

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

INSTITUTO DO CÉREBRO

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Experiências auditivas na juventude alteram a discriminação auditiva no Mandarim-Diamante (*Taeniopygia guttata*)**

Aluna: Gabriela Peixoto Barbalho

Orientador: Tarciso André Ferreira Velho

Natal/RN

Março de 2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Árvore do Conhecimento - Instituto do Cérebro - ICE

Barbalho, Gabriela Peixoto.

Experiências auditivas na juventude alteram a discriminação auditiva no Mandarin-Diamante (*Taeniopygia guttata*) / Gabriela Peixoto Barbalho. - Natal, 2021.

58f.: il.

Dissertação (mestrado em Neurociências) - Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2021.

Orientador: Tarciso André Ferreira Velho.

1. Mandarins. 2. Discriminação auditiva. 3. Experiência Social. 4. Prática Motora. 5. Percepção auditiva. I. Velho, Tarciso André Ferreira. II. Título.

RN/UF/BSICe

CDU 612.858.7

Experiências auditivas na juventude alteram a discriminação auditiva no  
Mandarim-Diamante (*Taeniopygia guttata*)

por

Gabriela Peixoto Barbalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em  
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Tarciso André Ferreira Velho

Natal/RN

Março de 2021

Experiências auditivas na juventude alteram a discriminação auditiva no  
Mandarim-Diamante (*Taeniopygia guttata*)

Gabriela Peixoto Barbalho

Apresentada em 25 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tarciso André Ferreira Velho (Instituto do Cérebro - UFRN)

Presidente

Prof. Dr. Mauro Pichorim (UFRN)

Examinador interno

Prof. Dr. Wilfredo Blanco Figuerola (UERN)

Examinador Externo à Instituição

## AGRADECIMENTOS

Como disse a grande artista contemporânea da música brasileira, Anitta: “Quero muito agradecer a mim, porque eu não desisti”. Fazer uma pós-graduação nunca foi fácil, mas tentar terminar durante uma pandemia foi outro nível de dificuldade.

Gostaria também de agradecer aos meus pais, por todo o suporte necessário, por sempre acreditarem nos meus planos e por compreenderem a minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho.

Ao meu orientador Tarciso, por todas as correções e ensinamentos, e por ter acreditado que eu era capaz de realizar esse projeto.

A todos do laboratório de Neurogenética, em especial à Andrea e Annara por estarem desde o começo de tudo, dando todo o suporte possível, e à Luisa por toda a disposição para ajudar.

Aos professores Eduardo Sequerra, Katarina Leão, Mauro Pichorim e Wilfredo Blanco pelas contribuições valiosas a este trabalho.

À UFRN, ICe, Capes e Sci-hub por terem viabilizado este projeto.

A todos do ICe, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Juliana por todos os ensinamentos não só profissional como pessoal.

Aos amigos do container, por todas as risadas, cafés da tarde e suporte físico e mental. Em especial aos meninos do La Rata por toda a ajuda prestada. E para Sara e Juliana, por todo o companheirismo, todas as conversas, saídas e por serem um alicerce em que eu poderia me apoiar durante essa trajetória.

À Cristina Hahn, por todas as conversas e *insights*, sem você esta jornada teria sido bem mais difícil.

## RESUMO

As aves canoras são consideradas um dos melhores modelos animais para investigar as bases neurobiológicas do aprendizado vocal. Assim como nós humanos, esses animais apresentam fases distintas do aprendizado vocal durante o desenvolvimento, que são influenciadas por experiências sociais e motoras. Além disso, a privação social em aves canoras pode gerar defeitos na produção vocal do indivíduo, enquanto que o impedimento da prática vocal retarda a maturação do canto. No entanto, não está totalmente claro se a experiência limitada durante o desenvolvimento pode afetar as habilidades de discriminação auditiva do animal, um fenômeno bem conhecido em humanos. Para responder a essa questão, manipulamos a experiência social e a prática motora em mandarins, a espécie de ave canora mais utilizada. Confirmamos primeiro que nossa manipulação alterou o aprendizado vocal, sem afetar grosseiramente o desenvolvimento. Mais precisamente, os animais em privação social exibiram canções anormais, típicas de animais sem um modelo vocal. Por outro lado, os animais jovens onde a prática do canto foi limitada continuaram a produzir vocalizações imaturas quando adultos. Notadamente, experimentos comportamentais demonstraram que animais controle, *i.e.*, animais com experiências sociais normais, apresentaram um desempenho inferior em tarefas de discriminação auditiva em comparação com animais isolados e juvenis. Em contraste, animais com o canto limitado não diferiram dos controles. Esses resultados sugerem que experiências auditivas no início do desenvolvimento podem influenciar a capacidade discriminatória em mandarins adultos, enquanto que a prática vocal parece ter pouca influência no desempenho de aves adultas. Ou seja, as aves que são expostas à experiência social normal durante o desenvolvimento pós-natal podem ter uma capacidade diminuída de discriminar cantos coespecíficos. Tal interpretação está de acordo com o aumento da especificidade observada nos neurônios auditivos do mandarim, e seria semelhante às perdas perceptuais observadas durante a aquisição da fala em humanos.

**Palavras-chave:** Mandarins, Humanos, Experiência Social, Prática Motora, Discriminação.

## ABSTRACT

Songbirds are considered one of the best animal models to investigate the neurobiological basis of vocal learning. As in humans, these animals have distinct phases for vocal learning that are influenced by social and motor experiences. More specifically, social deprivation in songbirds can generate deficits in the individual's vocal production, whereas singing prevention delays vocal maturation. However, it is not completely clear whether limited experience during development can affect the animal's auditory discrimination abilities, a well-known phenomenon in humans. To address this question, we manipulate social and motor practice experiences in zebra finches, the most widely used songbird species. We first confirmed that our manipulation altered vocal learning, without grossly affecting development. More precisely, socially deprived animals showed abnormal songs, typical of animals lacking a song model. In contrast, juvenile animals where singing practice was limited continued to produce immature vocalizations as adults. Notably, behavioral experiments demonstrated that control animals, *i.e.*, animals with normal social experiences, showed a lower performance in auditory discrimination tasks compared to isolated and juvenile animals. Conversely, sing-limited did not differ from control birds. These results suggest that early development auditory experiences may influence the discriminatory capacity in adult zebra finches, while vocal practice appears to have little influence in the performance of adult birds. That is, birds that are exposed to normal social experiences during postnatal development may have diminished ability to discriminate conspecific songs. Such interpretation is in agreement with the increased specificity observed in auditory neurons, and would parallel the perceptual losses observed during speech acquisition in humans.

**Keywords:** Zebra Finches, Humans, Social Experience, Motor Practice, Discrimination

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** O aprendizado vocal em humanos e mandarins segue trajetórias semelhantes.

**Figura 2.** Estrutura do canto em mandarins.

**Figura 3.** Representação esquemática simplificada dos circuitos auditivos e motores envolvidos no aprendizado vocal em mandarins (A & C) e as vias equivalentes em mamíferos (B & D), respectivamente.

**Figura 4.** A prática vocal influencia no aprendizado do canto.

**Figura 5.** O impedimento da prática vocal altera características espectrais do canto.

**Figura 6.** Limitação da prática vocal não influencia na discriminação auditiva.

**Figura 7.** Ausência de modelo auditivo interfere no aprendizado vocal.

**Figura 8.** Características espectrais do canto de mandarins sem modelo auditivo.

**Figura 9.** Ausência de tutor influencia na discriminação auditiva.

**Figura 10.** Experiência social não interfere no aprendizado vocal.

**Figura 11.** Características espectrais do canto de mandarins socialmente privados.

**Figura 12.** Privação social pode influenciar a discriminação auditiva.

**Figura 13.** Idade afeta a velocidade do aprendizado mas não influencia na performance discriminativa.

**Figura 14.** Privação social não influencia em testes de sociabilidade.

## TABELAS:

**Tabela 1.** Comparação estatística da taxa de similaridade.

## **ABREVIACÕES**

VMC Via motora do canto

VAC Via anterior do canto

MLd Núcleo mesencefálico dorso lateral

Ov Núcleo ovoidalis

NCM Nidopallium caudomedial

CMM Mesopallium caudomedial

NPs Neurônios de projeção

RA Núcleo robusto do arcopallium

nXIIts Núcleo hipoglosso

RAm Núcleo retroambigualis

PAm Núcleo parambigualis

DLM Núcleo medial dorso lateral anterior do tálamo

LMAN Núcleo magnocelular lateral do nidopallium anterior

CTRL Controle

CTRL ISO Controle isolado

ISO Isolado

IMPE Impedido

JUV Juvenil

A Aversivo

N Neutro

PS Poleiro social

PN Poleiro neutro

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b><i>Background</i> e Significância</b>	<b>11</b>
2.1	Aprendizado vocal em humanos	11
2.2	Aprendizado vocal em aves canoras	14
2.1	Mandarim-Diamante como modelo experimental	16
2.3	Circuitos neurais do aprendizado vocal	17
2.4	Aprendizado vocal e fatores sociais	20
2.5	Aprendizado vocal e discriminação	21
<b>3.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Métodos Gerais</b>	<b>24</b>
4.1	Animais	24
4.2	Condições sociais durante o desenvolvimento do canto	24
4.3	Análises Comportamentais	25
4.3.	Aprendizado do Canto	25
4.3.	Discriminação Auditiva	25
4.3.	Preferência de lugar	26
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>27</b>
5.1	A redução da prática vocal retarda o aprendizado do canto	27
5.2	A redução da prática vocal não altera a discriminação auditiva	31
5.3	Ausência de um tutor impede o aprendizado do canto	33
5.4	Ausência de um modelo auditivo afeta a discriminação auditiva	38
5.5	A privação social não altera o aprendizado do canto	39
5.6	A privação social é suficiente para alterar a discriminação auditiva	42
5.7	A idade altera a velocidade de aquisição mas não altera a discriminação auditiva	44
5.8	Motivação social não influencia na performance discriminativa	45
<b>6.</b>	<b>Discussão</b>	<b>47</b>
<b>6.1</b>	<b>Prática vocal e discriminação auditiva</b>	<b>47</b>
<b>6.2</b>	<b>Privação social e discriminação auditiva</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão e próximas etapas</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>Referências</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Aves canoras representam um dos principais modelos neurobiológicos para o estudo da comunicação vocal. Assim como humanos, estas aves exibem um período crítico para o aprendizado vocal que pode ser influenciado pelo contexto social, além de requerer uma audição intacta e possuir uma circuitaria neural especializada (ZEIGLER; MARLER; SCIENCES, 2004). Em ambos os grupos, o aprendizado vocal envolve tanto o desenvolvimento de capacidades perceptuais, quanto a habilidade de produzir vocalizações (KUHL, 2004; ZEIGLER; MARLER; SCIENCES, 2004). No entanto, a maioria dos estudos nessas aves são focados na produção de vocalizações, e pouco sabe-se sobre o efeito do ambiente social durante o desenvolvimento e o progresso da capacidade perceptual nestes animais (CAMPBELL; HAUBER, 2009a; MILLER-SIMS; BOTTJER, 2012; STURDY et al., 2001). Para suprir esta carência, propomos investigar a capacidade de discriminação auditiva no Mandarim-Diamante (*Taeniopygia guttata*), um conhecido modelo de aprendizado vocal, criado em diferentes condições sociais.

A experiência social influencia o desenvolvimento do canto de múltiplas formas no mandarim (MILLER-SIMS; BOTTJER, 2012). Machos juvenis, por exemplo, aprendem seus cantos a partir do contato com outros mandarins adultos, principalmente através do contato com o pai (CHEN; MATHESON; SAKATA, 2016; CLAYTON, 1987). Em contrapartida, a ausência de um modelo adulto leva ao desenvolvimento de cantos altamente anormais, caracterizados pela diminuição na variação das notas, além de variações na média da frequência e da duração das notas (FEHÉR et al., 2009; MORRISON; NOTTEBOHM, 1993; PRICE, 1979). Além disso, há evidências de que fêmeas e outros filhotes presentes no mesmo ambiente também podem influenciar o aprendizado do canto, possivelmente através de respostas comportamentais ou mesmo pela disponibilidade maior de modelos auditivos (CAROUSO-PECK; GOLDSTEIN, 2019; TCHERNICHOVSKI; NOTTEBOHM, 1998). De fato, o processo de aprendizado do canto pode ser mais efetivo ao incluir o contato visual e o auditivo concomitantemente (BRAINARD; DOUPE, 2002; CHEN; MATHESON; SAKATA, 2016).

Além da necessidade de interagir socialmente, os mandarins precisam praticar para aprimorar seus repertórios (KUHL, 2003a; MELTZOFF et al., 2009; MOONEY, 2009). Esse aperfeiçoamento ocorre através da comparação de suas próprias vocalizações com os modelos adquiridos no início da vida através de *feedback* auditivo (CLAYTON, 1987). Este processo pode ser prolongado através do impedimento do ato de cantar (HAYASE et al., 2018), podendo

levar ao desenvolvimento de respostas neuronais alteradas em algumas áreas do sistema auditivo (PHAN; PYTTE; VICARIO, 2006). Todavia, não se sabe como o *feedback* auditivo ou a ausência do mesmo pode influenciar no desenvolvimento da capacidade discriminatória em mandarins.

