



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

MURIELE NAZARETH LOBATO

IDENTIFICAÇÃO NEUROANATÔMICA DOS NÚCLEOS CEREBRAIS
RELACIONADOS AO CANTO EM *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS* (ORDEM
PASSERIFORMES, SUBORDEM OSCINES, FAMÍLIA ESTRILDIDAE)

BELÉM-PARÁ
2011

MURIELE NAZARETH LOBATO

IDENTIFICAÇÃO NEUROANATÔMICA DOS NÚCLEOS CEREBRAIS
RELACIONADOS AO CANTO EM *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS* (ORDEM
PASSERIFORMES, SUBORDEM OSCINES, FAMÍLIA ESTRILDIDAE)

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação da Prof^a. D^{ra}. Silene Maria Araújo de Lima.

Área de Concentração: Neurociências

BELÉM-PARÁ
2011

MURIELE NAZARETH LOBATO

IDENTIFICAÇÃO NEUROANATOMICA DOS NUCLEOS CEREBRAIS
RELACIONADOS AO CANTO EM *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS* (ORDEM
PASSERIFORMES, SUBORDEM OSCINES, FAMÍLIA ESTRILDIDAE)

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação da Prof^a. D^{ra}. Silene Maria Araújo de Lima.

Área de Concentração: Neurociências

Aprovação em: 28 de setembro de 2011.

BANCA JULGADORA DE DEFESA

Profra. Dr^a. Silene Maria Araújo de Lima (ICB/UFPA) – Orientadora e Presidente da Banca

Profra. Dra. Márcia Consentino Kronka Sosthenes (ICB/UFPA) – Membro Titular

Prof. Dr. Manoel da Silva Filho (ICB/UFPA) - Membro Titular

Prof. Dr. Fernando Allan Farias da Rocha (ICB/UFPA) – Membro Suplente

À DEUS e à minha família

AGRADECIMENTOS

À minha estimada orientadora, Prof^{fa}. Dr^a. Silene Maria Araújo de Lima, por me acolher, pela paciência, pela orientação competente, e sobretudo, por toda a amizade e confiança depositadas em mim e no nosso trabalho, sem as quais eu jamais estaria finalizando mais esta etapa da minha vida acadêmica.

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^{fa}. Dr^a. Maria Luisa da Silva por ter oportunizado a minha visita ao Instituto Max-Planck de Ornitologia, em Seewiesen, e por toda a sua colaboração para o entendimento de assuntos relacionados à ornitologia.

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 Prof. Dr. Fernando Allan Farias da Rocha pelas dicas e orientações sobre o tratamento estatístico dos dados desta pesquisa.

Às minhas queridas colegas de laboratório que desde o princípio (Cristiane e Sara) ou mais recentemente (Flávia e Layza) compartilharam comigo tanto bons momentos quanto dificuldades. Sempre me lembrarei com muito carinho de cada uma de vocês.

E ao apoio financeiro dos órgãos de Fomento CAPES e *European Commission Marie Curie Actions* sem o qual não teria como subsidiar minha pesquisa.

RESUMO

Sabe-se que as regiões cerebrais envolvidas no controle do canto são sexualmente dimórficas em muitas espécies de pássaros adultos de regiões temperadas como nos *zebra finches* em que os machos cantam e as fêmeas não cantam. Em diversas espécies de pássaros canoros dos trópicos, contudo, tanto os machos quanto as fêmeas são capazes de cantar. Porém, os mecanismos envolvidos na produção do canto em fêmeas ainda é pouco compreendido. Com o intuito de identificar diferenças que possam explicar o canto em fêmeas, nós estudamos a morfologia do sistema do canto de pássaros machos e fêmeas da espécie *Uraegynthus cyanocephalus*, espécie esta em que tanto machos quanto fêmeas cantam. Como primeiro passo para a análise e estabelecimento de diferenças anatômicas quanto ao sexo, nós quantificamos alterações de volume de áreas prosencefálicas relacionadas ao canto, através de marcação com Nissl e de marcação de receptores andrógenos (RA) por meio de hibridização in situ radioativa. Nós verificamos que, tanto em machos quanto em fêmeas, o volume do centro vocal superior (HVC) não sofre alteração estatisticamente significativa ao longo do desenvolvimento. Observamos, ainda, que o volume do HVC em machos é sempre superior ao das fêmeas, inclusive na fase adulta, quando esta diferença se torna significativa, existindo portanto, dimorfismo sexual. Contrariamente ao desenvolvimento do HVC, o núcleo robusto do arcopallio (RA) de machos aumenta de modo significativo gradualmente com a idade, atingindo o seu pico de crescimento na fase adulta. O volume do RA aumentou em 2,21 vezes no macho (0,104 mm³ em 20 dias para 0,236 mm³ na idade adulta). Nas fêmeas, as alterações volumétricas de RA observadas ao longo do crescimento não foram significativas.

PALAVRAS-CHAVE: aves canoras, dimorfismo sexual, desenvolvimento, sistema do canto.

APOIO FINANCEIRO: CAPES, *European Commission Marie Currie Actions*.

ABSTRACT

Song control regions in passerine birds are sexually dimorphic in the adult brain of species like the zebra finches in which males sing whereas females do not. In the majority of tropical bird species, however, females sing as well. The issue of female song production began to attract more attention recently, but the neural mechanisms involved in the female song production are still poorly understood. Here we study for the first time the ontogeny of the song control system in a species, in which both male and female sing regularly. In blue-capped cordon blues (*Uraeginthus cyanocephalus*), a close relative of the zebra finch, females sing but have shorter songs with fewer syllables compared to the males. Volumetric changes of forebrain song control regions (the HVC, the RA and the LMAN) of the blue capped cordon bleu have been quantified in both sexes at 20, 30, 50 and ≥ 100 days posthatching, by using the Nissl-staining method and in situ hybridization. In both sexes, no significant differences in the volumetric development of HVC (proper name) were detected. The Nissl-defined volume of the HVC in males was always superior to the females values, including the adulthood, when the volume values became significant bigger in males than in females. In contrast, the volume of the robust nucleus of the archistriatum (RA) increased with age reaching the highest values in adulthood. The Nissl-defined RA volume increased by 2,21 times in males (from $0,104 \text{ mm}^3$ at 20 days to $0,236 \text{ mm}^3$ in adulthood). In females, no significant differences in the volumetric development of RA were detected.

KEY-WORDS: songbirds, sexual dimorphism, ontogeny, song system.

FINANCIAL SUPPORT: CAPES, European Comission Marrie Currie Actions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Árvore filogenética das aves canoras com destaque para os grupos das aves que possuem canto aprendido	21
Figura 2 –	Fases e estágios do desenvolvimento do canto em zebra finches	23
Figura 3 –	Estruturas para coordenação do canto com a respiração em aves	24
Figura 4 –	Representação esquemática do encéfalo de ave seguindo a nova nomenclatura proposta por Reiner e colaboradores (2004)	25
Figura 5 –	Desenho esquemático do sistema do canto das aves	27
Figura 6 –	Foto de um <i>Uraeginthus cyanocephalus</i>	30
Figura 7 –	Organograma de distribuição dos animais em quatro grupos distinto de acordo com a fase do desenvolvimento	34
Figura 8 –	Esquema de como os cortes seriados eram organizados	36
Figura 9 –	Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo robusto do arcoptálio (RA)	47
Figura 10 –	Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo robusto do arcoptálio (RA)	48
Figura 11 –	Fotomicrografia de um corte sagital, corado pelo método de Nissl e em grande aumento (40x), da área de transição entre o núcleo robusto do arcoptálio (RA)	49

Figura 12 –	Representação diagramática da alteração volumétrica do núcleo robusto do arcopálio (RA)	52
Figura 13 –	Auto-radiografia de um corte mais lateral do encéfalo de um <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> macho de 50 dias que foi submetido à hibridização in situ radioativa	53
Figura 14 –	Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo centro vocal superior (HVC)	55
Figura 15 –	Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo centro vocal superior (HVC)	56
Figura 16 –	Fotomicrografia de um corte sagital, corado pelo método de Nissl e em grande aumento (40x), da área de transição entre o núcleo centro vocal superior (HVC)	57
Figura 17 –	Representação diagramática da alteração volumétrica do núcleo centro vocal superior (HVC)	60
Figura 18 –	Auto-radiografia de um corte do encéfalo de um <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> macho adulto (≥ 100 dias) que foi submetido à hibridização in situ radioativa	62
Figura 19 –	Auto-radiografia de um corte do encéfalo de um <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> fêmea adulta (≥ 100 dias) que foi submetido à hibridização in situ radioativa	65
Figura 20 –	Representação diagramática da diferença volumétrica do núcleo robusto do arquiestriado (RA)	70
Figura 21 –	Representação diagramática da diferença volumétrica do núcleo centro vocal superior (HVC)	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arcopalio (RA)	50
Tabela 2 –	Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo robusto do arcopalio (RA)	51
Tabela 3 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arcopalio (RA) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> machos e fêmeas	54
Tabela 4 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo centro vocal superior (HVC) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> machos e fêmeas	58
Tabela 5 –	Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo centro vocal superior (HVC) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> machos e fêmeas	59
Tabela 6 –	Comparação volumétrica do centro vocal superior (HVC) entre machos e fêmeas de <i>blue capped cordon bleus</i>	61
Tabela 7 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo centro vocal superior (HVC) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> machos e fêmeas	63
Tabela 8 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo magnoelular lateral do neoestriado anterior (LMAN) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> machos e fêmeas	66

Tabela 9 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arquiestriado (RA) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> e <i>Taeniopygia guttata</i>	68
Tabela 10 –	Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo robusto do arcopallio (RA) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> e de <i>Taeniopygia guttata</i>	69
Tabela 11 –	Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo centro vocal superior (HVC) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> e <i>Taeniopygia guttata</i>	71
Tabela 12 –	Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo centro vocal superior (HVC) de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> e de <i>Taeniopygia guttata</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HVC	Núcleo centro vocal superior
RA	Núcleo robusto do arcopallio
nXIIIts	Porção traquoseringeal do núcleo do hipoglosso
LMAN	Porção lateral do núcleo magnocelular do nidopallio anterior
DLM	Porção medial do tálamo dorsolateral
ISH	Hibridização <i>in situ</i>

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	18
1.1 – O CANTO	19
1.2 – ESTRUTURAS NEURAIS ENVOLVIDAS NO CANTO	25
1.3 – PRESENÇA DE DIMORFISMO SEXUAL NAS ÁREAS NEURAIS QUE CONTROLAM O CANTO	28
1.3.1 – Regulação dos núcleos cerebrais por hormônios esteróides	29
1.4 – A ESPÉCIE <i>URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS</i> NO CONTEXTO DESTA INVESTIGAÇÃO	30
1.5 – OBJETIVOS	31
1.5.1 – Objetivos Gerais	31
1.5.2 – Objetivos Específicos	31
2 – MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 – ANIMAIS	33
2.2 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – REMOÇÃO DOS CÉREBROS	34
2.3 – SECÇÕES SAGITAIS	35
2.4 – COLORAÇÃO DE NISSL	37
2.4.1 – Protocolo de Coloração	37

2.5 – HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> RADIOATIVA	38
2.5.1 – Introdução à Técnica	38
2.5.2 – Protocolo	40
2.5.2.1 – Marcação da Sonda de RNA	40
2.5.2.2 – Preparação do Mix de Hibridização	41
2.5.2.3 – Hibridização	42
2.5.2.4 – Auto-radiografia	43
2.6 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NÚCLEOS CEREBRAIS	43
2.6.1 – Quantificação da Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Corados com Nissl	44
2.6.2 – Quantificação da Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Corados Submetidos à Hibridização <i>in Situ</i>	45
2.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3 – RESULTADOS	46
3.1 – IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO	46
3.1.1 – Identificação do Núcleo Robusto do Arcopallio (RA)	46
3.1.2 – Identificação do Núcleo Centro Vocal Superior (HVC)	55

3.1.3 – Identificação do Núcleo Magnocelular Lateral do Nidopalio Anterior (LMAN)	64
3.2 – COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS TELENCEFÁLICOS RELACIONADOS AO CANTO ENTRE FÊMEAS DE <i>URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS</i> (BLUE CAPPED CORDON BLEU) E <i>TAENIOPYGIA GUTTATA</i> (ZEBRA FINCH)	66
3.2.1 – O núcleo robusto do arcopalio (RA) de fêmeas de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> (blue capped cordon bleu) e de <i>Taeniopygia guttata</i> (zebra finch)	67
3.2.2 – O núcleo centro vocal superior (HVC) de fêmeas de <i>Uraeginthus cyanocephalus</i> (blue capped cordon bleu) e de <i>Taeniopygia guttata</i> (zebra finch)	70
4 – DISCUSSÃO	74
4.1 – OBSERVAÇÕES GERAIS SOBRE A MARCAÇÃO DOS NÚCLEOS CENTRO VOCAL SUPERIOR (HVC), ROBUSTO DO ARQUIESTRIADO (RA) E MAGNOCELULAR LATERAL DO NEOESTRIADO ANTERIOR (LMAN) A PARTIR DOS MÉTODOS DE NISSL E HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> RADIOATIVA NO TELENCEFALO DE <i>URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS</i>	74
4.2 – DIMORFISMO SEXUAL NOS NÚCLEOS CENTRO VOCAL SUPERIOR (HVC) E ROBUSTO DO ARCOPALIO (RA) DE <i>URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS</i>	78
4.3 – COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO VOLUMÉTRICO DOS NÚCLEOS CENTRO VOCAL SUPERIOR (HVC), ROBUSTO DO ARCOPALIO (RA) E MAGNOCELULAR LATERAL DO NEOESTRIADO ANTERIOR (LMAN) COM O APRENDIZADO E PRODUÇÃO DO CANTO	81
5 – CONCLUSÃO	83

6 – REFERÊNCIAS	85
ANEXO I	92
ANEXO II	93

1 INTRODUÇÃO

Uma série de experimentos, utilizando técnicas de *play-back* em isolamento acústico e sonograma, demonstram evidências de aprendizado vocal em pássaros canoros oscines (THORPE, 1958), papagaios e beija-flores (BAPTISTA e SCHUCHMANN, 1990), em baleias (PAYNE e MCVAY, 1971), golfinhos (RICHARDS *et al.*, 1984; JANIK, 2000), morcegos (ESSER, 1994) e primatas não-humanos (CROCKFORD *et al.*, 2004). De todos os animais analisados, os pássaros canoros receberam maior atenção por parte da comunidade acadêmica em virtude da sua grande diversidade de espécies. Os pássaros oscines possuem mais de 4.000 representantes de espécies diferentes, oferecendo um rico material para estudos comparativos sobre o aprendizado vocal (WILBRECHT e NOTTEBOHM, 2003; POIRIER *et al.*, 2008).

O aprendizado vocal é uma habilidade sensório-motora, em que animais jovens necessitam escutar os sons que indivíduos adultos da mesma espécie emitem para desenvolver vocalizações normais quando atingem a fase adulta, ou seja necessitam memorizar e imitar um modelo auditivo. Sabe-se que tanto seres humanos quanto pássaros canoros são conhecidos como “aprendizes vocais”, uma vez que tanto em humanos (FROMKIN *et al.*, 1974) como em pássaros canoros (MARLER e TAMURA, 1964) ocorrem vocalizações anormais, se criados em isolamento.

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

O estudo do canto de pássaros pela neurobiologia, como modelo experimental para o estudo dos mecanismos de produção da fala humana, é uma área da neurociência em vasto crescimento. Dentre as áreas de interesse de estudo, destaca-se a histologia com a identificação dos núcleos cerebrais envolvidos no

aprendizado e produção do canto. 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 que é controlado por circuitos neurais discretos;
- Há distintas fases no desenvolvimento do canto, com períodos sensitivos bem definidos;
- 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 esteróides têm grande efeito no desenvolvimento e função dos circuitos neurais, bem como no comportamento do canto;
- Ocorre plasticidade do sistema do canto em animais adultos, incluindo neurogênese e mudanças sazonais de morfologia.

1.1 O CANTO

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 sonoro, visual ou químico (DAWKINS, 1989; BRADBURY e VEHRENCAMP, 1998; VIELLIARD, 2005).

O canto das aves é definido como um sinal de comunicação sonora que contém a informação de reconhecimento específico (VIELLIARD, 1987). Embora o reconhecimento específico seja a função primordial do canto, este também pode ser utilizado em outros contextos comportamentais bem específicos, geralmente associados à reprodução e à aquisição e manutenção de territórios (CAREW, 2000; BEECHER e BRENOWITZ, 2005; CATCHPOLE e SLATER, 2008; CLAYTON et al., 2009). Do mesmo modo que outras características biológicas, o canto varia entre indivíduos de uma população e pode ser diferenciado também entre populações de uma mesma espécie que ocupam regiões distintas (CAREW, 2000).

O canto determinado geneticamente (inato), faz uso de sinais o mais simples e estereotipados possíveis. Este tipo de canto é fixo e garante a especificidade da mensagem e sua transmissão de uma geração a outra. Em contrapartida, essa característica inata dificulta o surgimento de variações populacionais e individuais dentro de uma mesma espécie. 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 desenvolvem canto normal mesmo se mantidas em isolamento acústico. Este é o caso do canto das aves das famílias Columbidae (pombas, rolas e aparentados), Tinamidae (macucos e inhambus) e talvez da maioria dos pássaros não Passeriformes e dos Passeriformes Suboscines (SILVA, 1995; VIELLIARD, 1997; VIELLIARD, 2005).

Em diversas aves, somente o canto determinado geneticamente não é suficiente para tornar o canto funcional, sendo necessário a complementação do canto inato com o canto aprendido. Em outras palavras, para que o canto de certas aves seja funcional, é necessário que o filhote, em sua fase receptiva, escute o canto específico correto para que, na fase adulta, possam emitir sons reconhecíveis por seus congêneres. Caso isto não ocorra, ele será eliminado por ser incapaz de defender um território ou atrair um parceiro sexual (BAKER e CUNNINGHAM, 1985; 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).

Em contraste ao que ocorre nas espécies de canto inato, o canto aprendido possibilita o surgimento de variações individuais e populacionais, ocorrendo assim, a formação de dialetos (cantos com pequenas variações entre população distintas) (SILVA, 1995; NELSON, 2000).

Os estudos sobre canto são direcionados, preferencialmente, às espécies que apresentam canto aprendido, principalmente às aves Passeriformes Oscines (CAREW, 2000; CLAYTON *et al.*, 2009). Veja abaixo o organograma simplificado das aves canoras (Figura 1).

