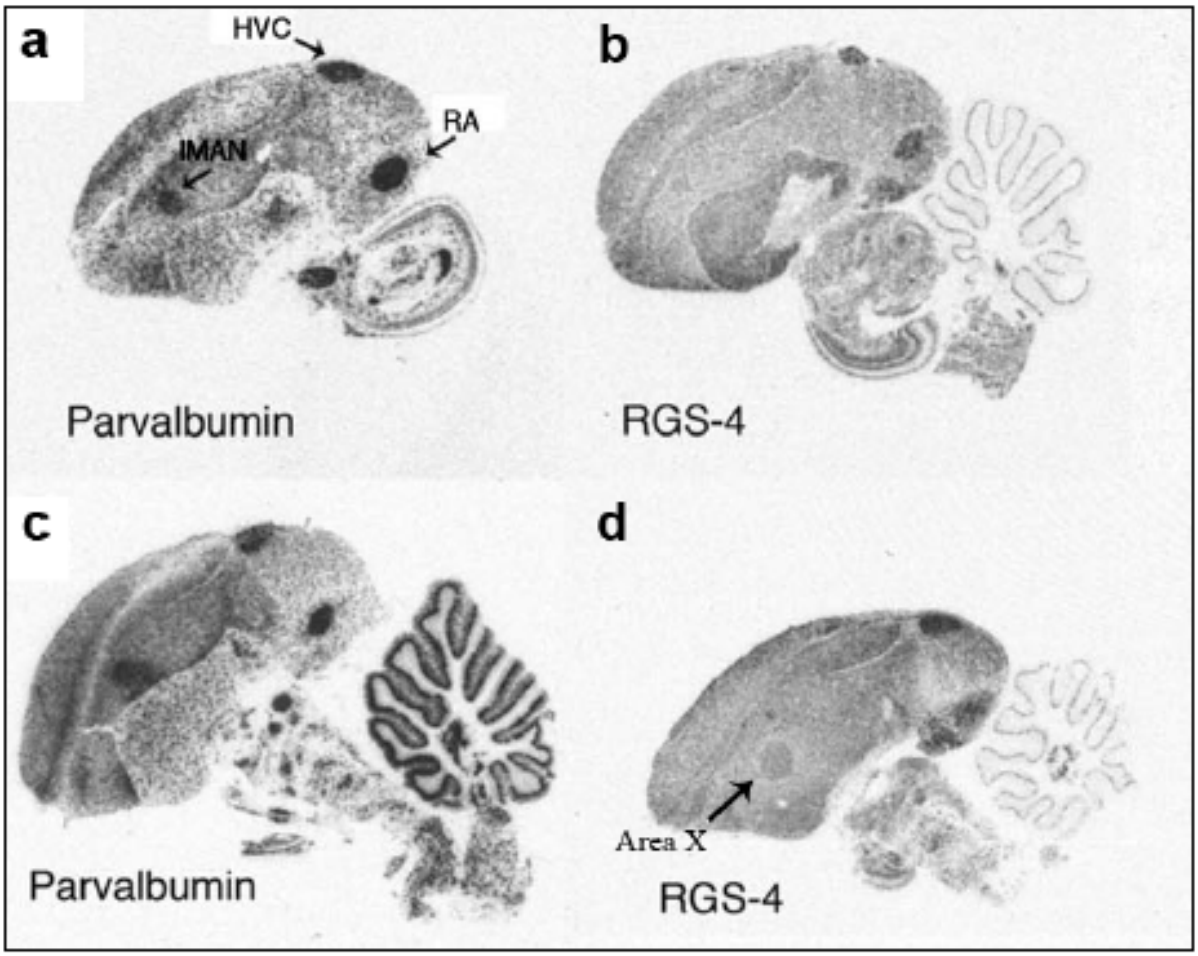
Figura 6 – Núcleos do sistema do canto em *zebra finch*



FONTE: Figura adaptada de http://www.zebrafinchatlas.org/.
Legenda: corte sagital do cérebro de um *zebra finch* corada por Nissl evidenciando alguns dos núcleos envolvidos no controle do canto. À direita, aproximações dos núcleos indicados, em maior aumento, no painel à esquerda.

Experimentos de hibridização *in situ* realizados em *zebra finch* e canários identificaram vários genes, dentre eles, a parvalbumina (PVALB) e o regulador 4 de sinalização de proteína G (RGS4), como genes super expressos nos núcleos HVC, RA, LMAN e Área X (LI et al., 2007). A proteína ligadora de cálcio PVALB é expressa especificamente ao longo da via vocal posterior ou motora em todas as aves com aprendizado vocal, sugerindo-se que o canto requer extra sinalização de cálcio (Li et al. 2007; JARVIS e PETKOV, 2012) (FIGURA 7). Outro gene muito utilizado na hibridização *in situ* para identificação dos núcleos de controle canto é o receptor andrógeno (AR).

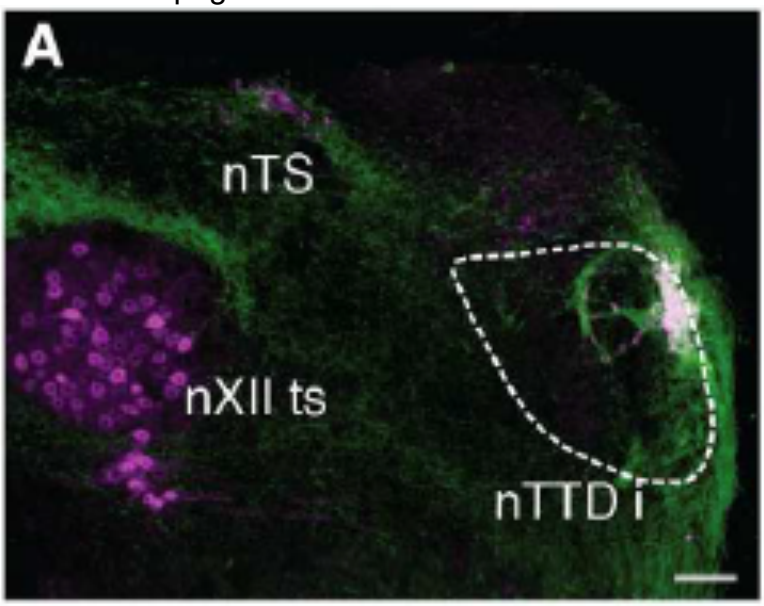
Figura 7 – Hibridização *in situ* em secções de cérebro de *zebra finch* e canário



FONTE: figura adaptada de Li et al. (2007).
Legenda: (a,c) Parvalbumina e (b, d) RGS4 são genes expressos em altos níveis em núcleos de canto de machos adultos de *zebra finch* (a, b) e canário (c, d). FONTE: figura adaptada de Li et al. (2007).

Outras técnicas bastante utilizadas na identificação dos núcleos que compõem o sistema do canto são a injeção de traçador neuronal e a imunohistoquímica (FIGURA 8).

Figura 8 – Imunofluorescência contra subunidade B da toxina colérica (CTB) no tronco encefálico de um *zebra finch* após injeção do traçador neuronal CTB na porção traqueosiringeal do nervo hipoglosso



FONTE: figura adaptada de FAUNES et al. (2017).
Legenda: (**A**) Fotomicrografia confocal de uma secção coronal evidenciando núcleo nXIIts relacionado à produção do canto corado através de imunohistoquímica contra CTB (magenta). Escala = 100 µm.

1.6 A ESPÉCIE *MYIOZETETES CAYANENSIS* NO CONTEXTO DESTA INVESTIGAÇÃO

A família *Tyrannidae* faz parte do grupo Passeriforme (Suboscines) e congrega um dos grupos mais diversificados de aves do mundo, sendo, no Brasil, os pássaros que mais se veem e ouvem. Os tiranídeos se adaptaram a diferentes nichos ecológicos (SICK, 1997). Entre as espécies da família *Tyrannidae* está o *Myiozetetes cayanensis*, popularmente conhecido como bentevizinho-de-asa-ferrugínea.

Esta espécie possui 17,5 cm, lados bem anegrados na cabeça, bem como faixa amarela ou alaranjada no píleo e bordas nitidamente ferrugíneas das rêmiges e das retrizes (SICK, 1997) (FIGURA 9). Ocupa áreas de florestas, capoeiras, cerrados e matas de galeria, alimentando-se de frutos e insetos. No Brasil, é facilmente encontrado nos estados do Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Pará e Maranhão (CARVALHO, 1960; SICK, 1997).

Figura 9 – Foto do *Myiozetetes cayanensis.*

Fonte:http://www.photoaves.com/cache/multithumb_thumbs/b_0_0_0_10_images_aves_tyrannidae_tyranninae_bentevizinho-de-asa-ferruginea.jpg

Estudos preliminares desenvolvidos por pesquisadores do Laboratório Ornitologia e Bioacústica da Universidade Federal do Pará (LOBio), demonstraram que machos e fêmeas cantam em dueto, alternando seu canto. Tal dado sugere que esta espécie também possua alguma forma de aprendizado temporal do canto (dados não publicados). Além disso, observou-se que o *Myiozetetes cayanensis* emite sinais sonoros complexos. Todas estas evidências apontam para existência de aprendizado vocal nesta espécie, daí nosso interesse em estudar de forma mais detalhada a neuroanatomia do cérebro deste pássaro.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Estudar a organização morfológica do sistema do canto de pássaros machos e fêmeas adultos da espécie *Myiozetetes cayanensis*.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Identificar os núcleos relacionados à produção do canto através de cortes histológicos corados pelo método de Nissl, hibridização *in situ* radioativa e através de injeção de traçador neuronal;

- Mensurar área e calcular volume dos núcleos em machos e fêmeas das espécies estudadas no animal adulto para averiguar a existência de dimorfismo sexual.

- Verificar se há diferença nas medidas de área e volume dos núcleos cerebrais estudados quanto à utilização do método dos diferentes métodos selecionados para a realização desta pesquisa;

- Comparar as áreas envolvidas na produção do canto, do ponto de vista morfológico, do *Myiozetetes cayanensis* com o *zebra finch* (*Taeniopygia guttata),* espécie de pássaro Oscine amplamente descrito na literatura.

2 JUSTIFICATIVA

A comunidade científica, ao longo dos anos, tem tomado como verdade que os Suboscines diferem dos Oscines por não serem capazes de aprender vocalizações. O que corrobora tal hipótese é a ausência de dialetos vocais (variação geográfica e entre populações do canto). Além do mais, experimentos de isolamento acústico em três espécies de Suboscines (*Empidonax trailii, Empidonax alnorum, Sayornis phoeb*) demonstraram que seus cantos permanecem inalterados na fase adulta (canto inato) (KROODSMA, 1984, 1985; KROODSMA e KONISHI, 1991). Investigações neuroanatômicas demonstraram que Suboscines não possuem os núcleos prosencefálicos relacionados ao aprendizado do canto (GAHR et al., 1993).

Entretanto, estudos recentes desenvolvidos em duas espécies de Contigidae (passeriforme Suboscine) revelaram a existência de extensivas variações vocais (dialetos) quantitativas e qualitativas entre as populações reprodutivas, indicando que esta espécie é capaz de aprender seu canto (KROODSMA, 2005; SARANATHAN et al., 2007) Outros estudos em representantes deste grupo, tais como em *Procnias tricarunculata* (araponga), *Syornis Phoebe* e *Willisornis poecilinotus* (rendadinho) mostraram indícios de regiões cerebrais possivelmente envolvidas no controle do canto (SARANATHAN et al., 2007; LIU et al., 2013; LIMA et al., 2015).

Esta evidência incita a investigação de outras espécies de pássaros Suboscines, visto que a distinção entre pássaros aprendizes e não-aprendizes vocais não é tão óbvia quanto sugerido. Assim, o presente estudo, além de fornecer a base metodológica para estudos neuroanatômicos posteriores de aves amazônicas e tropicais, contribui como um subsídio neurobiológico importante para estudos eto-ecológicos, ajudando a compreender o complexo processo de desenvolvimento do canto nas aves.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para o mapeamento das áreas cerebrais relacionadas ao canto utilizamos, 20 animais da espécie *Myiozetetes cayanensis*. Desses 20 espécimes, 10 foram utilizados para o estudo através de Nissl e de hibridização *in situ* (ISH) (5 machos e 5 fêmeas); os 10 restantes foram destinados ao estudo através de neurotraçadores.

A captura dos animais foi feita em uma área de Floresta Tropical Úmida no município de Santa Bárbara (a 50km da cidade de Belém-PA), bem como na Universidade Federal do Pará (UFPA), áreas onde a espécie em questão é abundante; preferiu-se realizar as coletas em locais diferentes para que a população de determinada área não fosse extinta. Para coleta foi utilizada uma rede de neblina, para onde os pássaros foram atraídos através da emissão do canto específico da espécie (*playback)* (equipamento de reprodução de som com alto-falante FOXPRO SCORPION X1A) (FIGURA 10). Após captura, os animais foram transportados até o laboratório de campo no Gunma, em Santa Bárbara ou até o laboratório de Neurobiologia da UFPA em bolsa de transporte com bloqueio da luz solar a fim de minimizar qualquer possível estresse não intencional causado pelo transporte.

Uma vez capturadas, as aves tiveram dois fins: morte por decapitação para extração do cérebro ainda fresco e posterior congelamento imediato do mesmo, método este necessário à aplicação da técnica de hibridização *in situ* radioativa; ou foram submetidas à cirurgia para injeção de traçador neuronal e perfundidas após tempo de sobrevida.

Todos os animais foram obtidos mediante autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) (Licença permanente para coleta de material zoológico número 30319-1) e todos os procedimentos experimentais foram realizados em concordância com as normas nacionais alemãs e aprovados pelo Governo da Alta Bavária, bem como pelo Comitê de proteção e cuidado aos animais do Instituto Max-

Planck, Alemanha e pelas Comissões de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA nº 2585040517) e da Universidade federal do Pará (CEUA nº 7696310817).

Figura 10 – Rede de neblina utilizada para captura das aves utilizando a técnica de *Playback*

Fonte: Foto realizada na Universidade Federal do Pará durante coleta de campo em julho de 2015.
Legenda: área circundada pelo tracejado em vermelho corresponde à rede de neblina que é confeccionada em linha de nylon. O pássaro é atraído para esta rede com o auxílio do equipamento de som que é posicionado próximo à rede (asterisco em preto) camuflado com folhas de árvore.

3.2 INJEÇÃO DE TRAÇADOR NEURONAL

Na tentativa de identificar as áreas cerebrais relacionadas à produção do canto na espécie *Myiozetetes cayanensis* lançamos mão da técnica de injeção de traçador neuronal retrógrado *in vivo*.

Após estudo piloto em *Zebra finch*, bem como pesquisa de literatura (BOTTJER et al, 2000; WILD e SUTHERS, 2000; HAYASHI et al, 2007; WILD e KRUTZFELDT, 2012), os traçadores neuronais escolhidos para teste em *Myiozetetes cayanensis* foram Dextrana biotinilada 3.000 MW (BDA 3.000, Molecular Probes), o Fast Dil

(D3899, D7756, Molecular Probes) e a subunidade beta da toxina colérica (CTB, Sigma Aldrich) por servirem ao propósito desta pesquisa.

A Dextrana biotinilada (BDA) é um polissacarídeo hidrofílico caracterizado por seu alto peso molecular, boa solubilidade em água, baixa toxicidade e relativo poder de reação, tornando a dextrana conjugada um traçador em longo prazo ideal para células vivas; além disso, o BDA 3.000 MW penetra melhor em nervos periféricos e difunde melhor do que as dextranas de maior peso molecular. Já o Fast DiI é um traçador lipofílico retrógrado da família das carbocianinas. E por fim, a CTB é usada para pesquisas de traçamento neuronal por se ligar ao monossialogangliosídeo (GM1), um glicoesfingolipídeo presente na maioria das membranas das células do sistema nervoso e tem sido reportado como um excelente traçador em estudos de transporte axonal.

Os neurotraçadores, em questão, foram injetados nas seguintes quantidades e concentrações conforme descrito na TABELA 1.

Tabela 1. Lista dos traçadores neuronais utilizados nesta pesquisa

Neurotraçador	Quantidade injetada	Concentração
Dextrana biotinilada (BDA) 3.000 MW	1 µl	2% em PBS
Fast DiI	2 µl	1% em PBS
Subunidade beta da toxina colérica (CTB)	2 µl	1% em PBS

3.2.1 Procedimento cirúrgico e pós-cirúrgico

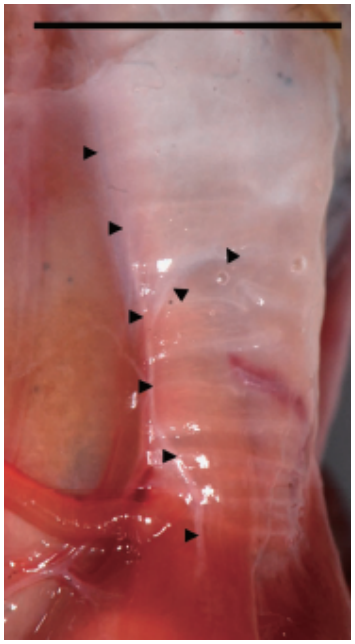
Para a injeção do traçador neuronal, o animal recebeu anestesia intramuscular composta de partes iguais de cloridrato de cetamina (50 mg/kg de peso corporal de Ketalar®; Pfizer) e xilazina (20 mg/kg de peso corporal de Rompum®; MILES-LAB) (GUIMARÃES e MORAES, 2000) e foi posicionado em decúbito lateral esquerdo numa mesa cirúrgica com bico e asas devidamente contidas (FIGURA 11).