Desta maneira, para investigar se o contexto social influencia na capacidade discriminatória em mandarins, criamos animais sem exposição a um tutor e examinamos as consequências comportamentais, *i.e.*, desenvolvimento do canto e a capacidade discriminatória de animais manipulados comparados a controles. Além disso, investigamos se o impedimento da prática do canto durante o desenvolvimento do mandarim pode afetar sua capacidade de discriminar sons coespecíficos quando adultos.

## **2. BACKGROUND & SIGNIFICÂNCIA**

### **2.1. Aprendizado vocal em humanos**

Períodos em que as conexões entre neurônios são mais flexíveis e suscetíveis a interferência ambiental são chamados de períodos críticos (FOX; III, 2010; MELTZOFF et al., 2009). Esses períodos são caracterizados por processos que alteram a organização da arquitetura neural, como o desenvolvimento de axônios, formação de sinapses, além da eliminação dos mesmos (KNUDSEN, 2004). Estas alterações são dependentes da experiência do indivíduo, que por sua vez pode desencadear a transcrição e tradução de genes específicos associados à plasticidade neuronal (FOX; III, 2010; KNUDSEN, 2004). Estes períodos são finalizados quando os mecanismos relacionados à plasticidade estabelecem conexões que se tornam mais resistentes à influência ambiental (KNUDSEN, 2004).

O sistema visual é um exemplo clássico de como a arquitetura neural é estabelecida durante o período crítico (FOX; III, 2010). Privações e modificações no *input* visual levam a alterações na conectividade neuronal (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2000). Mais especificamente, a privação de *input* sensorial de um olho, impele os axônios oriundos do outro olho a invadirem seu território, *i.e.* dominância ocular (ISSA et al., 1999). Essas alterações acontecem somente quando a manipulação é feita em um momento específico do desenvolvimento, *i.e.* período crítico. Além disso, experimentos semelhantes com indivíduos adultos não produzem o mesmo fenômeno (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2000).

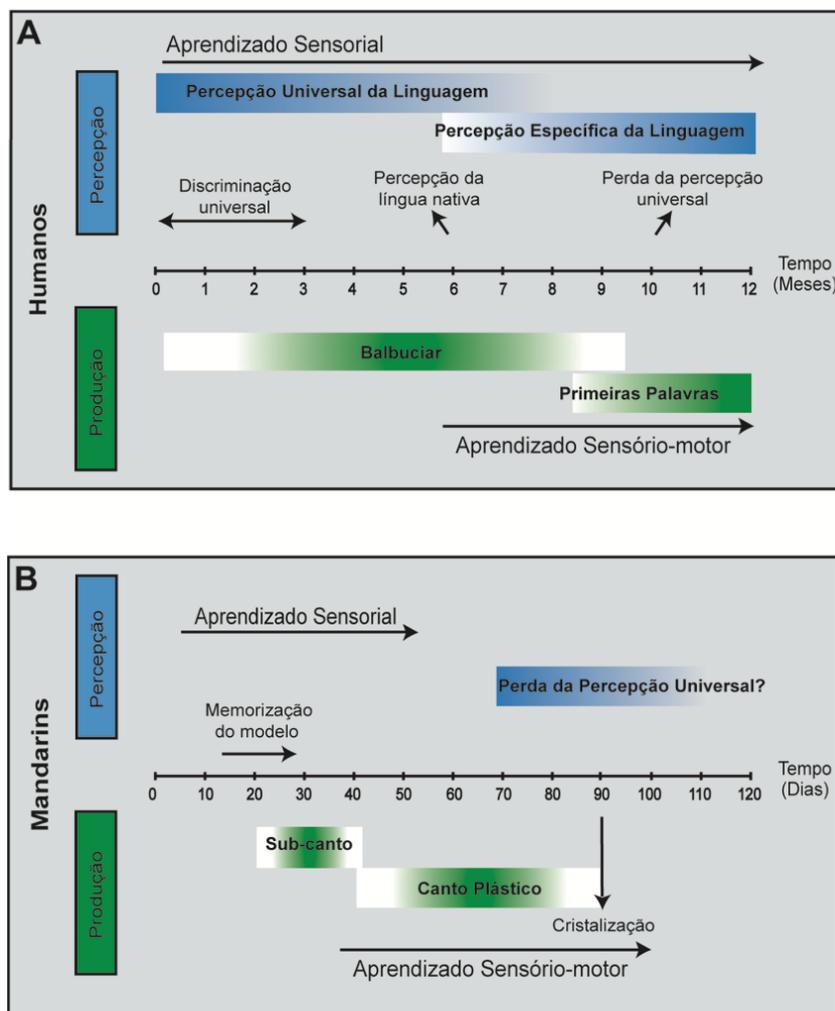
Todavia, os mecanismos moleculares que definem este e outros períodos críticos semelhantes ainda não estão completamente esclarecidos (FOX; III, 2010).

A aquisição da linguagem é um outro exemplo clássico de período crítico na neurobiologia (KUHL, 2012). O desenvolvimento da linguagem em crianças acontece de modo consistente, começando com o balbuciar por volta dos 6 meses de idade até alcançar frases completas por volta dos 3 anos (**Fig. 1A**; KUHL; RIVERA-GAXIOLA, 2008). No entanto, os períodos críticos para a aquisição dos diferentes aspectos da linguagem, *i.e.* níveis fonéticos, lexicais e sintáticos, variam (FUNABIKI; KONISHI, 2003; KUHL, 2012). Apesar de não saber ao certo o tempo preciso desses aspectos pela variabilidade entre indivíduos, alguns estudos indicam que a aprendizagem fonética ocorre antes do final do primeiro ano, enquanto que a aprendizagem sintática desenvolve-se entre 18 e 36 meses de idade (KUHL, 1992). Além disso, outros estudos apontam que a privação de experiências auditivas pode afetar o desenvolvimento da fala. Crianças surdas, por exemplo, produzem vocalizações tardiamente, com diferenças no tempo e na duração da fala (KUHL; MELTZOFF, 1996).

Mais especificamente, os bebês passam por um processo de restrição da sua percepção auditiva, onde nos primeiros meses de vida eles passam de generalistas da língua humana para especialistas (KUHL, 2003; MELTZOFF et al., 2009). Isto é, entre 6 e 12 meses de vida existe uma mudança onde a habilidade perceptual universal dos bebês vai gradualmente diminuindo, e eventualmente torna-se específica para a língua nativa (**Fig. 1A**; KUHL; TSAO; LIU, 2003; MELTZOFF et al., 2009). A hipótese é que os bebês ao ouvirem a linguagem do ambiente, armazenam representações perceptivas dos sons da fala que eles escutam. Esses sons, por sua vez, servem como modelos para o aprendizado e produção oral que acontece mais tarde durante o desenvolvimento (KUHL; MELTZOFF, 1996).

Acredita-se que esse tipo de aprendizagem estabeleça um comprometimento neural para a língua nativa do indivíduo (KUHL; MELTZOFF, 1996). Como colocado acima, a experiência sensorial com uma língua específica determina padrões auditivos armazenados na memória que são exclusivos desse idioma. Essas representações direcionam as tentativas de fala *i.e.* prática motora, até que uma ligação entre a percepção e o output motor seja estabelecida (KUHL, 1991). Portanto, essa exposição a uma linguagem específica leva a um “compromisso neural” com as características acústicas desse idioma (KUHL, 2000). O compromisso neural é constituído de uma arquitetura e circuitos neurais dedicados à análises de características fonéticas e prosódicas da linguagem do ambiente no qual o bebê está exposto. O circuito neural

maximiza a análise de um determinado idioma, *i.e.* língua nativa, e quando totalmente desenvolvido, interfere na aquisição de um novo idioma (KUHL, 2000). Causando assim, uma dificuldade na percepção da fala de línguas estrangeiras no final da infância e na idade adulta (KUHL; TSAO; LIU, 2003). Por isso, bebês e crianças pequenas são vistos como melhores do que os adultos na aquisição de uma segunda língua. Pois, o processo de aprendizagem da língua nativa e portanto, o compromisso neural com seus padrões, ainda está incompleto (KUHL; TSAO; LIU, 2003).



**Figura 1.** O aprendizado vocal em humanos e mandarins segue trajetórias semelhantes. A) Aquisição da fala em humanos. Em azul está indicado as fases da percepção auditiva e em verde os períodos de produção vocal; B) Desenvolvimento do canto em mandarins. Abertura e fechamento do período crítico em mandarins desenvolvidos em condições normais, apresentando o período sensorial em azul e o sensorio-motor em verde (Adaptado de KUHL, 2003).

O aprendizado vocal em humanos é influenciado pelo contexto social. Crianças órfãs privadas de estímulo durante a primeira infância, apresentam um atraso no desenvolvimento com déficits na cognição (RUTTER et al., 1998). Porém, ao serem adotadas em lares estruturados, a maioria delas consegue recuperar a perda cognitiva ao atingir quatro anos de idade (RUTTER

et al., 1998). Não obstante, bebês quando expostos a uma segunda língua através de interações sociais com cuidadores, aprendem de forma mais eficiente do que quando a exposição ocorre através de vídeos (KUHL, 2003). Estes dados sugerem que contingências sociais podem influenciar positivamente o processo de aprendizado da fala (MELTZOFF et al., 2009).

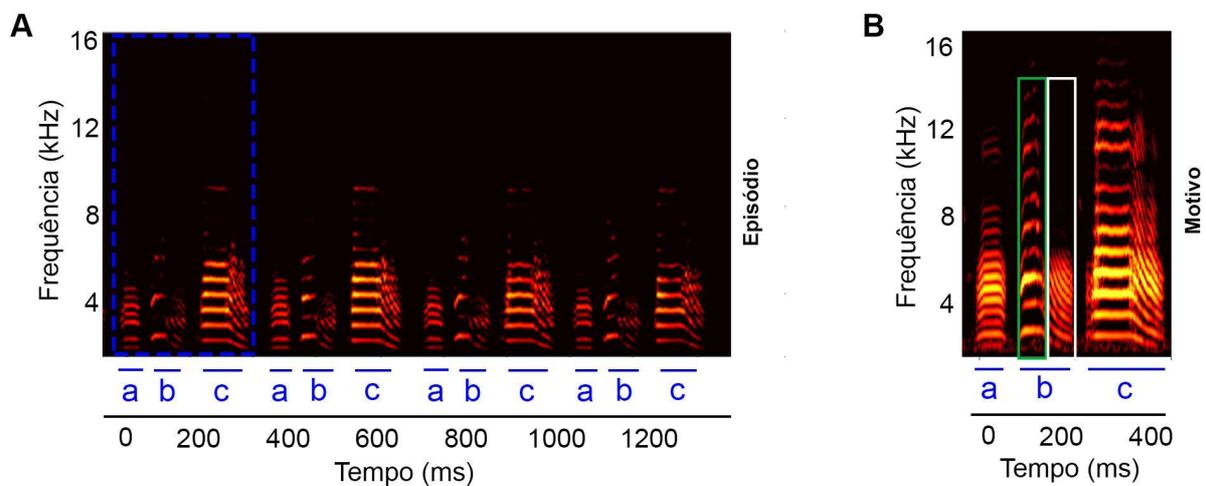
## **2.2. Aprendizado vocal em aves canoras**

A capacidade dos humanos de aprender vocalizações complexas é compartilhada com poucos animais. Dentro destes, inclui-se os cetáceos, elefantes, morcegos, pinípedes e algumas espécies de pássaros como as aves canoras, papagaios e beija-flores (KONOPKA; ROBERTS, 2016; MORI; WADA, 2015). Dentre estes, as aves canoras tornaram-se o modelo de escolha dos neurocientistas para o estudo do aprendizado vocal tanto a nível neural como comportamental (PRATHER; OKANOYA; BOLHUIS, 2017). Esta escolha se deve aos vários paralelos com o aprendizado vocal em humanos, além da facilidade de manutenção, um ciclo reprodutivo relativamente curto e facilmente criado em cativeiro (KUHL, 2012; MELLO, 2014).