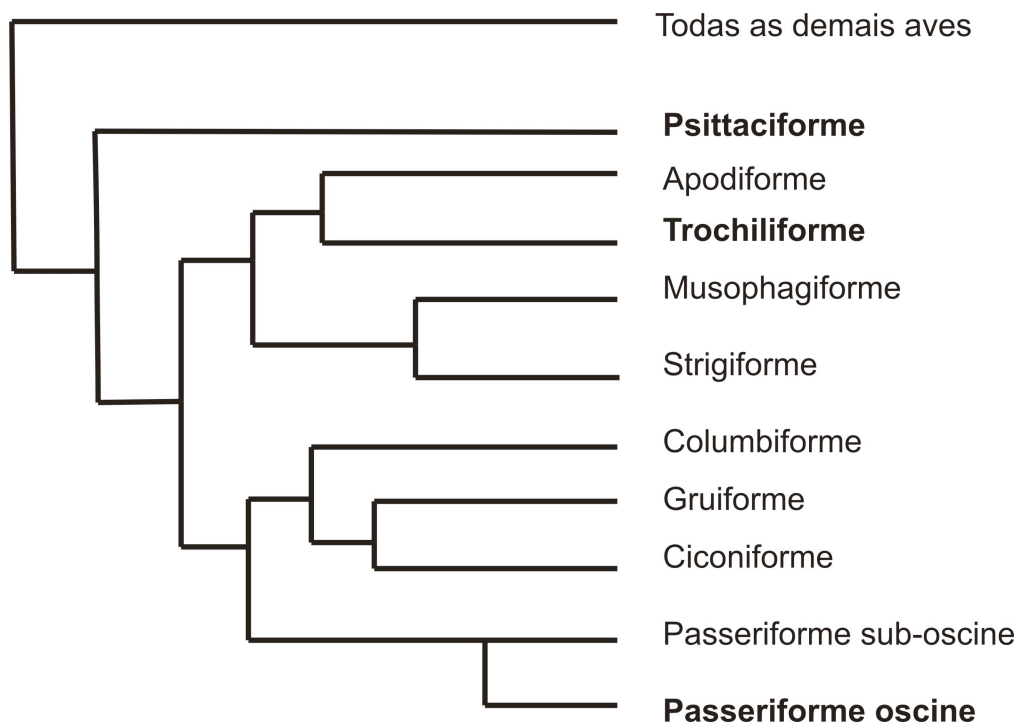


Figura 1. Árvore filogenética das aves canoras com destaque para os grupos das aves que possuem canto aprendido (em negrito). Figura da própria autora, 2011.

Apesar do canto, em muitas espécies, ser uma característica restrita dos machos (ex. *Zebra Finch*, *Taeniopygia guttata*), há evidências de que as fêmeas de muitas espécies, principalmente nos trópicos, também cantam 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; GARAMSZEG *et al.*, 2006).

A ontogênese do canto aprendido é dividida em três fases e cada fase é caracterizada pela taxa de informações sonoras adquiridas que são adicionadas ao repertório vocal do animal.

Na fase inicial, fase sensorial, o pássaro jovem deve ouvir, normalmente, o canto de outros machos da mesma espécie, para que este canto seja memorizado, contudo não ocorre prática vocal durante este período. A segunda fase é a sensório-motora e é caracterizada pela tentativa de conversão da memória sensorial 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 cristalizada e corresponde à transição da fase sensório-motora para o canto cristalizado (versão estereotipada do modelo sensorial ao qual foi exposto na primeira fase), que qualquer membro da espécie reconheceria como o seu próprio canto (KONISHI, 1985; BRENOWITZ *et al.*, 1997; CAREW, 2000).

Pesquisas confirmam que, apesar de haver diferenças consideráveis entre as espécies, no que diz respeito à duração de cada fase, existem características gerais de aprendizagem vocal que são comuns na maioria dos pássaros canoros (KONISHI, 1985; CAREW, 2000) (Figura 2).

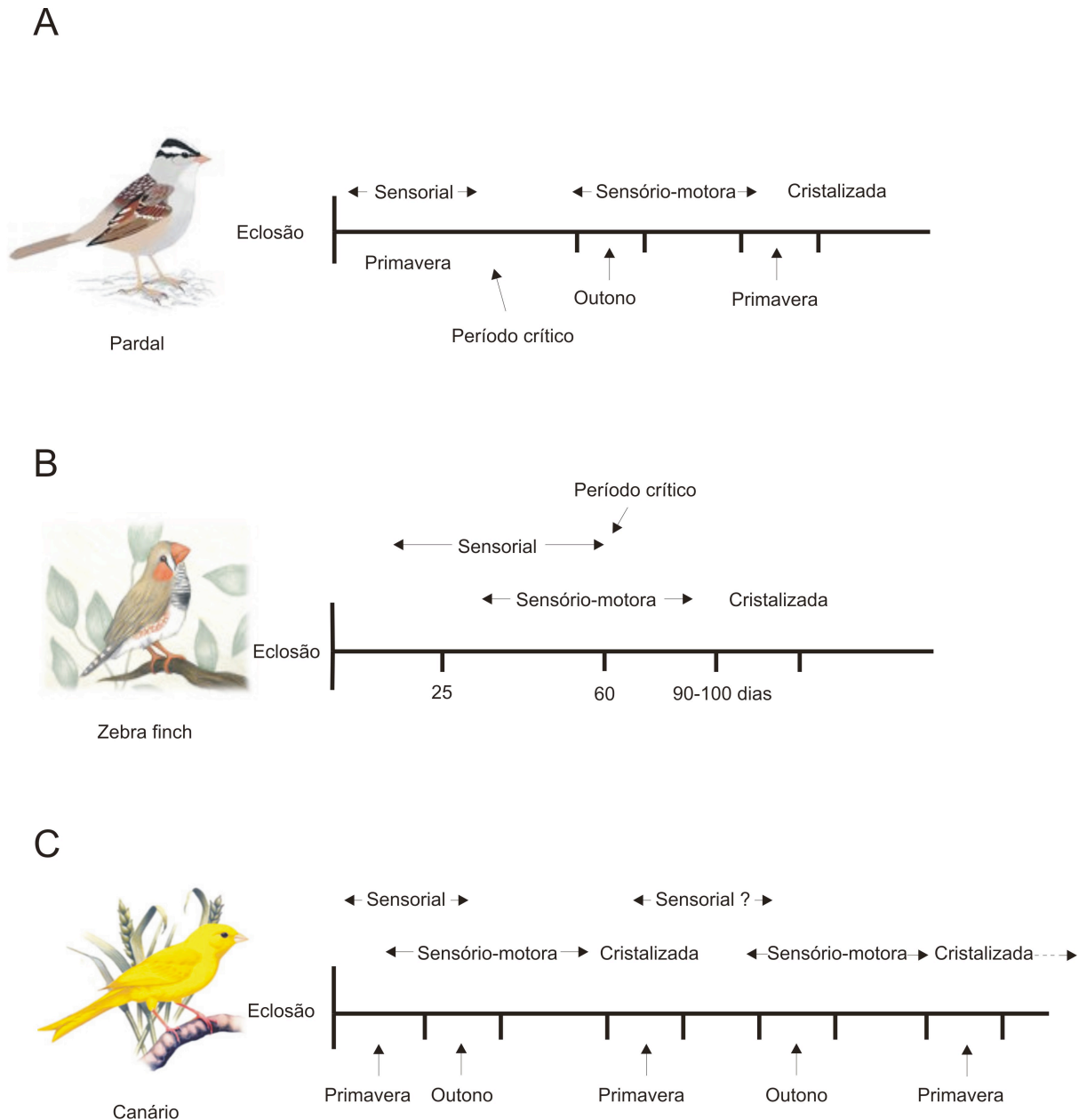


Figura 2. Fases e estágios do desenvolvimento do canto. (A) Pardais, tipicamente, apresentam duas fases bem definidas, sensorial e sensório-motora, que levam à cristalização do canto; para esses pássaros o período crítico determina o fim da fase sensorial. (B) Em *zebra finches*; as fases sensorial e 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; o canto se cristaliza durante a primavera, período reprodutivo. Figura da própria autora, 2011.

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 (análogo à laringe humana). A sua localização anatômica varia entre os diferentes grupos de aves, podendo estar localizada na traquéia ou em um dos brônquios primários. O tipo mais comum de siringe situa-se na junção da traquéia com os brônquios primários e é formada por duas metades simétricas (Figura 3). Ela também está presente em muitos pássaros não-canoros, contudo é mais bem desenvolvida nos aves canoras oscines (RODERICK e ZOLLINGER, 2008). A estrutura interna da siringe responsável pela produção do som é a membrana timpaniforme interna. Diferentemente dos humanos, o ar utilizado na produção do canto, nas aves, não provem dos pulmões e sim, dos sacos aéreos, os quais expõem o ar no interior dos brônquios ao serem comprimidos por músculos. Este ar, por sua vez, faz a membrana timpaniforme vibrar, gerando o som (CATCHPOLE e SLATER, 2008).

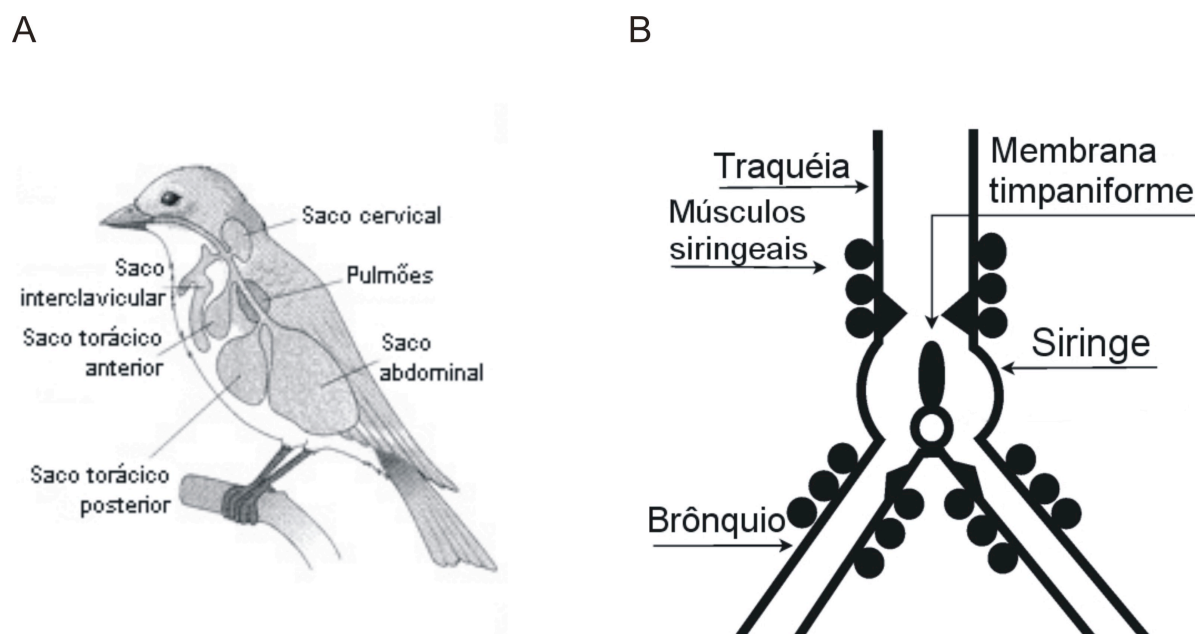


Figura 3. Estruturas para coordenação do canto com a respiração em aves. (A) o ar utilizado para produção do canto é originado do sistema de sacos aéreos. (B) O órgão vocal das aves, siringe, apresenta duas metades simétricas. As estruturas que, de fato, produzem o som são as membranas timpaniformes. Figura da própria autora, 2011.

1.2 ESTRUTURAS NEURAI ENVOVIDAS NO CANTO

De acordo com Reiner e colaboradores (2004) e Shimizu (2009), todos os vertebrados possuem a mesma organização telencefálica, que consiste de um pálido e glândlios da base. A Figura 4 demonstra a divisão do encéfalo das aves.

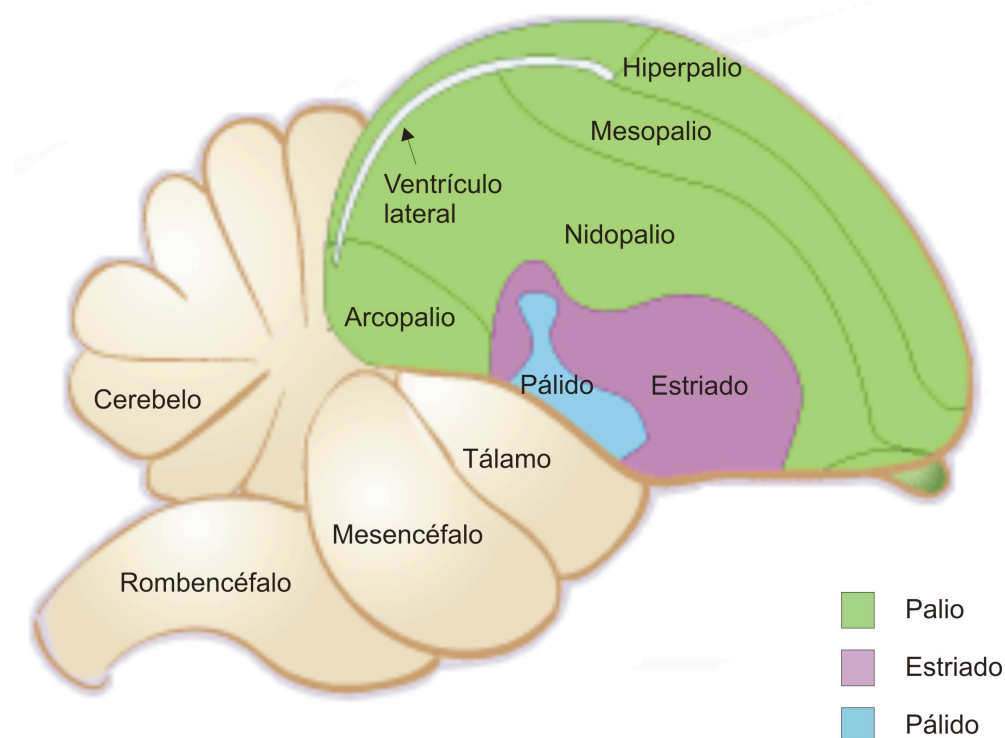


Figura 4. Representação esquemática do encéfalo de ave seguindo a nova nomenclatura proposta por Reiner e colaboradores (2004). Nas aves, o ventrículo lateral está localizado na porção dorsal do pálido, enquanto que nos mamíferos, grande parte desse ventrículo está situado próximo à borda que divide o pálido do subpálido. Figura da própria autora, 2011.

O sistema do canto consiste em um conjunto de estruturas neurais interconectadas e que estão envolvidas na produção e aprendizagem do canto. Até onde se sabe, essas estruturas são encontradas apenas em pássaros que aprendem a cantar e que necessitam do *feedback* auditivo para a correta produção do canto (CAREW, 2000; NOTTEBOHM, 2005).

De modo simplificado, o sistema do canto é composto por dois circuitos distintos: via pré-motora e motora e via prosencefálica anterior (FIGURA 5) (KONISHI,

1985; BRENOWITZ *et al.*, 1997; CAREW, 2000; NOTTEBOHM, 2005; CLAYTON *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

A via pré-motora e motora é responsável pela produção do canto e é formada por três núcleos cerebrais maiores com representações bilaterais: núcleo centro vocal superior (HVC), núcleo robusto do arcopallio (RA) e a porção traqueosiringeal do núcleo do hipoglosso (nXII_{ts}), os núcleos motores deste último inervam a musculatura da siringe (FIGURA 5).

A via prosencefálica anterior está relacionada com a aprendizagem do canto e também é composta por três núcleos (bilaterais): área X; a porção medial do tálamo dorsolateral (DLM) e a porção lateral do núcleo magnocelular do nidopallio anterior (LMAN) (Figura 5).

Há ainda um terceiro circuito (não ilustrado), a via auditiva, responsável pelo processamento auditivo, importante para o reconhecimento do canto (PRATHER e MOONEY, 2004).

Nesta pesquisa será dada ênfase aos dois primeiros circuitos, pois seus núcleos são objetos de estudo deste trabalho.

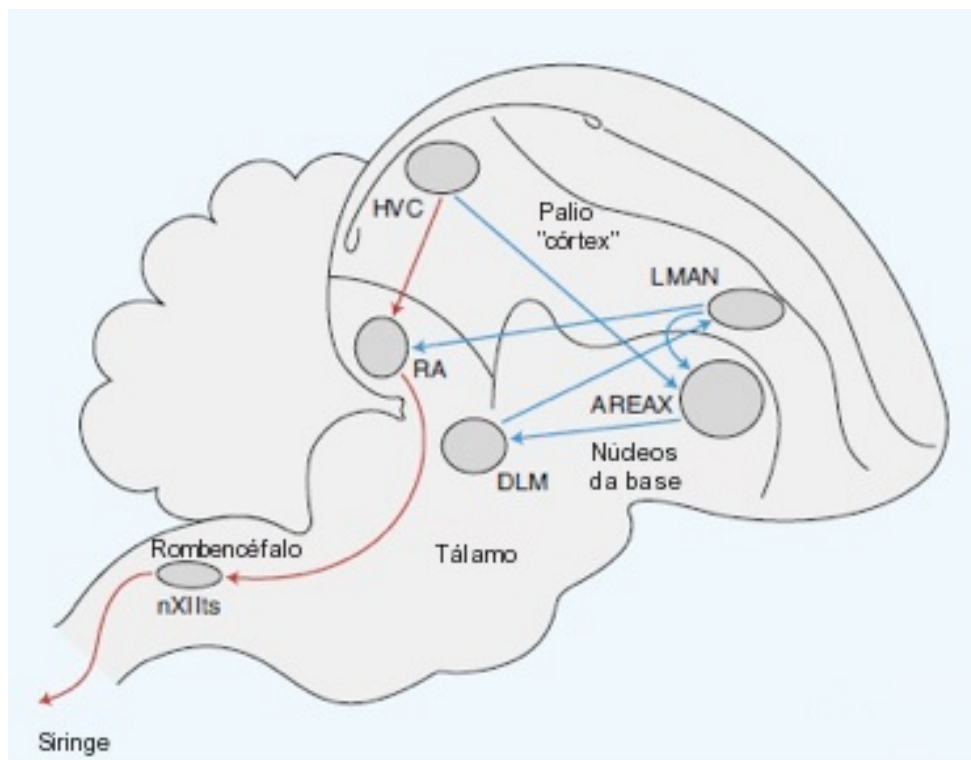


Figura 5: Desenho esquemático do sistema do canto das aves. Via de produção do canto (setas em vermelho) e via de aprendizagem vocal (setas em azul). Figura adaptada de Clayton *et al*, 2009.

A conclusão de que a via motora controla a produção do canto é apoiada pelo estudo de Nottebohm *et al* (1976), onde foram feitas lesões nos três núcleos participantes deste circuito (HVC, RA e nXIIts) e foi observado que essas lesões causavam deterioração do canto em pássaros adultos, ao passo que experimento controle onde lesões foram feitas em qualquer outro núcleo não alteravam o canto.

Como demonstrado na FIGURA 5, o HVC se projeta para o RA, o qual envia projeções para o nXIIts, 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 retroambiguo (RAm), na medula, responsável pela respiração, havendo assim, o perfeito sincronismo entre vocalização e respiração (BRENOWITZ *et al.*, 1997).

A via prosencefálica anterior, como mencionado acima, desempenha um papel fundamental na aprendizagem sensorial e no feedback auditivo. A área X recebe conexões do HVC e se projeta para o DLM, que por sua vez, se projeta para o LMAN, o qual envia conexões ao RA (KONISHI, 1985; BRENOWITZ *et al*, 1997; CAREW, 2000; NOTTEBOHM, 2005; CLAYTON *et al*, 2009; WANG *et al*, 2009).

Um dos trabalhos pioneiros a respeito da função da via prosencefálica anterior foi o desenvolvido por Sara Bottjer e colaboradores (1985), que descobriram que lesões no LMAN em *zebra finches* jovens alteravam, significativamente, o canto destes animais na fase adulta e que o tamanho deste núcleo era maior quando os animais estavam aprendendo a cantar, se comparado ao período em que o canto destes animais começava a se cristalizar; porém, se as mesmas lesões eram feitas no animal adulto, o seu canto não alterava de modo significativo. Através destes resultados, pode-se concluir que o LMAN é 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).