Figura 11 - Ave posicionada em decúbito lateral esquerdo em mesa cirúrgica durante cirurgia para injeção de traçador neuronal

Fonte: Foto realizada no laboratório de Neuroengenharia da Universidade Federal do Pará em agosto de 2015 durante realização de experimento.

Uma vez devidamente posicionada, o pescoço da ave foi exposto com o auxílio de um algodão embebido em álcool etílico a 70% e, se necessário, algumas penas foram removidas com pinça para melhor visualização da área da incisão. Como o nervo hipoglosso está localizado paralelo e lateralmente à traqueia (FIGURA 12), uma pequena incisão na porção ventrolateral do pescoço, à direita da traqueia foi realizada.

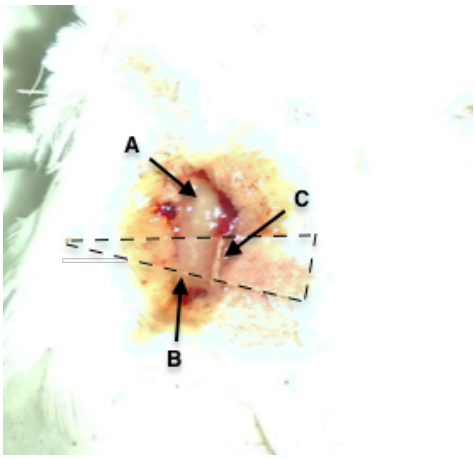
Figura 12 – Fotomicrografia da vista ventrolateral da siringe de um *zebra finch*



Fonte: Foto realizada no laboratório de Neurobiologia do Instituto Max Planck de Ornitologia, Seewiesen, durante realização de experimento em março de 2015.
Legenda: as setas pretas evidenciam o nervo hipoglosso (NXII) ao longo do lado direito da traqueia. Escala = 1 cm.

Posteriormente, o nervo hipoglosso foi exposto removendo-se a menor quantidade possível de tecido circundante. Uma vez exposto, um pedaço de *parafilm* (Sigma Aldrich) foi passado por baixo do nervo esticando-o (FIGURA 13); e algumas gotas de parafina derretida (42°C ponto de fusão) foram colocadas por cima do nervo para evitar a sua dessecação durante o processo de injeção. Uma micropipeta de vidro (World Precision Instruments 1B150F-4) com um diâmetro entre 20μm e 25μm foi conectada a uma mangueira que era utilizada para soprar o traçador para o interior do nervo. Após a injeção o *parafilm* foi cuidadosamente removido e a incisão foi fechada com a utilização de cola cirúrgica veterinária (Surgibond, SMI). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com o auxílio de lupa (Olympus OME-5000, Olympus Optical CO). A injeção foi realizada, preferencialmente, no nervo hipoglosso direito devido à maior proximidade do lado esquerdo aos vasos sanguíneos.

Figura 13 – Foto do nervo hipoglosso esquerdo de um *Melopsittacus undulatus* durante experimento piloto para teste dos traçadores CTB e Fast DiI



Fonte: Foto realizada no laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Pará durante realização de experimento em abril de 2017.

Legenda: (A) traqueia; (B) Pedaço de *parafilm* posicionado embaixo do nervo hipoglosso para esticá-lo e facilitar a injeção do traçador; (C) nervo hipoglosso esquerdo.

Após a cirurgia, esperou-se o animal acordar para colocação em gaiolas de tecido para não haver ferimentos ao se debaterem para fugir, pois se trata de animais selvagens. Foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE – UFPA) com esquema claro/escuro de 12 h/12 h, água e alimento à vontade. O tempo de sobrevida do animal após a injeção do traçador neuronal variou de 1 a 3 dias. Após este período, os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos (ver item 3.3).

3.3 PERFUSÃO

Decorrido o tempo de sobrevida, os animais injetados com traçador neuronal foram perfundidos.

Para tal, os espécimes foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg de peso corporal de Ketalar®; Pfizer) e xilazina (20mg/kg de peso corporal de Rompum®; MILES-LAB). Posteriormente, a caixa torácica foi cirurgicamente

exposta e se seguiu a perfursão intracardíaca com solução salina 0,9%. Quando não havia mais sangue na circulação, foi perfundida solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4 (PFA 4%). Terminada a perfusão, os cérebros foram removidos (ver item 3.4) e pós-fixados com PFA 4% durante 24 horas.

3.4 REMOÇÃO DOS CÉREBROS

Todos os animais coletados tiveram seus cérebros removidos. Para tal, utilizamos luvas e decapitamos a ave com auxílio de tesoura de ponta romba, através de um corte transversal na região entre o osso occipital e a coluna vertebral. Isolada a cabeça, o cérebro foi exposto rebatendo-se a pele do pescoço do animal. Em seguida, com a ajuda de uma microtesoura, foi realizado corte no sentido fronto-caudal ao nível da linha média do cérebro, e cortes ao redor do cérebro, a fim de remover a calota craniana superior. Após exposição, uma pinça foi inserida na região posterior até a base do crânio e, com movimentos de baixo para cima e em direção à porção anterior, o cérebro foi descolado da caixa craniana, rompendo nervos. Este foi então acondicionado em laminado de alumínio; devidamente identificado conforme protocolo padrão e, imediatamente, congelado em gelo seco ou nitrogênio líquido, sendo armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso. Com o intuito de evitar alterações da estrutura morfológica do tecido, o procedimento de extração do cérebro foi realizado o mais rápido possível, com duração média de 90 segundos.

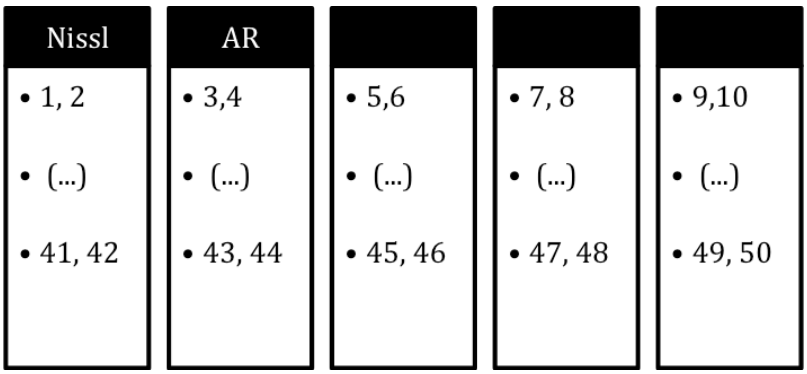
Já o cérebro dos animais perfundidos foram pós-fixados em PFA 4% por no mínimo 4 horas e depois colocados em solução de sacarose 30% e armazenados em geladeira até que eles afundassem (geralmente 8 horas). Decorrido este tempo, os cérebros foram embebidos em gelatina 12% e novamente pós-fixados por mais duas horas. Foram, então, colocados em solução de sacarose 30%, armazenados em geladeira até que afundassem e seccionadas em criostato como descrito no item 3.6.

3.5 SECÇÕES SAGITAIS

Os cérebros selecionados para análise através da coloração de Nissl e de ISH foram colocados no interior do criostato (JUNG CM 3000 LEICA) a temperatura de -19°C. O hemisfério esquerdo do cérebro foi embebido em um meio de inclusão (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura Finetek, EUA), montado e congelado no próprio criostato. Em seguida, foram feitos cortes seriados do hemisfério direito com a espessura de 20µm. Os cortes obedeceram sempre um procedimento padrão de orientação e foram sempre feitos de lateral para medial, terminando ao nível da linha média.

As secções foram coletadas em diferentes lâminas *Superfrost Plus* (Fisher Biotech, Orangeburg, NY), de modo a obter séries de secções adjacentes em cinco lâminas. A primeira lâmina de cada série dos cérebros congelados foi utilizada para coloração de Nissl com tionina 0,1%, ao passo que as demais foram destinadas a detecção de receptores andrógenos por meio da hibridização *in situ ou ainda* congeladas e armazenadas em freezer a -80°C para realização de outros procedimentos experimentais não inclusos nesta pesquisa. Obtivemos, em média, quatro séries de cinco lâminas cada, totalizando 20 lâminas por hemisfério cerebral (FIGURA 14).

Figura 14 – Desenho esquemático mostrando como os cortes seriados foram organizados



Fonte: Figura da própria autora, 2017.
Legenda: cada série foi composta de cinco lâminas e em cada lâmina coletou-se dez secções, totalizando 50 secções por série. A primeira lâmina de cada série foi destinada à coloração de Nissl; as demais à detecção de receptores andrógenos (AR) por meio de hibridização *in situ* ou armazenadas para posterior uso com outros tipos de marcações não inclusas nesta pesquisa.

3.6 SECÇÕES TRANSVERSAIS

Todos os animais submetidos à cirurgia para injeção de traçador neuronal, após um período médio de sobrevida de 1 a 3 dias foram perfundidos. E os cérebros e as siringes desses animais foram seccionados em criostato (JUNG CM 3000 LEICA) à 40 µm e à 45 µm respectivamente. Os cortes obedeceram sempre a um procedimento padrão de orientação e foram sempre feitos de caudal para frontal. As secções foram coletadas em PBS1x (*free-floating*) de modo a obter duas séries de secções adjacentes e posteriormente montadas, de modo sequencial, em diferentes lâminas gelatinizadas (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO). Ambas as séries foram submetidas à imunohistoquímica, porém a primeira série foi contracorada com Nissl com tionina 0,1%, ao passo que a segunda foi corada com DAB.

3.7 COLORAÇÃO DE NISSL

3.7.1 Protocolo de Coloração

As primeiras séries de lâminas (cortes sagitais e transversais) foram submetidas ao processo de coloração de Nissl, que envolve quatro etapas:

1. Etapa de hidratação:

    a. Imersão das lâminas durante sessenta segundos em cada uma das soluções ordenadas como se segue: etanol 100%, etanol 90%, etanol 70%, etanol 20%, água destilada;

2. Etapa de coloração:

    a. Os cortes foram imersos em tionina a 0,1% (ver protocolo em anexo I) por oito segundos;

    b. Imersão em água destilada, durante quarenta e cinco segundos, para remoção do excesso de corante.

3. Etapa de desidratação:

    a. As secções foram imersas, durante quarenta e cinco segundos, em etanol 20% e, subsequentemente, em soluções etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% durante cinquenta segundos;

    b. As secções foram finalmente imersas em xilol 100% durante quarenta segundos, antes de serem montadas com lamínula e com meio de montagem (Permount, Daigger, U.S.A.).

Terminado o processo de coloração, as lâminas permaneceram em capela para secagem para posterior armazenamento e análise.

3.8 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* RADIOATIVA

3.8.1 Introdução à Técnica

Esta técnica foi descrita pela primeira vez em 1969 e tem sido utilizada para identificar com precisão ácidos nucléicos ou seus transcritos em amostras de material humano ou de animais (SILVA-VELENZUELA et al., 2006). O fundamento da hibridização *in situ* (ISH) é que ácidos nucléicos, se preservados adequadamente, podem ser detectados através do pareamento de nucleotídeos contidos em fitas complementares de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA) através de ligações de hidrogênio numa lâmina de vidro (MOENCH, 1987; WILSON E HIGGINS, 1990). Portanto, torna-se possível parear DNA-DNA, DNA-RNA e RNA-RNA. Nesta pesquisa, foi realizado o pareamento RNA-RNA, visto que esta ligação apresenta alta estabilidade térmica, o que aumenta a especificidade, ou seja, aumenta a possibilidade se identificar apenas o RNA-alvo.

A identificação do RNA ou dos seus transcritos é feita por meio de sondas, contendo a sequência de nucleotídeos de um RNA conhecido, que irá se ligar ao RNA-alvo. As sondas de RNA utilizadas na reação de ISH devem ser inicialmente marcadas com radioisótopos (ISH radioativa) como ^{3}H, ^{35}S, ^{32}P; ou com materiais não-radioativos (ISH não-radioativa) como biotina, digoxigenina ou fosfatase alcalina (MOENCH, 1987; WILSON E HIGGINS, 1990; SILVA-VELENZUELA et al, 2006). Para a realização deste estudo utilizamos sondas de RNA marcadas com ^{35}S. Esta escolha foi baseada no fato de sondas radioativas poderem detectar níveis mais baixos de transcritos em relação às sondas não radioativas (BRAISSANT e WAHLI, 1998).

As sondas de RNA ou ribossondas podem ser preparadas a partir de reação de transcrição *in vitro*, utilizando sequências de DNA como molde, as quais foram subclonadas em um vetor próprio para transcrição. Vetores são definidos como fragmentos de DNA que se replicam em células vivas e são construídos para carregar um fragmento exógeno de DNA (WILSON E HIGGINS, 1990). Nesse trabalho, foram usadas ribossondas previamente preparadas no laboratório de biologia molecular do

Instituto Max-Planck de Ornitologia em Seewiesen, Alemanha (comunicação pessoal com Carolina Frankl, frankl@orn.mpg.de).

O sucesso dessa reação depende do estabelecimento de critérios rigorosos relacionados à preservação do tecido, preparação de sonda, reagentes e otimização das condições da reação. Ao se trabalhar com RNA, esses critérios devem ser ainda mais rigorosos, pois o RNA é facilmente degradado pela ação das ribonucleases, enzimas que são termoestáveis e resistentes a quase todos os tipos de superfícies. Para minimizar este problema é essencial a utilização de luvas e o uso de produtos específicos como RNase Away (Ambiom, Austin, Texas) para diminuir a ação das ribonucleases, evitando qualquer risco de contaminação do material ou da reação pelo pesquisador (SILVA-VELENZUELA et al., 2006).

3.8.2 Protocolo

3.8.2.1 Hibridização

O processo de hibridização tem duração de dois dias e para a realização desta pesquisa foram utilizados os seguintes marcadores: receptor andrógeno (AR); *RAS guanyl releasing protein 1* (RASGRP1), receptor de fator neutrófilo ciliar (CNTRF), *GLIS family zinc finger 3* (GLIS3), ALDH1A2, *Solute carrier family 6, member 7* (SLC6A7) e EPHB1. A escolha dos receptores foi feita após estudo prévio de microarranjo, que determinou maior nível de expressão gênica do prosencéfalo da ave em estudo para estes receptores. Este estudo foi realizado no laboratório de biologia molecular do Instituto Max-Planck de Ornitologia em Seewiesen, Alemanha (comunicação pessoal com Carolina Frankl, frankl@orn.mpg.de).

No primeiro dia, as secções destinadas à hibridização foram retiradas do freezer e levadas a uma câmara de ultravioleta para secagem. Depois de secas, as lâminas passaram por banhos consecutivos de: FPBS 4% (5 minutos), PBS 1x (lavagem), solução TEA (lavagem), solução TEA com 620 µl de anidrido acético (Merck 822278) (10 minutos), SSC 2x (lavagem), etanol 70% (1 minuto), etanol 90%

(2 minutos), etanol 100% (1 minuto), clorofórmio 100% (5 minutos), etanol 100% (1 minuto), etanol 95% (1 minuto).

Feito isto, as lâminas foram dispostas em uma bandeja para secagem durante 30 minutos. Enquanto as lâminas secavam, retirou-se o frasco com o mix de hibridização do freezer e o mesmo foi aquecido em água fervente por 10 minutos para desnaturação. Posteriormente, colocou-se 50 µl do mix de hibridização em cada uma das lâminas e as cobrimos com lamínulas. Terminado este processo, as lâminas foram incubadas à temperatura de 55°C *overnight*.

No segundo dia, removemos as lâminas da estufa de hibridização, e as mesmas passaram por banhos consecutivos de: SSC 2x (10 minutos, para remoção das lamínulas), solução RNase (30 minutos), solução RNase (30 minutos), SSC 2x (30 minutos a 50°C), SSC 0,2x (30 minutos a 55°C mais 30 minutos a 60°C), etanol 50% (1 minuto), etanol 70% (1 minuto), etanol 90% (1 minuto), etanol 100% (1 minuto). As lâminas foram, então, dispostas em uma bandeja para secagem até o processo de auto-radiografia.

3.8.2.2 Auto-radiografia

Depois de secas, as lâminas foram arrumadas em estojos de auto-radiografia, contendo filmes (Kodak BioMax MR). Os estojos foram cuidadosamente fechados e embrulhados em laminado de alumínio e, então, deixados por quatro semanas numa câmara escura.

Para a revelação, os filmes foram retirados dos estojos e incubados por 3 minutos em revelador, lavados por 20 segundos em água, incubados por 3 minutos em fixador e novamente lavados em água por 20 segundos, sendo subsequentemente pendurados para secagem.