O aprendizado vocal em aves canoras possui duas fases durante o período crítico. Assim como em humanos, o aprendizado pode ser dividido em uma fase sensorial e uma fase sensório-motora (**Fig. 1B**; para uma revisão recente veja PRATHER; OKANOYA; BOLHUIS, 2017). A fase sensorial é primordialmente perceptual, de memorização auditiva, na qual a memória de longo prazo é consolidada (BOLHUIS; OKANOYA; SCHARFF, 2010). Durante esta fase, animais juvenis escutam o canto de animais adultos, que serão futuramente utilizados como modelos para os processos subsequentes (BOLHUIS; OKANOYA; SCHARFF, 2010). Uma vez que os modelos são adquiridos, os animais praticam e aprimoram seus repertórios, comparando e recombinao progressivamente suas vocalizações através de feedback auditivo, utilizando esses modelos como guia (KUHL, 2003; MELTZOFF et al., 2009; MOONEY, 2009). Essa fase, chamada de sensório-motora, é conhecida por ser “plástica” (GOLDSTEIN; KING; WEST, 2003; WILBRECHT; NOTTEBOHM, 2003). Ou seja, as vocalizações durante este estágio, também chamadas de sub-canto, variam de iteração para iteração e possuem uma amplitude mais baixa comparado a vocalizações adultas (PRATHER; OKANOYA; BOLHUIS, 2017). Neste estágio, algumas características do sub-canto são retidas e outras são eliminadas (PRATHER; OKANOYA; BOLHUIS, 2017). Conforme o desenvolvimento progride para a fase adulta, o canto deixa de ser plástico e passa a ser altamente estereotipado, *i.e.* canto cristalizado (GOLDSTEIN; KING; WEST, 2003). Este canto cristalizado, possui um

conjunto determinado de características típicas da espécie e passa a ser menos dependente de feedback auditivo (GOLDSTEIN; KING; WEST, 2003). O animal adulto por sua vez, produz um canto padronizado ao longo de sua vida para diversas funções como defesa do território e atração de parceiras em potencial (MOONEY, 2009; WILLIAMS, 2004).

O canto das aves canoras normalmente possui uma estrutura prototípica (**Fig. 2**; BERWICK et al., 2011 para uma revisão). Ele consiste em elementos acústicos contínuos que possuem um tempo e frequência coeso chamados de notas (**Fig. 2B**, retângulos; KONISHI, 1985). O conjunto de uma ou mais notas formam uma sílaba, que é separada por intervalos de silêncio. As sílabas, por sua vez, representam uma unidade básica do canto, e geralmente são agrupadas para formar o que chamamos de “motivos”. Um agrupamento de motivos é chamado de “episódio” ou “frase” (**Fig. 2A**), podendo ter uma ordem fixa ou variada dependendo da espécie. Isto é, o tempo e a organização das sílabas e motivos são específicos de cada espécie (MARLER, 1970).



**Figura 2:** Estrutura do canto em mandarins. A) Sonograma representando um episódio do canto (*bout*), contendo quatro motivos; retângulo em azul indica um motivo; B) Sonograma de um motivo. As letras indicam sílabas individuais que compõem o motivo prototípico desse animal; retângulos verde e branco indicam exemplo de notas, *i.e.*, elementos acústicos contínuos que possuem frequência e tempo coesos.

### 2.2.1. O Mandarin-Diamante como modelo experimental

O Mandarin-Diamante (*Taeniopygia guttata*), uma ave canora, tem um dos cantos mais estudados no aprendizado vocal (veja MELLO, 2014 para uma discussão). Ele pertence à ordem Passeriformes, membro da família Estrildidae e do gênero *Taeniopygia*. São originários da Austrália e Indonésia, e habitam diversas regiões desses países (MELLO, 2014). Não obstante, são mantidos em cativeiro como animais domesticados em grande parte do mundo, inclusive no Brasil (PATTERSON; FEE, 2015). São pequenos, tendo uma média de comprimento de 10 cm, e massa corporal de aproximadamente 15 gramas (ZANN, 1996). São dimórficos, os machos possuem marcações específicas como cabeça e costas cinzentas, cauda branca e listrada, garganta preta listrada, mancha laranja na bochecha e mancha castanha nas laterais (ZANN, 1996). Enquanto que as fêmeas, não possuem marcações, tendo somente uma coloração acinzentada pelo corpo (PATTERSON; FEE, 2015). O tempo de vida deles na natureza varia de 2 a 3 anos, enquanto que em cativeiro, eles dispõem de uma expectativa de vida de 5 a 7 anos (PATTERSON; FEE, 2015). Os mandarins são diurnos e muito sociais, vivendo em bandos com cerca de 100 indivíduos (ZANN, 1996). O macho adulto produz um som que é estruturalmente único, utilizado para identificação e preservação da estrutura social do bando (STRIPLING et al., 2003). Enquanto que a fêmea, que não canta, tende a preferir machos com canções semelhantes às do pai (CAMPBELL; HAUBER, 2009b).

O aprendizado vocal do mandarim apresenta duas fases distintas. Os juvenis aprendem a formar suas canções a partir do contato com os outros machos adultos da espécie, principalmente seu pai (CLAYTON, 1987). Entre os dias 25-35 de vida, os juvenis começam a memorizar a informação auditiva, *i.e.*, o canto do tutor. E a partir do dia 35 eles produzem suas próprias vocalizações, o chamado sub-canto (EALES, 1985). Através de feedback auditivo, estas vocalizações iniciais progressivamente tornam-se mais estereotipadas, até estabilizar-se entre os dias 90-120 (para uma revisão veja ROSS et al., 2017). Uma vez estabilizado, o animal mantém o mesmo padrão de canto durante toda a vida por meio de feedback auditivo (NORDEEN; NORDEEN, 1992). No entanto, lesões cocleares, *i.e.*, perda da audição, podem causar alterações em seu canto mesmo depois de consolidado (NORDEEN; NORDEEN, 1992).

### 2.3. Circuitos neurais do aprendizado vocal

O aprendizado do canto requer dois sistemas, o sistema auditivo (**Fig. 3A**) e o sistema do canto (**Fig. 3C**). O sistema auditivo, presente em machos e fêmeas, possui regiões responsáveis pela percepção auditiva e exerce um papel importante no reconhecimento de indivíduos (CHIRATHIVAT; RAJA; GOBES, 2015; PRATHER; OKANOYA; BOLHUIS, 2017). O sistema do canto, por outro lado, serve para o aprendizado e produção do canto (DOUPE; FRANCISCO, 1997; GARST-OROZCO; BABADI; ÖLVECZKY, 2014; MOONEY, 2009). Este sistema pode ser subdividido em duas vias: *i*) uma via motora do canto (VMC), responsável pela produção motora do canto em toda vida do animal, e *ii*) uma via anterior do canto (VAC), necessária para o aprendizado do canto em juvenis (**Fig. 3C**; DOUPE; FRANCISCO, 1997; GARST-OROZCO; BABADI; ÖLVECZKY, 2014; MOONEY, 2009).

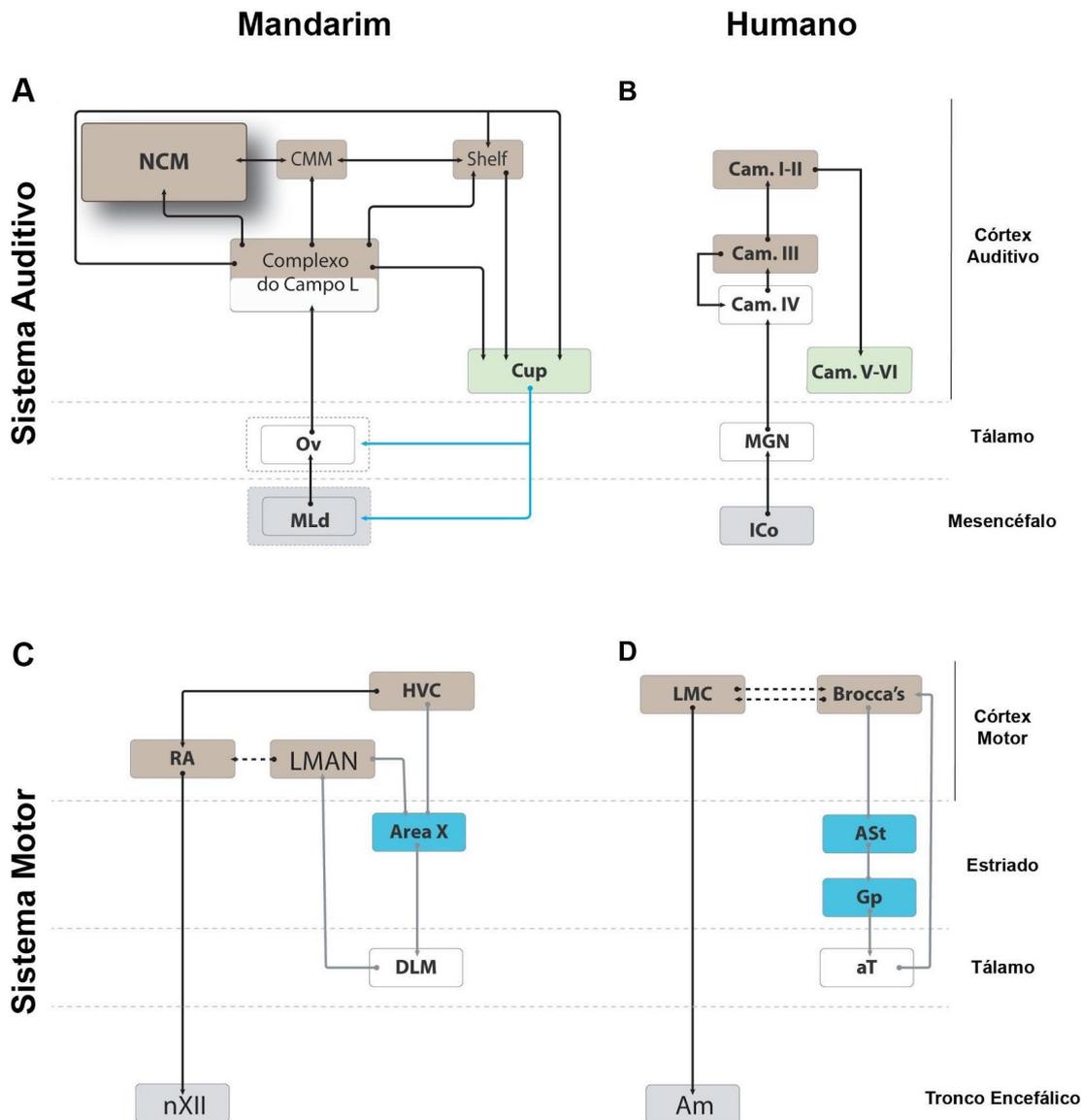
O sistema auditivo é fundamental para o processamento da informação e memorização de informações auditivas. A informação auditiva chega primeiramente na cóclea e vai para o núcleo coclear no rombencéfalo (MELLO et al., 1998; VATES et al., 1996). O núcleo coclear projeta seus axônios direta e indiretamente para o mesencéfalo chegando no núcleo mesencefálico dorso lateral (MLd em inglês), que é equivalente ao colículo inferior nos humanos (MELLO et al., 1998; VATES et al., 1996). O MLd, por sua vez, estende seus prolongamentos até o núcleo ovoidalis que em seguida estende para um complexo telencefálico chamado de Campo L (**Fig. 3A**; MELLO et al., 1998; VATES et al., 1996). Regiões do campo L são equivalentes às camadas IV do córtex primário auditivo nos humanos, por apresentarem similaridade em termos de conectividade e organização (**Fig. 3B**; WANG; BRZOZOWSKA-PRECHTL; KARTEN, 2010). Além disso, este complexo estende ramificações para outras regiões corticais, principalmente em dois núcleos denominados Nidopallium caudomedial (NCM em inglês) e Mesopallium caudomedial (CMM em inglês; MELLO et al., 1998; VATES et al., 1996). O NCM parece estar envolvido na aquisição, processamento e reconhecimento da memória criada a partir do canto do tutor e seria o equivalente às camadas supra granulares do córtex auditivo primário (PHAN; PYTE; VICARIO, 2006). Certos neurônios presentes no NCM são especificamente ativados quando o animal escuta o canto do seu tutor ou o próprio canto (YANAGIHARA; YAZAKI-SUGIYAMA, 2019). Além disso, lesões no NCM em mandarins juvenis levam a problemas no reconhecimento do canto do tutor (BRAINARD; DOUPE, 2002; GOBES; ZANDBERGEN; BOLHUIS, 2010). Enquanto que, o *shelf* e o *cup* são áreas que conectam o sistema auditivo com o sistema do canto (JARVIS, 2007). Estas

evidências sugerem então, que estas regiões, principalmente o NCM, são importantes para o processamento auditivo e podem estar envolvidas no armazenamento das memórias do canto.

O sistema de canto, por sua vez, é importante para o aprendizado sensório-motor do animal (BOLHUIS; MOORMAN, 2015). Ele possui um núcleo pré-motor, que é compartilhado tanto na VMC quanto na VAC, denominado de HVC (NOTTEBOHM; STROKES; LEONARD, 1976). As duas vias, originam-se de duas populações diferentes de neurônios de projeção (NPs) desse mesmo núcleo:  $HVC_{RA}$  e  $HVC_X$  (MOONEY, 2009). A VMC é composta por neurônios  $HVC_{RA}$  que inervam o núcleo robusto do arcopallium (RA em inglês, **Fig. 3C**). O RA, por sua vez, projeta seus axônios para a parte mais baixa do tronco cerebral conectando-se com a porção traqueossiríngea do núcleo hipoglosso (nXII<sub>ts</sub>) (SOLIS; DOUPE, 1999). Este núcleo possui neurônios motores que inervam os músculos da siringe, o órgão especializado do canto nas aves (GARST-OROZCO; BABADI; ÖLVECZKY, 2014; MOONEY, 2009). Evidências apontam que essa via é semelhante a via motora córtex-tronco nos mamíferos que controla a laringe (**Fig. 3D**; JARVIS, 2007). Alguns autores sugerem que a conexão do HVC com o RA funcione como um temporizador vocal, controlando o tempo do canto (ROBERTS; MOONEY, 2013). Pois, lesões no HVC provocam desestabilização na produção vocal ao longo da vida do animal, e aquecimento ou resfriamento desta área altera o tempo do canto (LONG; FEE, 2008; NOTTEBOHM; STROKES; LEONARD, 1976). Dessa forma, o VMC parece ser o responsável pela sustentação anatômica em que o telencéfalo exerce controle sobre a vocalização (MOONEY, 2009).