Estudos posteriores desenvolvidos por Constance Scharff e Fernando Nottebohm (1991) também mostraram que o LMAN, assim como a área X, são responsáveis por transmitir o feedback auditivo necessário para o aprendizado e que o LMAN é quem mantém a plasticidade no RA. Burt e colaboradores (2000), provaram que a via prosencefálica anterior contribui para a percepção dos estímulos acústicos específicos e heteroespecíficos, visto que, quando lesionavam o LMAN, os animais não eram capazes de discriminar nenhum dos estímulos sonoros testados.

1.3 PRESENÇA DE DIMORFISMO SEXUAL NAS ÁREAS NEURAIS QUE CONTROLAM O CANTO

Uma das espécies de aves canoras mais estudada e mais bem descrita na literatura é o *Taeniopygia guttata* (*zebra finch*). Este pássaro é nativo de regiões de clima temperado e somente os machos cantam. A esta diferença de

comportamento, quanto ao sexo, dá-se o nome de dimorfismo sexual (WILLIAMS, 1985; CAREW, 2000).

Este dimorfismo, também, pode ser identificado nas estruturas neurais que controlam canto. Vários estudos foram desenvolvidos em *zebra finches* e foi observado que vários núcleos do sistema do canto, como HVC, RA, nXIIIts, e LMAN são maiores, em volume, em machos do que em fêmeas. A maior diferença se dá no HVC, o qual é, aproximadamente, seis vezes maior em machos do que em fêmeas. Todos estes núcleos já podem ser identificados por microscopia óptica durante o desenvolvimento, aos 10 dias de idade. Em machos, o HVC, o RA e a área X começam a crescer durante a primeira semana pós-eclosão, enquanto que 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; NORDEEN e NORDEEN, 1988; NIXDORF-BERGWEILER, 1996).

1.3.1 Regulação dos núcleos cerebrais por hormônios esteróides

Os núcleos cerebrais relacionados ao canto possuem receptores que se ligam a hormônios esteróides ou a seus metabólitos. Esta ação hormonal não apenas regula a sazonalidade do canto, mas também parece contribuir com o processo de aprendizagem vocal (CAREW, 2000).

Os receptores de hormônios esteróides do cérebro de aves são os seguintes: receptores andrógenos, receptores estrógenos e receptores de progesterona. Os receptores andrógenos (AR) estão presentes nas seguintes áreas de controle do canto: HVC, RA, LMAN e nXIIIts. Os pássaros canoros contêm receptores estrógenos (ER) no HVC e RA. Quanto aos receptores de progesterona (PR), estes não são expressos nas áreas telencefálicas responsáveis pelo controle do canto. 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, ao ser tratada com testosterona, passou a cantar e seus núcleos se tornaram maiores se comparados com os das fêmeas não tratadas, provando que há mecanismos hormonais envolvidos na produção do canto.

1.4 A ESPÉCIE *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS* NO CONTEXTO DESTA INVESTIGAÇÃO

A espécie *Uraeginthus cyanocephalus* (ordem Passeriformes, subordem Oscines, família Estrildidae), popularmente conhecido como *Blue-capped Cordon Bleu* (Figura 6), é uma espécie nativa das regiões áridas e semi-áridas do leste da África. São pequenos, sexualmente dimórficos e socialmente monogâmicos. São, ainda, reprodutores oportunistas e apenas defendem a área ao redor do ninho, mas não territórios (GOODWIN, 1982).



Figura 6. Foto de um *Uraeginthus cyanocephalus*. Figura extraída de <http://www.2littlefinch.com>.

Pertencem à mesma família do zebra finch (família Estrildidae), mas diferentemente do que ocorre nesta espécie, as fêmeas do *Blue-capped Cordon Bleu* cantam regularmente (IMMELMANN, 1968). Como outros estrildídeos, cordon bleus produzem o canto em dois contextos sociais diferentes: durante e como parte da cômte e fora do contexto de acasalamento, particularmente quando o par não está visível.

Até o momento, não foi desenvolvido nenhum estudo morfológico do sistema do canto desses animais, daí a importância que esta pesquisa terá para fornecer a base metodológica para estudos neuroanatômicos posteriores de aves tropicais, inclusive aquelas existentes na Região Amazônica. Além disso, o conhecimento morfológico de estrutura neurais relacionadas ao canto poderá nos fornecer um importante subsídio funcional para entender o porquê das fêmeas de muitas espécies de regiões tropicais cantarem.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivos Gerais

Estudar a organização morfológica do sistema do canto de pássaros machos e fêmeas da espécie *Uraeginthus cyanocephalus* em animais adultos e em diferentes fases do desenvolvimento pós-eclosão.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Delinear os núcleos prosencefálicos relacionados a produção (HVC, RA) e aprendizado (LMAN) do canto através de cortes histológicos corados pelo método de Nissl;

- Delinear os núcleos prosencefálicos relacionados a produção (HVC, RA) e aprendizado (LMAN) do canto através de cortes histológicos submetidos à hibridização *in situ* radioativa para marcação de receptores andrógenos (AR);
- Mensurar área e calcular volume dos núcleos HVC, RA e LMAN, em machos e fêmeas da espécie estudada no animal adulto;
- Mensurar o taxa de crescimento das área e volume dos núcleos HVC, RA e LMAN, em machos e fêmeas em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário, pelos dois métodos citados acima;
- Verificar se há diferença nas medidas de área e volume dos núcleos cerebrais estudados quanto a utilização do método de Nissl e da hibridização *in situ*;
- Averiguar a existência de dimorfismo sexual no cérebro da espécie estudada e em que fase do desenvolvimento pós-embrionário este dimorfismo começa a ocorrer;
- Comparar o desenvolvimento do sistema do canto, do ponto de vista morfológico, das fêmeas da espécie *Uraeginthus cyanocephalus* com as fêmeas de *zebra finch* (*Taeniopygia guttata*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Utilizamos um total de 29 pássaros da espécie *Uraeginthus cyanocephalus*, sendo dezessete machos (N=17) e doze fêmeas (N=12), para o mapeamento dos núcleos cerebrais, relacionados à produção do canto utilizando o método de Nissl e hibridização *in situ* para receptores andrógenos.

Todos os animais foram obtidos de fornecedores e permaneceram em gaiolas viveiro no aviário do Instituto Max-Planck de Ornitologia em Seewiesen, Alemanha. Ao longo do estudo, os animais foram alojados em pares e receberam água e comida *ad libitum*. As gaiolas, onde as aves foram mantidas obedeciam um padrão geral: metálicas, 70 cm de largura, 50 cm de comprimento e 50 cm de profundidade e eram equipadas com três poleiros de madeira. Os animais foram mantidos a 22 graus Celsius e com 50% de umidade relativa do ar, em um ciclo claro/escuro de 14/10 (claro de 07:00-21:00, horário central europeu). 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.

Para o estudo morfológico do cérebro em distintas fases do desenvolvimento, os pássaros foram distribuídos nos seguintes grupos de acordo com a idade, após a eclosão, conforme demonstrado no diagrama da Figura 7.

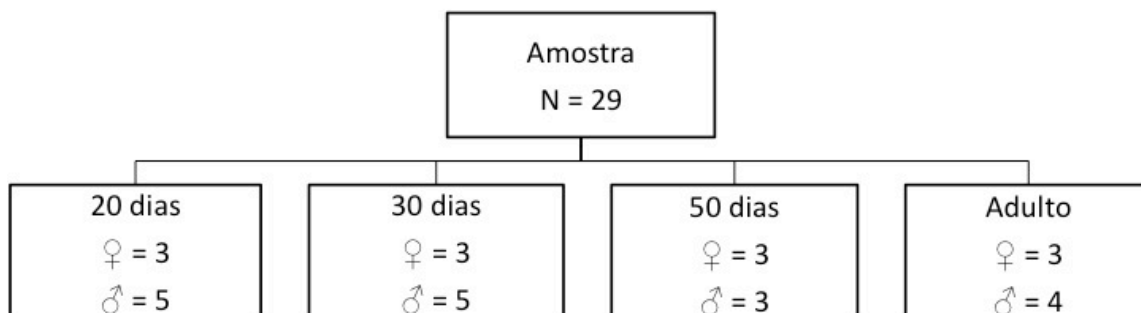


Figura 7. Organograma de distribuição dos animais em quatro grupos distintos de acordo com a fase do desenvolvimento. Figura da própria autora, 2011.

2.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO – REMOÇÃO DOS CÉREBROS

À medida que os animais atingiram as idades determinadas para o estudo de desenvolvimento das áreas neuroanatômica relacionadas ao canto, os mesmos foram submetidos ao procedimento experimental.

Iniciamos o procedimento experimental através da captura do animal e sua imediata extração dos cérebros. Nesta fase, utilizamos luvas decapitamos a ave e abrimos a caixa craniana 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 era exposto, rebatendo-se a pele do pescoço do animal.

Em seguida, com a ajuda de uma microtesoura, realizamos um corte no sentido fronto-caudal ao nível da linha média do cérebro, bem como, cortes ao redor do cérebro, a fim de remover a calota craniana superior.

Quando o encéfalo era exposto, de modo a não haver impedimento durante sua retirada, inseríamos uma pinça, na região posterior, até a base do crânio e, com movimentos de baixo para cima e em direção a porção anterior, o cérebro era descolado da caixa craniana, rompendo nervos. Após a remoção do cérebro, este era acondicionado em laminado de alumínio e devidamente identificado conforme protocolo padrão e finalmente era imediatamente congelado em gelo seco e armazenado em freezer com temperatura mantida constante a -80°C até o momento do uso.

Com o intuito de evitar, ao máximo, a alteração da estrutura morfológica do tecido, o procedimento de extração do cérebro era feito o mais rápido possível e durava em média 90 segundos.

2.3 SECÇÕES SAGITAIS

Os cérebros selecionados foram retirados do freezer e colocados no interior do criostato (JUNG CM 3000 LEICA) a temperatura de -15°C e ali permaneciam durante 30 minutos para descongelamento gradual.

Decorrido os 30 minutos, o hemisfério esquerdo do cérebro era embebido em um meio de inclusão (Tissue-Tek[®] O.C.T., Sakura Finetek, EUA), montado e congelado no próprio criostato. Em seguida, a temperatura do criostato era ajustada em -19°C e eram feitos cortes seriados do hemisfério direito à $20\mu\text{m}$.

Os cortes obedeceram sempre um procedimento padrão de orientação e eram sempre feitos de lateral para medial e terminavam ao nível da linha média. O hemisfério esquerdo era, novamente, armazenado em freezer para posterior uso, caso fosse necessário.

As secções eram coletadas em diferentes lâminas *Superfrost Plus* (Fisher Biotech, Orangeburg, NY), de modo a obter séries de secções adjacentes em cinco lâminas conforme o esquema demonstrado na Figura 8. A primeira lâmina de cada série era utilizada para coloração de Nissl com tionina 0,1%, ao passo que a segunda era destinada a detecção de receptores andrógenos por meio da hibridização *in situ*. Já as demais lâminas foram congeladas e armazenadas em freezer a -80°C para realização de outros procedimentos experimentais não incluídos nesta pesquisa.

Em média, obtinha-se quatro séries de cinco lâminas cada, totalizando 20 lâminas por hemisfério cerebral.

Nissl	AR			
• 1, 2	• 3,4	• 5,6	• 7, 8	• 9,10
• (...)	• (...)	• (...)	• (...)	• (...)
• 41, 42	• 43, 44	• 45, 46	• 47, 48	• 49, 50

Figura 8. Esquema de como os cortes seriados eram organizados. Cada série era composta de cinco lâminas e em cada lâmina coletava-se dez secções, totalizando 50 secções por série. A primeira lâmina de cada série era destinada à coloração de Nissl; a segunda à detecção de receptores andrógenos (AR) por meio de hibridização *in Situ*; e as demais foram armazenadas para posterior uso com outros tipos de marcações não incluídas nesta pesquisa. Figura da própria autora, 2011.

2.4 COLORAÇÃO DE NISSL

2.4.1 Protocolo de Coloração

Conforme explicado no item anterior, somente as primeiras lâminas de cada série eram mantidas em temperatura ambiente para a secagem das mesmas.

Em menos de cinco horas após a secagem, iniciava-se o processo de coloração, 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 entre lamínula com meio de montagem (Permount, Daigger, U.S.A.).

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

2.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* RADIOATIVA

2.5.1 Introdução à Técnica

Esta técnica foi descrita pela primeira vez em 1969 e tem sido utilizada para identificar, com precisão, ácidos nucleicos 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 nucleicos, se preservados adequadamente, podem ser detectados através do pareamento de nucleotídeos contidos em fitas complementares de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou de ácido ribonucleico (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, será realizado o pareamento RNA-RNA, visto que esta ligação apresenta alta estabilidade térmica, o que aumenta a especificidade, ou seja, aumenta a possibilidade de identificar apenas o RNA-alvo.

A identificação do RNA ou dos seus transcritos é feita por meio de sondas, onde é inserida a sequência de nucleotídeos de um RNA conhecido, o qual irá se ligar ao RNA-alvo. As sondas de RNA utilizadas na reação de ISH devem ser inicialmente marcadas com radioisótopos (ISH radioativa) como ^3H , ^{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 ³⁵S. Esta escolha foi baseada no fato de sondas radioativas poderem detectar níveis bem baixos de transcritos quando comparado 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 Frankl, C. frankl@orn.mpg.de).

O sucesso dessa reação depende do estabelecimento de critérios rigorosos relacionados à preservação do tecido, preparação de sonda e 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).

2.5.2 Protocolo

2.5.2.1 Marcação da Sonda de RNA

Primeiramente, colocávamos o marcador radioativo (^{35}S) e as soluções em temperatura ambiente e o descongelamento dos mesmos era efetuado em banho maria à 37°C. Então, acrescentava-se, a um eppendorf estéril, os seguintes componentes: 3,5 µl de DNA, 4,0 µl de TSC 5x, 2,0 µl de DTT 0,1 M, 4,0 µl de ATP 2,5 mM, 4,0 µl de GTP, 4,0 µl de UTP, 2,5 µl de rCTP 0,1 mM, 0,5 µl de RNasin, 0,5 µl de polymerase, 3,0 µl ^{35}S -CTP.

O tipo de polimerase adicionada dependia da enzima de restrição utilizada para confeccionar a sonda de RNA. Caso tenha sido utilizada EcoRI ou XhoI, adicionava-se a polimerase SP6. No entanto, se tiver sido usada a HindIII ou NsiI, a polimerase inserida era a T7.

Assim que todos os componentes eram adicionados ao eppendorf, este era rapidamente centrifugado (10 segundos) e aquecido, durante 90 minutos, em banho maria de 37°C.

Passados os 90 minutos, retirava-se o eppendorf do banho maria e adicionava-se 1,0 µl de DNase I à mistura, que era mais uma vez centrifugada (10 segundos) e deixada em banho maria (37°C) por mais 15 minutos.

Decorridos os 15 minutos, adicionávamos à solução 1,0 µl de t-RNA-yeast, 7,5 µl de acetato de amônia 10M e 70,0 µl de etanol absoluto. Então, o eppendorf era armazenado à -20°C durante 30 minutos.

Após este passo, a mistura era centrifugada durante 15 minutos a velocidade de 13000 rpm. Feito isto, o precipitado era separado do líquido e descartava-se este último. Então, era adicionado 900 µl de etanol 70% ao eppendorf, que era centrifugado por 5 minutos com a mesma velocidade (13000

rpm). E mais uma vez, separava-se o precipitado do líquido. Então, a tampa do eppendorf era deixada aberta para que o precipitado pudesse secar. Este processo tinha duração de 30 minutos.

Depois de seco, adicionava-se ao precipitado 20 µl de DTT 0,1M. A mistura era centrifugada por 10 segundos e a sonda de RNA marcada radioativamente era guardada em freezer a temperatura de -20°C.

Toda vez em que a sonda de RNA era utilizada, necessitava-se medir o grau de radioatividade da mistura. Para tal, adicionava-se 10ml de líquido de *Szintilation* ao frasco de *Szintilation*. O eppendorf com a sonda era trazido para temperatura ambiente e centrifugado durante 10 segundos. Posteriormente, adicionava-se 10µl de sonda de RNA ao frasco de cintilação. Este frasco era levado ao Vortex para centrifugação e com o medidor de radioatividade mediu-se o grau de radioatividade do frasco. A mistura devia ter entre 1 e 3 Mio. cpm para que a sonda de RNA estivesse adequada para uso.

2.5.2.2 Preparação do Mix de Hibridização

Para o preparo deste mix, misturava-se 500 µl de tampão de hibridização 2x, 500 µl de formamida (Sigma F-7503), 10 µl de SDS 10%, 10 µl de sulfato de sódio, 25 µl de DTT 4M, montante de sonda marcada radioativamente necessário para o total de lâminas que seriam submetidas a hibridização. Centrifugava-se a mistura por 10 segundos e a mesma era armazenada em freezer à temperatura de -20°C.

2.5.2.3 Hibridização

O processo de hibridização tinha duração de dois dias. No primeiro dia, as secções destinadas à hibridização eram retiradas do freezer e levadas a uma câmara de U.V. para secagem.

Depois de secas, as lâminas passavam 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 eram dispostas em uma bandeja para secagem durante 30 minutos. Enquanto as lâminas secavam, o frasco com o mix de hibridização era retirado do freezer e aquecido em água fervente por 10 minutos para a desnaturação do mesmo. Após, colocava-se 50 µl do mix de hibridização em cada uma das lâminas e as cobria com lamínulas. Terminado este processo, as lâminas eram incubadas *overnight* a temperatura de 55°C.

No segundo dia, removíamos as lâminas da estufa de hibridização, e as mesmas passavam 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 eram, então, dispostas em uma bandeja para secagem até o processo de auto-radiografia.

2.5.2.4 Auto-radiografia

Depois de secas, as lâminas foram arrumadas em estojos de auto-radiografia, onde são postos 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 dos filmes, estes 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. Depois foram pendurados para secagem.

2.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS NÚCLEOS CEREBRAIS

Escolhemos dois núcleos para análise morfológica detalhada: núcleo centro vocal superior (HVC), núcleo robusto do arcopallio (RA).

2.6.1 Quantificação da Área e Volume dos Núcleos Cerebrais nos Cortes Corados com Nissl

Os cortes sagitais de córtex corados com Nissl foram analisados por meio de microscopia óptica convencional com o auxílio de um microscópio binocular (LEICA DM6000; OLYMPUS BX-41; Leitz Ortoplan) acoplados a uma câmera de vídeo e ou câmera fotográfica digital EVOLT 330 (OLYMPUS).

A medida que os núcleos HVC e RA foram localizados, utilizando-se objetiva de 10x, estes eram 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, no momento em que estes são delimitados com o auxílio de uma ferramenta chamada “built-in”. Uma vez que possuíamos estruturas tridimensionais para serem mensuradas, foi essencial obtermos medidas das áreas de cada núcleo desde a secção em que o HVC e/ou RA começam a aparecer até a última secção em que eles deixam de aparecer.

Para o cálculo da área total bastou realizar uma somatória de todas as medidas de área obtidas.

O volume nuclear total foi, posteriormente, definido como a área total multiplicada pela espessura do corte e pelo intervalo entre cortes obtidos:

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

Vale ressaltar que a espessura utilizada em todos os cortes foi de 20 μm e que o intervalo entre uma secção de Nissl e a próxima é de 10 amostras (Ver Figura 02). Sendo assim, o cálculo foi feito como é demonstrado no exemplo abaixo:

Ex.: VOLUME TOTAL = área total do núcleo (μm^2) x 20 μm x 10

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

Após a revelação dos filmes auto-radiográficos, 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, obteve-se a área de todos os núcleos reagiram positivamente aos receptores andrógenos.