3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunocitoquímica contra CTB foi executada de acordo com protocolo descrito por Faunes e Wild 2017 (ANEXO III). Todos os passos de incubação foram feitos em temperatura ambiente e precedidos de lavagem com PBS (3 lavagens de 10 minutos cada).

Primeiramente, as secções foram incubadas, por 15 minutos, em solução contendo água oxigenada 3% e metanol 50% em PBS para eliminar toda a atividade de peroxidase endógena. Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* em anticorpo primário diluído (Tabela 2) em solução bloqueadora constituída de Triton X-100 0,4% e soro normal de burro a 2% (Donkey serum. Sigma. U.S.A.).

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados neste estudo

Antígeno	**Descrição do Imunógeno**	**Fornecedor, espécie hospedeira.**	**Concentração/Diluição utilisada**
Subunidade beta da toxina colérica	Subunidade beta da toxina colérica extraída do vibrião colérico tipo Inaba 569B	List Biological, goat.	1:12.500

No dia seguinte, as secções foram incubadas, por 1 hora, em anticorpo secundário diluído a 1:500 em solução bloqueadora. Em seguida, as secções foram incubadas, por mais 1 hora, em neutravidina (NeutrAvidin (HRP) Horseradish Peroxidase Conjugate. T. Scientific. U.S.A.) diluída a 1:1.000 em PBS triton 0,4%. Por fim, as secções foram incubadas numa solução composta de Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) 0,25mg/mL, Cloreto de cobalto ($CoCl_2$) a 0.2mg/mL e PBS resultando em uma coloração marrom de fácil visualização. Para que a reação de peroxidase do DAB tivesse início, adicionava-se algumas gotas de água oxigenada 0,3%; e reação era interrompida após 1-3 minutos, lavando-se as secções com PBS.

Terminado o processo de imunohistoquímica, as secções formam montadas em lâminas gelatinizadas e deixadas para secar em temperatura ambiente. A primeira série de cortes era contracorada com Nissl e a segunda série era desidratada (ver ANEXO IV) para que os cortes fossem clareados. E finalmente, as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se meio de montagem *Permount* (Daigger, U.S.A.).

3.10 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NÚCLEOS CEREBRAIS

Através das técnicas descritas acima visamos à identificação dos núcleos relacionados à produção do canto nas espécies de pássaros Suboscines em questão. Uma vez identificadas, comparamos estas áreas com os núcleos centro vocal superior (HVC), robusto do arcopálio (RA) e com a porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts), existentes nos oscines, verificando a existência ou não destes núcleos nas espécies de Suboscines estudadas. A espécie de pássaro oscine que usamos para efeito de comparação foi a *Taeniopygia guttata*, que é largamente estudada e descrita na literatura.

3.10.1 Quantificação da Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Corados com Nissl e Marcados através de Traçador Neuronal

Os cortes sagitais e transversais de córtex corados com Nissl foram analisados por meio de microscopia óptica convencional com o auxílio de um microscópio binocular (LEICA DMRBE; Leitz Ortoplan) acoplados a uma câmera de vídeo e/ou câmera fotográfica digital EVOLT 330 (OLYMPUS). A medida que os núcleos relacionados ao canto foram localizados, utilizando-se objetiva com aumento de 5 vezes, estes foram fotografados e os arquivos resultantes, devidamente, identificados para posterior análise.

A mensuração da área foi feita com o auxílio de programa de análise de imagens, como o *Image J* e/ou o *Spot Advanced* (NHI, *National Health Institute*, USA). Estes programas, através do uso de ferramentas de mensuração, calculam a área dos núcleos cerebrais após delineamento manual. Uma vez que temos estruturas

tridimensionais para serem mensuradas, é essencial obtermos medidas das áreas de cada núcleo desde a secção em que o os núcleos relacionados à produção do canto começam a aparecer até a última secção em que eles deixam de aparecer. Para o cálculo da área total basta realizar uma somatória de todas as medidas de área obtidas. O volume nuclear total foi posteriormente definido pela fórmula:

VOLUME TOTAL = Σ área x espessura dos cortes x intervalo entre as amostras

3.10.2 Quantificação de Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Submetidos à Hibridização *In Situ*

Após a revelação dos filmes autorradiográficos, estes foram digitalizados com o auxílio de um Scanner HP (Hewlett-Packard) de modo a obter imagens de cada lâmina separadamente. A mensuração da área foi feita com o auxílio do programa de análise de imagem *Image J* (NHI, National Health Institute, USA). Através do uso das ferramentas “built-in” e de mensuração, obtivemos a área de todos os núcleos reagiram positivamente aos receptores andrógenos. Os cálculos de área total e volume dos núcleos envolvidos na produção do canto foram realizados conforme foi descrito anteriormente (ver item 3.10.1).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram digitados e tabulados em banco de dados e análise estatística. O banco de dados foi construído com *Microsoft EXCEL 2008* para MAC ou PC. Para a análise morfológica, quando pertinente, realizou-se a análise estatística descritiva, sendo informados os valores percentuais dos resultados obtidos, bem como, a obtenção de medidas de tendência central e dispersão. Para a análise de significância estatística, utilizamos o programa *Graphpad* Prisma 5.0 para MAC ou PC. Para identificar qualquer diferença, quanto ao tamanho das áreas cerebrais entre Suboscines e Oscines, ou ainda relacionada ao sexo (dimorfismo sexual) nas áreas

cerebrais estudadas foi aplicado o ANOVA, utilizando nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Os nossos resultados foram obtidos de 20 experimentos divididos nas três técnicas estudadas. O material analisado apresentava boa preservação tecidual e os núcleos puderam ser facilmente identificados a partir da descrição anatômica e/ou mapas estereotáxicos feitos em *zebra finch* (NIXDORF-BERGWEILLER e BISCHOF, 2007).

4.1 ANIMAIS

Foram estudados os cérebros de vinte pássaros distribuídos conforme demonstrado na TABELA 3.

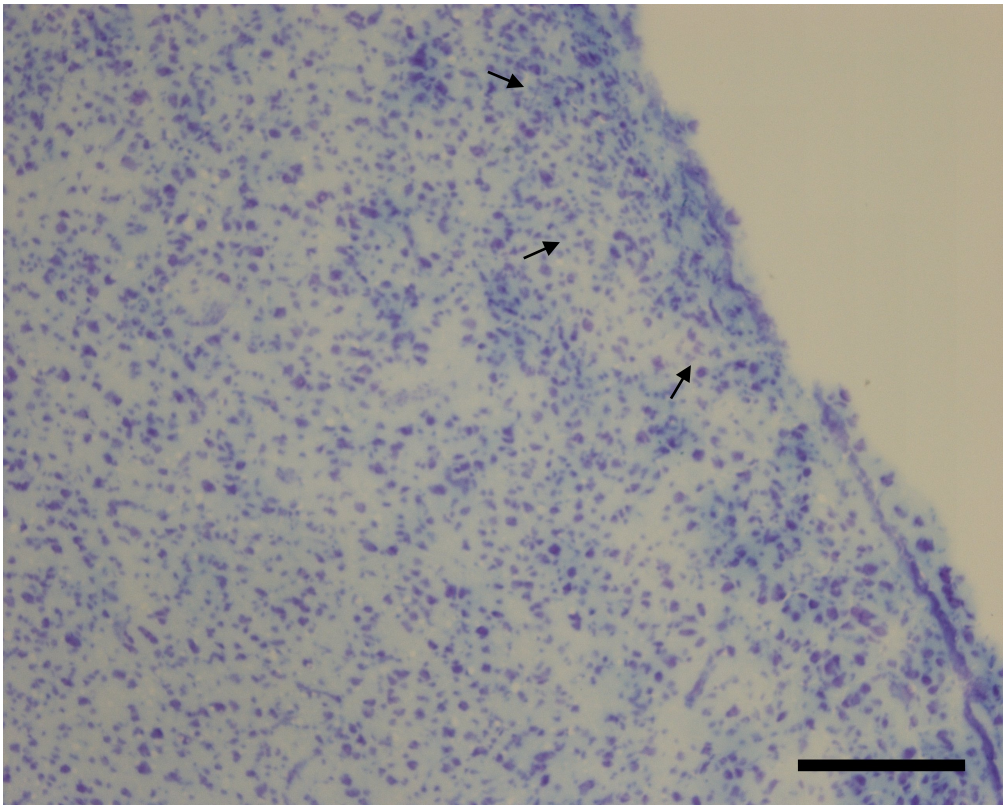
Tabela 3. Distribuição dos animais estudados conforme sexo e técnica utilizada

ANIMAL	MACHO	FÊMEA	NISSL	HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*	TRAÇADOR NEURONAL
MC 2		X	X	X	
MC 3		X	X	X	
MC 6		X	X	X	
MC 51	X		X	X	
MC 52	X		X	X	
MC 54		X	X	X	
MC 55	X		X	X	
MC 56	X		X	X	
MC 61		X	X	X	
MC 64	X		X	X	
MC 65		X			X
MC 66	X				X
MC 67	X				X
MC 68	X				X
MC 69		X			X
MC 70	X				X
MC71		X			X
MC72	X				X
MC73		X			X
MC74	X				X
TOTAL	11	9	10	10	10

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO PELO MÉTODO DE NISSL

Através do método de Nissl, verificamos que o córtex desses animais apresenta um padrão de coloração regular; porém em nenhum dos animais analisados identificamos áreas com organização, notadamente, distintas das demais zonas do córtex e que se assemelhassem aos núcleos relacionados à produção do canto, como verificado no córtex dos pássaros Oscines (FIGURAS 15 e 16); assim, não foi possível também quantificar estas áreas.

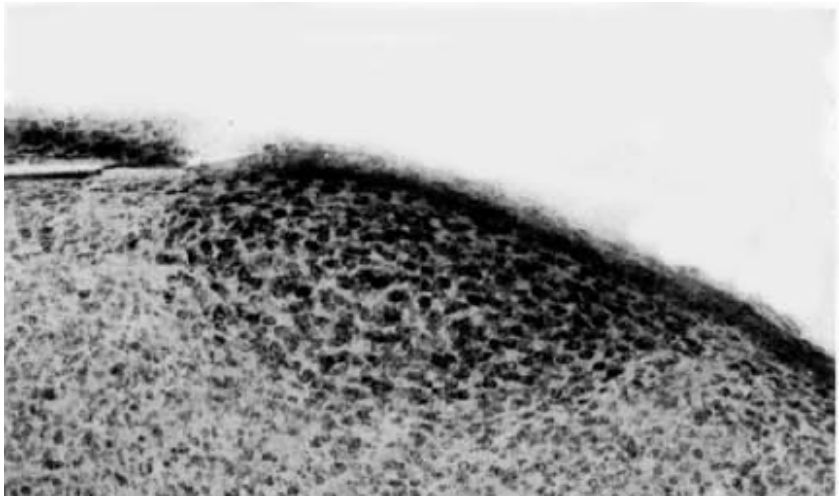
Figura 15 – Secção corada com tionina 0,1% pelo método de Nissl de um *Myiozetetes cayanensis*.



FONTE: Foto da própria autora.

Legenda: A região delimitada por setas corresponde à área em que o núcleo HVC costuma ser identificado nas aves oscines. Escala= 100 µm.

Figura 16 – Secção corada com Nissl de um pássaro Oscine (*zebra finch*) macho adulto

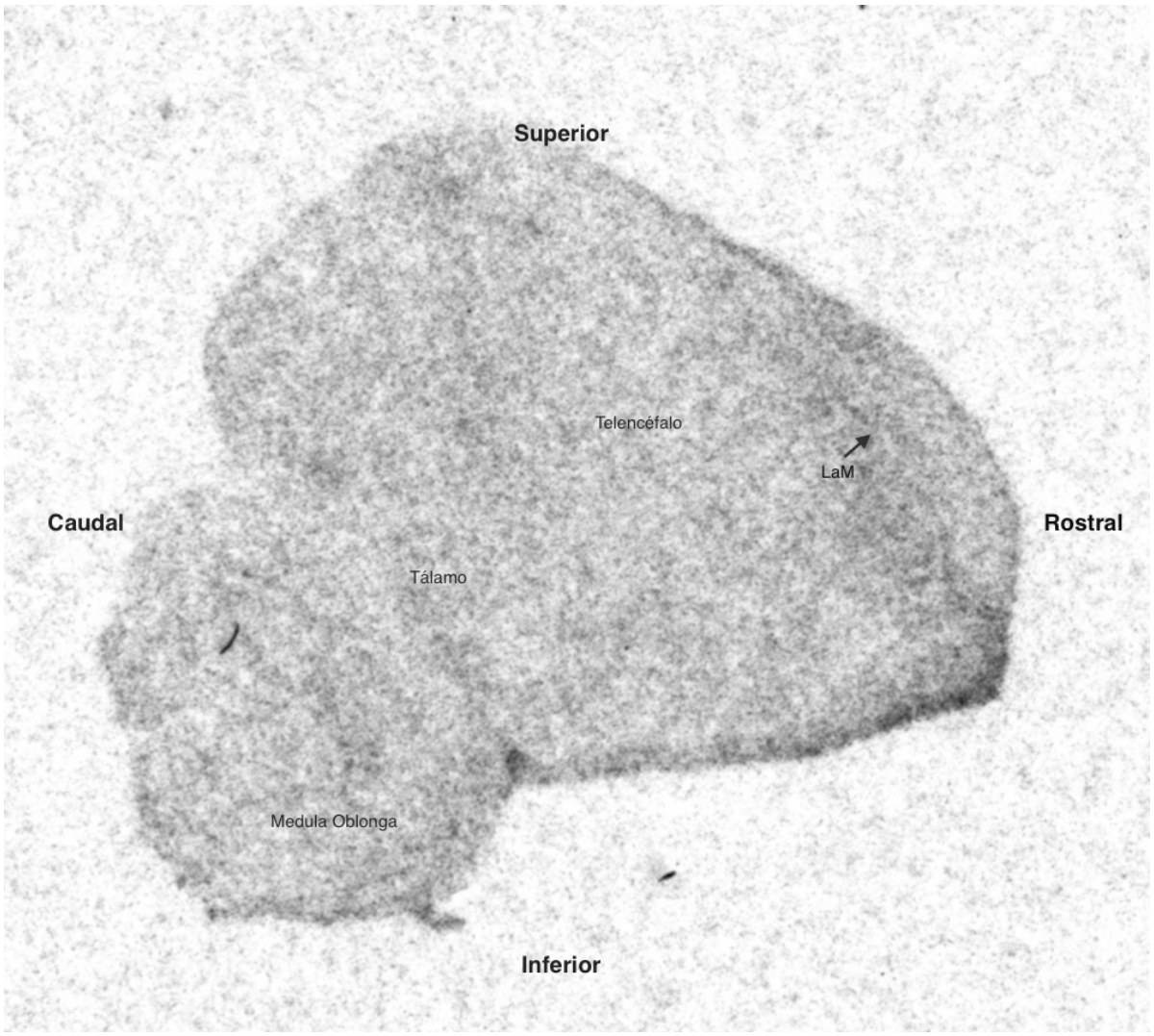


FONTE: NIXDORF-BERGWEILLER, 1996.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO PELO MÉTODO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* RADIOATIVA

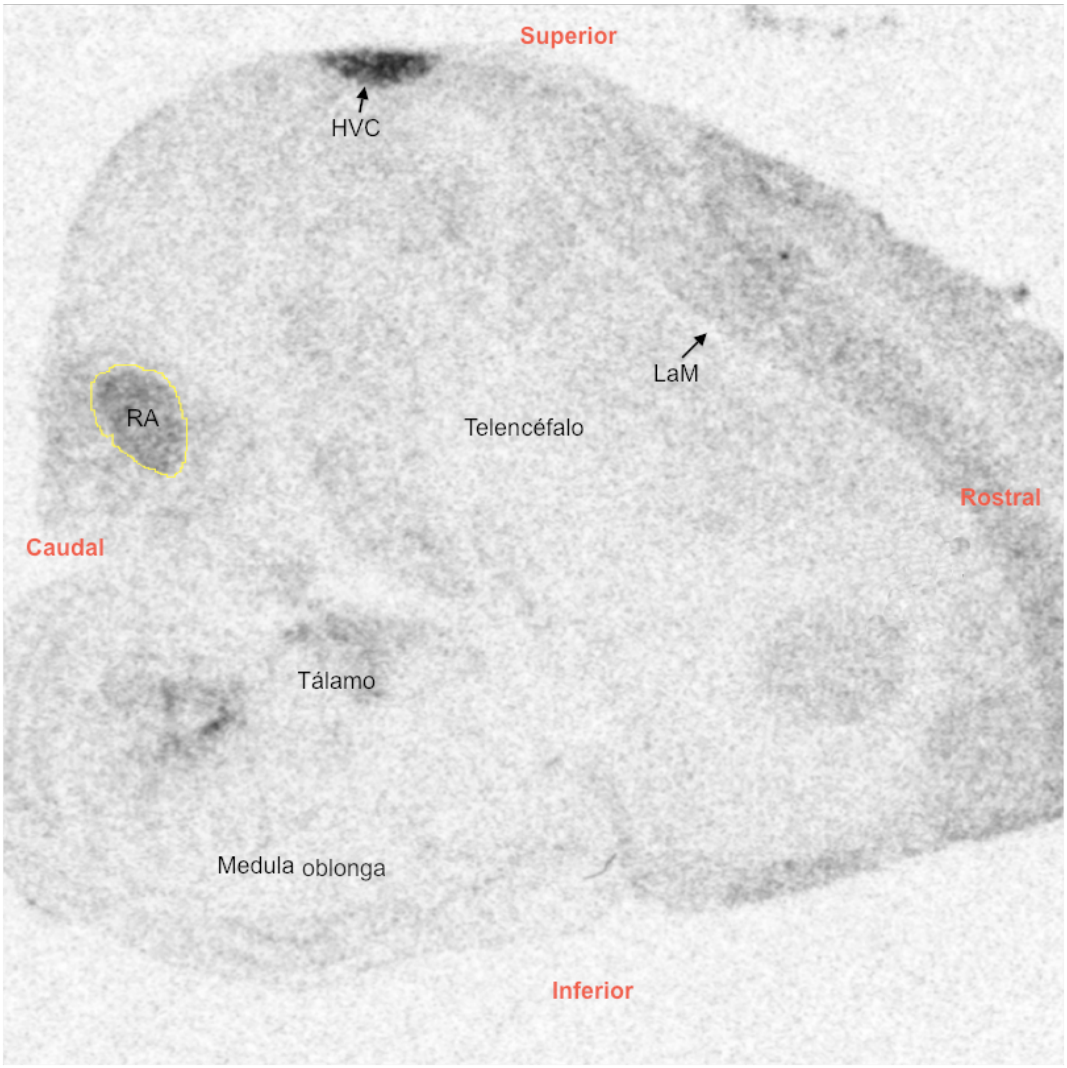
Para a realização da técnica de hibridização *in situ* (ISH) utilizamos sondas tanto para *zebra finches* quanto para o próprio *Myiozetetes cayanensis* e como mencionado, anteriormente, testamos os seguintes marcadores: receptor andrógeno (AR); *RAS guanyl releasing protein 1* (RASGRP1), receptor de fator neutrófilo ciliar (CNTRF), *GLIS family zinc finger 3* (GLIS3), ALDH1A2 e *Solute carrier family 6, member 7* (SLC6A7) e EPHB1. Apesar de repetidas tentativas, nenhum núcleo que indique a existência de um sistema rudimentar do canto semelhante ao existente nos pássaros canoros, capazes de aprender o canto, foi identificado (FIGURAS 17 e 18).