Os neurônios de projeção do  $HVC_X$  fazem parte da VAC e inervam uma área localizada no estriado, chamada de área X (**Fig. 3C**). Essa área conecta-se com o núcleo medial dorso lateral anterior do tálamo (DLM em inglês), que envia projeções para o núcleo magnocelular lateral do nidopallium anterior (LMAN em inglês) (DOUPE; FRANCISCO, 1997). Os axônios dos neurônios de projeção do LMAN bifurcam quando saem da margem caudal do núcleo (BOTTJER et al., 1989). Uma ponta percorre caudalmente o prosencéfalo e forma sinapses excitatórias rápidas no RA, e a outra, termina na área X formando um loop de feedback dentro da VAC (BOTTJER et al., 1989). Evidências anatômicas, fisiológicas e comportamentais sustentam a ideia da identificação dessa via como um circuito recorrente especializados entre regiões corticais, gânglios basais e tálamo, equivalente portanto a circuitaria associada com o aprendizado vocal observada em humanos (**Fig. 3D**; BOLHUIS; MOORMAN, 2015; MOONEY, 2009). Sugere-se que a ligação  $LMAN_{RA}$  serve como um mediador de correção e

erro da produção vocal baseado em feedback auditivo (ROBERTS; MOONEY, 2013). Além disso, lesões na VAC durante o aprendizado impedem o desenvolvimento normal do canto. A hipótese é que esse circuito contém neurônios sensoriais que fornecem uma entrada auditiva importante durante o desenvolvimento (SCHARFF; NOTTEBOHM, 1991).



**Figura 3. Representação esquemática simplificada dos circuitos auditivos e motores envolvidos no aprendizado vocal em mandarins (A & C) e as vias equivalentes em humanos (B & D), respectivamente.** Nas figuras A e B, flechas pretas indicam vias ascendentes e flechas em azul indicam vias descendentes. Nas figuras C e D, flechas pretas indicam a via motora, enquanto que as flechas cinzas demonstram os circuitos recorrentes córtex-estriado-tálamo-córtex. As cores correspondentes em cada camada indicam áreas equivalentes entre mandarins e humanos. MLd, núcleo mesencefálico dorso

lateral; Ov, núcleo ovoidalis; NCM, Nidopallium caudomedial; CMM, Mesopallium caudomedial; RA, núcleo robusto do arcopallium; DLM, núcleo medial dorso lateral do tálamo anterior; LMAN, núcleo magnocelular lateral do nidopallium anterior; Cam. I-II, camadas I-II; Cam. III, camada III; Cam. IV, camada IV; Cam. V-VI, camadas V-VI; MGN, núcleo geniculado medial; ICo, colículo inferior; Brocca's, área de Brocca; ASt, estriado anterior; Gp, globus pallidus; aT, tálamo anterior; Am, núcleo ambíguus. Nem todas as áreas e conexões estão representadas nesta figura.

#### **2.4. Aprendizado vocal e fatores sociais**

O aprendizado do canto é guiado por um modelo auditivo e influenciado por contingências sociais (PRICE, 1979). Mandarins juvenis aprendem a vocalizar a partir do pai ou de outro macho coespecífico, quando o pai não está presente (BÖHNER, 1983; CLAYTON, 1987). Além disso, as fêmeas também parecem influenciar no aprendizado vocal. Experimentos iniciais sugerem que a associação do canto com imagens de fêmeas apresentando comportamento de cópula melhora o aprendizado em mandarins juvenis (CAROUSO-PECK; GOLDSTEIN, 2019). Ademais, machos criados por fêmeas surdas apesar de cantarem mais, possuem canções menos estereotipadas com sílabas atípicas (WILLIAMS, 2004). A relação entre filhotes também pode influenciar a trajetória do desenvolvimento vocal (TCHERNICHOVSKI; NOTTEBOHM, 1998). Em ninhadas com mais de um filhote macho, o animal mais novo é normalmente o primeiro que canta e no final apresenta uma melhor similaridade ao canto do pai (TCHERNICHOVSKI; NOTTEBOHM, 1998). Estes resultados podem estar relacionados com a quantidade de testosterona que parece ser mais alta nos filhotes mais novos (SCHWABL, 1993). Alternativamente, a presença de outros modelos *i.e.* dos irmãos, pode afetar na imitação do canto em indivíduos que vocalizam mais tarde (TCHERNICHOVSKI; NOTTEBOHM, 1998). Concomitante, estes resultados mostram que a aquisição do canto em mandarins é influenciada não somente pelo modelo auditivo, mas talvez possa ser influenciada pelo comportamento de animais presentes no mesmo ambiente, além, é claro, do tutor (CLAYTON, 1987; CAROUSO-PECK; GOLDSTEIN, 2019).

Experimentos com tutoramento controlado corroboram com a ideia da influência do contexto social no aprendizado do canto (DERÉGNAUCOURT et al., 2013). Mandarins juvenis tendem a ter um aprendizado reduzido se o modelo for proveniente de playback quando comparados com o tutor ao vivo. Além disso, o aprendizado parece ser melhor quando os animais controlam o playback, em um procedimento ativo, comparado com playbacks passivos (DERÉGNAUCOURT et al., 2013). Sugere-se que estas interações sociais podem alterar a

saliência do estímulo, modificando processos atencionais e portanto a formação de memórias auditivas (GOLDSTEIN; KING; WEST, 2003).

Mandarins quando isolados desenvolvem um canto com características anormais (PRICE, 1979). A estabilidade da nota e o padrão temporal do canto permanecem normais da espécie. Este canto, porém, apresenta pouca variação das notas e médias mais altas de frequência e duração das notas (PRICE, 1979). Estes animais isolados ainda conseguem incorporar novos elementos em seu canto quando apresentados a um tutor quando adultos (MORRISON; NOTTEBOHM, 1993). Sugere-se que a ausência de modelos vocais atrasa o fechamento do período crítico de aprendizado (BRAINARD; DOUPE, 2002; MORRISON; NOTTEBOHM, 1993).

## **2.5. Aprendizado vocal e discriminação**

Existem dois tipos de aprendizados importantes no processo de desenvolvimento vocal nos mandarins. O aprendizado de desempenho, onde o animal juvenil incorpora elementos do canto do tutor. E a capacidade de discriminar vocalizações, cujo objetivo é identificar outros indivíduos coespecíficos (CLAYTON, 1988). Esses dois tipos de aprendizados são distintos, visto que a discriminação é puramente sensorial, e o aprendizado de desempenho trata-se de um processo sensório-motor (CLAYTON, 1988). No entanto, o processo no qual os sons são percebidos, discriminados e utilizados para coordenar interações sociais durante a vida, não está totalmente esclarecido (STRIPLING et al., 2003).

A capacidade discriminatória dos mandarins pode ser afetada pelo seu contexto social. De modo geral, juvenis que crescem junto com o tutor apresentam uma preferência pelo seu canto (CLAYTON, 1987; RIEBEL; SMALLEGANGE, 2003). Porém, animais que são isolados antes do 25º dia de vida não apresentam essa preferência (CLAYTON, 1988). Sugere-se que mesmo o animal possuindo uma capacidade discriminativa, não consegue aprender o suficiente para discernir o canto do tutor dentre outros indivíduos (CLAYTON, 1988). Além disso, um estudo com mandarins juvenis isolados do tutor, aponta que esses animais não apresentam perda na sua capacidade discriminatória (BRAATEN; PETZOLDT; COLBATH, 2006) . No entanto, outro experimento mostrou que animais que continuam com a mãe e irmãos depois da retirada do tutor, apresentam discriminação normal para notas e razão de frequências, mas apresentaram déficit na discriminação da frequência de alcance quando comparados a animais criados em condições normais, *i.e.*, em uma unidade familiar. Enquanto que animais isolados

da unidade familiar apresentam uma diminuição da discriminação para esses três fatores, *i.e.*, frequência de alcance, razão de frequências e notas. Os autores sugerem que o isolamento além de desenvolver cantos anormais pode afetar a percepção auditiva do animal (STURDY et al., 2001). Ademais, juvenis mudos não apresentam preferência por cantos familiares, sugerindo que a prática do próprio canto também pode influenciar os processos discriminatórios (PYTTE; SUTHERS, 1999). Porém não está muito claro se esse déficit é decorrente de alterações na capacidade perceptual ou é simplesmente uma falta de motivação do próprio animal (STURDY et al., 2001). Pois além da percepção, a escuta, atenção e motivação fazem parte das habilidades requeridas para os animais discriminarem sons de maneira precisa (STURDY et al., 2001).

Mandarins juvenis criados pela própria espécie, possuem uma preferência para sons coespecíficos em comparação a hétero-específicos. Esta preferência sugere que o sistema auditivo possui especializações inatas às particularidades acústicas da sua própria espécie (MARLER, 2004). No entanto, experimentos iniciais mostraram que animais criados por *cross-fostering* apresentam uma diminuição na preferência por cantos coespecíficos. Os autores apontam que exposição a cantos diferentes da espécie durante o desenvolvimento, poderia gerar um distúrbio na sua capacidade discriminatória (CAMPBELL; HAUBER, 2009a). Indicando que, mesmo com predisposições da espécie, a experiência social pode influenciar no processo discriminativo do animal (TER HAAR et al., 2014).

Ademais, o desempenho auditivo dos mandarins pode estar relacionado ao seu desenvolvimento. Moore e colaboradores (2019) demonstraram que a codificação sensorial em alguns neurônios auditivos de mandarins adultos, pode ser significativamente alterada com a manipulação da experiência vocal durante o desenvolvimento. Mais especificamente, mandarins criados em condições normais possuem, a nível neuronal, uma maior percepção e taxa de disparo em neurônios auditivos, quando comparados com mandarins criados através do *cross-fostering* (MOORE; WOOLLEY, 2019). Sugerindo que, durante o desenvolvimento, a experiência com diferentes tipos de sons naturais pode regular substancialmente a habilidade de codificação da informação de neurônios auditivos. Além disso, mandarins adultos são melhores para discriminar chamadas vocais que possuem diferentes frequências comparado com juvenis (MILLER-SIMS; BOTTJER, 2012). Indicando que, assim como os bebês humanos, os mandarins dependem da experiência social e maturação de determinados circuitos neurais para obterem uma melhor capacidade perceptual (MILLER-SIMS; BOTTJER, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

Objetivo Geral: Analisar como o isolamento social ou a limitação da prática vocal afetam a discriminação auditiva no Mandarim-Diamante (*Taeniopygia guttata*).

Objetivo específico 1: Investigar os efeitos da limitação do ato de cantar durante o desenvolvimento na habilidade de discriminação auditiva.

Objetivo específico 2: Investigar os efeitos da privação social na capacidade discriminativa do mandarim.

#### **4. MÉTODOS GERAIS:**

**4.1. Animais:** Pássaros Mandarin (*Taeniopygia guttata*) foram obtidos do aviário do Instituto do Cérebro da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e mantidos em um ciclo claro/escuro de 14:10. Os pássaros foram acondicionados em gaiolas de 58.5 x 35.5 x 28 cm com luzes acesas às 06:00 horas, acesso livre a comida (sementes e água mineral), temperatura de 26° Celsius e 60% de umidade.

**4.2. Condições sociais durante o desenvolvimento do canto:** Mandarins machos foram divididos em quatro grupos experimentais.

Grupo 1 - Controle: animais foram mantidos com sua família, *i.e.*, os pais e filhotes mantidos juntos, em gaiolas expostas a todo aviário (**Fig. 4**).

Grupo 2 - Impedido: animais foram impossibilitados de cantar durante o período sensório-motor através da colocação de pesos entre 5g – 20g em seus pescoços (HAYASE et al., 2018; HOESE et al., 2000). Esses pesos foram envolvidos em um tecido flexível e um elástico de borracha para uma melhor manipulação e para que os animais não fossem machucados pelo aparato. Este procedimento permitiu que os animais alimentassem normalmente, porém, por alterar a postura, eles tinham dificuldade de cantar, pois não conseguiam assumir a postura necessária para a produção do canto. Os pesos foram colocados somente durante o dia (período claro) a partir do 45º dia de vida. Em um período inicial, de habituação, os animais usaram o peso durante 4 horas e uma vez habituados, este período foi estendido em 1hr por dia até atingir o limite de 8 horas/dia. A manipulação foi adaptada de Hayase e colaboradores (2018), devido ao estresse causado nos animais com a colocação de pesos maiores e um tempo maior de uso. Os animais experimentais foram pesados semanalmente para monitorar eventuais perdas de peso devido ao procedimento. Além disso, eles podiam ver e ouvir seus tutores normalmente durante o desenvolvimento.