Os cálculos de área total e volume dos núcleos HVC e RA foram realizados conforme foi descrito anteriormente no procedimento de Nissl (ver item 2.6.1).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram digitados e tabulados em banco de dados e análise estatística. O banco de dados foi construído no *Microsoft EXCEL 2008 for MAC*. Para a análise morfológica, quando pertinente, realizou-se 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. Para detectar qualquer diferença durante o desenvolvimento utilizamos a análise de variância (teste ANOVA), utilizando nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Para identificar qualquer diferença, relacionada ao sexo (dimorfismo sexual), nas área cerebrais estudadas foi aplicado o teste T de *Student* não pareado, utilizando nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Os nossos resultados foram obtidos de 22 experimentos divididos nas duas 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). Nos animais mais jovens, onde os núcleos ainda não estão completamente formados, utilizamos padrões descritos na literatura para a identificação de cada um dos núcleos.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS RELACIONADOS AO CANTO

No material submetido à coloração de Nissl, os núcleos robusto do arcopallio (RA) e centro vocal superior (HVC) foram claramente delineados tanto em machos quanto em fêmeas, distinguindo-se a área dos núcleos relacionados ao canto do tecido circunjacente; todavia, não foi possível definir com precisão os limites do núcleo magnocelular lateral do nidopallio anterior (LMAN), ou muitas vezes, este núcleo foi indetectável por esta técnica.

Diferentemente da técnica de Nissl, todos os núcleos, RA, HVC e LMAN foram detectados nas secções submetidas à hibridização *in situ* radioativa em ambos os sexos e em todas as idades estudadas.

3.1.1 Identificação do Núcleo Robusto do Arcopallio (RA)

Através do método de Nissl, verificamos que o córtex desses animais apresenta um padrão de coloração regular e que as células dos núcleos RA apresentam organização, notadamente, distinta das demais zonas do córtex (Figuras 9 e 10). A Figura 11 ilustra uma fotomicrografia, em grande aumento, da

região de transição entre a área do RA 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 RA no animal adulto.

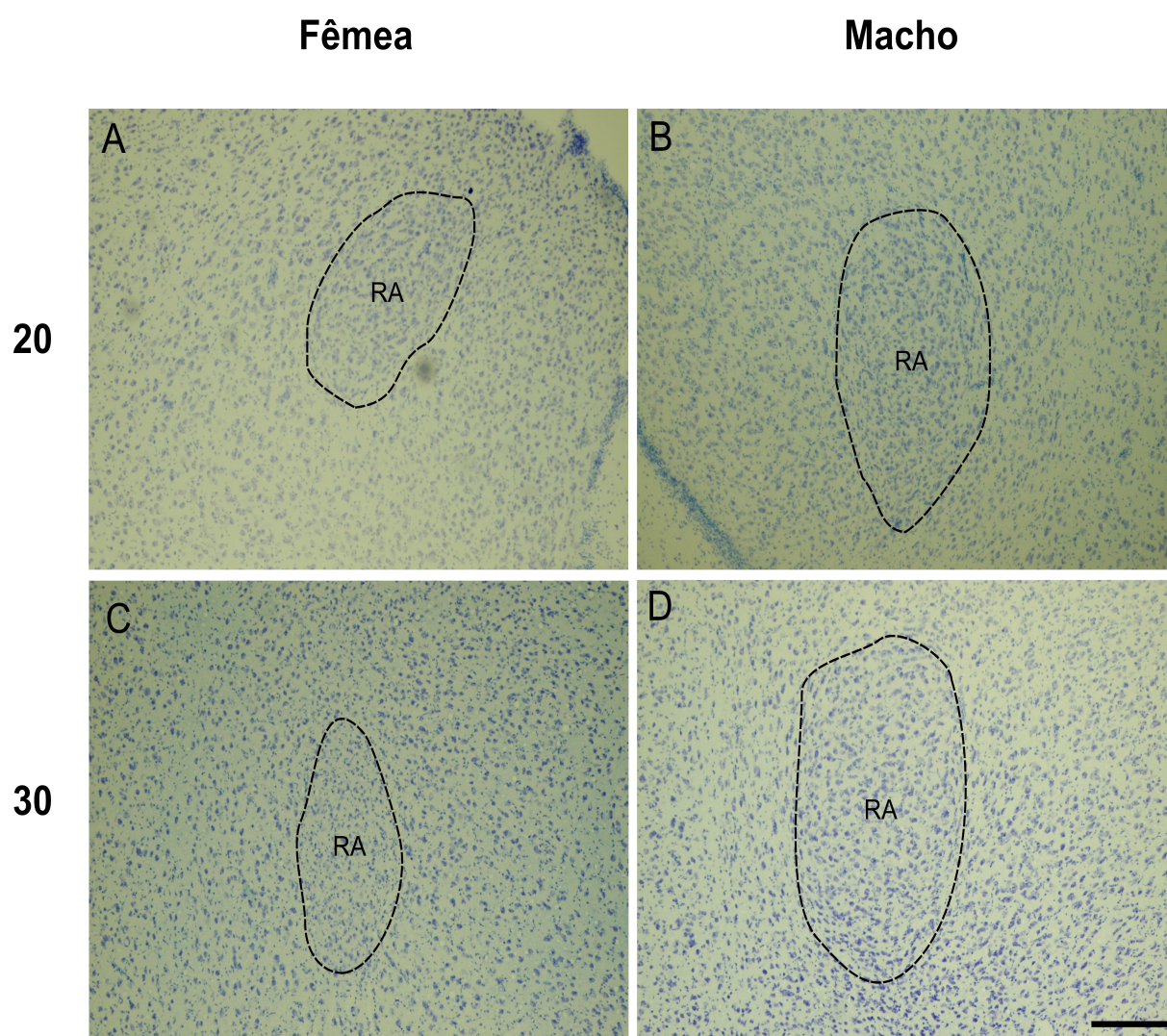


Figura 9. Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo robusto do arcopálio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* fêmeas nas idades de 20, 30 dias (A, C, respectivamente); e de *Uraeginthus cyanocephalus* machos nas idades de 20, 30 dias (B, D, respectivamente). O RA foi claramente identificado (linhas pontilhadas) em cada idade estudada e em ambos os sexos. Escala=200 μ m.

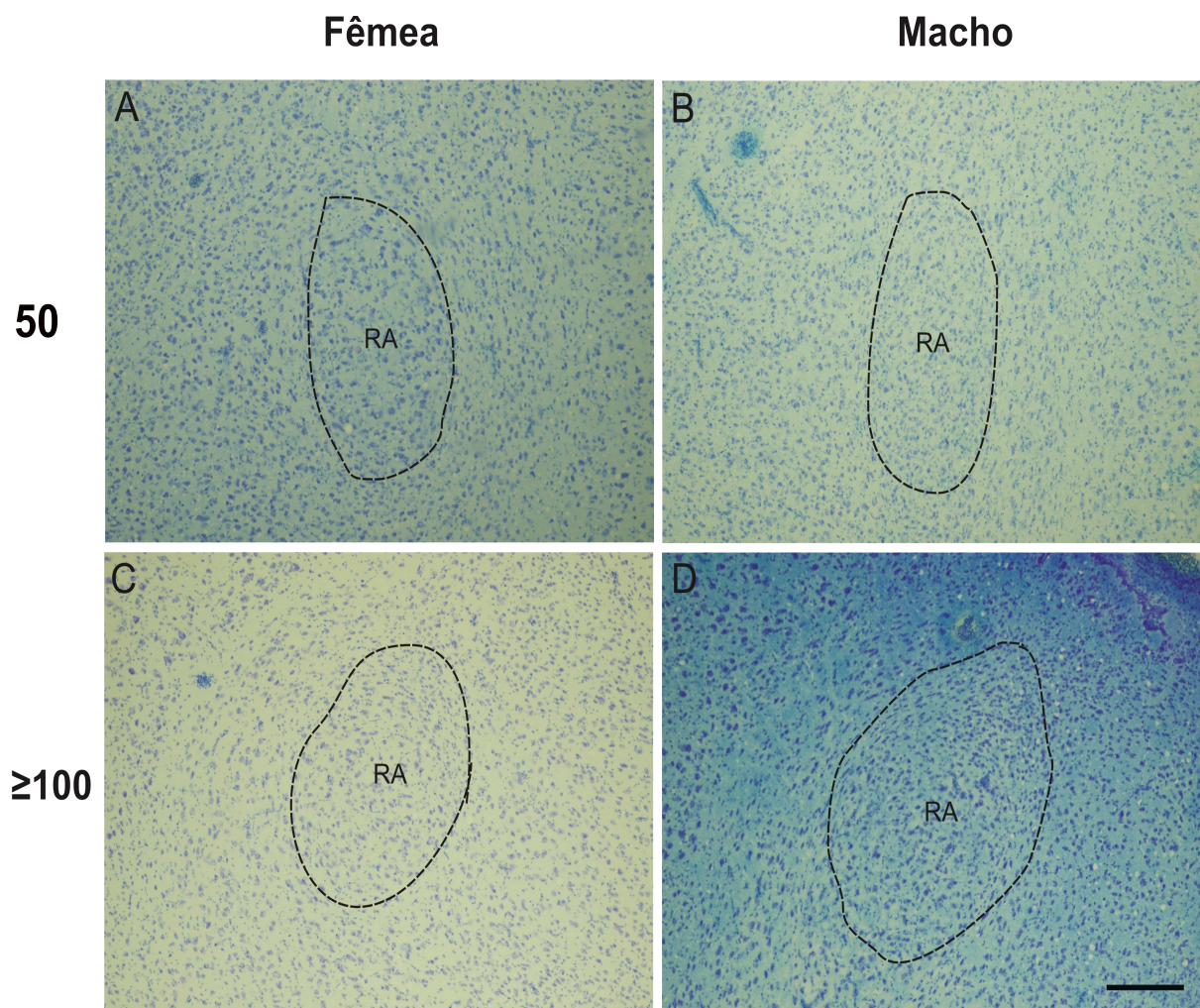


Figura 10. Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo robusto do arcopallio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* fêmeas nas idades de 50 dias e adultos (≥ 100) (A, C, respectivamente); e de *Uraeginthus cyanocephalus* machos nas idades de 50 dias e adultos (≥ 100) (B, D, respectivamente). O RA foi claramente identificado (linhas pontilhadas) em cada idade estudada e em ambos os sexos. Escala=200 μm .

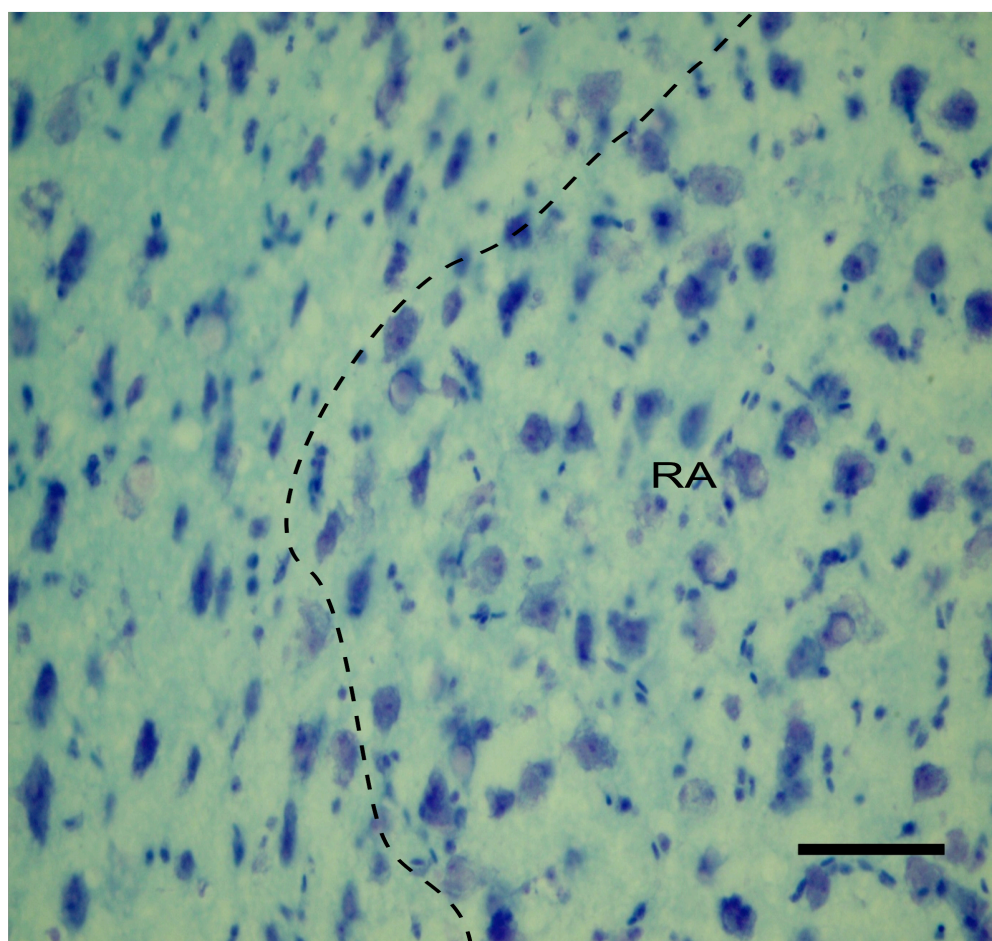


Figura 11. Fotomicrografia de um corte sagital, corado pelo método de Nissl e em grande aumento (40x), da área de transição entre o núcleo robusto do arcopalio (RA) e o tecido adjacente de um *Uraeginthus cyanocephalus* macho adulto. Escala=50 μ m.

Foram feitas análises dos cortes histológicos corados pelo método de Nissl e a mensuração do volume do RA de cada animal. O sexo, idade e os valores individuais do volume de RA obtidos estão resumidos na Tabela 1.

TABELA 1. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arcopalio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	Machos	Fêmeas
	RA (mm ³)	RA (mm ³)
20	0,0883	0,0766
	0,1064	0,0579
	0,0536	0,0857
	0,1154	-
	0,0931	-
30	0,1525	0,0734
	0,209	0,0785
	0,1661	0,0684
	0,1118	-
	0,058	-
50	0,086	0,0877
	0,1187	0,059
	0,1709	0,0768
≥ 100	0,289	0,1331
	0,1825	0,0502
	0,1204	0,1483
	0,2314	-

A Tabela 2 ilustra os valores representativos médios de volume do núcleo RA e seus desvios padrões, em cada fase do desenvolvimento.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo robusto do arcopálio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	Macho			Fêmea		
	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão
20	5	0,0910	0,0240	3	0,0734	0,0142
30	5	0,1395	0,0573	3	0,0734	0,0050
50	3	0,1252	0,0428	3	0,0745	0,0144
≥ 100	4	0,2058	0,0717	3	0,1105	0,0528

Analisando a Tabela 2 verificamos que o núcleo robusto do arquiestriado (RA) de *blue capped cordon bleus* machos apresentou um crescimento proporcional a idade, porém lento até a idade de 50 dias, quando passou a se desenvolver de modo mais acentuado, tendo um crescimento de 64,4% (de 0,1252 mm³ aos 50 dias para 0,2058 mm³ na fase adulta). Por outro lado, o volume do RA das fêmeas se manteve praticamente inalterado até a idade de 50 dias; a partir de então, o volume de RA aumentou em 48,3% (de 0,0745 mm³ aos 50 dias para 0,1105 mm³ na fase adulta). Quando comparamos o volume de RA de machos e fêmeas, observamos que o RA dos machos foi maior que o das fêmeas em todas as idades estudadas. A razão entre os volumes do RA fêmea e macho foi de 0.54 na idade adulta.

Aplicando o teste ANOVA ($p < 0,05$) constatamos que, em machos, o desenvolvimento volumétrico de RA é contínuo e proporcional à idade e que o crescimento deste núcleo dos 20 primeiros dias pós-eclosão até a idade adulta foi estatisticamente significativo ($p = 0,03$), tendo um crescimento de 125,5% (de 0,0910 mm³ para 0,2058 mm³ entre 20 e ≥ 100 dias). Já nas fêmeas, o volume de RA teve um aumento entre 50 dias e a idade adulta, contudo este aumento não foi significativo (Figura 12).

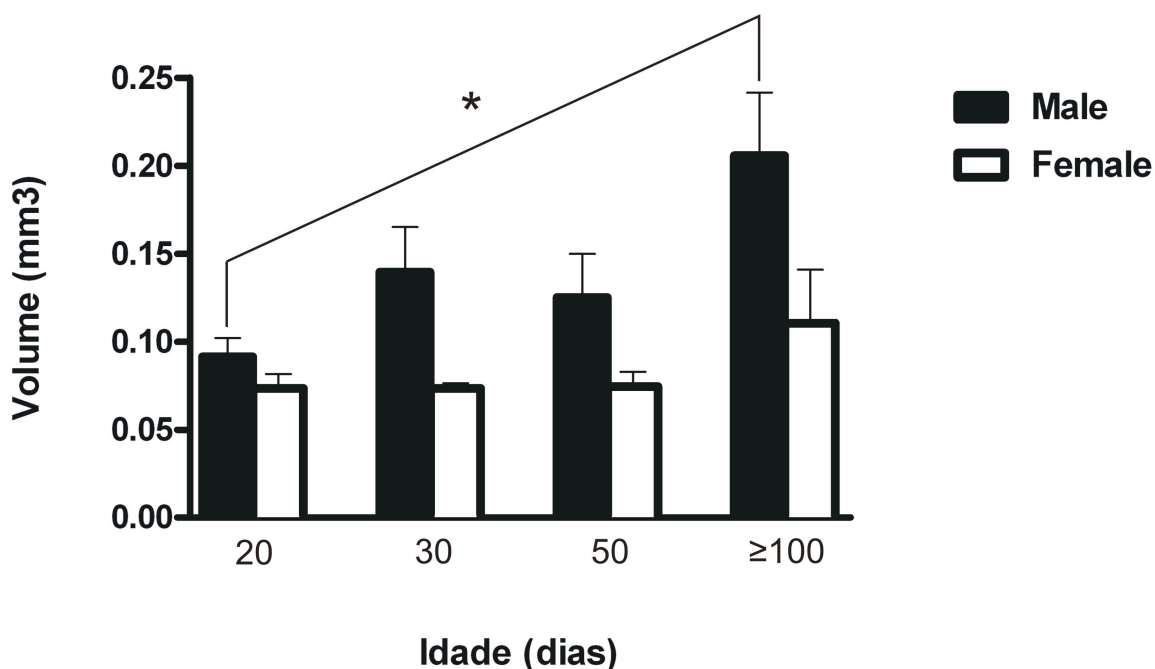


Figura 12. Representação diagramática da alteração volumétrica do núcleo robusto do arcopallio (RA) de *blue capped cordon bleus* (*Uraeginthus cyanocephalus*) ao longo do desenvolvimento (valores médios \pm erro padrão) utilizando a técnica de Nissl.

Quando comparamos os volumes de RA entre machos e fêmeas, verificamos que, apesar do RA de machos ser maior que o das fêmeas em todas as idades estudadas, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,1429$ aos 20 dias; $p=0,0509$ aos 30 dias; $p=0,062$ aos 50 dias; $p=0,0561$ na fase adulta). Esses achados nos levam à suposição de que, pelo menos nesse animal, o núcleo RA não apresentou um comportamento sexualmente dimórfico.