Figura 17 – Auto-radiografia de um corte sagital do encéfalo de um *Myiozetetes cayanensis* macho que foi submetido à hibridização in situ radioativa para marcação de receptores andrógenos



FONTE: foto da própria autora.
Abreviações: LaM=lâmnia do mesopalio.

Figura 18 – Auto-radiografia de um corte sagital do encéfalo de um pássaro Oscine (*Uraeginthus cyanocephalus)* macho de 50 dias que foi submetido à hibridização in situ radioativa para marcação de receptores andrógenos



FONTE: LOBATO, 2011.
Legenda: os núcleos RA (área escura delimitada de amarelo) e HVC (indicado por seta) foram marcados pela técnica. Abreviações: RA - núcleo robusto do arcopálio; LaM - lâmnia do mesopálio.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO PELO MÉTODO DE TRAÇADOR NEURONAL

Como mais uma tentativa de identificar núcleos relacionados à produção do canto no objeto de estudo desta pesquisa, realizamos experimentos injetando os

traçadores neuronais BDA 3.000 MW, CTB e Fast DiI (Ver TABELA 1) no nervo hipoglosso das aves capturadas. Escolhemos injetar os traçadores neuronais neste nervo, pois é ele quem leva a informação motora para a produção do canto da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) à siringe.

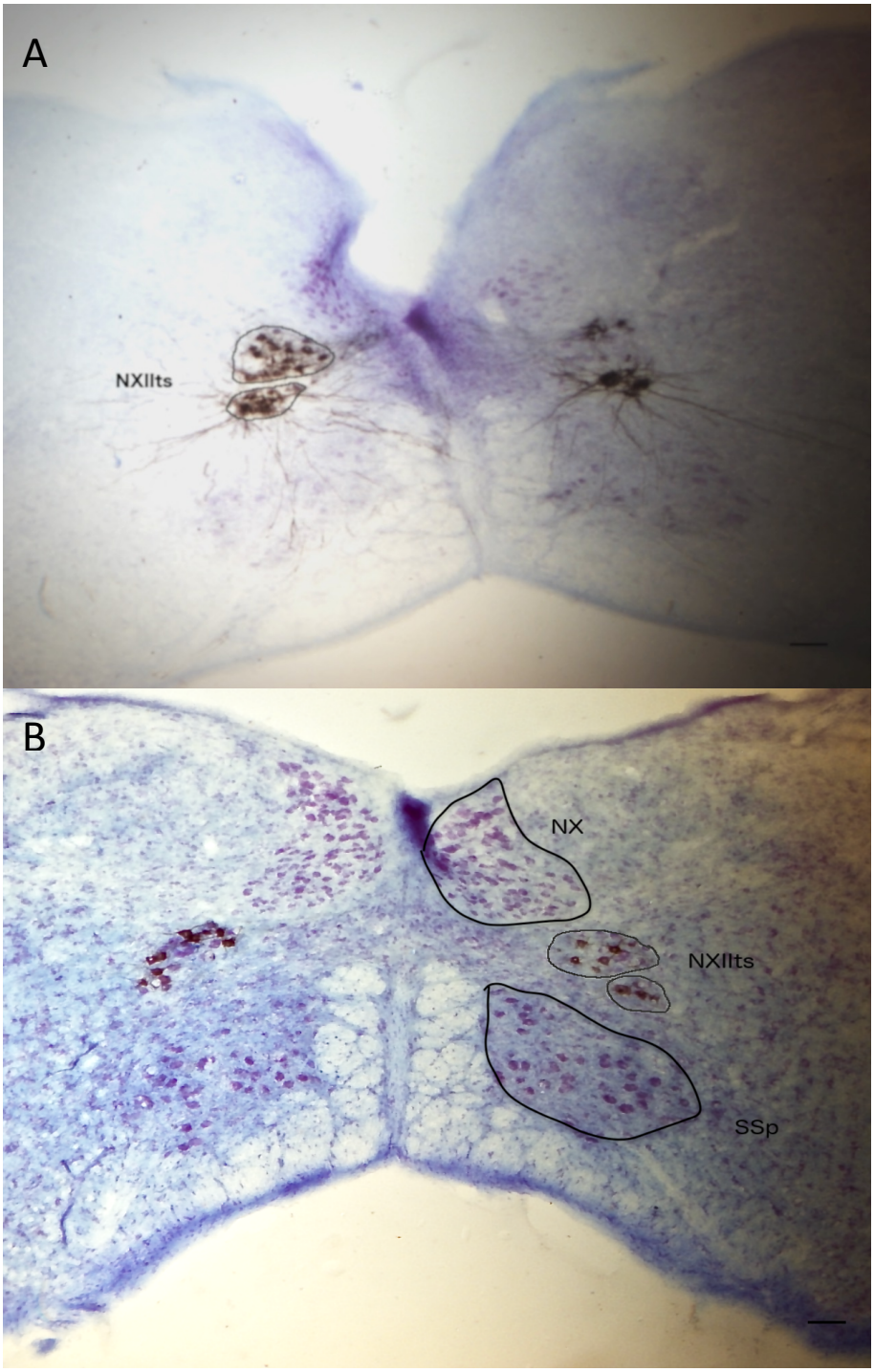
Para este fim foram capturados dez espécimes; dos quais sete receberam BDA 3.000 MW, quatro receberam o CTB e três receberam o Fast DiI conforme descrito na tabela abaixo (TABELA 4). Todavia, só completamos o experimento em cinco aves, pois uma morreu durante a cirurgia e as outras quatro morreram durante o pós-operatório. Das aves sobreviventes uma recebeu BDA 3.0000 MW, duas receberam apenas CTB e duas receberam CTB mais BDA 3.000 MW ou Fast DiI (TABELA 4). As aves sobreviventes que receberam CTB foram perfundidas no dia seguinte à cirurgia, enquanto que a ave que recebeu apenas BDA foi perfundida três dias após a cirurgia.

Tabela 4. Lista dos animais submetidos à cirurgia de injeção de traçador neuronal distribuídos conforme sexo, traçador neuronal recebido, local da aplicação do traçador e se chegou à fase final do experimento

Espécime	Sexo	Traçador Neuronal	Local da Aplicação	Completou experimento
MC65	Fêmea	BDA 3.000 MW	Nervo hipoglosso direito	Não
MC66	Macho	BDA 3.000 MW	Nervo hipoglosso direito	Não
MC67	Macho	BDA 3.000 MW	Nervo hipoglosso direito	Sim
MC68	Macho	BDA 3.000 MW	Nervo hipoglosso direito	Não
MC69	Fêmea	BDA 3.000 MW + Fast DiI	Nervo hipoglosso direito (BDA) e esquerdo (Fast DiI)	Não
MC70	Macho	BDA 3.000 MW + Fast DiI	Nervo hipoglosso direito (BDA) e esquerdo (Fast DiI)	Não
MC71	Fêmea	CTB	Nervo hipoglosso direito	Sim
MC72	Macho	CTB + Fast DiI	Nervo hipoglosso direito (Fast DiI) e esquerdo (CTB)	Sim
MC73	Fêmea	CTB + BDA 3.000MW	Nervo hipoglosso direito (BDA 3.000 MW) e esquerdo (CTB)	Sim
MC74	Macho	CTB	Nervo hipoglosso direito	Sim

Foi possível identificar o NXIIts apenas nas aves que receberam CTB (FIGURA 19).

Figura 19 – Fotomicrografia de uma secção transversal da medula de *Myiozetetes cayanensis* contracorada com Nissl



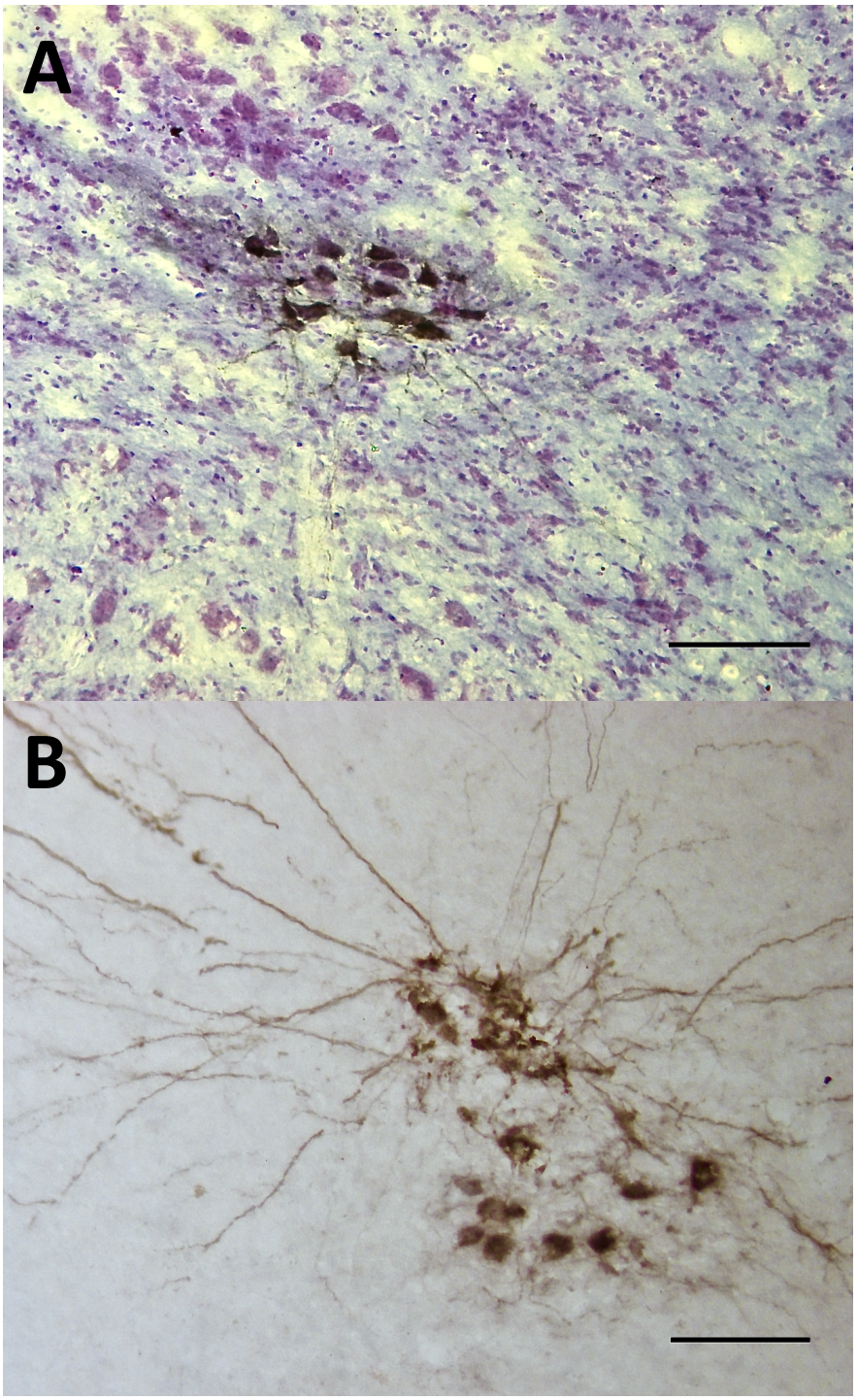
FONTE: foto da própria autora.

Legenda: (A) NXIIts de um macho. (B) NXIIts de uma fêmea. Note as células coradas por CTB (células mais escuras em tom de marrom) estão marcadas apenas no núcleo hipoglosso - porção traqueosiringeal (NXIIts); NX, núcleo vago; SSp, núcleo supraespinhal. Escala=100 µm.

Contracorando com Nissl, verificamos que o córtex desses animais apresenta um padrão de coloração regular e que as células do núcleo NXIIts apresentam organização, notadamente, distinta das demais zonas do córtex. O NXIIts do Myiozetetes foi identificado tanto em machos quanto em fêmeas e, assim como nos oscines, é formado por dois aglomerados de células com formato alongado: uma porção dorsomedial, sempre o grupamento maior, e uma porção ventrolateral, grupamento menor. A área do NXIIts foi fácil de distinguir, pois além de ter sido a única corada por CTB, o núcleo é composto por células maiores com formato arredondado ou poligonal.

A Figura 20 ilustra uma fotomicrografia, em maior aumento, da região de transição entre a área do NXIIts e a da área adjacente e como pode ser observado, as células deste núcleo são maiores e apresentam um padrão organizacional distinto, quando comparado às células adjacentes ao NXIIts. Além disso, principalmente nas secções reveladas por DAB, ficam bem evidentes as projeções dos neurônios que compõem este núcleo.

Figura 20 – Corte transversal da medula de um *Myiozetetes cayanensis* macho evidenciando a área do NXIIts em maior aumento

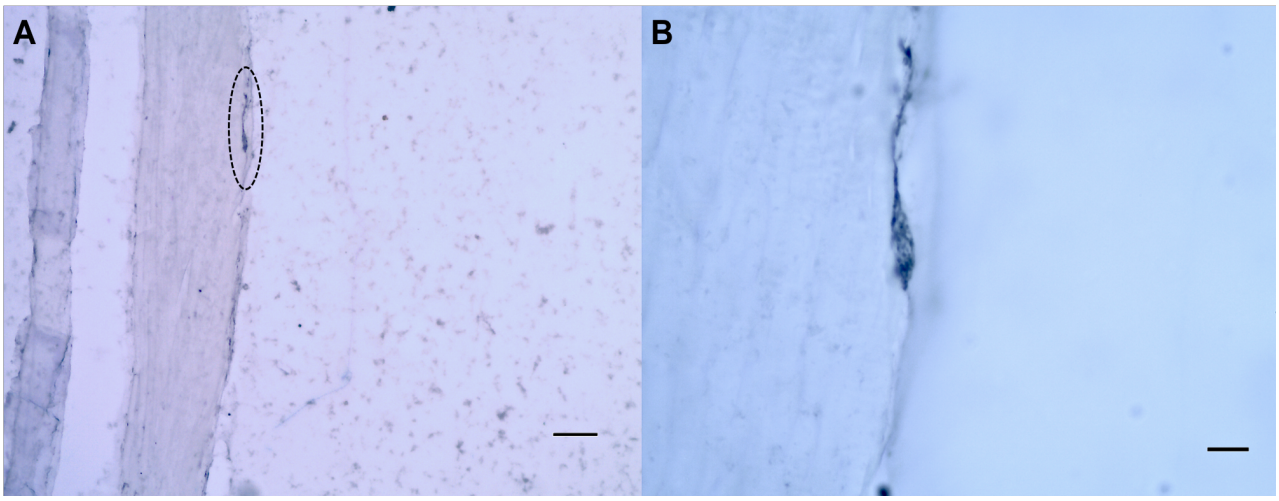


Fonte: Figura da própria autora.