Grupo 3 - Isolado: animais foram mantidos em isolamento social. A partir do 15º dia de vida o pai foi retirado para evitar qualquer exposição ao canto de machos adultos. No dia 35º as mães foram retiradas para evitar contato com outro animal. Neste contexto, os filhotes ouviram outros mandarins do aviário, porém estavam visualmente isolados prevenindo assim o aprendizado do canto (**Fig. 7**; PRICE, 1979).

Grupo 4 - Controle Isolado: animais foram mantidos em isolamento social a partir do 35º dia de vida para evitar qualquer exposição ao canto de machos adultos após a memorização do

modelo auditivo proveniente do pai. Ou seja, foram mantidos em isolamento social pelo mesmo tempo em que os animais do grupo 3, mas tiveram a possibilidade de aprender com um tutor por um tempo, *i.e.*, início do período sensorial (**Fig. 10**; BÖHNER, 1990).

### 4.3. Análises comportamentais

**4.3.1. Aprendizado do canto:** as gravações de som, ou seja, os comportamentos vocais, foram analisados para quantificar: (1) o grau de similaridade do canto comparado ao tutor; (2) a estereotipia do canto no decorrer do desenvolvimento, *i.e.*, consistência das vocalizações; (3) a estrutura do canto no decorrer do desenvolvimento, *i.e.*, sonogramas.

Os cantos, *i.e.*, episódios, foram gravados através do software especializado SAP 2011 (Sound Analysis Pro; <http://soundanalysispro.com>; TCHERNICHOVSKI et al., 2000), e segmentados em motivos através dos softwares RavenLite (The Cornell Lab) e Matlab (Mathworks Inc., EUA). Os primeiros 50 motivos do dia foram analisados através do SAP 2011, usando parâmetros de comparação padrão, *i.e.*, análise assimétrica quando comparado ao tutor, e simétrica quando comparado às próprias vocalizações. Este software faz uma análise espectral e calcula um conjunto de características físicas do canto, gerando uma tabela com as características acústicas dessa comparação, que são definidas da seguinte maneira:

Amplitude - “forma de onda do som, é o desvio absoluto do zero”;

Pitch - “medida do período de oscilação”;

Frequência Média - “avalia o centro da distribuição de energia nas frequências”;

Goodness of Pitch - “estimativa da periodicidade do pitch harmônico”;

Entropia de Wiener - “medida da largura e uniformidade do espectro de potência”;

Duração da Sílabas - “tempo em milissegundos da sílaba”.

Essas características, por sua vez, resumem a estrutura acústica do canto analisado.

**4.3.2. Discriminação auditiva:** para determinar a capacidade discriminatória auditiva, animais experimentais e controles foram submetidos a um teste de discriminação conforme Tokarev & Tchernichovski (2014). Animais foram levados para uma câmara de isolamento acústico e colocados em uma gaiola especialmente desenhada para o teste de discriminação auditiva (**Fig. 6**). Este aparato possuía um poleiro circular em frente a uma janela que permitia a visualização de um outro indivíduo que servia como estímulo motivacional para o animal a ser testado. No momento que o pássaro pousava no poleiro um sensor de movimento (infravermelho) era acionado e um de dois cantos era tocado (pseudo-randomizado): um neutro (estímulo social) e

um aversivo (estímulo aversivo). Quando o canto era o “aversivo”, um sopro de ar era lançado em direção ao pássaro se o animal continuasse no poleiro após o início do canto. O animal tinha em torno de 2.0 segundos para evitar a punição deixando o poleiro. Já quando o canto tocado era o “neutro”, nada acontecia e o animal poderia continuar no poleiro. Com isso, estipulamos uma taxa de discriminação, onde foi considerado como certo escapar ao som aversivo e ficar ao som neutro (taxa de discriminação = (% escapadas no aversivo + % ficadas no neutro) /2). Cada animal foi submetido a 3 sessões diárias de uma hora de duração, totalizando 30 sessões em aproximadamente 10 dias.

**4.3.3. Teste de interação social:** Para investigar se um determinado grupo aprendia mais rapidamente a discriminar pela falta de estímulo social ou do aprendizado sensorial durante o desenvolvimento, foi feito um teste de interação social. Esse teste teve como objetivo analisar a motivação do animal frente a um estímulo social. Os animais foram levados para uma câmara de isolamento acústico e colocados em uma gaiola especialmente desenhada para o teste. A gaiola continha três câmaras (A, B e C), divididas por uma placa com uma janela lateral. Na câmara B ficava o animal teste, contendo dois poleiros em T (1 e 2) cada um voltado para uma janela, para visualização da câmara ao lado. Enquanto que o animal observador (estímulo social), ficava em uma das câmaras laterais (A ou C) (**Fig. 15A**). O animal teste era levado para a gaiola um ou dois dias antes do teste para habituação do espaço, e após esse tempo, o animal observador era colocado randomicamente em uma das câmaras laterais durante uma hora. Em seguida o observador era retirado e o animal teste ficava por mais uma hora no local. Gravações de vídeos foram feitas uma hora antes, durante e uma hora após o teste, para mensurar o tempo e a quantidade de vezes e em que o animal ficava em determinado poleiro. Além disso, o animal teste foi rastreado através de um programa pelo *Matlab* em todo o momento no qual se encontrava na gaiola, e sensores infravermelhos foram usados em cada poleiro para detecção de engajamento do animal. Animais que não visitaram o poleiro social durante o teste foram excluídos das análises.

## 5. RESULTADOS

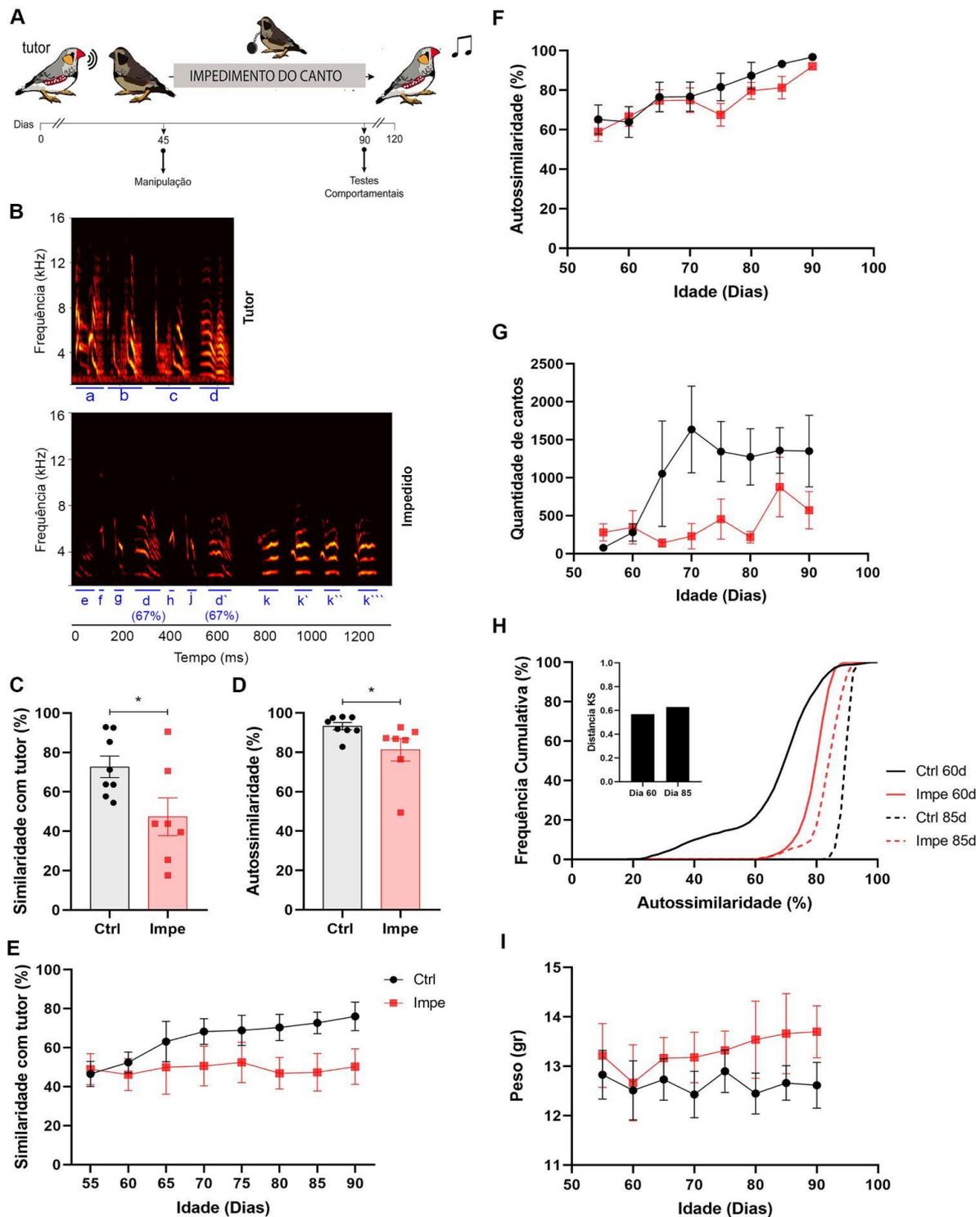
### 5.1. A redução da prática vocal retarda o aprendizado do canto

As respostas auditivas tornam-se progressivamente mais específicas ao próprio canto com a progressão do aprendizado vocal. No entanto, não está claro se a prática vocal influencia no aparecimento destas respostas ou se afeta a percepção auditiva. Por tudo isso, foi desenvolvido um grupo de animais que foram limitados de cantar livremente durante o período sensório-motor, doravante chamados de impedidos (ver **Fig. 4A** para mais detalhes). Este tipo de procedimento atrasa a consolidação do canto, embora não esteja claro se isto afeta a trajetória do mesmo (HAYASE et al., 2018). Para limitar os mandarins juvenis de cantarem livremente nós adaptamos o protocolo de Hayase e colaboradores (2018), e gravamos o canto destes animais periodicamente. É possível observar que o grupo impedido canta significativamente menos do que o grupo controle (**Fig. 4G**; Mann-Whitney, duas caudas;  $p=0,0406$ ;  $n= 8$  e  $7$ , controle e impedido respectivamente), mostrando que o procedimento experimental foi eficiente na prevenção do ato de cantar. Esses cantos foram então comparados com o canto do seu tutor para determinar o grau de aprendizado. Comparações dos sonogramas apontam que, mesmo com as limitações impostas, há certa similaridade entre o canto do animal impedido e seu tutor (**Fig. 4B**; por exemplo 67% para a sílaba “d”). A similaridade dos cantos ao final do período de aprendizado vocal (dia 85 de vida neste caso, porque infelizmente problemas técnicos impediram a avaliação do dia 90) mostra que o grupo impedido produz cópias inferiores às cópias do grupo controle (**Fig. 4C**;  $72,69 \pm 5,47$ ;  $47,36 \pm 9,58$ ; Mann-Whitney, duas caudas,  $p= 0,0371$ ; Média  $\pm$  Erro Padrão). Além disso, a autossimilaridade, i.e., estereotipia do canto, no dia 85 é menor do que o grupo controle (**Fig. 4D**;  $93,26\% \pm 1,82$ ;  $81,31\% \pm 5,66$ ; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,0205$ ; Média  $\pm$  Erro Padrão), indicando que neste dia existe uma maior variação entre iterações do canto no grupo impedido.

Para avaliar o desenvolvimento vocal nesses animais foi realizada uma análise da similaridade com o tutor em diferentes idades. Como esperado, o grupo controle apresenta uma melhora gradativa no decorrer dos dias, enquanto que o grupo impedido permanece abaixo dos 55% (**Fig. 4E**; Two-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Em contraste a similaridade ao tutor, a estereotipia do canto aumenta com a progressão do desenvolvimento em ambos os grupos. Ou seja, existe

uma crescente consolidação do canto à medida que o animal vai se desenvolvendo, independente da redução da prática vocal (**Fig. 4F**; Two-way ANOVA,  $p=0,5301$ ).