Através da técnica de hibridização *in situ* radiotiva para receptores andrógenos, confirmamos que o núcleo robusto do arquiestriado (RA) é sítio deste receptor hormonal, tanto em machos quanto em fêmeas de *blue capped cordon bleus* (Figura 13).

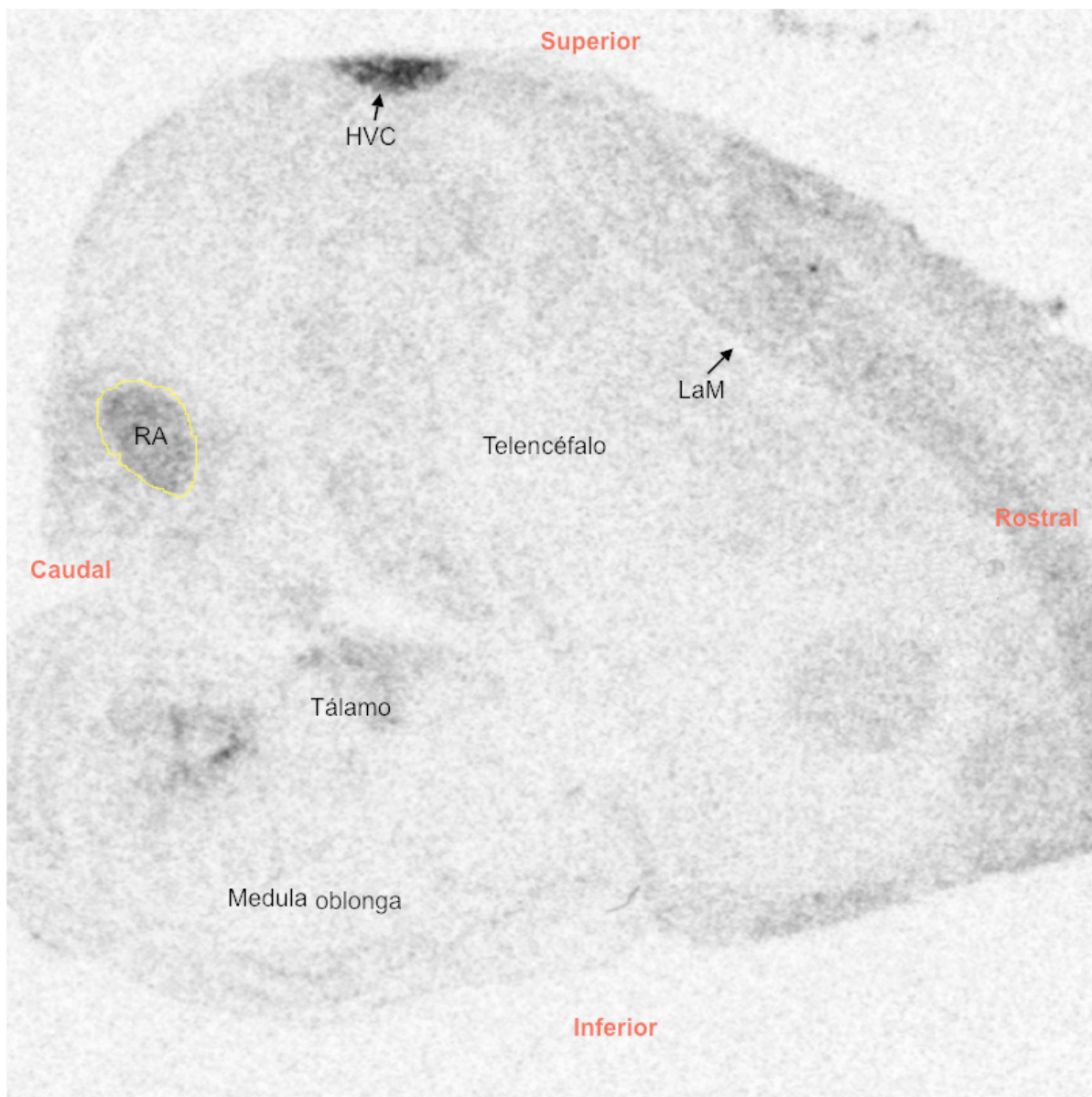


Figura 13. Auto-radiografia de um corte mais lateral do encéfalo de um *Uraeginthus cyanocephalus* macho de 50 dias que foi submetido à hibridização *in situ* radioativa para marcação de receptores andrógenos. O núcleo robusto do arcopálio (área escura delimitada de amarelo) foi marcado pela técnica. Abreviações: HVC=núcleo centro vocal superior ; LaM=lâmnia do mesopálio.

Também foram feitas análises dos cortes histológicos submetidos à hibridização *in situ* radiotiva e a mensuração do volume do RA de cada animal. No entanto, por razões que ainda estão sendo investigadas, não foi possível obtermos os dados de todos os animais estudados. O sexo, idade e os valores individuais do volume de RA obtidos estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arcopalio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à hibridização *in situ* radioativa.

Idade (dias)	Machos RA (mm ³)	Fêmeas RA (mm ³)
20	0,1496	0,3242
30	0,1504	-
50	0,3244 0,2536	0,1142 -
≥ 100	-	-

Com base nos dados preliminares da hibridização *in situ* radioativa, pudemos notar que o crescimento de RA, em machos, foi proporcional à idade; em contrapartida, nas fêmeas o RA pareceu decrescer com a idade. Ao compararmos o volume de RA de machos e fêmeas, aos 20 dias de idade, este volume foi 116,7% maior nas fêmeas do que o dos machos, mas a partir daí o RA das fêmeas passou a decrescer, enquanto que o dos machos cresceu; e aos 50 dias pós-eclosão, o RA dos machos foi até 153% maior do que o das fêmeas.

Quando confrontamos os resultados preliminares da hibridização *in situ* radioativa com os obtidos das amostras coradas com Nissl, notamos que as medidas volumétricas de RA do material submetido à hibridização é sempre superior às medidas conseguidas pelo método de Nissl, tanto em machos quanto em fêmeas. Além disso, o fato do crescimento volumétrico de RA ter sido proporcional à idade, em *blue capped cordon bleu* machos, corroborou os dados obtidos pelo método de Nissl; por outro lado, a possível regressão volumétrica de RA observada, nas fêmeas até a idade de 50 dias, contradisse os dados oriundos das secções coradas com Nissl, onde não houve crescimento ou regressão do volume de RA dos 20 aos 50 dias de idade pós-eclosão.

3.1.2 Identificação do Núcleo Centro Vocal Superior (HVC)

Pelo método de Nissl, observamos que o córtex desses animais apresenta um padrão de coloração regular e que as células do núcleo HVC são maiores e mais intensamente coradas que as células localizadas no exterior deste núcleo, sendo portanto, possível distingui-lo das demais zonas do córtex (Figuras 14 e 15). A Figura 16 ilustra uma fotomicrografia, em grande aumento, da região de transição entre o núcleo HVC e a área adjacente no animal adulto.

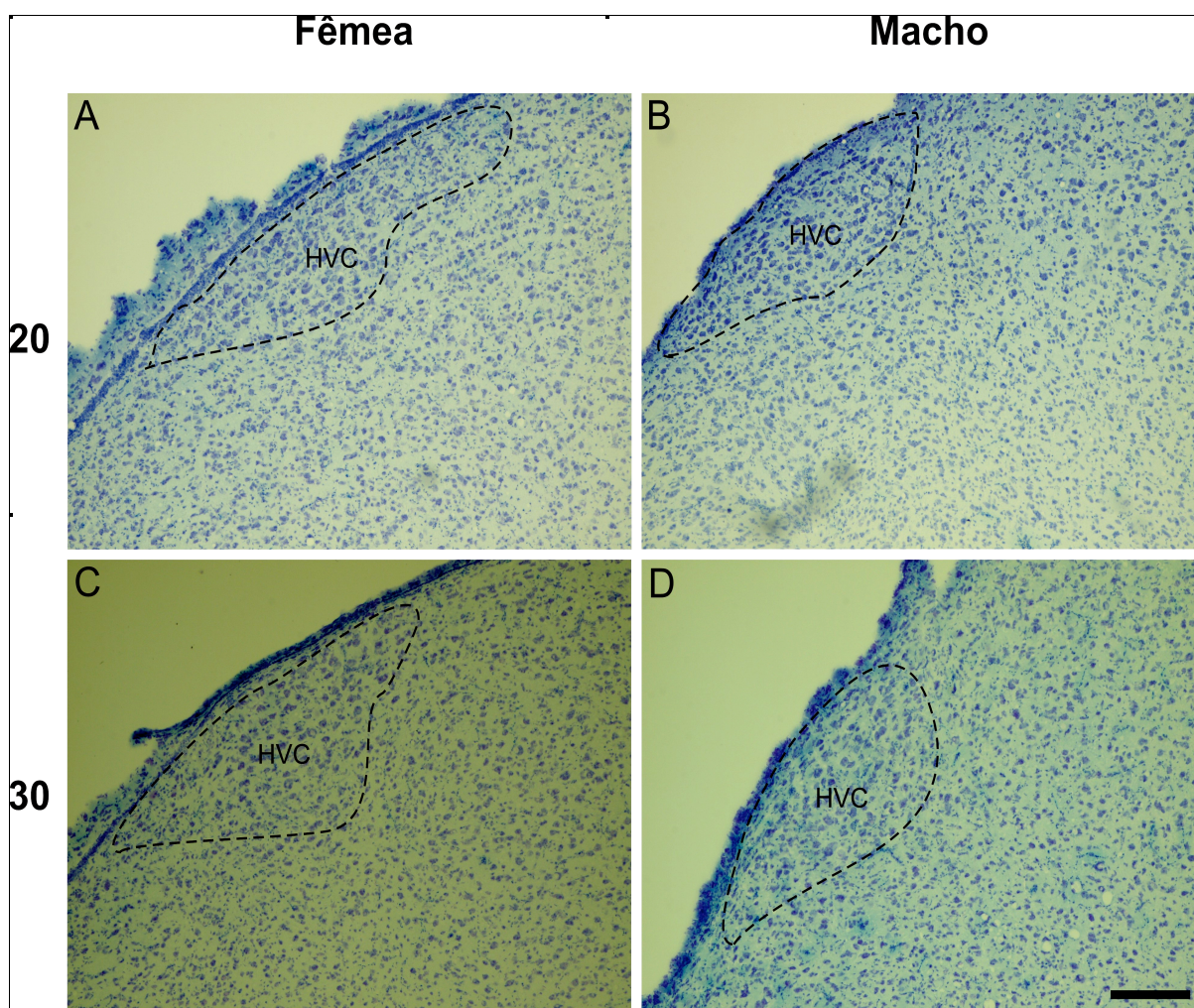


Figura 14. Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* fêmeas nas idades de 20, 30 dias (A, C, respectivamente); e de *Uraeginthus cyanocephalus* machos nas idades de 20, 30 dias (B, D, respectivamente). O HVC foi claramente identificado (linhas pontilhadas) em cada idade estudada e em ambos os sexos. Escala=200 μ m.

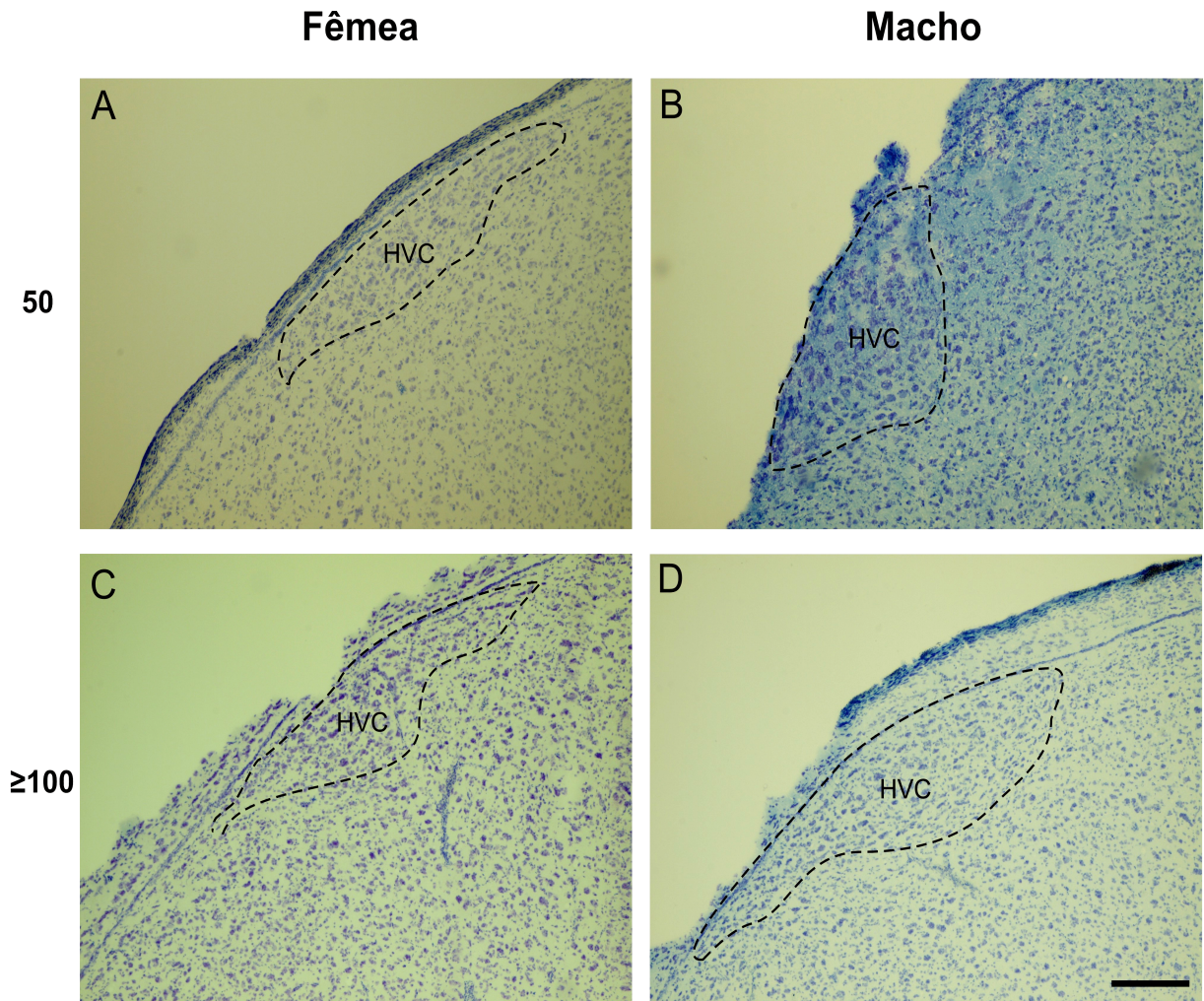


Figura 15. Cortes sagitais, corados pelo método de Nissl e em baixa magnificação, do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* fêmeas nas idades de 50 dias e adultos (≥ 100) (A, C, respectivamente); e de *Uraeginthus cyanocephalus* machos nas idades de 50 dias e adultos (≥ 100) (B, D, respectivamente). O HVC foi claramente identificado (linhas pontilhadas) em cada idade estudada e em ambos os sexos. Escala=200 μm .

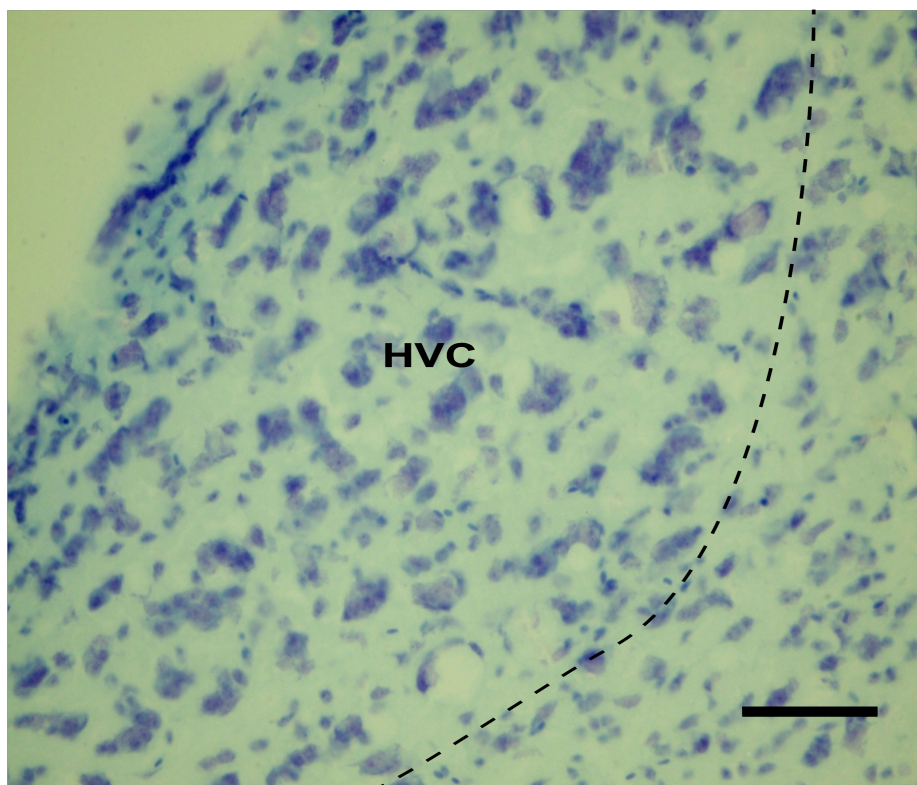


Figura 16. Fotomicrografia de um corte sagital, corado pelo método de Nissl e em grande aumento (40x), da área de transição entre o núcleo centro vocal superior (HVC) e o tecido adjacente de um *Uraeginthus cyanocephalus* macho adulto. Escala=50 μ m.

Análises dos cortes histológicos corados pelo método de Nissl, bem como medidas de volume do HVC de cada animal foram realizadas. O sexo, idade e os valores individuais do volume de HVC obtidos estão sintetizados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	Machos	Fêmeas
	HVC (mm ³)	HVC (mm ³)
20	0,136	0,0806
	0,146	0,0536
	0,0808	0,0912
	0,2109	-
	0,1882	-
30	0,1538	0,1326
	0,114	0,1416
	0,11	0,0628
	0,0962	-
	0,1398	-
50	0,1989	0,1432
	0,115	0,1152
	0,14	0,1418
≥ 100	0,152	0,0766
	0,1356	0,0654
	0,2254	0,08246
	0,1624	-

A Tabela 5 demonstra os valores representativos médios de volume do núcleo centro vocal superior e seus desvios padrões, em cada etapa do desenvolvimento estudada.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	Macho			Fêmea		
	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão
20	5	0,1520	0,050	3	0,0751	0,0194
30	5	0,1228	0,0234	3	0,1123	0,0431
50	3	0,1513	0,0431	3	0,1334	0,0158
≥ 100	4	0,1688	0,0393	3	0,0748	0,0087

Com base na análise da Tabela 5, vimos que o HVC de *blue capped cordon bleus* machos decresceu dos 20 para os 30 dias, voltando a atingir volume semelhante ao dos 20 dias na idade de 50 dias pós-eclosão. A partir daí continua a crescer até a idade adulta, porém de modo discreto (11,6% de aumento volumétrico; de 0,1513 mm³ aos 50 dias para 0,1688 mm³ na fase adulta). Em contrapartida, o volume de HVC das fêmeas teve um crescimento contínuo até a idade de 50 dias. Este crescimento foi de 77,6% (de 0,0751 mm³ aos 20 dias para 0,1334 mm³ aos 50 dias). Dos 50 dias até a idade adulta, o HVC das fêmeas regrediu e seu volume passou a ser, praticamente, o mesmo do encontrado aos 20 dias pós-eclosão. Quando comparamos o volume de HVC de machos e fêmea, observamos que o HVC dos machos foi sempre superior ao das fêmeas, não importando a idade.