Legenda: (A) Fotomicrografia contracorada com Nissl evidenciando a área de transição entre o NXIIts (células coradas em tom de marrom) e o tecido adjacente. Escala=50 µm. (B) Fotomicrografia revelada por DAB evidenciando as células do NXIIts e suas projeções. Escala=10 µm.

Partindo do princípio de que o CTB é um marcador retrógrado e anterógrado, analisamos algumas secções da siringe destes animais, a fim de ratificar que o núcleo marcado era de fato o NXIIts. Para tal, fizemos cortes transversais de 45 μm e processamos este material como descrito nos itens 3.6 e 3.9. Ao analisarmos o material contracorado com Nissl em microscópio, constatamos que as microinjeções de CTB no nervo hipoglosso produziram marcação ipsilateral nos músculos da siringe e marcação bilateral na parede da traqueia. Uma das estruturas da siringe marcadas por CTB foram terminais semelhantes a uma placa motora (*motor endplate-like terminals*) nos músculos da siringe como demonstrado na Figura 21, ratificando assim, que o núcleo medular marcado era o NXIIts.

Figura 21 – Fotomicrografia de uma secção transversal da siringe de um *Myiozetetes cayanensis*



FONTE: Figura da própria autora.
Legenda: (A) placa motora circundada por tracejado em preto em menor aumento. Escala= 50 μm; (B) placa motora demonstrada na figura A em maior aumento. Escala= 30 μm.

Foram feitas análises dos cortes histológicos marcado por CTB e contracorados pelo método de Nissl e a mensuração do volume do NXIIts de cada animal. O sexo e os valores individuais do volume de NXIIts obtidos estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) de *Myiozetestes cayanensis* machos e fêmeas

	NXIIts (mm^3)		
	Dorsomedial	**Ventrolateral**	**Núcleo inteiro**
Macho	0,0248	0,0089	0,0337
	0,0351	0,0125	0,0481
Fêmea	0,0145	0,0043	0,0188
	0,0168	0,0046	0,0214

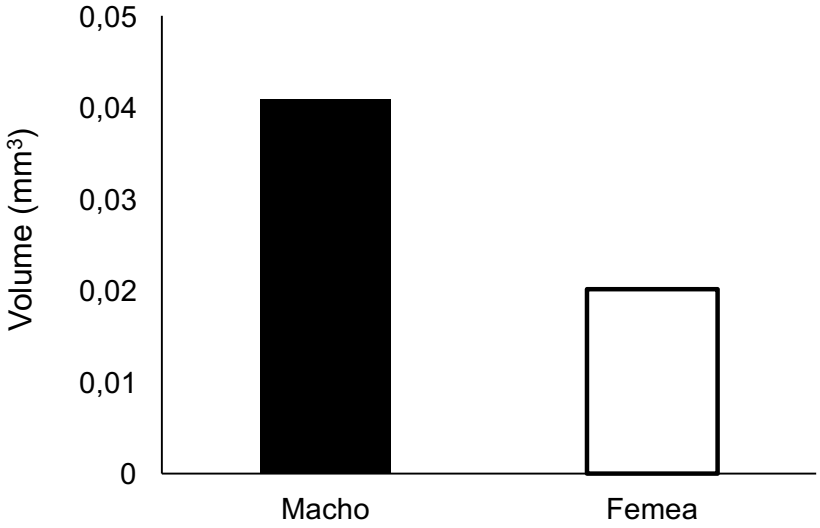
A Tabela 6 demonstra os valores representativos médios de volume do núcleo NXIIts e seus desvios padrões em cada animal estudado.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) de *Myiozetestes cayanensis* machos e fêmeas. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à injeção de CTB e contracorada com Nissl

		Volume médio (mm^3)			Desvio Padrão		
	N	**Dorso medial**	**Ventro lateral**	**Núcleo inteiro**	**Dorso medial**	**Ventro lateral**	**Núcleo inteiro**
Macho	2	0,030	0,011	0,041	0,007	0,003	0,010
Fêmea	2	0,016	0,004	0,020	0,001	0,0002	0,002

Com base na análise das Tabela 5 e 6, verificamos que a estimativa do volume total (núcleo inteiro) do NXIIts de *Myiozetetes cayanensis* apresentam pouca variação entre os machos (desvio padrão 0,01) e entre as fêmeas (desvio padrão 0,002) caracterizando uma consistência dos dados. Em machos, a porção dorsomedial do núcleo analisado é 2,7 vezes maior que a porção ventrolateral. Já nas fêmeas esta diferença é ainda maior sendo a porção dorsomedial quatro vezes maior que a porção ventrolateral. Quando comparamos o volume total de NXIIts de machos e fêmeas, observamos que o NXIIts dos machos é duas vezes maior que o das fêmeas conforme demonstrado no gráfico abaixo (FIGURA 22).

Figura 22 - Representação diagramática do volume total da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) de *Myiozetetes cayanensis* machos e fêmeas (valores médios) utilizando a técnica de injeção do traçador neuronal CTB



FONTE: Figura da própria autora.

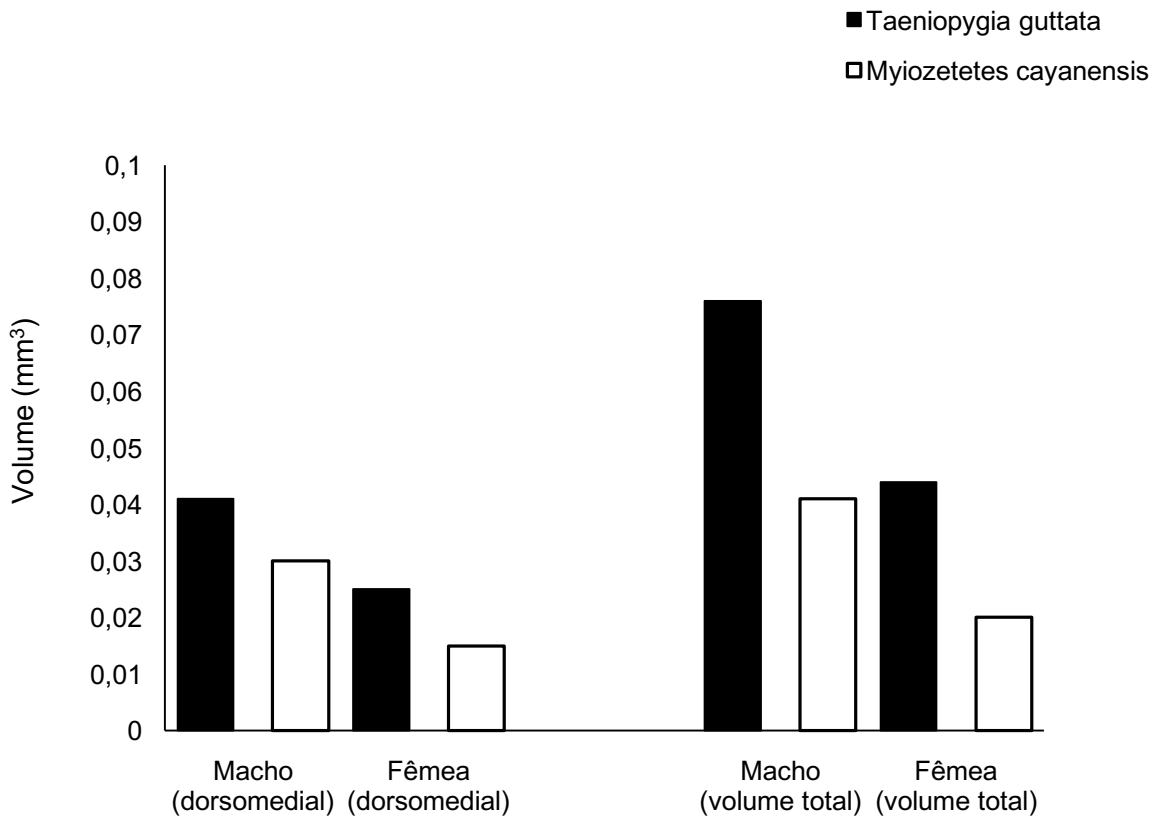
A partir de dados fornecidos por Roberts e colaboradores (2007), comparou-se os dados obtidos em *Myiozetetes cayanensis* com os valores dos volumes de NXIIts medidos em um pássaro aprendiz vocal, o *Taeniopygia guttata* (*zebra finch*; Passeriforme, Oscine). A Tabela 7 resume os valores representativos médios de volume do núcleo NXIIts nas duas espécies analisadas.

Tabela 7 - Valores médios do volume do núcleo NXIIts de *Myiozetetes cayanensis* e de *Taeniopygia guttata* machos e fêmeas

Porção do NXIIts	**Sexo**	***Myiozetetes cayanensis*** **Volume médio (mm^3)**	***Taeniopygia guttata*** **Volume médio (mm^3)**
Dorsomedial	Macho	0,030	0,076
	Fêmea	0,015	0,041
Núcleo inteiro	Macho	0,041	0,076
	Fêmea	0,020	0,044

Comparamos os volumes estimados tanto da porção dorsomedial de NXIIts, quanto do núcleo inteiro, isto é a somatória dos volumes das porções dorsomedial e ventrolateral de NXIIts. Obtivemos os seguintes resultados: nos machos, a porção dorsomedial de NXIIts foi 1,4 vezes maior em *zebra finch* do que em *Myiozetetes cayanensis*; e como era esperado, o volume do núcleo inteiro também foi maior em *zebra finch* (1,7 vezes maior). Já nas fêmeas essa diferença foi ainda mais acentuada, o volume da porção dorsomedal de NXIIts foi quase 3 vezes maior em *zebra finch* (2,7 vezes maior), já o volume total de NXIIts em *zebra finch* foi o dobro do volume encontrado em *Myiozetetes cayanensis*. Esses dados podem ser melhor visualizados na Figura 23.

Figura 23 - Representação diagramática dos volumes da porção dorsomedial do NXIIts e do núcleo inteiro (volume total) em *zebra finch* e *Myiozetetes cayanensis* machos e fêmeas (valores médios)



FONTE: Figura da própria autora.

Tendo essas diferenças volumétricas em mente, o próximo passo foi aplicar testes estatísticos para verificar se as diferenças volumétricas de NXIIts entre machos e fêmeas e entre espécies eram significativas, contudo não obtivemos nenhum resultado devido ao pequeno número amostral.

5. DISCUSSÃO

Desde a década de 70, pássaros canoros tem se tornado um modelo experimental muito popular no meio científico e isso se deve à descoberta da existência de um sistema de controle do canto, ou seja, uma série de núcleos cerebrais bem delimitados que controlam o aprendizado e a produção do canto neste grupo de animais. Isto incluiu os pássaros canoros num seleto grupo de animais, que além dos humanos, são capazes de aprender uma vocalização com base em um modelo auditivo. Um sistema nervoso claramente delineado controlando um único comportamento também bem definido, a vocalização. Assim, o sistema de controle do canto rapidamente se tornou um modelo adequado para o estudo de como o cérebro é capaz de controlar um comportamento, em outras palavras, este modelo experimental permitiu aos pesquisadores relacionarem alterações de estruturas ou funções neurais com alterações no comportamento (BAKER, 2001; HARDING, 2004; WILD, 2004; JARVIS, 2007; MORI e WADA, 2015).

A ordem de pássaros canoros que tem sido vastamente utilizada pelos cientistas como modelo experimental é a Passeriformes. Esta ordem compreende os pássaros de duas subordens, os Oscines e os Suboscines. Apesar dos Suboscines constituírem aproximadamente 20% (1.151 espécies) do total de aves da ordem Passeriformes, estudos a respeito do sistema de controle do canto tem sido desenvolvidos quase que exclusivamente em Oscines (ROBERTSON et al., 2009). Para ajudar a preencher esta lacuna, nós utilizamos uma espécie de pássaro Suboscines da Amazônia, o *Myiozetetes cayanensis*, como nosso modelo experimental.

No presente trabalho, nós utilizamos as técnicas de coloração de Nissl, imunohistoquímica, injeção de traçador neuronal e hibridização *in situ* radioativa como ferramentas para identificar os núcleos relacionados com o controle da produção do canto. Nós identificamos, unicamente por meio de injeção do traçador neuronal CTB no nervo hipoglosso associada à coloração de Nissl, o núcleo NXIIts, o qual se mostrou presente tanto em machos quanto em fêmeas.

5.1 COMPARAÇÃO COM ACHADOS PRÉVIOS: CONSIDERAÇÕES DAS TÉCNICAS UTILIZADAS.

A mensuração do tamanho de áreas cerebrais é fundamental para o estudo das projeções neuronais e sua correlação com as diferenças do tamanho de áreas cerebrais, envolvidas no controle desta atividade (BALL e MACDOUGALL-SHACKLETON, 2001).

A estimativa do tamanho de uma área cerebral e seu conteúdo celular depende de uma delimitação precisa dos núcleos cerebrais. Esta delimitação pode ser feita por meio de citoarquitetura, propriedades citoquímicas, marcadores metabólicos e mapa eletrofisiológico (GAHR, 1997). Devido a dificuldades técnicas e à resolução espacial limitada das técnicas existentes de mapeamento *in vivo* (por exemplo, tomografia computadorizada), uma das técnicas mais utilizada e bem estabelecida para delinear áreas cerebrais é ainda a clássica coloração de Nissl (KONISHI e AKUTAGAWA, 1985; GAHR, 1990; GAHR, 1997; BERNARD e BALL, 1995; NIXDORF-BERGWEILER, 1996; SMITH et al., 1997).

Nesta pesquisa, nós utilizamos a coloração de Nissl para tentar identificar os núcleos HVC (nome próprio), o núcleo robusto do arcopálio (RA) e a porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso - (NXIIts), núcleos estes relacionados à produção do canto em aves canoras. Em Myiozetetes cayanensis, somente o núcleo NXIIts pode ser delineado, mostrando-se presente tanto em machos quanto em fêmeas. O corante de Nissl destacou algumas propriedades histológicas, tais como intensidade da marcação do núcleo, do citoplasma e do nucléolo; densidade do núcleo; e tamanhos do núcleo e do corpo celular dos neurônios. Neste trabalho, obtivemos um padrão de coloração regular e as células constituintes do núcleo NXIIts foram mais intensamente marcadas do que as células do tecido adjacente; além disso, foi possível verificar que os corpos celulares dos neurônios deste núcleo foram maiores que os das células localizadas no exterior do mesmo. Uma segunda característica vantajosa da técnica empregada foi a capacidade de podermos

mensurar o NXIIts e reproduzir os resultados com a qualidade da marcação referida semelhante aos já descritos na literatura.

Apesar das vantagens já mencionadas, não foi possível identificar os núcleos HVC e RA em machos e fêmeas da espécie estudada em nenhuma das secções analisadas. Já o NXIIts pode ser identificado apenas nas secções transversais e isto já era esperado; pois ao se examinar trabalhos que se propuseram mensurar o volume de NXIIts em espécies de pássaros Oscines, notamos que sempre são utilizados cortes coronais por ser melhor visualizado neste plano de corte (WADE et al., 2002; ROBERTS et al., 2007; TSUKAHARA et al., 2009).

A delimitação de um núcleo cerebral com base nas propriedades citológicas citadas acima, embora válida, é um pouco problemática, pois o método de Nissl, como todos os outros métodos, é limitado nas informações que provê. Este tipo de coloração marca mais intensamente as porções celulares que são altamente basofílicas, como ribossomos livres e ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RAINE, 1989). Visto que os ribossomos são organelas importantes para a síntese de proteínas, é razoável assumir que a coloração de Nissl seja indicativo de relativa atividade metabólica de um neurônio (RAINE, 1989; PETERS et al., 1991). Esta atividade, bem como, a citoarquitetura pode variar independentemente das propriedades citoquímicas e conectivas/projecionais de uma área cerebral.

Por conta destas limitações, muitas investigações foram realizadas com o objetivo de corroborar ou não a adequação do método de Nissl para delinear áreas cerebrais em estudos que visam avaliar a ocorrência de diferenças no volume de núcleos telencefálicos entre machos e fêmeas. Gahr, em 1990, com o propósito de avaliar diferenças sazonais no volume do HVC de canários machos, utilizou diferentes métodos para tal avaliação. Enquanto o material corado com Nissl revelou uma variação sazonal, o volume do HVC, delineado com base na distribuição de células imunorreativas para o receptor de estrogênio, não variou sazonalmente. Este estudo também definiu o HVC por meio da utilização de traçador neuronal e, através deste método, também não houve variação sazonal significativa no volume de HVC. Um

estudo subsequente ao de Gahr igualmente demonstrou, por meio da distribuição de projeções neuronais de HVC para RA, que o volume HVC de canários machos não sofre alteração ao longo do ano (KIRN et al., 1991).