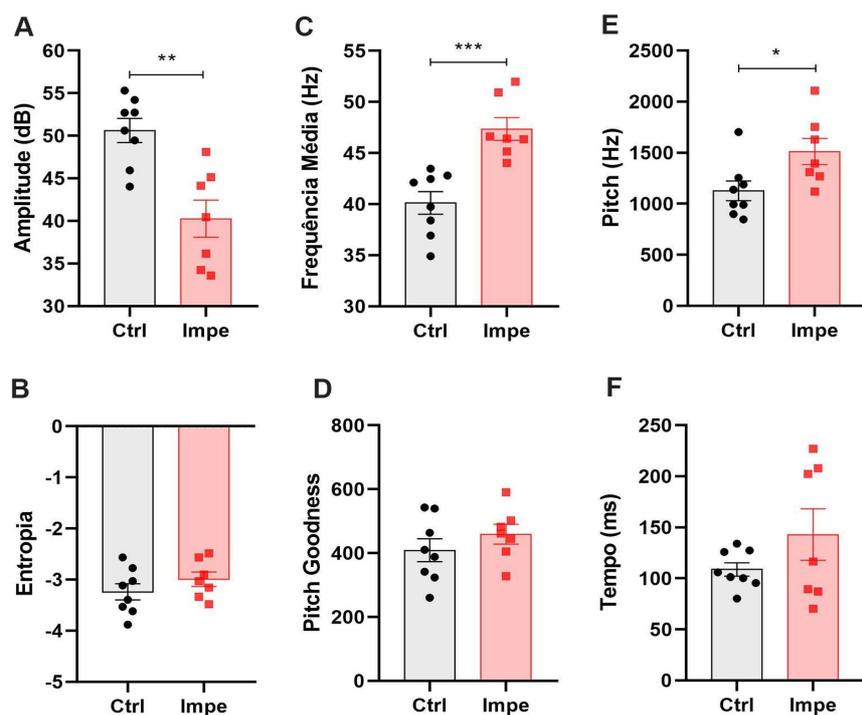
De modo a avaliar se existe uma diferença no canto em dias consecutivos, análises de frequência cumulativa em dois momentos do desenvolvimento, foram realizadas. Esses dias são pontos importantes no desenvolvimento do animal, *i.e.*, período plástico (60 dias) e período de cristalização do canto (90 dias). Com isso, é possível observar que nos dias 60 x 61, ambos os grupos possuem uma média acima de 65% (**Fig. 4H**; 67,23%  $\pm$ 0,27; 80,11  $\pm$ 0,09; controle e impedido respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão). Enquanto que nos dias 85 x 86, o grupo controle teve um aumento significativo na média, ao contrário do grupo impedido que se manteve semelhante aos dias 60 x 61 (**Fig. 4H**; 90,24%  $\pm$ 0,03; 84,37%  $\pm$ 0,10; controle e impedido respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão). Para estimar a diferença entre as duas curvas, foi feita uma análise da distância entre as curvas do grupo controle em relação ao grupo impedido. Esta avaliação mostra que a diferença nos dias 60 x 61 é de 0,5695, e para os dias 85 x 86 é de 0,6296 (**Fig. 4H, inset**; Distância de Kolmogorov–Smirnov;  $p<0,0001$ ). É possível observar um aumento na distância das curvas com o passar do desenvolvimento, sugerindo uma divergência na trajetória do aprendizado vocal dos dois grupos. Além disso, é importante ressaltar que os animais foram pesados semanalmente para avaliar possíveis perdas de peso devido ao procedimento. Todavia, é possível observar que os animais impedidos são mais pesados que animais controle, indicando que o procedimento não gerou graves consequências na saúde dos animais experimentais (**Fig. 4I**; Mann-Whitney, duas caudas;  $p=0,0011$ ;  $n=4$  e 3 para controle e impedido respectivamente).



**Figura 4. A prática vocal influencia no aprendizado do canto.** A) Desenho esquemático mostrando a manipulação da prática vocal em mandarins juvenis; B) Sonogramas comparando o canto do tutor com o seu aprendiz impossibilitado de cantar; letras indicam as sílabas e percentual indica o grau de semelhança com a sílaba equivalente do tutor; C-D) Aprendizado vocal demonstrando a similaridade ao tutor e a autossimilaridade aos dias 85 de idade, respectivamente. E-F) Curva do aprendizado e

estereotipia do canto ao longo do desenvolvimento, respectivamente. G) Quantidade de cantos por dia ao longo do desenvolvimento; H) Frequência cumulativa mostrando o aumento na estabilidade vocal dos animais entre 60 (linha contínua) e 85 (linha pontilhada) dias de idade; linha preta e vermelha, representam grupo controle e impedido respectivamente; *Inset*, mostra a distância de Kolmogorov-Smirnov entre as curvas dos grupos controle e impedido aos 60 e 85 dias de idade; I) Peso corporal dos animais durante o desenvolvimento. Ctrl., controle; Impe., impedido. \*  $p \leq 0.05$ .

Para uma melhor avaliação do canto de animais impedidos, análises das características espectrais individuais do canto foram realizadas. Enquanto que as análises de similaridade e autossimilaridade fazem uma comparação global das diferentes propriedades físicas do canto, esta avaliação é mais específica por fazer uma média dos componentes espectrais do canto. Por tudo isso, é possível observar que existe uma diferença significativa na amplitude, na frequência média e no *pitch* do canto dos animais impedidos quando comparado aos controles (**Fig. 5A, C e E**; Mann-Whitney, duas caudas;  $p=0,0037$ ;  $p=0,0003$ ;  $p=0,0205$ ; para amplitude, frequência média e *pitch* respectivamente;  $n=8$  e  $7$  para controle e impedido respectivamente). Enquanto não foram observadas diferenças na entropia, no *pitch goodness* e na duração das sílabas destes animais (**Fig. 5B, D e F**; Mann-Whitney, duas caudas;  $p=0,3357$ ;  $p=0,3969$ ;  $p=0,7789$ ; para entropia, *pitch goodness* e duração da sílaba respectivamente). Juntos, estes resultados corroboram com uma ideia de um déficit no aprendizado vocal dos animais impedidos de cantar.

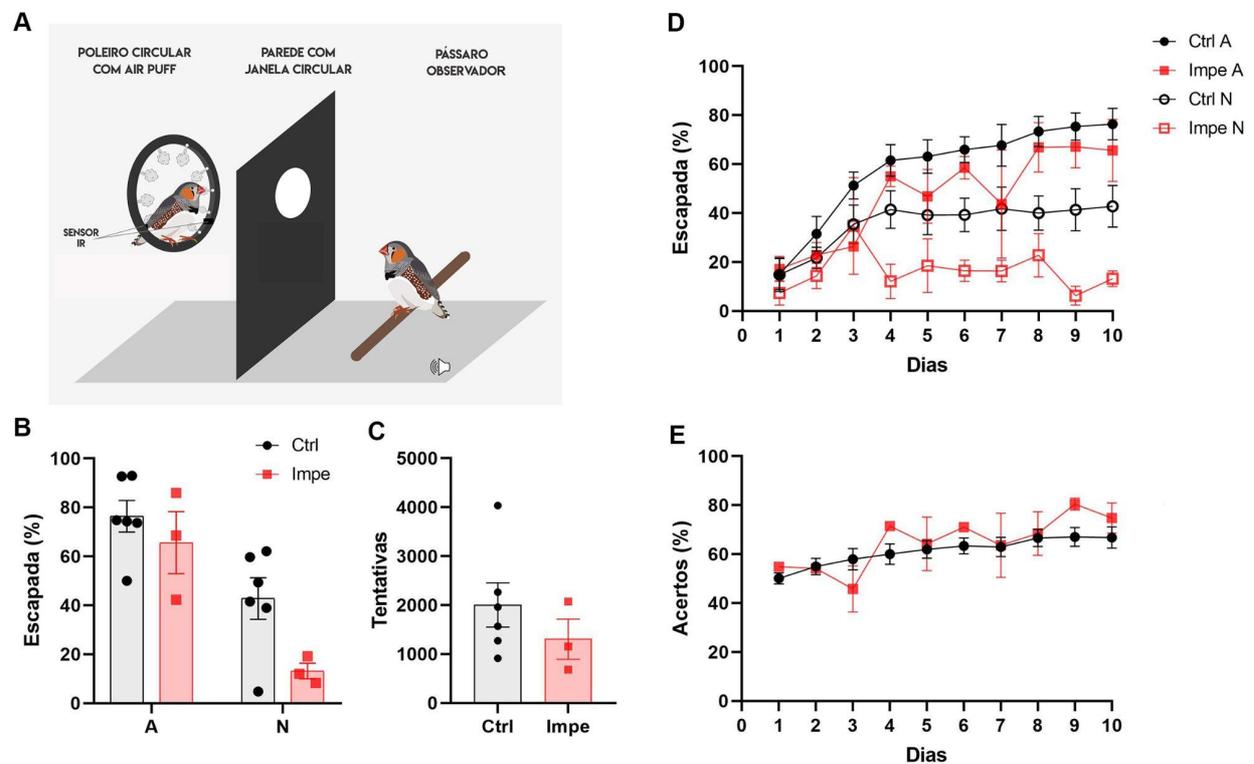


**Figura 5. O impedimento da prática vocal altera características espectrais do canto.** O impedimento do ato de cantar altera a Amplitude (A), Frequência média (C) e o *Pitch* (E), mas não afeta a Entropia de Wiener (B), *Pitch goodness* (D) e a Duração da sílaba (F). n=8 e 7 para controle e impedido, respectivamente. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

## 5.2. A redução da prática vocal não altera a discriminação auditiva

Para investigar se a prática do canto influencia na percepção auditiva dos mandarins, submetemos animais impedidos a um teste de discriminação. Resumidamente, o teste se baseia na discriminação de dois cantos, um associado com um estímulo aversivo e outro com um estímulo neutro (TOKAREV & TCHERNICHOVSSKI, 2014). O animal por sua vez, caso consiga discriminar entre os cantos, deve aprender a escapar do estímulo aversivo e ficar no estímulo neutro (**Fig. 6A**). É possível observar que no último dia do teste ambos os grupos possuem uma taxa de escapadas ao som aversivo acima de 65% (**Fig. 6B**; 76,39%  $\pm$  6,45; 65,60%  $\pm$  12,68; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,3810$ ; Média  $\pm$  Erro Padrão), e abaixo de 45% ao som neutro (**Fig. 6B**; 42,76%  $\pm$  8,49; 13,17%  $\pm$  3,18; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,1667$ ; Média  $\pm$  Erro Padrão), indicando que ambos os grupos aprendem a tarefa. É importante ressaltar que não existe uma diferença significativa na quantidade de tentativas entre os grupos (**Fig. 6C**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,3810$ ). Além disso, a taxa de escapadas ao canto aversivo ao longo do treinamento mostra uma curva de aprendizado

semelhante entre animais controle e impedidos. Ambos os grupos começam com uma baixa taxa de escapadas e entre o terceiro e quarto dia de treinamento, atingem taxas acima de 50% (**Fig. 6D**; Two-way ANOVA,  $p=0,7421$ ). Em contraste, a taxa de escapadas ao som neutro mostra que o grupo controle têm um aumento inicial, permanecendo abaixo de 45%, enquanto que o grupo impedido permanece abaixo dos 35% (**Fig. 6D**; Two-way ANOVA,  $p=0,1406$ ). Para considerar simultaneamente as respostas ao canto aversivo e neutro, analisamos a taxa de discriminação. Com isso, é possível observar que ambos os grupos apresentam uma curva de aprendizado semelhante, aumentando a taxa de acertos no decorrer dos dias (**Fig. 6E**; Two-way ANOVA,  $p=0,0894$ ). Estes resultados, portanto, sugerem que a limitação da prática vocal não leva a defeitos na discriminação.



**Figura 6. Limitação da prática vocal não influencia na discriminação auditiva.**

A) Desenho esquemático do aparato de discriminação; B) Taxa de escapadas aos sons aversivo e neutro no último dia de teste; C) Número total de tentativas; D-E) Percentual de escapadas aos sons aversivo e neutro (D), e taxa de discriminação (E) ao longo do teste.  $n=6$  e  $3$  para controle e impedido respectivamente. A, aversivo; N, neutro; Ctrl, controle; Impe, impedido; IR, infravermelho.

### 5.3. Ausência de um tutor impede o aprendizado do canto

O aprendizado do canto parece moldar as respostas de neurônios auditivos em pássaros canoros (COUSILLAS et al., 2004; MOORE; WOOLLEY, 2019; PHAN; PYTTE; VICARIO, 2006; YANAGIHARA; YAZAKI-SUGIYAMA, 2019). No entanto, não está claro se estas mudanças são acompanhadas por alterações na capacidade perceptual destes animais. Para investigar esta possibilidade nós geramos um grupo de animais que não foram expostos a um modelo auditivo (doravante chamados de isolados) e avaliamos o efeito do aprendizado do canto na discriminação auditiva. É importante lembrar que animais isolados não desenvolvem vocalizações normais (PRICE, 1979). Por isso, os animais foram gravados periodicamente e comparados a animais controle, *i.e.*, pássaros que cresceram na presença de um tutor como uma unidade familiar (ver **Fig. 7A** para mais detalhes). Para determinar o grau de aprendizado, o canto de cada animal foi analisado ao término do desenvolvimento vocal (~90 dias de idade) e comparado ao canto do seu tutor, *i.e.*, similaridade com o tutor, no caso dos isolados foi o pai biológico. O índice de similaridade mostra que existe um efeito significativo do isolamento no aprendizado do canto (**Fig. 7C**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,0016$ ;  $n=6$  e  $9$  para controle e isolado respectivamente). Mais especificamente, animais controle apresentam elementos acústicos semelhantes ao tutor, claramente evidenciados pela presença de sílabas em comum (**Fig. 7B**; 70% e 77% de similaridade, para as sílabas “c” e “d” respectivamente). Em contraste, animais isolados não apresentam sílabas em comum com o seu pai, embora apresentem algumas notas prototípicas da espécie (**Fig. 7B**; 85% de similaridade para o fragmento “y”). Estes cantos são caracterizados por sílabas alongadas e de maior modulação da amplitude, que são comumente encontradas em animais crescidos nestas condições (PRICE, 1979). Estes pássaros, obviamente, apresentam cantos com baixa similaridade ao tutor (**Fig. 7C**;  $30,33 \pm 6,20$  versus  $76,07 \pm 7,33$  para isolado e controle respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão). Confirmando que de fato a ausência de um tutor, *i.e.*, modelo acústico, leva a defeitos no aprendizado vocal.