Ao aplicar o teste ANOVA ($p < 0,05$) verificamos que, em machos, tanto a regressão inicial, quanto o posterior crescimento contínuo de HVC até a idade adulta não foram estatisticamente significativos. Também não achamos significância estatística em nenhuma das alterações volumétricas de HVC observadas nas fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus* (Figura 17).

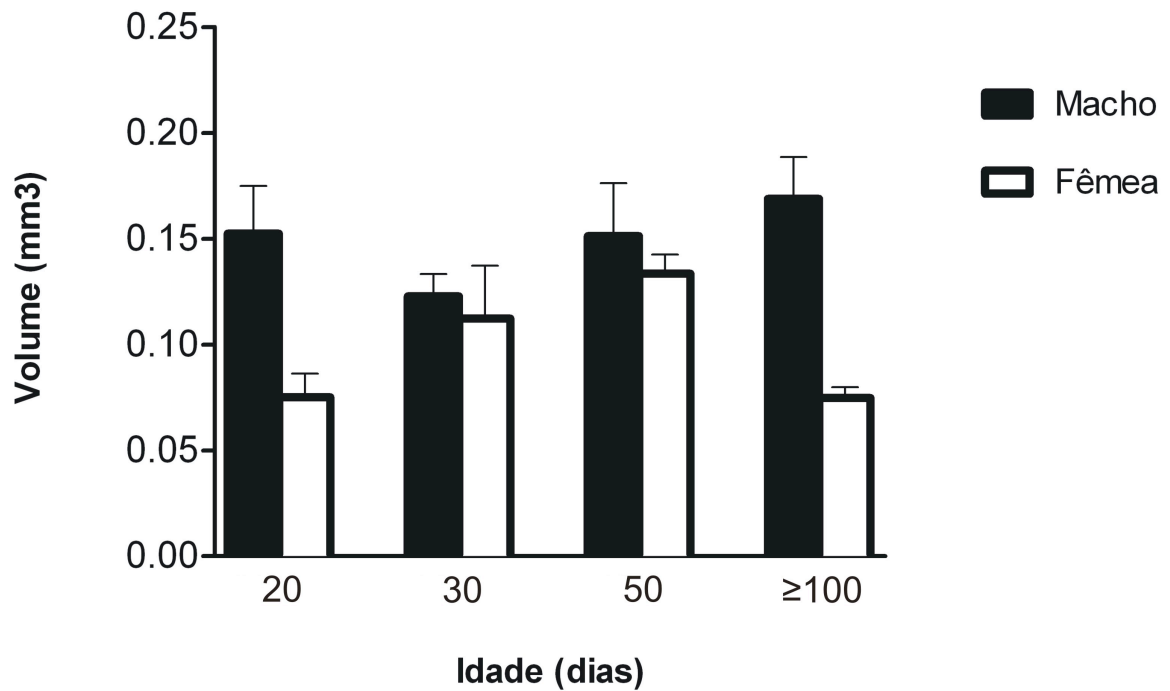


Figura 17. Representação diagramática da alteração volumétrica do núcleo centro vocal superior (HVC) de *blue capped cordon bleus* (*Uraeginthus cyanocephalus*) ao longo do desenvolvimento (valores médios \pm erro padrão) utilizando a técnica de Nissl.

Após a realização do teste T de *Student* não-pareado ($p < 0,05$), observamos que o HVC de machos foi significamente maior que o das fêmeas nas idades de 20 dias ($p = 0,0238$) e adulta ($p = 0,0053$); portanto pode-se afirmar que HVC de *Uraeginthus cyanocephalus*, nessas idades, é sexualmente dimórfico (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação volumétrica do centro vocal superior (HVC) entre machos e fêmeas de *blue capped cordon bleus* (*Uraeginthus cyanocephalus*) através do teste T de *Sudent* não-pareado ($p < 0,05$) nas amostras coradas com Nissl.

Idade (dias)	Volume do HVC (mm ³)		p-valor
	Macho	Fêmea	
20 dias	0,1520	0,0751	0,0238*
30 dias	0,1228	0,1123	0,3327
50 dias	0,1513	0,1334	0,2681
≥100 dias	0,1688	0,0748	0,0053*

Por meio da técnica de hibridização *in situ* radiotiva para receptores andrógenos, ratificamos que o centro vocal superior é sítio deste receptor hormonal tanto em machos quanto em fêmeas de *blue capped cordon bleus*. O ponto mais escuro circundado, em amarelo, na Figura 18, corresponde a região do HVC.

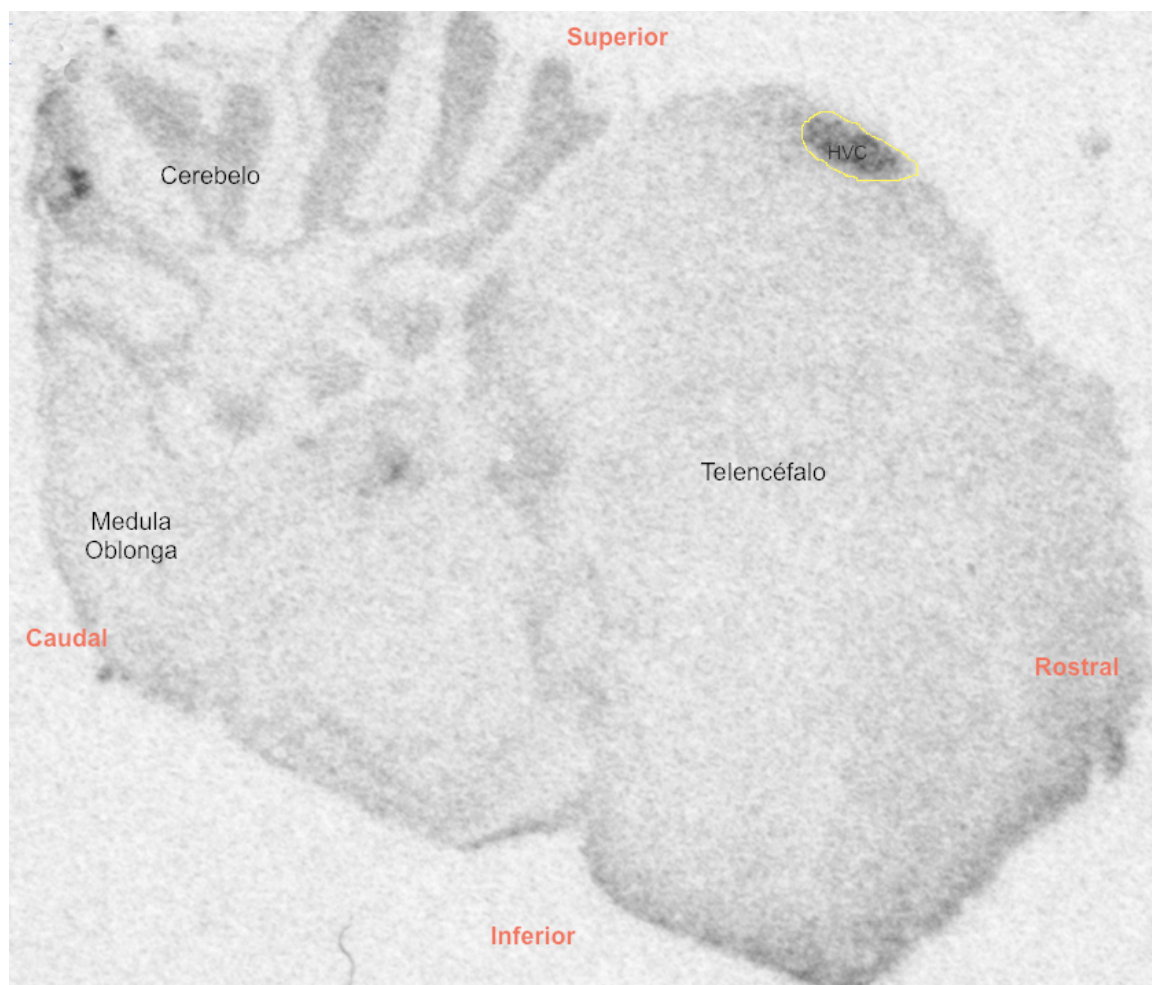


Figura 18. Auto-radiografia de um corte do encéfalo de um *Uraeginthus cyanocephalus* macho adulto (≥ 100 dias) que foi submetido à hibridização *in situ* radioativa para marcação de receptores andrógenos. O núcleo centro vocal superior (área escura delimitada de amarelo) foi marcado pela técnica.

Também foram feitas análises dos cortes histológicos submetidos à hibridização *in situ* radiotiva e aferidos o volume do HVC de cada animal. No entanto, por razões que ainda estão sendo investigadas, não foi possível obtermos os dados de todos os animais estudados. O sexo, idade e os valores individuais do volume de RA obtidos estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à hibridização *in situ* radioativa.

Idade (dias)	Machos HVC (mm ³)	Fêmeas HVC(mm ³)
20	0,176	0,2412
	-	0,1972
30	-	0,0992
	0,0638	-
50	0,1552	-
	0,0892	-
	0,2372	0,167
≥ 100	0,1361	-

Com base nos dados preliminares da hibridização *in situ* radioativa, alegamos hipoteticamente que o HVC, em machos, de fato, teve um decréscimo inicial e posterior crescimento, atingindo seu volume máximo na idade adulta, assim como foi observado nos dados obtidos pela técnica de Nissl. Nas fêmeas, o HVC também pareceu decrescer, inicialmente, voltando a crescer a partir dos 30 dias até a idade adulta. Todavia o maior valor de HVC, nas fêmeas, foi aos 20 dias de idade pós-eclosão. Estes dados contradisseram os obtidos por meio do método de Nissl, em que o HVC das fêmeas tendeu a um crescimento contínuo até os 50 dias e somente após este período decresceu.

Ao compararmos o volume de HVC entre machos e fêmeas, aos 20 dias de idade, o HVC das fêmeas tendeu a ser maior que o dos machos, mas a partir daí o HVC das fêmeas decresceu, enquanto que o dos machos cresceu; e na idade adulta, o HVC dos machos passou a ser maior que o das fêmeas.

Vale ressaltar que as medidas de volume de HVC obtidas pelo método de hibridização *in situ* foram semelhantes às obtidas pela técnica de Nissl em quase

todas as idades estudadas, tanto em machos quanto em fêmeas. A única exceção foi no grupo das fêmeas de 20 dias, cujas medidas de volume de HVC originadas das secções submetidas à hibridização *in situ* foram maiores do que as obtidas pelo método de Nissl.

3.1.3 Identificação do Núcleo Magnocelular Lateral do Nidopalio Anterior (LMAN)

O núcleo magnocelular lateral do nidopalio anterior não pode ser avaliado ou mensurado nas amostras destinadas à coloração de Nissl, pois, na maioria das secções, não foi possível distinguir com precisão a área nuclear do tecido circundante, o que tornou inviável a mensuração da área e, conseqüentemente, do volume nuclear.

Nos cortes submetidos à hibridização *in situ* radioativa, contudo, o LMAN foi detectado tanto em machos quanto em fêmeas de *blue capped cordon bleus* (Figura 19); isto nos levou a crer que este núcleo é um sítio de receptores andrógenos no telencéfalo desta espécie de ave.

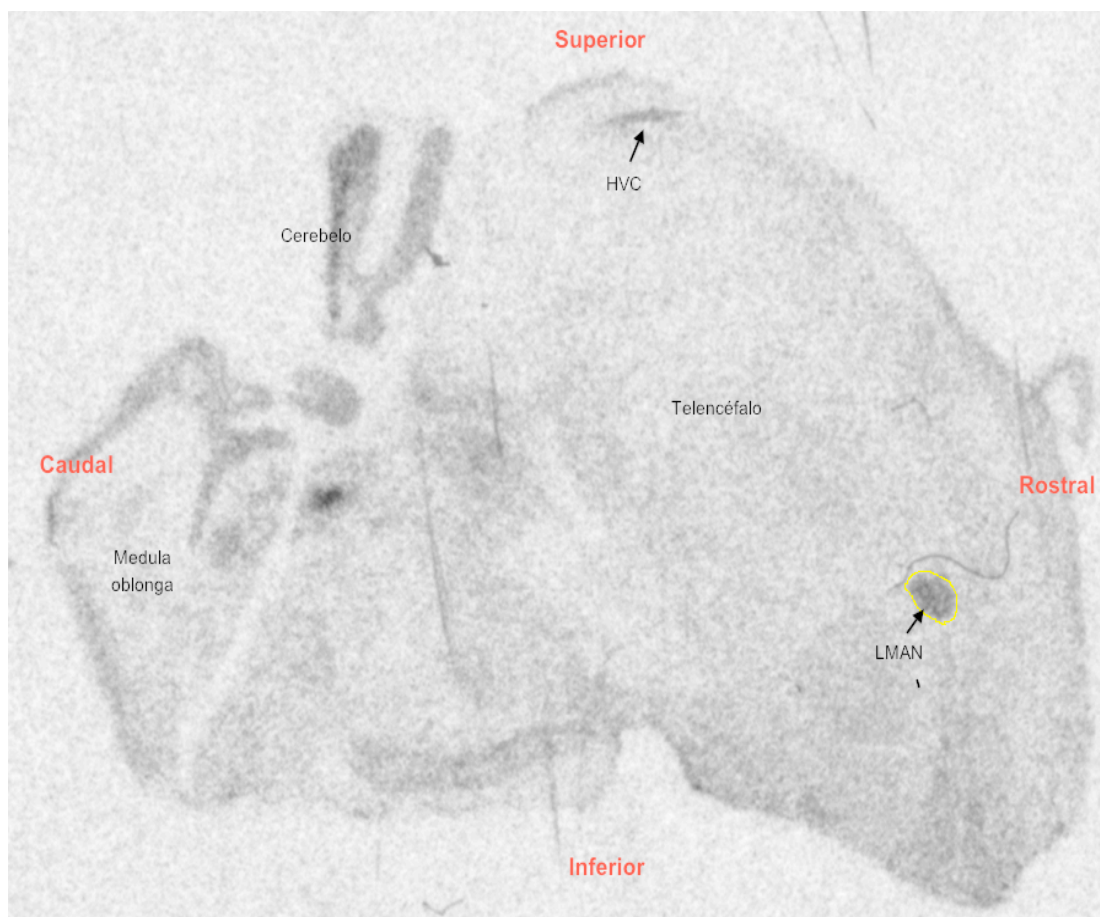


Figura 19. Auto-radiografia de um corte do encéfalo de um *Uraeginthus cyanocephalus* fêmea adulto (≥ 100 dias) que foi submetido à hibridização in situ radioativa para marcação de receptores andrógenos. O núcleo magnocelular lateral do nidopálio anterior (área escura delimitada de amarelo) foi marcado pela técnica. Abreviações: HVC=núcleo centro vocal superior.

No entanto, por razões ainda desconhecidas, não foi possível adquirirmos os dados de todos os animais estudados. O sexo, idade e os valores individuais do volume de LMAN obtidos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo magnoelular lateral do neoestriado anterior (LMAN) de *Uraeginthus cyanocephalus* machos e fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas das amostras submetidas à hibridização *in situ* radioativa.

Idade (dias)	Machos	Fêmeas
	LMAN (mm ³)	LMAN (mm ³)
20	0,1722	0,1694
		0,0756
30	0,0826	-
50	0,0584	-
	0,1132	-
≥ 100	-	0,0698

Com base nos dados preliminares da hibridização *in situ* radioativa, afirmamos hipoteticamente que o LMAN, em machos, parece regredir com a idade. Nas fêmeas o padrão de desenvolvimento observado em machos parece se repetir, isto é, o volume de LMAN diminui com a idade. Se compararmos o volume de LMAN entre machos e fêmeas, aos 20 dias de idade, os valores são equivalentes em ambos os sexos.

3.2 COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS NÚCLEOS TELENCEFÁLICOS RELACIONADOS AO CANTO ENTRE FÊMEAS DE *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS* (BLUE CAPPED CORDON BLEU) E *TAENIOPYGIA GUTTATA* (ZEBRA FINCH)

Com o intuito verificar qualquer semelhança ou distinção no desenvolvimento dos núcleos centro vocal superior (HVC) e robusto do arcopallio (RA), do ponto de vista morfológico, entre diferentes espécies, nós utilizamos os

dados volumétricos destes núcleos obtidos através da mensuração de sua área em cortes corados pela técnica de Nissl em diferentes idades pós-eclosão (20, 30, 50 e ≥ 100 dias).

As espécies escolhidas para efeito de comparação entre espécies foram o *blue capped cordon bleu*, objeto de estudo desta pesquisa, e o *zebra finch*, pois, de todas as espécies que estão mais bem descritas na literatura atualmente, este é o seu relacionado mais próximo filogeneticamente (ambos pertencem à família *Estrildidae*). Nós também decidimos fazer a comparação somente entre fêmeas, porque as fêmeas destas duas espécies possuem comportamentos vocais distintos: enquanto a fêmea de *blue capped cordon bleu* canta, a de *zebra finch* não canta.

O valores de volume dos núcleos de HVC e RA de *blue capped cordon bleu* foram obtidos desta pesquisa, já dados volumétricos de HVC e RA de *zebra finch* foram extraídos do estudo desenvolvido por Nixdorf-Bergweiller (1996). E o teste estatístico eleito para verificar diferenças volumétricas de HVC e RA entre estas duas espécies foi o teste T de *Student* não-pareado.

3.2.1 O núcleo robusto do arcopalio (RA) de fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus* (*blue capped cordon bleu*) e de *Taeniopygia guttata* (*zebra finch*)

A TABELA 9 mostra os valores individuais de volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arcopalio (RA) em fêmeas de *blue capped cordon bleu* e de *zebra finch* nas seguintes idades pós-eclosão: 20, 30, 50 e ≥ 100 dias.

TABELA 9. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo robusto do arquiestriado (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* e *Taeniopygia guttata* fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas de amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	<i>Uraeginthus cyanocephalus</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
	RA (mm ³)	RA (mm ³)
20	0,0766	0,141
	0,0579	0,111
	0,0857	0,142
30	0,0734	0,067
	0,0785	0,067
	0,0684	0,142
50	0,0877	0,055
	0,059	0,055
	0,0768	0,028
≥ 100	0,1331	0,037
	0,0502	0,025
	0,1483	0,074
	-	0,064

A Tabela 10 elucida os valores representativos médios de volume do núcleo RA e seus desvios padrões, em cada fase do desenvolvimento.

TABELA 10. Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo robusto do arcopalio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* e de *Taeniopygia guttata* fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas de amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	<i>Uraeginthus cyanocephalus</i>			<i>Taeniopygia guttata</i>		
	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão
20	3	0,0734	0,0142	3	0,1310	0,0176
30	3	0,0734	0,0050	3	0,0920	0,0433
50	3	0,0745	0,0144	3	0,0460	0,0156
≥ 100	3	0,1105	0,0528	4	0,0500	0,0228

Examinando com a atenção os dados expostos na Tabela 10, constatamos que, enquanto o RA das fêmeas de *blue capped cordon bleu* se manteve inalterado ao longo do desenvolvimento (ver item 3.2.1 deste trabalho), o RA das fêmeas de *zebra finch* teve um decréscimo de volume de 61,8% entre os 20 dias e a idade adulta, quando atingiu o seu menor volume (0,05 mm³). É justamente nesta idade que nós obtivemos a maior diferença de volume de RA entre as fêmeas das duas espécies analisadas: o RA da fêmea de *blue capped cordon bleu* foi 54,75% maior que o da fêmea de *zebra finch*.