Desde os estudos de Gahr (1990) e Kirn e colaboradores (1991), várias outras pesquisas foram efetuadas com o intuito de comparar a delimitação de núcleos relacionados ao canto por meio de variados métodos. Por exemplo, auto-radiografias para receptores hormonais e neurotransmissores (JOHNSON e BOTTJER, 1993; BALL et al., 1994; BERNARD e BALL, 1995), imunocitoquímica (BALL et al., 1995 a, b), traçadores neuronais (JOHNSON e BOTTJER, 1993; SMITH et al., 1997), e marcadores enzimáticos (SMITH et al., 1997). Estes estudos analisaram diferenças entre machos e fêmeas (BALL et al., 1994, 1995 a, b), bem como variações volumétricas em machos em diferentes condições hormonais (JOHNSON e BOTTJER, 1993) ou fotoperiódicas (BERNARD e BALL, 1995; SMITH et al., 1997). Em todas estas análises foi observado equivalência entre os limites nucleares definidos pelo método de Nissl e por outros marcadores, confirmando a validade desta técnica para definir os limites de áreas cerebrais.

Tendo esta divergência em mente, procuramos minimizar este problema elegendo duas técnicas alternativas para a identificação e delimitação dos núcleos HVC, RA e NXIIts: a hibridização *in situ* radioativa e a injeção de traçador neuronal.

A hibridização *in situ* é um método de delineamento citoquímico utilizado para identificar, com precisão, ácidos nucléicos ou seus transcritos em amostras de material humano ou de animais (SILVA-VELENZUELA *et al.*, 2006). O fato de marcar ácidos nucléicos e não apenas proteínas a torna uma técnica mais específica que o método de Nissl.

Para a execução da técnica de hibridização *in situ* radioativa utilizamos não apenas sondas confeccionadas em *zebra finch*, como é de praxe na literatura, mas também confeccionamos sondas específicas para *Myiozetetes cayanensis* para que pudéssemos eliminar qualquer viés de não-especificidade entre espécies. Quanto à

escolha dos marcadores elegemos os receptores andrógenos, por ser sabido que em *zebra finches*, os núcleos HVC, RA e LMAN são sítios de receptores andrógenos (METZDORF *et al.*, 1999). Além deste marcador, após uma análise prévia de microarranjos de DNA, que determinou o maior nível de expressão gênica do prosencéfalo da ave em estudo, elegemos também os seguintes receptores: *RAS guanyl releasing protein 1* (RASGRP1), receptor de fator neutrófilo ciliar (CNTRF), *GLIS family zinc finger 3* (GLIS3), ALDH1A2 e *Solute carrier family 6, member 7* (SLC6A7) e EPHB1.

Apesar de repetidos esforços não conseguimos, nesta pesquisa, marcar os núcleos HVC, RA e NXIIts, através da hibridização *in situ*, em nenhuma das amostras obtidas. E as razões exatas pelas quais isto ocorreu permanecem desconhecidas, porém uma das hipóteses é que seja necessário adequar o protocolo utilizado para *Myiozetetes cayanensis* já que o protocolo utilizado, neste trabalho, foi o mesmo que é utilizado, com sucesso, em *zebra finches*. Outra hipótese é que tenha ocorrido algum erro no armazenamento ou transporte do material e que parte do RNA tenha sido degradado.

Tradicionalmente, teorizou-se que pássaros Suboscines não são capazes de cantar e que por esta razão não apresentam os núcleos telencefálicos formadores do sistema do canto (BRENOWITZ et al., 1991; TOUCHTON et al., 2014). Portanto, a hipótese mais aceita é a de que o nosso animal experimental não possua os núcleos telencefálicos HVC e RA, corroborando com dados da literatura. Contudo, estudos recentes utilizando a técnica de hibridização *in situ* em duas espécies de Suboscines (*Sayornis phoebe* e *Willisornis poecilinotus*) demonstraram a evidência da existência de um núcleo que funcionalmente se assemelha ao RA de Oscines (LIU et al., 2013; LIMA et al., 2015) contradizendo os nossos achados.

A última técnica eleita para identificação e delineamento dos núcleos relacionados à produção do canto no *Myiozetetes cayanensis* foi a injeção de traçador neuronal. Para tal, escolhemos os seguintes neurotraçadores: BDA 3.000 MW, CTB e

Fast DiI. Neste trabalho, conseguimos identificar apenas o núcleo medular NXIIts e unicamente por meio do traçador CTB.

Associando injeções de CTB à técnica de Nissl, observamos motoneurônios siringeais não apenas na porção dorsomedial do núcleo NXIIts, mas também em um núcleo motor menor localizado ventrolateralmente ao NXIIts. Acreditamos que, em *Myiozetetes cayanensis*, o núcleo NXIIts seja composto por essas duas porções conforme já foi descrito em outras espécies.

Nottebohm em 1976 ao realizar experimentos de lesão do nervo hipoglosso em canários identificou a porção caudal de NXIIts e afirmou que este núcleo se resumia a esta única porção. Todavia, anos mais tarde Bottjer e Arnold (1982) ao estudarem *zebra finches*, marcaram um grupo dorsal e um ventrolateral; e Wild (1981) estudando cacatua também identificou, por meio de HRP, esses dois grupamentos celulares como partes constituintes do NXIIts. Células em uma posição ventrolateral muito similar também foram marcadas em galo por meio de injeções de traçador neuronal em músculos siringeais (YOUNGREN e PHILIPS, 1983). Mais recentemente o NXIIts também foi descrito como sendo formado por uma porção dorsomedial e outra ventrolateral em corvo (TSUKAHARA et al., 2009) e em *zebra finches* (ROBERTS et al., 2007; FAUNES et al., 2017).

5.2 DIMORFISMO SEXUAL DO NÚCLEO HIPOGLOSSO - PORÇÃO TRAQUEOSIRINGEAL (NXIITS) DE MYIOZETETES CAYANENSIS

Em 1976, Nottebohm e Arnold publicaram dados surpreendentes baseados na análise de cortes do telencéfalo de *zebra finches* (*Taeniopygia guttata*) e canários (*Serinus canaria*) machos e fêmeas corados pelo método de Nissl. Eles descobriram que algumas áreas cerebrais relacionadas à aprendizagem e à produção do canto (HVC, LMAN, RA, área X) eram significativamente maiores, em volume, nos machos, que cantam, do que nas fêmeas, que normalmente não cantam. Esta descoberta mudou o modo de pensar dos neurocientistas interessados em estudar diferenças sexuais cerebrais, pois notou-se que era possível relacionar alterações de estruturas

ou funções neurais com alterações no comportamento; e desde então, têm sido realizados vários estudos para investigar diferenças sexuais no sistema do canto de aves.

No presente estudo, alterações volumétricas do núcleo medular NXIIts envolvido na produção do canto foram quantificadas em machos e fêmeas de *Myiozetetes cayanensis* por meio da injeção do traçador neuronal CTB associado ao método de Nissl. Verificamos que, em machos, os volumes estimados tanto da porção dorsomedial de NXIIts, quanto do núcleo inteiro, isto é a somatória dos volumes das porções dorsomedial e ventrolateral de NXIIts foram maiores nos machos do que nas fêmeas. Quando comparamos o volume total de NXIIts de machos e fêmeas, observamos que o NXIIts dos machos foi duas vezes maior do que o das fêmeas.

Não existem estudos prévios semelhantes nesta espécie nem em outros Suboscines. Contudo, em *zebra finches* (Oscines), estudos prévios também relataram um comportamento dimórfico de NXIIts semelhante ao que encontramos em nosso trabalho. Por exemplo, Wade e colaboradores (2002) relataram um volume total de NXIIts em machos cerca de 1,7 vezes maior do que nas fêmeas. A mesma diferença também foi relatada por Roberts e colaboradores (2007).

Desde o estudo pioneiro de Nottebohm e Arnold (1976) sobre diferenças volumétricas de áreas telencefálicas relacionadas ao canto entre machos e fêmeas, diversos outros estudos comparativos sobre diferenças sexuais em pássaros canoros de diferentes espécies têm sido realizados. Estes estudos sugerem uma correlação entre diferenças sexuais no cérebro e diferenças sexuais obsevadas no comportamento do canto destes animas (MacDOUGALL-SHACKLETON e BALL, 1999; BALL et al., 2008).

Em espécies em que as fêmeas normalmente não cantam como *Taeniopygia guttata* (*zebra finch*) a diferença volumétrica dos núcleos envolvidos na produção do canto, entre machos e fêmeas, é bastante acentuada (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; ARNOLD, 1980; GAHR e GÜTTINGER, 1985; WADE e BUHLMAN,

2000; BALL, 2016); esta diferença tende a diminuir nas espécies em que a fêmea normalmente canta, porém menos do que os machos e este é o caso do *Blue-capped cordon bleu*, por exemplo (GAHR e GÜTTINGER, 1986; LOBATO et al., 2015) cujo repertório vocal do macho é duas vezes maior que o das fêmeas. E como era de se esperar, nas espécies em que machos e fêmeas cantam igualmente a diferença volumétrica, entre sexo, dos núcleos evolvido na produção do canto tende a ser ainda menor (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; BRENOWITZ et al., 1985; DEVOOGD et al., 1991; BALL, 2016).

Contudo, esta lógica não se aplicou ao nosso animal experimental, pois apesar de macho e fêmea cantarem em dueto e igualmente, observamos uma diferença acentuada no volume de NXIIts entre machos e fêmeas.

Outros estudos, especialmente em espécies que cantam em dueto, levantaram questionamentos a respeito da variação morfológica do sistema do canto e as diferenças de comportamento entre machos e fêmeas. Por exemplo, machos e fêmeas da espécie *Laniarius funebris* cantam em dueto e possuem repertório semelhante tanto em tamanho quanto em complexidade, contudo os núcleos relacionados à produção do canto são maiores nos machos do que nas fêmeas. O mesmo também foi observado na espécie *Ploceus bicolor*, em que machos e fêmeas cantam em dueto uníssono, possuindo cantos idênticos. Em uma espécie de corvídeo (*Corvus macrorhynchos*), pertencente ao grupo dos Oscines, machos e fêmeas possuem cantos não usuais e até mesmo de difícil identificação, porém apresentam comportamento do canto bem semelhantes e, mais uma vez, apesar da semelhança no comportamento do canto, o mesmo não se reflete na morfologia do sistema do canto, uma vez que o volume dos núcleos que controlam a produção do canto são maiores nos machos quando comparado com as fêmeas (GAHR et al., 1998; GAHR et al., 2008; WANG et al., 2009; BALL, 2016).

Achados como os mencionados acima sugerem que existem limitações na resposta adaptativa do sistema do canto a condições ecológicas, assim sendo, o volume nuclear não parece ser a única variável que determina o comportamento do

canto de uma ave, porém outras variáveis críticas que regulam o canto, como níveis hormonais, número de sinapses, expressão gênica ou percepção auditiva podem responder de tal forma que cada sexo pode modificar seu comportamento do canto conforme necessário.

5.3 EXISTE SISTEMA DO CANTO EM SUBOSCINES?

No meio científico, postulou-se que para que uma ave desenvolva um canto aprendido ela necessita apresentar estruturas auditivas intactas (KONISHI, 1965), um desenvolvimento vocal demorado (MARLER e PETERS, 1982) e uma circuitaria telencefálica especializada que, além de inervar os núcleos medulares da respiração e vocais, deve ainda controlar a aquisição e a produção do canto aprendido.

Experimentos prévios de aprendizagem vocal demonstraram que Suboscines podem desenvolver vocalizações espécie-específica mesmo com audição comprometida (KONISHI, 1963; DOUPE e KUHL, 1999). Estudos desenvolvidos em Maria-fibius (*Empidonax trailii*) e em papa-moscas-de-alder (*Epidonax alnorum*) criados com tutores heteroespecíficos, bem como em *Sayornis phoebe* que tiveram sua cóclea removida, revelaram que todos produziram canto adulto normal quando comparados aos cantos de animais silvestres das mesmas espécies (KROODSMA, 1984; KROODSMA e KONISHI, 1991; TOUCHTON et al., 2014).

Ao longo dos anos, investigações neuroanatômicas realizadas em algumas espécies de Suboscines (*Empidonax trailii*, *Epidonax alnorum*, *Sayornis Phoebe*) também mostraram que as espécies estudadas não possuíam núcleos telencefálicos que controlam a aquisição do canto semelhante aos presentes em Oscines (SIMPSON e VICARIO, 1990; BRENOWITZ et al., 1991 KROODSMA e KONISHI, 1991; JARVIS, 2004). Com base nesses achados, assumiu-se que Suboscines não sejam, portanto, aprendizes vocais.

Acredita-se que a via produtora do canto de Suboscines seja composta apenas pelos núcleos mesencefálico (DM) e medular (NXIIts) (FARRIES, 2001; JARVIS,

2004; JARVIS, 2009). Portanto, a não existência de projeções do telencéfalo para os núcleos mesencefálico e medular constituiria a razão pela qual não haja aprendizado vocal neste grupo de aves. Em *Myiozetetes cayanensis*, não identificamos nenhum núcleo telencefálico; apenas o núcleo medular NXIIts, corroborando os achados anteriores descritos na literatura. Nossos resultados sugerem a não existência de um sistema do canto em *Myiozetetes cayanensis*, logo é muito provável que esta ave não possua canto aprendido. Contudo, mais estudos, nesta espécie, são necessários para que se possa fazer tal afirmação.

Contradizendo o paradigma estabelecido acerca dos Suboscines, entra em cena uma pesquisa recente que mostrou, na espécie *Sayornis Phoebe*, a existência de uma circuitaria rudimentar com um núcleo que apresenta propriedades semelhantes ao do núcleo RA de Oscines (núcleo *RA-like*); demonstrou, também, que lesões nesta região provocam alterações vocais muito parecidas com as alterações causadas por lesão no RA de Oscines (LIU et al., 2013). Uma região semelhante ao RA de Oscines também foi descrita em rendadinho (*Willisornis poecilinotus*) através de hibridização *in situ* (LIMA et al.; 2015).

Embora estudos como o de Liu e cols. (2013) e de Lima e cols. (2015) apontem para a possível existência de um sistema rudimentar de controle do canto em Suboscines, o papel deste núcleo *RA-like* em Suboscines ainda é pouco compreendido, pois não foi demonstrado nenhuma projeção desta região para o núcleo motor vocal (NXIIts). Uma hipótese levantada é a de que este núcleo *RA-like* talvez faça parte da circuitaria de processamento auditivo, pois se assemelha muito à uma região que circunda o RA, em Oscines, chamada de "*RA cup*" (MELLO et al., 1998; WILD et al., 2005); esta região mostra ativação celular mediante a apresentação do canto (MELLO e CLAYTON, 1994). Todavia nenhum estudo que suporte esta hipótese foi efetuado até o momento.

Evidências que sugerem aprendizado vocal, como a variação geográfica do canto por exemplo, também têm sido propostas na araponga-da-nicarágua (*Procnias tricarunculata*) (SARANATHAN et al., 2007; KROODSMA et al., 2013), em *Chiroxiphia*

linearis (TRAINER e McDONALD, 1993; TRAINER et al., 2002), em *Lipaugus vociferans* (FITZSIMMONS et al., 2008), em *Contopus cooperi* (ROBERTSON et al., 2009) e em espécies de Suboscines traqueofones (IRESTEDT et al., 2002), porém os substratos neurais envolvidos que expliquem tal comportamento ainda não foram descritos. A evidência de aprendizado vocal nas espécies *Chiroxiphia linearis* e *Lipaugus vociferans*, contudo, não parecem ser convincentes, sendo necessários mais estudos para ratificar os achados anteriores (TRAINER e PARSONS, 2001; KROODSMA, 2011).

Diante de tudo o que foi exposto, fica a certeza de que é indispensável a realização de mais estudos neste grupo de aves tão diverso (composto por aproximadamente 1150 espécies), já que pesquisas experimentais que comprovem a não existência de aprendizado vocal em Suboscines ainda são bastante escassas se compararmos aos milhares de estudos realizados em Oscines.

6. CONCLUSÃO

- As técnicas de injeção do neurotraçador subunidade beta da toxina colérica (CTB) e de coloração de Nissl foram eficazes na marcação do núcleo medular relacionado à produção de canto (porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso - NXIIts) neste estudo morfológico.

- A morfologia da porção traqueosiringeal do núcleo hipoglosso (NXIIts) é semelhante à encontrada em pássaros Oscines já anteriormente descritos como o *zebra finch (Taeniopygia guttata)*.

- Com base nos cortes resultantes dos experimentos de injeção do traçador subunidade beta da toxina colérica (CTB) e contracorados com Nissl, o NXIIts de *Myiozetetes cayanensis* aparenta ser sexualmente dimórfico, embora as fêmeas desta espécie também cantem. Contudo mais estudos comportamentais, relativos à frequência e à qualidade do canto, são necessários para corroborar estes achados anatômicos.

- Não foram identificados núcleos telencefálicos que se assemelhassem ao HVC e ao RA de Oscines por meio de nenhuma das técnicas utilizadas.

- Aparentemente, não existe um sistema que controle a produção ou a aquisição do canto em Myiozetetes cayanensis, levando-nos a concluir que o canto desta espécie seja inato. Todavia mais pesquisas são imprescindíveis para que possamos confirmar os resultados obtidos.

7 REFERÊNCIAS

AKUTAGAWA, E.; KONISHI, M. New brain pathways found in the vocal system of a songbird. **The Journal of Comparative Neurology**. 2010; 518:3086-3100.