Para uma melhor avaliação do aprendizado vocal, foram realizadas análises de similaridade ao longo do desenvolvimento. É possível notar que o grupo isolado apresenta diferenças significativas em quase todos os dias avaliados do desenvolvimento quando comparado ao grupo controle (**Fig. 7E**; Two-way ANOVA,  $p < 0.0001$ ;  $n=8$  e  $9$  para controle e isolado respectivamente; Sidak *post hoc*; para detalhes ver **Tabela 1**). Estes resultados mostram que,

como esperado, as vocalizações de mandarins não mostram uma progressão gradual com o tempo quando não são apresentados a um tutor durante o desenvolvimento.

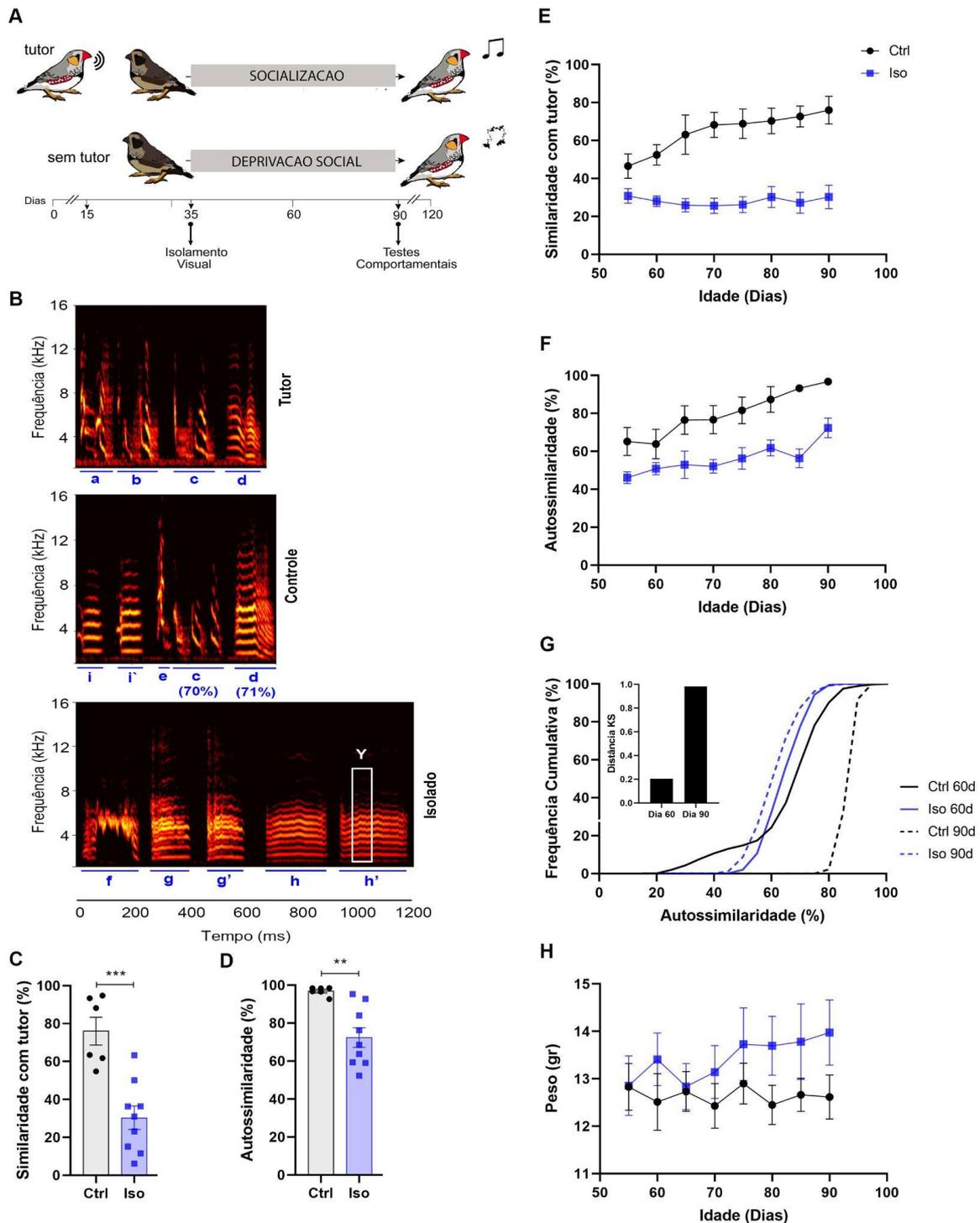
Embora os escores de similaridade possam indicar aprendizado ou defeito de aprendizado, animais isolados não possuem um modelo auditivo e, portanto, a comparação com o pai biológico não é muito adequada. Desta forma, foram realizadas comparações com o próprio canto. A autossimilaridade é informativa para avaliar o desenvolvimento das vocalizações, pois permite estimar a ontogenia do canto independente da existência ou não de um modelo auditivo. Espera-se que à medida que o canto progride, haja uma diminuição na variabilidade entre iterações (WILLIAMS, 2004). A estabilidade das vocalizações dos animais ao término do aprendizado, mostra que o grupo isolado difere marcadamente em relação ao grupo controle (**Fig. 7D**;  $72,35 \pm 5,17$  versus  $96,82 \pm 0,91$  para isolado e controle, respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,0016$ ;  $n= 6$  e  $9$  para controle e isolado respectivamente). A alta variabilidade entre iterações do canto indica que animais isolados ainda não consolidaram o seu canto. Isto contrasta com animais controle que apresentam um canto altamente estereotipado nesta idade (**Fig. 7D**). No entanto, é possível observar um aumento gradual na autossimilaridade em ambos os grupos (**Fig. 7F**). Este aumento sugere que mesmo produzindo canções anormais, animais isolados ainda mostram desenvolvimento vocal, embora retardado, típico da espécie. Sugerindo que componentes inatos contribuem para a progressão do canto ao longo do desenvolvimento (MARLER, 2004).

Para obtermos uma ideia mais clara da estereotipia dos cantos desses animais, analisamos a estabilidade do canto em dias consecutivos durante o desenvolvimento. É possível observar que entre os dias 60 e 61, ambos os grupos possuem metade dos índices de autossimilaridade acima de 65% (**Fig. 7G**;  $66,36\% \pm 0,14$ ;  $67,23\% \pm 0,27$  para os grupos isolado e controle respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão). Não obstante, aos 90 dias, o grupo isolado mantém seus valores similares aos dias 60 e 61, enquanto que o grupo controle aumenta acima de 85% (**Fig. 7G**;  $63,10 \pm 0,16$ ;  $88,64\% \pm 0,05$  para os grupos isolado e controle respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão). Sugerindo que os animais controle conseguiram desenvolver e padronizar seus cantos, enquanto que os animais isolados não obtiveram o mesmo sucesso mesmo após terem atingido idade adulta, por apresentarem uma maior variação do canto em dias consecutivos. Mais especificamente, ao quantificar a distância das curvas do grupo controle em relação ao isolado, é possível observar uma diferença significativa entre as mesmas (**Fig. 7G, Inset**;

Distância de Kolmogorov–Smirnov= 0,2031 e 0,9820 para os dias 60 versus 61 e 90 versus 91, respectivamente;  $p < 0,0001$ ;  $n=6$  e  $7$ , isolado e controle respectivamente). Notadamente, os valores da distância entre os grupos nos dias 60 x 61 é menor quando comparada aos dias 90 x 91, provavelmente por causa do período em que os animais se encontravam que são naturalmente variáveis (*i.e.* período plástico). Ademais, assim como os animais impedidos, os animais isolados são mais pesados que o grupo controle (**Fig. 7I**; Two-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ;  $n=4$  e  $5$  para controle e isolado respectivamente), indicando que o procedimento não gerou consequências negativas na saúde dos animais.

**Tabela 1. Comparação estatística da taxa de similaridade ao longo do desenvolvimento entre animais controle e isolado.** Valores significativamente diferentes estão indicados em negrito (Two-Way ANOVA, Sidak *post hoc*).

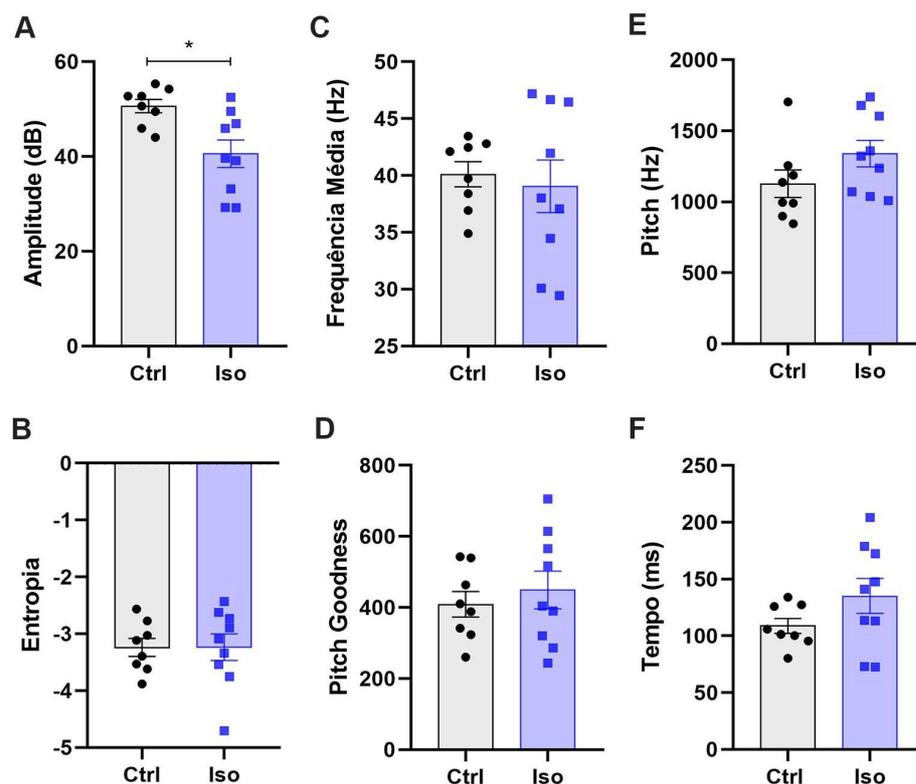
Dias	Controle vs. Isolado
55	0,1349
60	0,0534
65	<b>0,0003</b>
70	<b>&lt;0,0001</b>
75	<b>&lt;0,0001</b>
80	<b>&lt;0,0001</b>
85	<b>&lt;0,0001</b>
90	<b>&lt;0,0001</b>



**Figura 7. Ausência de modelo auditivo interfere no aprendizado vocal.** A) Desenho experimental mostrando a manipulação dos animais; B) Sonogramas comparando o canto do tutor (painel superior) e seus filhotes crescidos normalmente (painel do meio) e em isolamento (painel inferior). As letras indicam as sílabas e o percentual indica a similaridade das mesmas com sílabas do pai biológico (tutor); C-D) Aprendizado vocal mostrando a similaridade ao tutor e a autossimilaridade no dia 90 de vida, respectivamente; E-F) Curvas de similaridade ao tutor e autossimilaridade ao longo do desenvolvimento, respectivamente; G) Frequência cumulativa demonstrando o grau de estabilidade

vocal em dias consecutivos. Linha azul representa o grupo isolado, e linha em preto representa o grupo controle; linha contínua indica os dias 60x61, e linha pontilhada mostra os dias 90x91; *Inset*, distância de Kolmogrov-Smirnov entre as curvas dos animais controle e isolado aos 60 e 90 dias de idade; H) Peso corporal dos animais experimentais ao longo do desenvolvimento. Ctrl, controle; Iso, isolado. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