A fim de saber se esta diferença era estatisticamente significativa aplicamos o teste T de Student não-pareado e obtivemos os seguintes resultados (Figura 20): aos 20 dias o RA das fêmeas de *zebra finch* foi maior que o das fêmeas de *blue capped cordon bleu* ($p=0,0057$); aos 30 dias não houve diferença volumétrica significativa do RA entre as espécies avaliadas ($p=0,2508$); aos 50 dias o volume de RA das fêmeas de *blue capped cordon bleu* passa a ser maior que o das fêmeas de *zebra finch* ($p=0,0406$); e finalmente na idade adulta (≥ 100 dias) a diferença observada na fase anterior se mantém ($p=0,0421$).

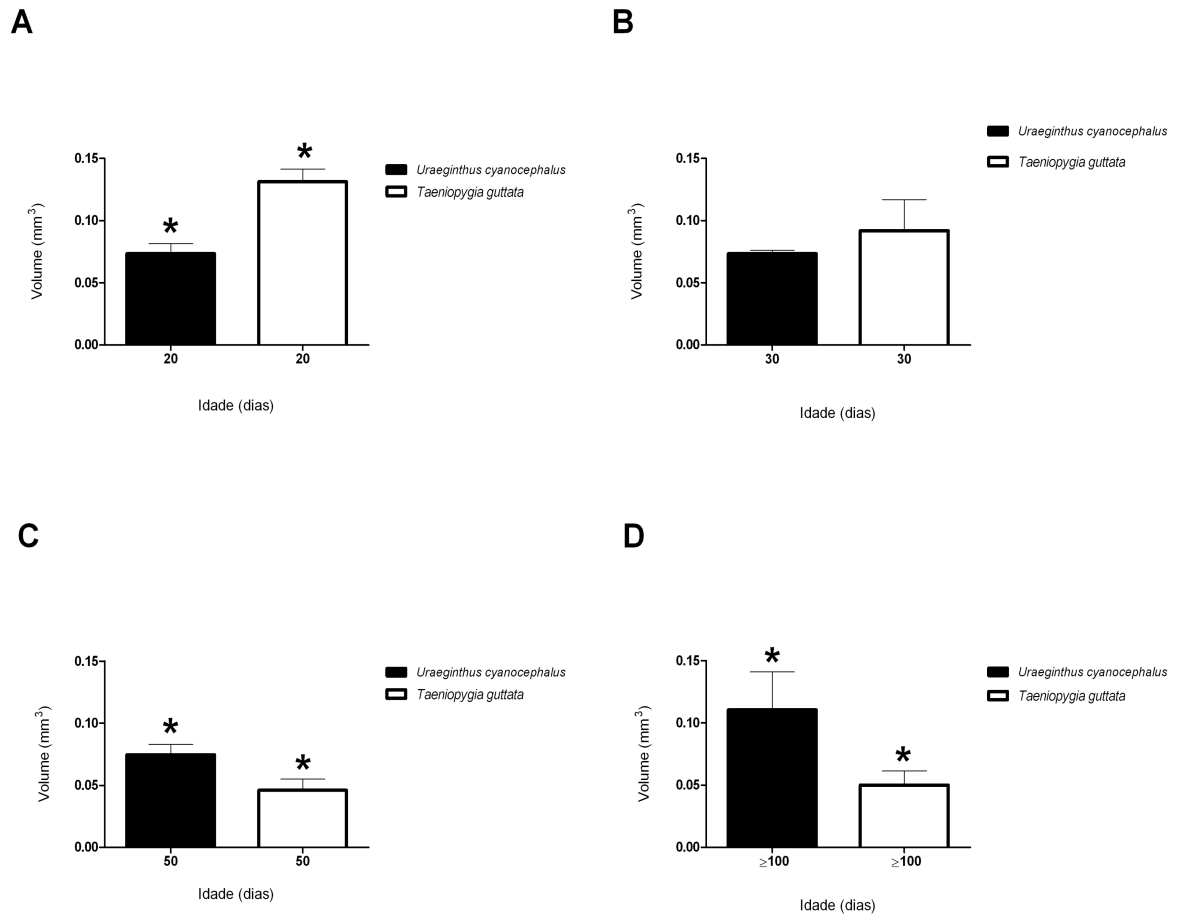


Figura 20. Representação diagramática da diferença volumétrica do núcleo robusto do arquiestriado (RA) (valores médios \pm erro padrão) entre fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus* e de *Taeniopygia guttata* nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias (A), 30 dias (B), 50 dias (C) e idade adulta (D) utilizando a técnica de Nissl.

3.2.2 O núcleo centro vocal superior (HVC) de fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus* (*blue capped cordon bleu*) e de *Taeniopygia guttata* (*zebra finch*)

A Tabela 11 demonstra os valores individuais de volume do núcleo centro vocal superior (HVC) em fêmeas de *blue capped cordon bleu* e de *zebra finch* nas seguintes idades pós-eclosão: 20, 30, 50 e ≥ 100 dias.

TABELA 11. Valores individuais do volume, em milímetros cúbicos, do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* e *Taeniopygia guttata* fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas de amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	<i>Uraeginthus cyanocephalus</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
	HVC (mm ³)	HVC (mm ³)
20	0,0806	0,100
	0,0536	0,130
	0,0912	0,123
30	0,1326	0,115
	0,1416	0,130
	0,0628	0,117
50	0,1432	0,082
	0,1152	0,080
	0,1418	0,059
		0,037
≥ 100	0,0766	0,050
	0,0654	0,102
	0,0825	0,086
	-	0,036

A Tabela 12 resume os valores representativos médios de volume do núcleo RA e seus desvios padrões, em cada fase do desenvolvimento.

TABELA 12. Valores médios e desvio padrão do volume do núcleo centro vocal superior (HVC) de *Uraeginthus cyanocephalus* e de *Taeniopygia guttata* fêmeas nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias, 30 dias, 50 dias e ≥ 100 dias. Estas medidas foram obtidas de amostras submetidas à coloração de Nissl.

Idade (dias)	<i>Uraeginthus cyanocephalus</i>			<i>Taeniopygia guttata</i>		
	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão	N	Volume médio (mm ³)	Desvio Padrão
20	3	0,0751	0,0194	3	0,1177	0,0157
30	3	0,1123	0,0431	3	0,1207	0,0081
50	3	0,1334	0,0158	4	0,0645	0,0211
≥ 100	3	0,0748	0,0087	4	0,0685	0,0307

Com base nos dados expostos na Tabela 12, podemos afirmar que nas fêmeas de blue capped cordon bleu, o HVC teve o seu volume aumentado em 77,1% até a idade de 50 dias pós-eclosão (de 0,0751 mm³ aos 20 dias para 0,1334 mm³ aos 50 dias); e a partir de então, o HVC regride voltando a ter o mesmo volume mensurado no início do desenvolvimento (20 dias pós-eclosão). Em contrapartida, o HVC das fêmeas de zebra finch decresceu em 45,2% até a idade de 50 dias pós-eclosão (de 0,1177 mm³ aos 20 dias para 0,0645 mm³ aos 50 dias) e entre 50 dias e a idade adulta nenhuma alteração volumétrica de HVC pode ser detectadas. Apesar das alterações parecerem ser significativas, quando aplicamos testes estatísticos nenhuma das alterações volumétrica de HVC observadas ao longo do desenvolvimento tanto em blue capped cordon bleu (ver item 3.2.2 deste trabalho) quanto em zebra finches (NIXDORF-BERGWEILLER, 1996) foram significativas.

Quando comparamos os volumes de HVC entre as duas espécies estudadas, verificamos que as maiores diferenças volumétricas encontradas foram na idade de 20 dias (HVC da fêmea de *zebra finch* é 56,7% maior do que o da fêmea de *blue capped cordon bleu*) aos 50 dias pós-eclosão (HVC da fêmea de *blue capped cordon bleu* é 106,8% maior do que o da fêmea de *zebra finch*).

Tendo essas diferenças volumétricas em mente, o próximo passo foi aplicar o teste T de *Student* não-pareado para avaliar a significância estatística das diferenças volumétricas de HVC entre as espécies analisadas e obtivemos o seguinte resultado: ao 20 dias pós-eclosão, o HVC de *zebra finch* foi, de fato, maior que o de *blue capped cordon bleu* ($p=0,0209$), enquanto que aos 50 dias pós-eclosão, o HVC da fêmea de *blue capped cordon bleu* passou a ser maior que o da fêmea de *zebra finch* ($p=0,0026$). Nas demais idades avaliadas o volume de HVC em ambas as espécies foi semelhante ($p=0,3794$ aos 30 dias e $p=0,3742$ no animal adulto) (Figura 21).

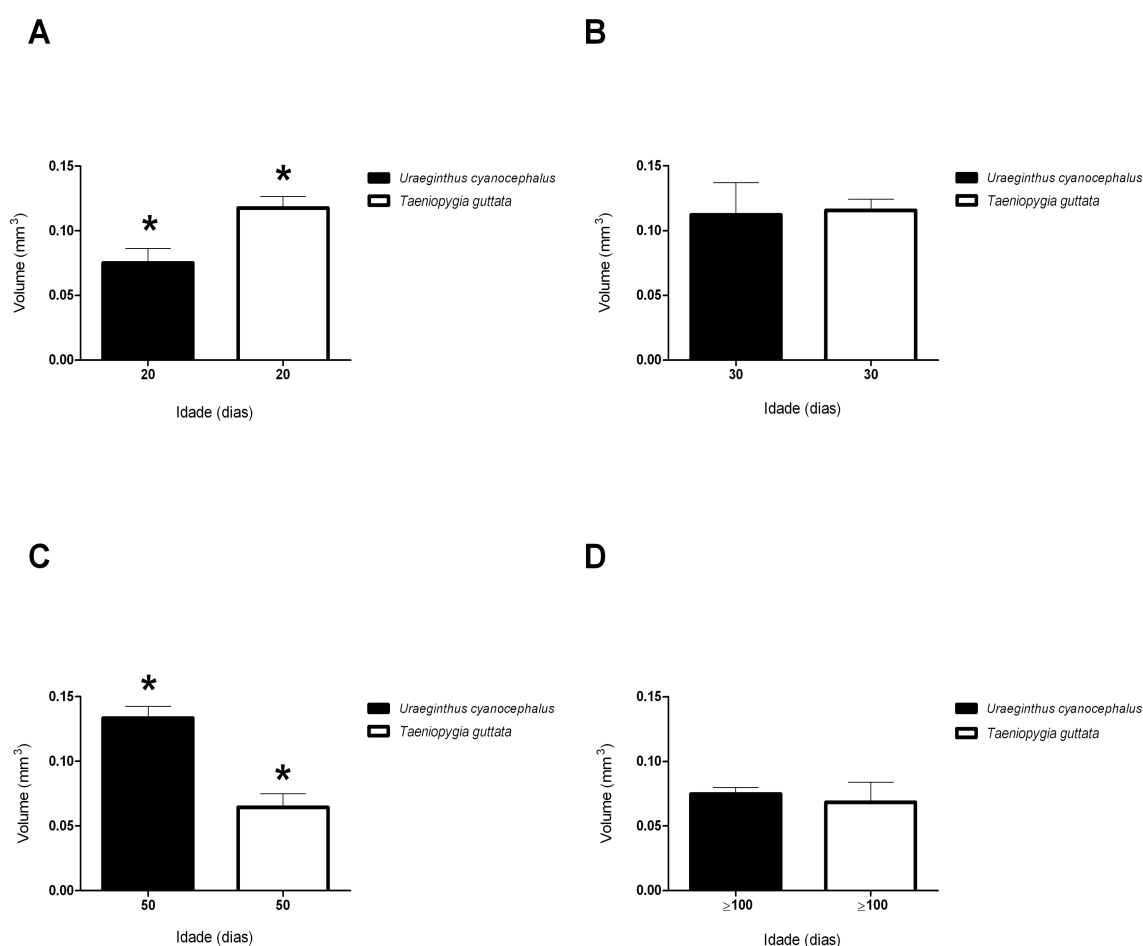


Figura 21. Representação diagramática da diferença volumétrica do núcleo centro vocal superior (HVC) (valores médios \pm erro padrão) entre fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus* e de *Taeniopygia guttata* nas seguintes idades pós-eclosão: 20 dias (A), 30 dias (B), 50 dias (C) e idade adulta (D) utilizando a técnica de Nissl.

4 DISCUSSÃO

4.1 OBSERVAÇÕES GERAIS SOBRE A MARCAÇÃO DOS NÚCLEOS CENTRO VOCAL SUPERIOR (HVC), ROBUSTO DO ARQUIESTRIADO (RA) E MAGNOCELULAR LATERAL DO NEOESTRIADO ANTERIOR (LMAN) A PARTIR DOS MÉTODOS DE NISSL E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* RADIOATIVA NO TELENCEFALO DE *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS*

O estabelecimento de correlações entre estrutura e função do sistema nervoso (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; NOTTEBOHM, 1981) e dos mecanismos neuronais subjacentes à plasticidade neuronal que ocorre tanto durante o desenvolvimento quanto na fase adulta, foi importante para se esclarecer se o comportamento sexualmente dimórfico do canto em aves canoras tem um vínculo direto com o crescimento de áreas cerebrais. A mensuração do tamanho de áreas cerebrais, desta forma, é fundamental para o estudo das projeções neuronais e sua correlação com as diferenças do tamanho de áreas cerebrais, envolvidas no controle desta atividade, entre machos e fêmeas (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, 1994; BERNARD e BALL, 1995; NIXDORF-BERGWEILER, 1996; SMITH *et al.*, 1997).

Nesta pesquisa, a coloração de Nissl, mais uma vez, se confirmou como um método eficaz para a delimitação dos núcleos HVC e RA. Em *blue capped*

cordon bleus (*Uraeginthus cyanocephalus*), estes núcleos puderam ser delineados em todas as idades estudadas (20, 30, 50 e ≥ 100 dias pós-eclosão) e em ambos os sexos. Tal eficiência pode ser observada por várias características dos resultados obtidos descritos a seguir. Primeiro, 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. O núcleo centro vocal superior (HVC), nas preparações coradas com Nissl, foi caracterizado por um agrupamento de células, maiores e intensamente coradas, circundado por um rebordo de células menores (GAHR, 1990). Neste trabalho, obtivemos um padrão de coloração regular e as células constituintes dos núcleos HVC e RA foram mais intensamente marcadas do que as células do tecido adjacente; além disso, foi possível verificar que os corpos celulares dos neurônios dos núcleos HVC e RA foram maiores que os das células localizadas no exterior destes núcleos. Uma segunda característica vantajosa da técnica empregada foi a capacidade de podermos mensurar as áreas nucleares (HVC e RA) e reproduzir os resultados com a qualidade da marcação referida semelhante aos já descritos na literatura.

Apesar das vantagens já mencionadas, uma limitação da técnica foi a de não permitir a delimitação do núcleo magnocelular lateral do nidopálio anterior (LMAN) em cortes finos de 20 μm . Este núcleo pode ser visto na maioria das seções dos machos dos grupos de 30 e 50 dias, porém suas bordas eram muito difusas para que o mesmo fosse completamente delineado. Já nos machos de 20 e ≥ 100 dias, assim como nas fêmeas, de todas as idades avaliadas, o LMAN não pode ser distinguido do restante do tecido. Contudo, este núcleo pode ser claramente delineado através do método de Nissl em cortes mais espessos. Por exemplo, Johnson e colaboradores (1995), a fim de determinar a organização topográfica da via prosencefálica anterior, em *zebra finches*, pode delimitar o LMAN, utilizando o método de Nissl, em cortes de 50 μm de espessura. Um ano mais tarde, Nixdorf-Bergweiler (1996), ao estudar o desenvolvimento de áreas cerebrais relacionadas ao canto, também em *zebra finches*, obteve sucesso ao tentar delinear o LMAN, por meio do método de Nissl, em cortes de 100 μm de espessura. Desta forma, o uso de um corte de 20 μm pode ter sido o motivo para o não aparecimento desse núcleo em nosso material.

A delimitação de um núcleo cerebral com base nas propriedades citológicas citadas acima, embora válida, é um pouco problemática, já que é sabido que 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 pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de corroborar ou não a adequação do método de Nissl para delinear áreas cerebrais em estudos que visam avaliar a variação funcional do sistema do canto, inclusive a ocorrência de diferenças no volume de núcleos telencefálicos entre machos e fêmeas. Gahr, em 1990, com o objetivo 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, 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), surgiram várias outras investigações comparando a delimitação do HVC e de outros núcleos relacionados ao canto através de variados métodos. Por exemplo, autoradiografias 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). Estas pesquisas 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). Todos estes estudos mostraram 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.

Contudo, a fim de amenizar este problema, elegemos a uma técnica alternativa para delimitação dos núcleos HVC, RA e LMAN: a hibridização *in situ* radioativa.

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

Partindo do pressuposto que *blue capped cordon bleus* e *zebra finches* pertencem à mesma família filogenética e que, em *zebra finches*, os núcleos HVC, RA e LMAN são sítios de receptores andrógenos (METZDORF *et al.*, 1999), escolhemos a marcação de receptores andrógenos, por meio da hibridização *in situ* radioativa, como técnica complementar ao Nissl para a marcação destes núcleos telencefálicos.

Como era esperado, todos os núcleos cerebrais, sob investigação, foram marcados através da hibridização *in situ*, confirmando a hipótese levantada por Metzdorf e colaboradores (1999) de que HVC, RA e LMAN sejam sítios de receptores andrógenos em todas as aves passeriformes oscines. Esta técnica se mostrou mais vantajosa que o Nissl, pois ocorreu marcação apenas das áreas de interesse o que tornou a delimitação destes núcleos mais precisa e os resultados obtidos mais fidedignos.

Apesar dos esforços não conseguimos, nesta pesquisa, marcar os núcleos HVC, RA e LMAN, através da hibridização *in situ*, em todas as 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 *blue capped cordon bleus*, já que o protocolo utilizado, neste trabalho, foi o mesmo que é utilizado, com sucesso, em *zebra finches*.

4.2 DIMORFISMO SEXUAL NOS NÚCLEOS CENTRO VOCAL SUPERIOR (HVC) E ROBUSTO DO ARCOPALIO (RA) DE *URAEGINTHUS CYANOCEPHALUS*

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 a aprendizagem e produção do canto (HVC, LMAN, RA, área X) eram significativamente maiores, em volume, em machos do que em fêmeas. Esta descoberta mudou o modo de pensar dos neurocientistas interessados em estudar diferenças sexuais cerebrais e desde então, tem sido realizado vários estudos para investigar diferenças sexuais no sistema do canto de aves.

No presente estudo, alterações volumétricas dos núcleos telencefálicos, envolvidos na aprendizagem e na produção do canto, ao longo do desenvolvimento foram quantificadas em machos e fêmeas de *blue capped cordon bleus* (*Uraeginthus cyanocephalus*) por meio do método de Nissl.