ARNOLD, A. P. Effects of androgens on volumes of sexually dimorphic brain regions in zebra finch. **Brain Res**. 1980; 185:441-444.

BAKER, M. C. Bird song research: the past 100 years. **Bird Behavior**. 2001; 14: 3-50.

BALL, G. F.; CASTO, J. M.; BERNARD, D.J. Sex differences in the volume of avian songcontrol nuclei: comparative studies and the issue of brain nucleus delineation. **Pychoneuroendocrinology**. 1994; 19:485-504.

BALL, G. F.; ABSIL, P.; BALTHAZART, J. Assessment of volumetric sex differences in the song control nuclei HVC and RA in zebra finches by immunocytochemistry for methionine enkaphalin and vasoactive intestinal polypeptide. **Brain Res**. 1995; 699:83-96. a

BALL, G. F.; ABSIL, P.; BALTHAZART, J. Peptidergic delineations of nucleus interface reveal sex differences in volume. NeuroReport. 1995; 6:957-960. b

BALL, G. F.; MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A. Sex differences in songbirds 25 years later: what have we learned and where do we go? **Microscopy research and thecnique**. 2001; 54:327-334.

BALL, G. F. Species variation in the degree of sex diferences in brain and behaiviour related to birdsong: adaptations and constraints. **Phil. Trans. R. Soc. B**. 2016; 371:20150117.

BAPTISTA, L. F.; SCHUCHMANN, K. L. Song learning in the anna humminbird (*Calpyte anna*). **Ethology**. 1990; 84:15-26.

BARKER, J. M.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Anatomically discrete sex differences and enhancement of testosterone of cell proliferaton in the telencephalic ventricle zone of the adult canary brain. **J. Chem. Neuroanat**. 2015; 55:1-8.

BEECHER, M. D.; BRENOWITZ, E. A. Functional aspects of song learning in songbirds. **TRENDS in Ecology and Evolution**. 2005; 20:143-149.

BERNARD, D. J.; BALL, G. F. Two histological markers reveal a similar photoperiodic difference in the volume of the high vocal Center in male european starlings. **The Journal of Comparative Neurology**. 1995; 360: 726-734.

BRADBURY, J. W.; VEHRENCAMP, S. L. **Principles of animal communication**. Massachusetts: Sinauer, 1998.

BRAINARD, M. S.; DOUPE, A. J. What songbirds teach us about learning. **Nature**. 2002; 417: 351-358.

BRAISSANT, O.; WAHLI, W. A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissues sections. **BIOCHEMICA**. 1998; 1:10-15.

BRENOWITZ, E. A.; ARNOLD, A. P.; LEVIN, R. N. Neural correlates of female song in tropical duetting birds. **Brain Res**. 1985; 343(1):104-112.

BRENOWITZ, E. A.; NALLS, B.; WINGFIELD, J. C.; KROODSMA, D.E. Seasonal changes in avian song nuclei without seasonal changes in song repertoire. **J. Neurosci**. 1991; 11: 1367-1374.

BRENOWITZ, E. A.; MARGOLIASH, D.; NORDEEN, K. W. An itroduction to birdsong and the avian song system. **J. Neurobiol**. 1997;33(5):495-500.

BRENOWITZ, E. A. Plasticity of the song control system in adult birds. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 2004; 1016:560-585.

BOTTJER, S. W.; ARNOLD, A. P. Afferent neurons in the hypoglossal nerve of zebra finch (Poephila guttata): localization with horseradish peroxidase. **J Comp Neurol**. 1982; 210(2):190-197.

BOTTJER, S. W.; MIESNER, E. A.; ARNOLD, A. P. Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. **Science**. 1984; 224(4651):901-3.

BOTTJER, S. W.; BRADY, J. D.; CRIBBS, B. Connections of a motor cortical region in zebra finches: relation to pathways for vocal learning. **J Comp Neurol**. 2000; 420:244-260.

CAREW, T. J. **Behavioral neurobiology the cellular organization of natural behavior**. Massachusetts: Sinauer, 2000. p.231-268.

CARVALHO, C. T. de. Comportamento de *Myiozetetes cayanensis* e notas biológicas sobre espécies afins (Passeres, Tyrannidae). **Papéis avulsos do Departamento de Zoologia.** 1960; 14:121-132.

CATCHPOLE, C. K.; SLATER, P.J.B. **Birdsong: biological themes and variation**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p.182-218.

CESTARI, C.; PIZO, A. The use of auxiliary courts by the lek-forming White-bearded manakin *Manacus manacus* (*Aves, Pipridae*). **Acta. Ethol**. 2012; 15:73-79.

CLAYTON, D. F. *et al*. Integrating genomes, brain and behavior in the study of songbirds. **Current Biology**. 2009; 19:865-873.

COLLEN, R.; CASEY, C. Vocal learning in seals, sea lions and walruses. **Current Opinion in Neurobiology**. 2014; 28: 66-71.

CROCKFORD, C. et al. Wild chimpanzees produce group-specific calls: a case for vocal learning? **Ethology**. 2004; 110:221-243.

DAWKINS, M.S. **Explicando o comportamento animal**. São Paulo: Manole, São Paulo, 1989.

DEVOOGD, T. J.; PYSKATY, D. J.; NOTTEBOHM, F. Lateral asymetries and testosterone-induced changes in the gross morphology of hypoglossal nucleus in adult canaries. J. Comp. Neurol. 1991; 307:65-76.

DOUPE, A. J.; KUHL, P. K. Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. **Annu. Rev. Neurosci**. 1999; 22:567-631.

DÜRING, D. N.; THOMPSON, C. K.; ZIEGLER, A.; FARBER, C.; MÜLLER, J.; SCHARFF, C.; ELEMANS, C. P. The songbird syrinx morphome: a three-dimensional, high-resolution, interactive morphological map of zebra finch vocal organ. BMC Biol. 2013; 11(1):1.

ESSER, K. H. Audio-vocal learning in a nonhuman mammal: the lesser spear-nosed bat *Phyllostomus discolor*. **Neuroreport**. 1994; 5:1718-1720.

FARRIES, M. A. The oscine song system considered in the context of the avian brain: lessons learned from comparative neurobiology. **Brain Behav**. 2001; 58:80-100.

FAUNES, M.; WILD, J. M. The sensory trigeminal complex and the organization of its primary afferents in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). **J Comp Neurol**. 2017; 1-12.

FAUNES, M.; BOTELHO, J. F.; WILD, J. M. Innervation of the syrinx of the zebra finch (Taeniopygia guttata). **J Comp Neurol**. 2017; 525(13):2847-2860.

FITZSIMMONS, L. P.; BAKER, N. K.; MENNILL, D. J. Individual variation and lek-based vocal distinctiveness in songs of the screaming piha (*Lipaugus vociferans*), a suboscine songbird. **The Auk**. 2008; 125(4):908-914.

FROMKIN, V. *et al*. The development of the language in genie: a case of language aquisition beyond the critical period. **Brain Lang**. 1974; 1:81-107.

FUSANI, L.; METZDORF, R.; HUTCHISON, J. B.; GAHR, M. Aromatase inhibition affects testosterone-induced masculinization of song and the neural song system in female canaries. **J. Neurobiol**. 2003; 54:370-379.

GAHR, M; GÜTTINGER, H. R. Korrelation zwischen der sexualdimorphen Gehirndifferenzierung und der Verhaltensausprägung bei Prachtfinken (Estrildidae). **Bonn. Zool. Beitr**. 1985; 27:218-244.

GAHR, M; GÜTTINGER, H. R. Functional aspects of singing in male and female *Uraeginthus bengalus* (Estrildiae). **Ethology**. 1986; 72:123-131.

GAHR, M. Delineation of a brain nucleus: comparisons of cytochemical, hodological, and cytoarchitectural views of the song control nucleus HVC of the adult canary. **J. Comp. Neurol**. 1990; 294:30-36.

GAHR, M.; GUTTINGER, H. R.; KROODSMA, D. Estrogen receptors in the avian brain: survey reveals general distribution and forebrain areas unique to songbirds. **Journal of Comparative Neurology**. 1993; 327:112-122.

GAHR, M. How should brain be delineated? Consequences for developmental mechanisms and for correlations of área size, neuron numbers and functions of brain nuclei. **Trends Neuroscience**. 1997; 20: 58-62.

GAHR, M.; SONNESCHEIN, E.; WICKLER, W. Sex difference in the size of neural song control regions in a dueting songbird with similar song repertoire sizes of males and females. **J. Neurosci**. 1998; 18:1124-1131.

GAHR, M. Distribution of sex steroid hormone receptors in the avian brain: functional implications for neural sex defferences and sexual behaviors. **Microscope Research and Technique**. 2001; 55:1-11.

GAHR, M. METZDORF, R. SCHMIDI, D.; WIDDER, W. Bidirectional sexual dimorphisms of the song control nucleus hvc in a songbird with unison song. **PLoS ONE**. 2008; 3:e3073.

GEBERZAHN, N.; GAHR, M. Undirected (solitary) birdsong in female and male blue-capped cordon-bleus (Uraeginthus cyanocephalus) and its endocrine correlates. **PLoS One**. 2011; 6(10):e26485.

GEBERZAHN, N.; GAHR, M. Song learning in male and female Uraeginthus cyanocephalus, a tropical songbird species. **J Comp Psychol**. 2013; 127(4):352-364.

GOLLER, F.; SUTHERS, R. A. Role of syringeal muscles in controlling the phonology of birdsong. **J Neurophysiol**. 1996; 76(1):287-300.

GOLLER, F.; LARSEN, O. N. New perspectives on mechanisms of sound generation in songbirds. **J Comp Physiol A**. 2002; 188: 841-850.

GUIMARÃES, L. D.; MORAES, A. N. Anestesia em aves: agentes anestésicos. **Ciência Rural**. 2000; 30(6): 1073-1081.

GURNEY, M. E.; KONISHI, M. Hormone induces sexual differentiation in the zebra finch song system. **Brain Res**. 1980; 208:1380-1382.

HARDING, C. F. Learning from Bird brains: how the sudy of songbird brains revolutionized neuroscience**. Lab Animal**. 2004; 33 (5): 28-33.

HAYASHI, A.; MORADZADEH, A.; HUNTER, D. A.; KAWAMURA, D. H.; PUPPALA, V. K.; TUNG, T. H.; MACKINNON, S. E.; MYCKATYN, T. M. Retrograde labeling in peripheral nerve research: it is not all black and white. **J Reconstr Microsurg**. 2007; 23(7): 381-389.

IRESTEDT, M.; FJELDSA, J.; JOHANSSON, U. S.; ERICSON, P. G. P. Systematic relationships and biogeography of tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2002; 23:499-512.

JANIK, V. M. Whistle matching in wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Science**. 2000; 289:1355-1357.

JARVIS, E. D.; RIBEIRO, S.; SILVA, M. L.; VENTURA, D.; VIELLIARD, J.; MELLO, C. V. Behaviorally-driven gene expression reveals song nuclei in hummingbird brain. **Nature**. 2000; 406:628-632.

JARVIS, E. D. Learned birdsong and the neurobiology of human language. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 2004; 1016:749-777.

JARVIS, E. D. Neural systems for vocal learning in birds and human: a synopsis. **J. Ornithol**. 2007; 148(1):35-44.

JARVIS, E. D. The evolution of vocal learning systems in birds and humans. In. KAAS, J. H. **Evolutionary neuroscience**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 297-303.

JARVIS, E. D.; PETKOV, C. Birds, primates and spoken language origins: behavioral phenotypes and neurobiological substrates. **Front. Evol. Neurosci**. 2012; 4:1-24.

JOHNSON, F. BOTTJER, S. W. Hormone-induced changes in identified cell populations of the higher vocal Center in male canaries. 1993; **J Neurobol**. 1993; 24:400-418.

KING, A. Functional anatomy of the syrinx. In: **Form and Function in Birds**. London: A. King and J Mclelland, Academic Press, 1989. Vol 4, pp 105-192.

KIRN, J. R.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; NOTTEBOHM, F. Production and survival of projection of neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. **J. Neurosci**. 1991; 11:1756-1762.

KONISHI, M. The role of auditory feedback in the vocal behaiviour of the domestic fowl. **Z. Tierpsychol**. 1963; 20:349-367.

KONISHI, M. The role of auditory feedback in the control of vocalization in the white-crowned sparrow. **Z. Tierpsychol**. 1965; 22:770-783.

KONISHI, M. Birdsong: from behavior to neuron. **Ann. Rev. Neurosci**. 1985; 8:125-170.

KONISHI, M.; AKUTAGAWA, E. Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain. **Nature**. 1985; 315:145-147.

KROODSMA, D. Songs of the Alder flycatcher (*Empidonax alnorum*) and willow flycatcher (*Empidonax traillii*) are innate. **Auk**. 1984; 101: 13-24.

KROODSMA, D. Develpment and use of two song forms by the Eastern Phoebe. **Wilson Bulletin**. 1985; 97:21-29.

KROODSMA, D. KONISHI, M. A suboscine bird (esatern Phoebe, *Sayornis Phoebe*) develops normal song without auditory feedback. **Anim. Behav**. 1991; 42:477-487.

KROODSMA, D. **The singing life of birds: the art and science of listening to birdsong**. New York: Houghton Mifflin, 2005.

KROODSMA, D. Neither individually distinctive songs nor “lek signatures”are demonstrated in suboscine screaming pihas. **The Auk**. 2011; 128:789-790. doi:10.1525/auk.2011.128.4.789.

KROODSMA, D.; HAMILTON, D.; SÁNCHEZ, J. E.; BYERS, B. E.; FANDIÑO-MARIÑO, H. Behavioral evidence for song learning in the susboscine bellbirds (procniasspp.; contigidae). **The Wilson Journal of Ornithology**. 2013; 125:1-14. Doi:10.1676/12-033.1.

LI, X.; WANG, X. J.; TANNENHAUSER, J.; PODELL, S.; MUKHERJEE, P.; HERTEL, M.; BIANE, J.; MASUDA, S.; NOTTEBOHM, F.; GAASTERLAND, T. Genomic resources for songbird research and their use in characterizing gene expression during brain development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. 2007; 104(16):6834-6839.

LIMA, J. L. R.; SOARES, F A.; REMEDIOS, A. C.; THOM, G.; WIRTHLIN, M.; ALEIXO, A.; SCHNEIDER, M. P.; MELLO, C. V.; SCHNEIDER, P. N. A putative RA-like region in the brain of the scale-backed antbird, *Willisornis poecilinotus* (*Furnariides, Suboscines, Passeriformes, Tamnophilidae*). **Genet. Mol. Biol**. 2015; 38:249-254.

LIU, W. C.; KAZUHIRO, W.; JARVIS, E. D.; NOTTEBOHM, F. Rudimentary substrates for vocal learning in a suboscine. **Nature Communications**. 2013; 4:2082

LOBATO, Muriele. **Identificação neuroanatômica dos núcleos cerebrais relacionados ao canto em *uraeginthus cyanocephalus* (ordem passeriformes, subordem oscines, família estrildidae)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

LOBATO, M; VELLEMA, M.; GAHR, C.; LEITÃO, A.; LIMA, S. M. A.; GEBERZAHN, N.; GAHR, M. Mismatch in sexual dimorphism of developing song and song control system in blue-capped cordon-bleus, a songbird species with singing females and males. **Front. Ecol. Evol**. 2015; http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2015.00117

MARGOLIASH, D. Functional organization of forebrain pathways for song production and perception. **J. Neurobiol**. 1997; 33:671-693.

MARLER, P.; TAMURA, M. Culturally transmitted patterns of vocal behaivior in sparrows. **Science**. 1964; 146:1483-1486.

MARLER, P. A comparative approach to vocal learning: song development in white-crowned sparrows. **J Comp Physiol Psycol**. 1970; 71(2p2):1.

MARLER, P.; PETERS, S. Subsong and plastic song. In: KROODSMA, D.E.; MILLER, E.H. **Acoustic communication in birds**. New York: Academic Press, 1982. p. 25-50.

MCKAY, B. D.; BAKER, F. K.; MAYS JR., H. L.; DOUCET, S. M.; HILL, G. E. A molecular phylogenetic hypothesis for the manakins (*Aves: Pipridae*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2010; 55:733-737.

MELLO, C. V.; CLAYTON, D. F. Song-induced zenk gene expression in auditory pathways of songbird brain and its relation to the song control system. **J. Neurosci**. 1994; 14:6662-6666.

MELLO, C. V.; VATES, G. E.; OKUHATA, S.; NOTTEBOHM, F. Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (Taeniopygia guttata). **J. Comp. Neurol**. 1998; 395:137-160.

METZDORF, R.; GAHR, M.; FUSANI, L. Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and nonsongbirds. J**. Comp. Neurol**. 1999; 407:115-129.

MOENCH, T. R. *In situ* hybridization. **Molecular and Cellular Probes.** 1987; 1:195-205.

MONEY, R. Neural mechanisms for learned birdsong. **Learn. Mem**. 2009; 16:655-669.

MORI, C.; WADA, K. Songbird: a unique animal model for studying the molecular basis disorders of vocal development and communication. **Exp. Anim**. 2015; 64(3): 221-230.