No que concerne ao núcleo HVC, verificamos que, em machos, o volume deste núcleo permaneceu praticamente inalterado dos 20 dias até a idade adulta. Já, nas fêmeas, o mesmo núcleo apresentou um crescimento de 77,6% do início do desenvolvimento (20 dias) até a idade de 50 dias, quando começou a regredir e seu volume, na idade adulta, passou a ser, praticamente, o mesmo do encontrado aos 20 dias pós-eclosão, porém, estas alterações volumétricas foram estatisticamente insignificantes. Se compararmos o comportamento volumétrico de HVC, ao longo do

desenvolvimento, do nosso animal experimental com o de outras espécies de pássaros oscines já estudadas, observamos que o *Uraeginthus cyanocephalus* macho apresenta um comportamento distinto. Por exemplo, enquanto que em *blue capped cordon bleus* o HVC se mantém inalterado ao longo do desenvolvimento, em *zebra finches*, o HVC de machos apresenta um aumento proporcional à idade atingindo seu volume máximo na fase adulta (BOTTJER *et al.*, 1985; BUREK *et al.*, 1994; NIXDORF-BERGWEILER, 1996). Já o desenvolvimento de HVC observado nas fêmeas de *blue capped cordon bleus* foi semelhante ao encontrado em *zebra finches* fêmeas (BOTTJER *et al.*, 1985; BUREK *et al.*, 1994; NIXDORF-BERGWEILER, 1996); em ambas as espécies o HVC não apresenta alteração volumétrica ao longo do desenvolvimento.

Embora, nenhuma das alterações volumétricas de HVC ao longo do desenvolvimento tenha sido estatisticamente relevante, pode-se afirmar que elas foram importantes para a diferença volumétrica de HVC entre machos e fêmeas de *blue capped cordon bleus*. Foi na idade de 20 dias pós-eclosão e na fase adulta que obtivemos os maiores valores de HVC, em machos e os menores valores de HVC em fêmeas. E foram justamente no início do desenvolvimento (20 dias pós-eclosão) ($p = 0,0238$) e na fase adulta ($p = 0,0053$), que observamos um comportamento sexualmente dimórfico de HVC. Estudos prévios também relataram, em *zebra finches*, um comportamento dimórfico de HVC no início do desenvolvimento o qual se tornou ainda mais expressivo na idade adulta (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; ARNOLD, 1980; GURNEY e KONISHI, 1980; GURNEY, 1982; BOTTJER *et al.*, 1985; WILLIAMS, 1985; NORDEEN e NORDEEN, 1989; BUREK *et al.*, 1995; JACOBS *et al.*, 1995; NIXDORF-BERGWEILLER, 1996).

Ao analisarmos o núcleo robusto do arcopalio (RA) de *Uraeginthus cyanocephalus* verificamos que, nos machos, este núcleo cresceu de modo significativo ($p = 0,03$) ao longo do desenvolvimento e seu volume, na fase adulta foi 2,2 vezes maior do que no início do desenvolvimento (20 dias pós-eclosão). Este achado está em concordância com o de trabalhos anteriores realizados em *zebra finches*, em que o RA também teve um crescimento significativo ao longo do desenvolvimento (BOTTJER *et al.*, 1985; KONISHI e AKUTAGAWA, 1985; NIXDORF-BERGWEILER, 1996). Ao passo que nas fêmeas de *blue capped cordon*

bleus, o volume de RA manteve-se praticamente inalterado ao longo do desenvolvimento, nas fêmeas de zebra finch o RA decresce com a idade, podendo diminuir em até 58% do seu volume inicial (BOTTJER *et al.*, 1985; KONISHI e AKUTAGAWA, 1985; NIXDORF-BERGWEILER, 1996).

Sabendo-se que o *Taeniopygia guttata* (zebra finch), das espécies mais bem descritas na literatura, é o relacionado mais próximo filogeneticamente do *Uraeginthus cyanocephalus* (blue capped cordon bleu), e que o RA de zebra finch é sexualmente dimórfico (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; BOTTJER *et al.*, 1985; KONISHI e AKUTAGAWA, 1985; NIXDORF-BERGWEILER, 1996), nós esperávamos que o RA de blue capped cordon bleu também apresentasse um comportamento sexualmente dimórfico, contudo, em nossa pesquisa, observamos que o RA desta ave não apresentou diferença volumétrica significativa entre machos e fêmeas. Atribuímos esta possível ausência de dimorfismo sexual de RA ao pequeno grupo amostral de nossa pesquisa.

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 tem sido realizados. Estes estudos sugerem uma correlação entre diferenças sexuais no cérebro e diferenças sexuais observadas no comportamento do canto destes animais (MacDOUGALL-SHACKLETON e BALL, 1999; BALL *et al.*, 2008).

Em espécies em que as fêmeas normalmente não cantam como *Taeniopygia guttata* (zebra finch) e *Funco hyemalis* a diferença volumétrica de HVC entre machos e fêmeas é bastante acentuada (fêmea/macho – 0,14 em zebra finches e 0,26 em Funco hyemalis); 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 nosso animal experimental. Em *Uraeginthus cyanocephalus*, cujo repertório vocal do macho é duas vezes maior que o das fêmeas, a razão do volume de HVC entre fêmea e macho (fêmea/macho) foi de 0,44 e foi, de fato, menor que a observada em zebra finches. Em um congênero do blue capped cordon bleu, o *Uraeginthus bengalus*, cujas fêmeas também produzem cantos menores que os machos, a razão

fêmea/macho foi de 0,67. E como era de se esperar, nas espécies em que machos e fêmeas cantam igualmente a diferença volumétrica de HVC entre machos e fêmeas tende a ser ainda menor; isto foi observado no *Thryothorus leucotis*, cuja razão fêmea/macho do volume de HVC foi igual a 0,77 (NOTTEBOHM e ARNOLD, 1976; BRENOWITZ *et al.*, 1985; GAHR e GÜTTINGER, 1985; GAHR e GÜTTINGER, 1986; BALL *et al.*, 2008).

Nenhuma análise quantitativa pode ser realizada com os dados resultantes da marcação de receptores andrógenos, pois os mesmos estão incompletos.

4.3 COMPARAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO VOLUMÉTRICO DOS NÚCLEOS CENTRO VOCAL SUPERIOR (HVC), ROBUSTO DO ARCOPALIO (RA) E MAGNOCELULAR LATERAL DO NEOESTRIADO ANTERIOR (LMAN) COM O APRENDIZADO E PRODUÇÃO DO CANTO

O aprendizado do canto é composto de uma fase sensorial, quando um modelo de canto adulto é incorporado à memória do pássaro juvenil; e de uma fase sensório-motora, quando o pássaro juvenil tenta ajustar o seu próprio canto com o modelo de canto adulto que fora incorporado a sua memória na fase anterior (Ver introdução). Em *Uraeginthus cyanocephalus* (*blue capped cordon bleu*) o desenvolvimento do canto é similar ao desenvolvimento de *zebra finches* (NOTTEBOHM 1993) e a fase sensorial tem início por volta dos 30 dias e terminado um após os 40 dias pós-eclosão; a fase sensório-motora inicia um pouco antes dos 40 dias e termina por volta dos 60 dias pós-eclosão (dados oriundos de observações de campo). Apesar de não termos observado nenhuma alteração volumétrica significativa de HVC, ao longo do desenvolvimento, tanto em machos quanto em fêmeas de *blue capped cordon bleus*, ao que parece o HVC, nas fêmeas, tem uma tendência a decrescer após o início da fase sensório-motora (50 dias pós-eclosão), enquanto que, nos machos, o crescimento volumétrico de HVC tende a ser contínuo até a fase adulta. No que concerne ao desenvolvimento de RA, observamos que o volume de RA nas fêmeas também não sofre alteração significativa ao longo do

desenvolvimento, ao passo que nos machos o crescimento entre 20 dias e a fase adulta é estatisticamente significativo ($p=0,03$). Nas fêmeas de *blue capped cordon bleu*, tanto o fato do HVC apresentar uma tendência à regressão após os 50, quanto a não alteração volumétrica de RA, ao longo do desenvolvimento, podem ser explicados pelo pequeno repertório vocal que as fêmeas apresentam. Os machos de *blue capped cordon bleu* possuem um repertório duas vezes maior que o das fêmeas (GEBERZAHN e GAHR, dados em não publicados), contudo os fatores responsáveis por esta regressão volumétrica, nas fêmeas, ainda são desconhecidos.

Quando comparamos o desenvolvimento destes dois núcleos (HVC e RA) com o das fêmeas de *zebra finches*, notamos que durante a fase sensório-motora (50 dias pós-eclosão) tanto o HVC quanto o RA das fêmeas de *blue capped cordon bleu* foi significativamente maior que o das fêmeas de *zebra finch* (HVC, $p=0,0026$; RA, $p=0,0406$). Esta diferença é totalmente explicável pelo fato das fêmeas de *zebra finch* não cantarem, logo elas não necessitam de um sistema do canto tão desenvolvido sexual (WILLIAMS, 1985; NIXDORF-BERGWEILLER, 1996; CAREW, 2000;).

Com base nos dados preliminares resultantes dos experimentos de hibridização *in situ*, verificamos que o núcleo LMAN, tanto em machos quanto em fêmeas de *blue capped cordon bleu*, apresentou os maiores volumes nos primeiros 30 dias do desenvolvimento e depois pareceu regredir até a idade adulta. Esta regressão pode estar associada ao fato do LMAN ser um núcleo importante para o aprendizado do canto, aprendizado este que envolve tanto a memorização do canto (fase sensorial) quanto a reprodução do mesmo (fase sensório-motora) (BOTTJER *et al.*, 1984). Portanto, pode-se supor que em *blue capped cordon bleu*, LMAN é um núcleo extremamente importante para a formação da memória do canto, e que o mecanismo de formação da memória é similar em ambos os sexos. Em *zebra finches*, LMAN também é essencial para a formação da memória do canto tanto em machos quanto em fêmeas e esta formação da memória parece ocorrer nos primeiros 35 dias do desenvolvimento, já que após este período o volume de LMAN decresce em 48% até a idade adulta (MILLER, 1979; BÖHNER, 1990; NIXDORF-BERGWEILLER, 1996).

5 CONCLUSÃO

- As técnicas de Nissl e de hibridização *in situ* radioativa foram eficazes na marcação dos núcleos telencefálicos relacionados ao canto: centro vocal superior (HVC), núcleo robusto do arcopallio (RA) e núcleo magnocefalular lateral do nidopallio anterior (LMAN).
- A morfologia do sistema do canto do *Uraeginthus cyanocephalus* é semelhante a de espécies relacionadas filogeneticamente e que já foram bem descritas na literatura.
- Com base nos dados oriundos dos cortes destinados à coloração de Nissl, não houve alteração volumétrica significativa de HVC ao longo do desenvolvimento de machos e fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus*. Entretanto, o RA dos machos de *Uraeginthus cyanocephalus* cresceu (>2x) entre os 20 dias pós-eclosão e a idade adulta. Nenhuma mudança foi observada nas fêmeas.
- O HVC de *Uraeginthus cyanocephalus* adulto é sexualmente dimórfico, ao passo que RA não apresentou, de modo significativo, comportamento dimórfico.
- O fato de RA não ter apresentado um comportamento sexualmente dimórfico pode ser devido à utilização de um pequeno grupo amostral.
- Os dados resultantes dos cortes destinados à hibridização *in situ* não puderam ser quantificados por estarem incompletos. Mais estudos são necessários para que possamos estabelecer alguma hipótese com relação a esses dados.

- Tanto o HVC quanto o RA das fêmeas de *Uraeginthus cyanocephalus*, durante a fase sensório-motora do canto (50 dias pós-eclosão), é significativamente maior que o das fêmeas de *Taeniopygia guttata*.

6 REFERÊNCIAS

- ARNOLD, A. P. Sexual differences in the brain. **Am. Sci.** 1980; 68:165-173.
- BAKER, M. C.; CUNNINGHAM, M. S. The biology of bird-song dialects. **Behavioral and brain Sciences.** 1985; 8:85-133.
- 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. **Psychoneuroendocrinology.** 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 enkephalin 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. *et al.* Sex differences in brain and behavior and the neuroendocrine control of the motivation to sing. In: ZEIGER, H. P.; MARLER, P. **Neuroscience of birdsong.** New York: Cambridge University Press, 2008. p.320-331.
- BAPTISTA, L. F.; SCHUCHMANN, K. L. Song learning in the anna humminbird (*Calpyte anna*). **Ethology.** 1990; 84:15-26.
- 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.
- BÖHNER, J. Early acquisition of song in the zebra finch. **Anim. Behav.** 1990; 39:369-374.
- BOTTJER, S. W.; MIESNER, S. L.; ARNOLD, A. P. Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. **Science.** 1984; 224:901-903.
- BOTTJER, S. W. *et al.* Ontogeny of brain nuclei controlling song learning and behavior in zebra finches. **The Journal of Neuroscience.** 1985; 5:1556-1985.
- 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.; MARGOLIASH, D.; NORDEEN, K. W. An introduction to birdsong and the avian song system. **J. Neurobiol**. 1997;33(5):495-500.

BUREK, M. J.; NORDEEN, K. W.; NORDEEN, E. J. Ontogeny of sex differences among newly-generated neurons of the juvenile avian brain. **Dev. Brain Res**. 1994; 78:57-64.

BUREK, M. J.; NORDEEN, K. W.; NORDEEN, E. J. Initial sex differences in neuron growth and survival within an avian song nucleus develop in the absence of afferent input. **J. Neurobiol**. 1995; 27:85-96.

BURT, J. M. *et al.* Lesions of the anterior forebrain song control pathway in female canaries affect song perception in an operant task. **J. Neurobiol**. 2000; 42:1-13.

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

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

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

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.

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

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

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

- GAHR, M; GÜTTINGER, H. R. Korrelation zwischen der sexualdimorphen Gehirndifferenzierung und der Verhaltensausrprägung 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* (Estrildidae). **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. How should brain be delineated? Consequences for developmental mechanisms and for correlations of area size, neuron numbers and functions of brain nuclei. **Trends Neuroscience**. 1997; 20: 58-62.
- GAHR, M. Distribution of sex steroid hormone receptors in the avian brain: functional implications for neural sex differences and sexual behaviors. **Microscope Research and Technique**. 2001; 55:1-11.
- GARAMSZEG, L. Z. *et al.* The evolution of song in female birds in Europe.
- GOODWIN, D. **Estrildid finches of the world**. Oxford: Oxford University Press, 1982.
- GURNEY, M. E.; KONISHI, M. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. **Science**. 1976; 194: 211-213.
- GURNEY, M. E.; KONISHI, M. Hormone induces sexual differentiation in the zebra finch song system. **Brain Res**. 1980; 208:1380-1382.
- GURNEY, M. E. Behavioral correlates of sexual differentiation in the zebra finch song system. **Brain Res**. 1982; 231:153-172.
- HIGGINS, W. *In situ* hybridization. **Molecular Neurobiological Techniques Neuromethods**. 1990; 16:239-284.
- IMMELMANN, K. Zur biologischen Bedeutung des Estrildidengesanges. **Journal of Ornithology**. 1968; 109:284-299.
- JACOBS, E. C.; GRISHAM, W.; ARNOLD, A. P. Lack of a synergistic effect between estradiol and dihydrotestosterone in the masculinization of the zebra finch song system. **J. Neurobiol.** 1995; 27:513-519.
- JANIK, V. M. Whistle matching in wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Science**. 2000; 289:1355-1357.
- JARVIS, E. D. *et al.* Behaviorally-driven gene expression reveals hummingbird brain vocal nuclei. **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.

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

JOHNSON, F.; SABLAN, M. M.; BOTTJER, S. W. Topographic organization of a forebrain pathway involved with vocal learning in zebra finches. **The Journal of Comparative Neurology.** 1995; 358: 260-278.

JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KANDEL, E. R. *et al.* **Princípios da neurociências.** 4. ed. São Paulo: Manole, 2003. 1412p.

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. 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.

LANGMORE, N.E. Vocal duetting; definitions, discoveries and directions. **TRENDS in Ecology and Evolution.** 2002; 17: 451-452.

MacDOUGALL-SHACKLETON, S. A.; BALL, G. F. Comparative studies of sex differences in the song-control system of songbirds. **Trends Neurosci.** 1999; 22:432-436.

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 behavior in sparrows. **Science.** 1964; 146:1483-1486.

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

MILLER, D. B. Long-term recognition of father's song by female zebra finches. **Nature.** 1979; 180:389-391.

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

MUNDINGER, P.C. Microgeographic and macrogeographic variation in the acquired vocalizations of birds. In: KROODSMA, D.E.; MILLER, E.H. **Acoustic communication in birds.** New York: Academic Press, 1982. p. 147-208.

NELSON, B. Avian dependence on sound pressure level as an auditory distance cue. **Animal Behaviour**. 2000; 59:57-67.

NIXDORF-BERGWEILER, B. E. Divergent and parallel development in volume sizes of the telencephalic song nuclei in male and female zebra finches. **J. Comp. Neurol.** 1996; 375:445-456.

NIXDORF-BERGWEILLER, B. E.; BISCHOF, H. J. A stereotaxic atlas of the brain of the zebra finch, *Taeniopygia guttata*, with special emphasis on telencephalic visual and song system nuclei in transverse and sagittal sections. **National Center for Biotechnology Information**. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2348>>. Acesso em: 28 outubro 2010.

NORDEEN, E. J.; NORDEEN, K. W. Sex and regional differences in the incorporation of neurons Born during song learning in zebra finches. **The Journal of Neuroscience**. 1988; 8:2869-2874.

NORDEEN, E. J.; NORDEEN, K. W. Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into the avian song nuclei during adolescence. **Dev. Brain Res**. 1989; 49:27-32.

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

NOTTEBOHM, F.; STOKES, T. M.; LEONARD, C. M. Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. **J. Comp. Neurol.** 1976; 165:457-486.

NOTTEBOHM, F. A. brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. **Science**. 1981; 214:1368-1370.

NOTTEBOHM, F. A. The search for neural mechanisms that define the sensitive period for song learning in birds. **Neth. J. Zool.** 1993; 43:193-234.

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

ONISHI, B. K. A. Coloração de Nissl por cresil violeta. In. XAVIER, G. F. **Técnicas de estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999. p. 93-103.

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

PETERS, A. S. L. *et al.* **The fine structure of the nervous system**. Philadelphia: Saunders, 1976. p. 11-12.

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.

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

REINER, A. *et al.* Songbirds and the revised avian brain nomenclature. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2004; 1016:77-108.

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.

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

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

SCHARFF, C.; NOTTEBOHM, F. A comparative study of the behavioral deficits following lesions of various parts of the zebra finch song system: implications for vocal learning. **J. Neurosci.** 1991; 11:2896-2913.

SHIMIZU, T. Why can birds be so smart? Background, significance, and implications of the revised view of the avian brain. **Comparative cognition and behavior reviews**. 2009;4:103-115.

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. *et al.* Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. **J. Bras. Patol Med Lab**. 2006; 42:207-213.

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

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.

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.

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. O uso de caracteres bioacústicos para avaliações filogenéticas em aves. **Anais de Etologia**, 1997; 15:93-107.

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.

WANG, R. et al. Song control nuclei in male and female large-billed crows (*Corvus macrorhynchos*). **Zoological Science**. 2009; 26:771-777.

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

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

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-H₂O 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 DEPC(Sigma D-5758) o 1,0 liter H₂O_{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-H₂O 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 Ditioneitol (DTT) 4,0 M

Dissolvel 1,0 g de DTT (*Dithiothreitol*, Sigma D-9779) em 1,62 ml DEPC- H₂O. 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-H₂O 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 preparo de 1,0 ml de solução Ficoll 6%, deve-se misturar 60,0 mg de Ficoll (Sigma F-2637) em DEPC-H₂O 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-H₂O.

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 de 10 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 ditioneitol 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).