NIXDORF-BERGWEILLER, B. E. Divergent and parallel development in volume sizes of telencephalic song nuclei in male and female zebra finches.**The Journal of Comparative Neurology**. 1996; 375:445-456.

NOTTEBOHM, F.; STROKES, T. M.; LEONARD, C. M. Central control of song in the canary, Serinus canarius. **J. Comp. Neurol**. 1976; 165:457-86.

NOTTEBOHM, F.; ARNOLD, A. P. Sexual dimorphism in vocal areas of the songbird brain. **Science**. 1976; 194:211-213.

NOTTEBOHM, F. The neural basis of birdsong. **PLoS Biol.** 2005; 3:759-761.

NOWICKI, S.; SEARCY, W. A. Song function and the evolution os females preferences why birds sing, why brain matter. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2004; 1016:704-723.

OHLSON, J. I.; PRUM, R. O.; Ericson, G. P. A molecular phylogeny of the contigas (*Aves: Contigidae*). **Mol. Phylogen. Evol.** 2007; 42:25-37.

PAYNE, R. S.; MCVAY, S. Songs of humpback whales. **Science**. 1971; 173:587-597.

PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, F. H. **The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells**. New York: Oxford University Press. 3.ed. 1991. p. 11-65

POIRIER, C. *et al*. A three-dimensional MRI atlas of the zebra finch brain in stereotaxic coordinates. **J Neuroimage**. 2008; 41:1-6.

PRATHER, J. F.; MOONEY, R. Neural correlates of learned song in the avian forebrain: simultaneous representation of self and others. **Current Opinion in Neurobiology**. 2004; 14:496-502.

PRUM, R. O. Syringeal morphology, phylogeny, and evolution of the neotropical manakins (Aves: Pipridae). American Museum of Natural History. 1992.

RAINE, C. S. Neurocelular anatomy. In. SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W. **Basic neurochemistry**. 4.ed. New York: Raven Press. 1989. p. 3-33.

RASIKA, S.; NOTTEBOHM, F.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. 1994; 91:7854-7858.

RIEBEL, K. *et al*. Female songbirds still struggling to be heard. **TRENDS in Ecology and Evolution**. 2005; 20:419-420.

RIEDE, T.; GOLLER, F. Functional morphology of the sound-generating labia in the syrinx of two songbird species. **J Anat**. 2010; 216(1):23-36.

RICHARDS, D. G. *et al*. Vocal mimicry of computer-generated sounds and vocal labeling of objects by a bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. **J Comp Psychol**. 1984; 98:10-28.

ROBERTSON, B. A.; FONTAINE, J. J.; LOOMIS, E. Seasonal patterns of song structure variation in a suboscine passerine. **The Wilson Journal of Ornithology**. 2009; 121(4): 815-818.

RODERICK, A. S.; ZOLLINGER, S. A. From brain to song: the vocal organ and vocal tract. In. ZEIGIER, M. P.; MARLER, P. **Neuroscience of birdsong**. New York: Cambridge University Press, 2008. p. 78-98.

SARANATHAN, V.; HAMILTON, D.; POWELL, G. V. N.; KROODSMA, D.; PRUM, R. O. Genetic evidence supports song learning in the three-wattled bellbird *Procnias tricarunculata* (*Cotingidae*). **Molecular Ecology**. 2007; 16: 3689-3702.

SCHIMIDT, M. F.; ASHMORE, R. Breathing and singing: forebrain and brainstem. In. ZEIGLER, H. P.; MARLER, P. **Neuroscience of birdsong**. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2008. p. 115-135.

SHOREY, L. Mating success on White-bearded manakin (*Manacus manacus*) leks: male characteristics and relatedness. **Behav. Ecol. Sociobiol**. 2002; 52: 451-457.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira,1997. 862p.

SILVA, M. L. Estereotipia e versatilidade nos cantos das aves: os padrões de canto em sabiás e outras aves. **Anais de Etologia.** 1995; 13: 133-147.

SILVA, M. L. **Estrutura e organização de sinais de comunicação complexos: o caso do Sabiá-laranjeira Turdus rufiventris (Aves, Passeriformes, Turdinae)**. 2001. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA-VELENZUELA, M. G.; ALMEIDA, F. C. S.; MATIZONKAS-ANTONIO, L. F.; LIBÓRIO, T. N.; ACQUAFREDA, T.; CAZAL, C.; FERRAZ, A.; NUNES, F. D. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. **J. Bras. Patol Med Lab**. 2006; 42:207-213.

SIMPSON, H. B.; VICARIO, D. S. Brain pathways for learned and unlearned vocalizations differ in zebra finches. **J. Neurosci**. 1990; 10:1541-1556.

SLATER, P. J. B.; MANN, N. I. Why do females of many spieces sing in the tropics? **Journal of Avian Biology**. 2004; 35: 289-284.

SMALL, T. E.; BRENOWITZ, E. A.; WOJTENEK, W.; MOORE, I. T. Testosterone mediates seasonal growth of the song control nuclei in tropical bird. **Brain Behav. Evo**l. 2015; 6:110-121.

SMITH, G. T.; BRENOWITZ, E. A.; WINGFIELD, C. J. Seasonal changes in the size of the avian song control nucleus HVC defined by multiple histological markers. **The Journal of Comparative Neurology**. 1997; 381: 253-261.

SNOW, D. W. Family *Contigidae* (contigas). In. HOYO, J.; ELLIOT, A.; CHRISTIE, D. A. **Handbook of the birds of the wrold**. V. 9. Barcelona: Lynx Edicions, 2004. p. 32-109.

THOMPSON, C. K.; BRENOWITZ, E. A. Seasonal change in neuron size and spacing but not neuronal recruitment in a basal ganglian nucleus in the avian song control system**. J. Comp. Neurol**. 2005; 481:276-283.

THORPE, W. H. The learning of song patterns by birds with special reference to the song of the chaffinch, *Fringilla coelebs*. **Ibis**. 1958; 100:535-570.

TOUCHTON, J. M.; SEDDON, N.; TOBIAS, J. A. Captive rearing experiments confirm song development without learning in a tracheophone suboscine bird. **PLoS One**. 2014; 9:e95746.

TRAINER, J. M.; MCDONALD, D. B. Vocal repertoire of the long-tailed manakin and its relation to male-cooperation. **Condor**. 1993; 95:769-781.

TRAINER, J. M.; PARSONS, R. J. Uniformity of long-tailed manakin songs from three localities in Costa Rica. The Wilson Bulletin. 2001; 113:431-434.

TRAINER, J. M.; MCDONALD, D.; LEAM, W. The development of coordinated sinsging in cooperatively displaying long-tailed manakins. **Behav Ecol**. 2002; 13:65-69.

TSUKAHARA, N.; KAMATA, N.; NAGASAWA, M.; SUGITA, S. Bilateral innervation of syringeal muscles by hypoglossal nucleus in the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). **J. Anat**. 2009; 215: 141-149.

VICARIO, D. Neural mechanisms of vocal production in songbirds. **Curr. Opin. Neurobiol**. 1991; 1:595-600.

VIELLIARD, J. **Uso da bioacústica na observação das aves**. II Encontro Nac. Anilhad. Aves. Rio de Janeiro, 1987. p. 98-121.

VIELLIARD, J. M. E. **A diversidade de sinais e sistemas de comunicação sonora na fauna brasileira**. I Seminário Música Ciência e Tecnologia. São Paulo, 2005. Anais do I Seminário Música Ciência e Tecnologia,vol. 1.

WADE, J.; BUHLMAN, L. Lateralization and effects of adult androgen in a sexually dimorphic neuromuscular system controlling song in zebra finch. **J. Comp. Neurol**. 2000; 426:154-164.

WADE, J.; BUHLMAN, L.; SWENDER, D. Post-hatching hormonal modulation of

sexually dimorphic neuromuscular system controlling song in zebra finches. **Brain Research**. 2002; 929: 191-201.

WANG, R.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZENG, S.; XIE, W.; YU, Y.; ZHANG, X.; ZUO, M. Song control nuclei in male and female large-billed crows (*Corvus macrorhynochos*). **Zoological Science**. 2009; 26:771-777.

WILBRECHT, L.; NOTTEBOHM, F. Vocal learning in birds and humans. **MRDD Research Reviews**. 2003; 9:135-148.

WILD, J. M. Identification and localization of the motor nuclei and sensory projections of the glossopharyngeal, vagus, and hypoglossal nerves of the cockatoo (Cacatua roseicapilla), Cacatuidae. **J Comp Neurol**. 1981; 203(3):351-377.

WILD, J. M.; WILLIAMS, M. N.; SUTHERS, R. A. Neural pathways for bilateral vocal control of songbirds. **J Comp Neurol**. 2000; 423: 413-426.

WILD, J. M. Functional neuroanatomy of the sensoriomotor control of singing. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 2004; 1016: 438-462.

WILD, J. M.; WILLIAMS, M. N.; HOWIE, G. J.; MOONEY, R. Calcium-biding proteins define interneurons in hvc of the zebra finch (Taeniopygia guttata). **J. Comp. Neurol**. 2005; 483:76-90.

WILD, J. M.; KRUTZFELDT, N. E. Trigeminal and telencephalic projections to jaw and other upper vocal tract premotor neurons in songbirds: Sensoriomotor circuitry for beak movements during singing. **J Comp Neurol**. 2012; 520: 590-605.

WILLIAMS, H. Sexual dimorphism of auditory activity in the zebra finch song system. **Behavioral and Neural Biology**. 1985; 44:470-484.

YAMAMURA, T.; BARKER, J.; BALTHAZART, J.; BALL, G. F. Androgens and estrogens synergize to regulate the expression. Of doublecortin and enhance neuronal recruitment in the song system of adult female canaries. **J. Neurosci**. 2011; 31:9649-9657.

YOUNGREN, O. M.; PHILIPS, R. E. Location and distribution of tracheosyringeal motorneuron somata in the fowl. **J Comp Neurol**. 1983; 213(1):86-93.

ANEXO I

Preparo das Soluções para Coloração de Nissl

1. Etanol 90%

Para o preparo de 100 ml de etanol a 90%, mistura-se 90 ml de álcool absoluto com 10 ml de água destilada.

2. Etanol 70%

Para o preparo de 100 ml de etanol a 70%, junta-se 70 ml de álcool absoluto a 30 ml de água destilada.

3. Etanol 20%

Para o preparo de 100 ml de etanol a 20%, coloca-se 20 ml de álcool absoluto em 80 ml de água destilada.

4. Tionina 0,1%

Para o preparo de tionina 0,1%, misturava-se 250 mg de tionina em 250 ml de água destilada em misturador, até todo o soluto ser dissolvido.

ANEXO II

Preparo de soluções para a reação de hibridização *in situ* radioativa

1. Acetato de amônia 10M

Junta-se 770,8 mg de acetato de amônia (Sigma A-1542) em 1,0 ml DEPC-H_2O e armazenar em freezer com temperatura de -20° C.

2. DEPC-H2O

Para cada 1,0 l de água destilada, adiciona-se 1,0 ml de DEPCT(Sigma D-5758)o 1,0 liter H_2O_{dest} add 1,0 ml DEPC (Sigma D-5758). Misturar bem e incubar *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, a mistura deve ser autoclavada.

3. Dextran a 50%

Para 20 ml de dextran a 50%, adicionar 10,0 g de dextran (Sigma D-8906), completar com DEPC-H_2O até o montante de 20 ml. Em seguida, a solução deve ser aquecida a 80°C até que o dextran seja completamente dissolvido.

4. Solução de Ditiotreitol (DTT) 4,0 M

Dissolvel 1,0 g de DTT (*Dithiothreitol*, Sigma D-9779) em 1,62 ml DEPC- H_2O. Armazenar em freezer com temperatura a -20°C.

5. Etanol 70%

Para o preparo de 20 ml de solução, mistura-se 14 ml de etanol absoluto com 6 ml de água DEPC.

6. Solução RNA *Yeast*

Para se obter 1,0 ml de solução, coloca-se 20,0 mg de RNA yeast (Sigma R-6750) mais água DEPC até completar 1,0 ml. Em seguida, a mistura é armazenada em freezer com temperatura de - 20°C.

7. Solução RNA-t-*yeast*

Para preparr 1,0 ml de solução, dissolve-se 50,0 mg de RNA-t-*yeast* (Invitrogen 15401-029) em DEPC-H_2O até completar 1,0 ml de solução. Posteriormente, a solução deve ser armazenada em freezer com temperatura de - 20°C.

8. Tampão de hibridização-2x

Adiciona-se em um tubo de ensaio estéril de 50 ml: 2400 µl de NaCl 5 M, 200 µl de TrisHCl 1 M, 66 µl de solução Ficoll 6%, 200 µl de solução BSA 2%, 66 µl de solução PVP 6%, 40 µl de EDTA 0,5 M, 200 µl de DNA de salmão, 500 µl de solução RNA-*yeast*, 20 µl de soluçãoYeast-t-RNA-Solution, 4000 µl de solução Dextran 50%, 2308 µl de água DEPC.

Misturar bem e dividir em alíquotas de 0,5 ml, utilizando ependorfs estéries. Por fim, armazenar as alíquotas em freezer com temperatura de -20°C.

9. Solução Ficoll 6%

Para o prepro de 1,0 ml de solução Ficoll 6%, deve-se misturar 60,0 mg de Ficoll (Sigma F-2637) em DEPC-H_2O até completar 1,0 ml. Armazenar a mistura à -20°C.

10. Tiosulfato de sódio 10%

Diluir 100 mg de tiosulfato de sódio (Sigma S-1648) em água DEPC-até atingir o total de 1,0 ml de solução. Armazenar em freezer com temperatura de -20°C.

11. Solução Polivinilpirolidona (PVP) 6%

Adicionar 0,6 g de PVP (*Polyvinylpyrrolidone*, Sigma P-5288) em 15 ml PP-vial e em 10 ml de água DEPC-H_2O.

12. rCTP 0,1 mM

Dissolver 1,0 µl de rCTP 10 mM (Promega P114B) ou de *Riboprobe Combination System* SP6/T7 (Promega P 1460) em 99,0 µl de água DEPC. Guardar a solução em freezer -20°C.

13. rNTP-Mix 2,5 mM

Misturar 100 µl de rATP 10 mM com 100 µl rGTP de10 mM, 100 µl de rUTP 10 mM e 100 µl de água DEPC. Armazenar a -20°C.

Algumas das soluções utilizadas já são vendidas prontas para o uso e são as seguintes: solução de BSA a 2% (Sigma B-8894); solução de DNase (Promega M610A ou P1460); solução de ditiotreitol a 0,1 M (Promega P117B), solução de 0,5 M EDTA (Sigma E-7889); etanol absoluto (Rotipuran 99,8 p.A.); solução de NaCl 5 M; polimerase SP6 (Promega P108B), T7 (Promega P207B) ou *Riboprobe Combination System* SP6/T7 (Promega P 1460); solução RNasina (Promega N251A); DNA de salmão; solução SDS 10% (Invitrogen 15553-027); Tris-HCl 1M (Sigma T-2663); solução de TSC 5x (Promega P118B).

ANEXO III

Protocolo de imunohistoquímica em secções *free-floating* (FAUNES e WILD, 2017)

1. Lavagem com PBS 3x (10 minutos cada) para retirar o tissue-tech;
2. Incubar 15 minutos em solução H_2O_2 0,3% em PBS-Metanol 1:1;

   Para 20 ml: - 10 ml PBS
   - 10 ml Metanol
   - 600 µl H_2O_2 (10vol) ou 200 µl (30 vol)
3. Lavagem em PBS 3x (10 minutos cada);
4. Incubar 1h em solução de bloqueio.

   Solução de bloqueio: Normal Horse Serum ou Normal Donkey Serum ou BSA 2% em PBST (0,3% triton x100 em PBS, ou seja 3ml de triton por litro de PBS).

   Para 20 ml:
   - 400 µl NHS ou NDS ou BSA
   - 19600 µl PBST5.
5. Incubar *overnight* em anticorpo primário diluído em solução de bloqueio em agitação suave (com um *shaker*). Este passo pode ser em temperatura ambiente (em torno de 25ºC);
6. Lavagem em PBS 3x (10 minutos cada);
7. Incubar 2h em anticorpo secundário diluído em PBST;
8. Lavagem em PBS 3x (10 minutos cada);
9. Incubar 1h em neutravidina diluída 1:1000 em PBST;
10. Lavagem em PBS 3x (10 minutos cada);
11. Incubar por 1-2 minutos em solução de DAB;
12. Acrescentar umas gotinhas de solução H_2O_2 1>100 em agua destilada, agitando suavemente. A H_2O_2 vai iniciar a reação e o DAB vai começar a se depositar.
13. Lavagem em PBS 4x (10 minutos cada).

ANEXO IV

Protocolo de desidratação

1. Passar as lâminas por bateria de álcool crescente, por 2 minutos em cada álcool.
   As concentrações do etanol podem ser por exemplo 50% -> 75% -> 90% -> 100% I -> 100% II.

2. Incubar as lâminas em Xilol e deixar 1h.

3. Cobrir o tecido com meio de montagem (e.g., Permount, Entellan) e lamínula e deixar para secar.