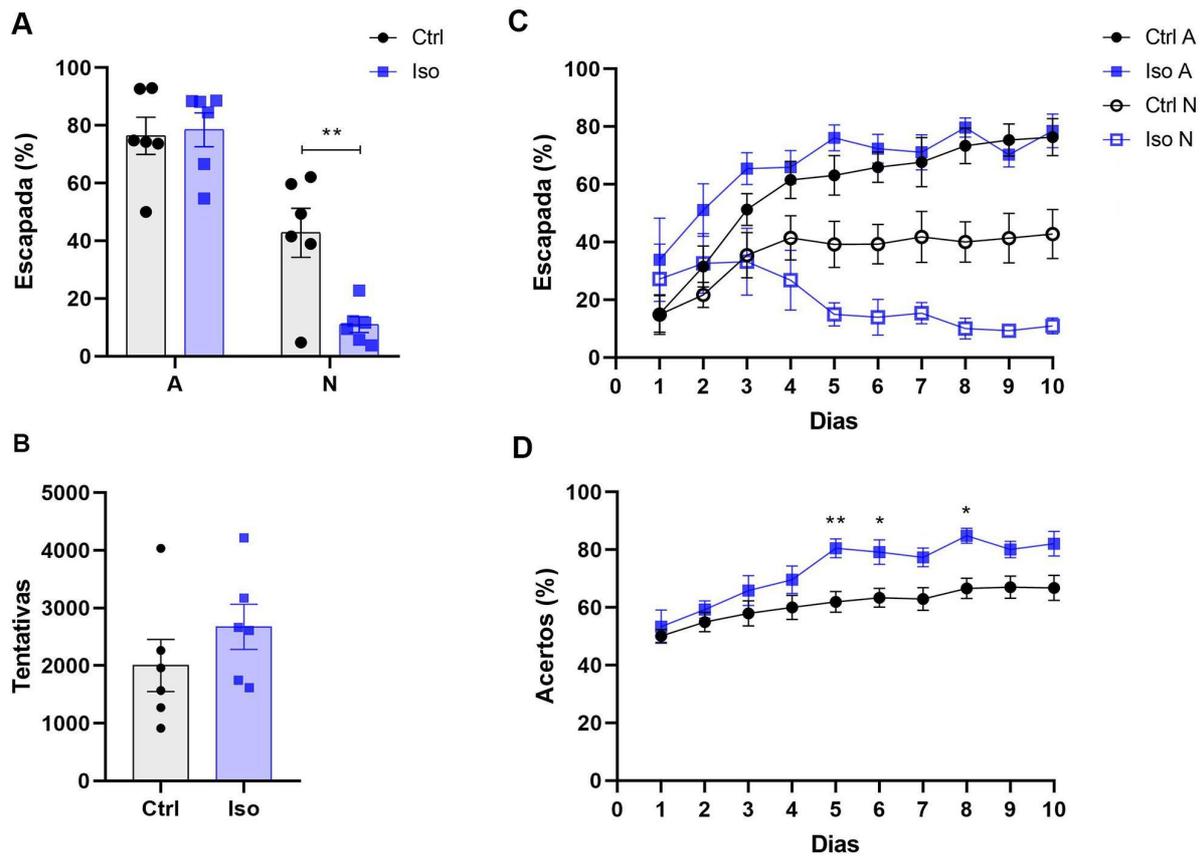
Para uma melhor avaliação dos cantos de animais isolados, foram feitas análises das características espectrais individuais. É possível observar que dentre os parâmetros analisados, a amplitude do canto em animais isolados é significativamente diferente quando comparado aos controles (**Fig. 8A**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p = 0,0111$ ). Enquanto que as demais características, não apresentam diferença entre os grupos (**Fig. 8B-F**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p = 0,7430$ ;  $p = 0,7430$ ;  $p = 0,7430$ ;  $p = 0,0927$ ;  $p = 0,1996$ ; para entropia, frequência média, *pitch goodness*, *pitch* e duração da sílaba, respectivamente). Indicando que mesmo sem um modelo auditivo, o canto desses animais ainda possui características típicas da espécie.



**Figura 8. Características espectrais do canto de mandarins sem modelo auditivo.** Privação social altera a amplitude (A), mas não afeta Entropia de Wiener (B), Frequência média (C), *Pitch goodness* (D), *Pitch* (E) e a Duração da sílaba (F).  $n = 8$  e  $9$  para controle e isolado respectivamente. \*  $p \leq 0.05$ .

#### 5.4. A ausência de um modelo auditivo afeta a discriminação auditiva

Um sistema de comunicação verdadeiro envolve além da produção do sinal (neste caso a vocalização) um receptor que seja capaz de perceber e interpretar o sinal de forma adequada (HAUSER, M. D. & KONISHI, M., 2003). Um dos objetivos deste trabalho é investigar a relação entre aprendizado vocal e a capacidade discriminatória, diferenciando a existência ou não de um modelo auditivo. Por tudo isso, para determinar se a falta de tutoramento poderia influenciar a discriminação em mandarins nós submetemos animais isolados ao teste comportamental de discriminação auditiva. Os grupos controle e isolado possuem uma média acima de 75% na taxa de escapadas no som aversivo (**Fig. 9A**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p > 0.9999$ ; 76,39%  $\pm$  6,45; 78,53%  $\pm$  5,88 para controle e isolado, respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão;  $n = 6$  para ambos os grupos) e abaixo de 45% para o som neutro (**Fig. 9A**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p = 0,0411$ ; 42,76%  $\pm$  8,49 e 10,95%  $\pm$  2,72 para controle e isolado, respectivamente; Média  $\pm$  Erro Padrão). Ou seja, todos os animais tomaram a decisão correta em mais da metade das tentativas no último dia, indicando que eles conseguiram efetivamente aprender a tarefa e distinguir os cantos. No entanto, o grupo isolado parece aprender mais rapidamente e atinge uma média de escapadas acima de 50% ao canto aversivo já no segundo dia de teste, enquanto que o controle atinge essa faixa somente no terceiro dia. Esta diferença, no entanto, não é significativa (**Fig. 9C**; Two-way ANOVA,  $p = 0,2007$ ). Por outro lado, a taxa de escapadas ao som neutro ao longo do teste mostra que o grupo isolado possui a menor média na maioria dos dias (**Fig. 9C**; Two-way ANOVA, Interação grupo vs dia  $p = < 0,0001$ ). Quando se considera simultaneamente as respostas ao canto aversivo e neutro (taxa de discriminação), é possível observar que ambos os grupos aumentam a taxa de acertos no decorrer dos dias. Nota-se, no entanto, que o grupo isolado acerta mais que o grupo controle a partir do quinto dia (**Fig. 9D**; Two-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ; Sidak *post hoc*). Estes resultados sugerem que animais sem o modelo auditivo aprendem a discriminar melhor do que animais controle. É importante ressaltar que não existe uma diferença significativa no número de tentativas entre os grupos (**Fig. 9B**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p = 0,1797$ ), sugerindo que a melhor performance observada no grupo isolado não se deve simplesmente a quantidade de engajamentos no teste.



**Figura 9. Ausência de tutor influencia na discriminação auditiva.** A) Percentual de escapadas aos sons aversivo ou neutro no último dia de teste; B) Número total de tentativas durante o período de testes; C) Percentual de escapadas aos sons aversivo e neutro; D) Taxa de discriminação ao longo do experimento. Em C, símbolos abertos representam as escapadas ao som neutro e fechados representam as escapadas ao som aversivo. A, aversivo; N, neutro; Ctrl, controle; Iso, isolado. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .

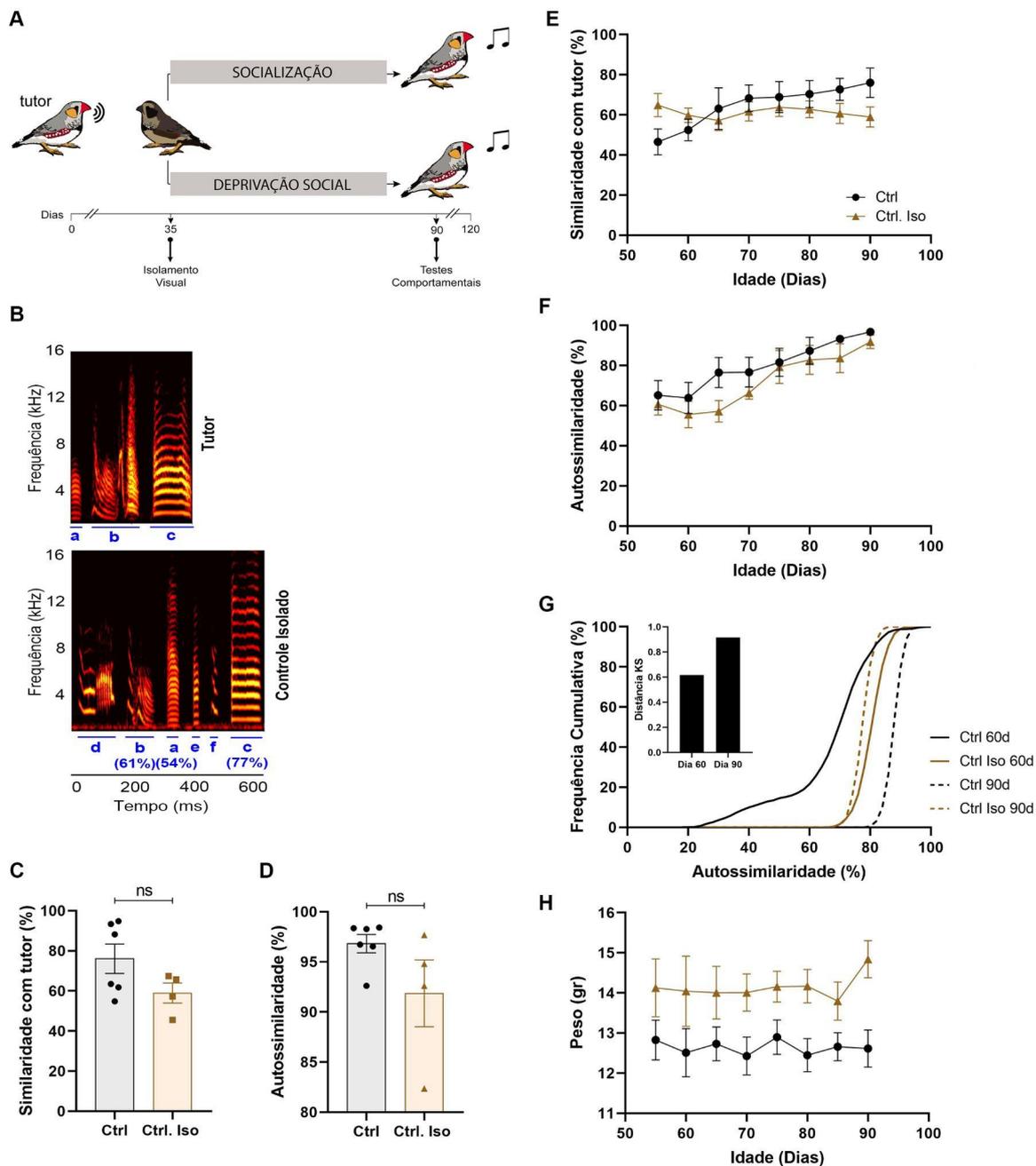
### 5.5. A privação social não altera o aprendizado do canto

Devido aos resultados obtidos, não fica imediatamente claro qual a causa da diferença observada. Isto é, se a melhora da performance no teste de discriminação nos animais isolados foi em decorrência da ausência de tutor ou devido ao isolamento social *per se*. Para desambiguar os resultados, foi gerado um grupo de animais expostos ao tutor até o dia 35 de idade, tempo suficiente para aquisição do modelo (BÖHNER, 1990), e posteriormente isolados até o fim do aprendizado vocal (Fig. 10A). Uma análise rápida mostra que estes animais, assim como animais controle, produzem sílabas com uma boa similaridade ao tutor (Fig. 10B; 54%, 61% e 77% para as sílabas “a”, “b” e “c” respectivamente). Mais importante ainda, não há uma diferença significativa no aprendizado (similaridade) e na estereotipia (autossimilaridade) do canto ao final do período de aprendizado nestes animais (Fig. 10C-D; Mann-Whitney, duas

caudas,  $p=0,3524$  e  $p=0,1714$  para similaridade e autossimilaridade, respectivamente;  $n= 6$  e  $4$ , para controle e controle isolado respectivamente). O resultado final, *i.e.*, aprendizado e estereotipia, portanto parece não ser afetado pelo isolamento social após a memorização do modelo.

Então, para uma avaliação mais detalhada, foi analisado o canto ao longo do desenvolvimento. Os índices de similaridade mostram que existe uma diferença entre os grupos (**Fig. 10E**; Two-way ANOVA,  $p < 0.0001$ ;  $n=8$  e  $4$  para controle e controle isolado, respectivamente), indicando que embora os animais controle isolado conseguiram adquirir um modelo auditivo nos vinte dias em que foram expostos ao tutor, a trajetória do canto parece ser diferente. Por outro lado, a autossimilaridade é semelhante entre os grupos (**Fig. 10F**; Two-way ANOVA,  $p=0.8532$ ), consistente com a produção de um canto estável, o chamado canto cristalizado. Estes resultados, portanto, corroboram a ideia de que o contexto social durante a prática do canto exerce uma influência sutil no desenvolvimento do mesmo. Mais ainda, a estabilidade do canto em dias consecutivos mostra que a distância das curvas de frequência cumulativa são diferentes (**Fig. 10G - Inset**; Distância de Kolmogorov–Smirnov;  $p < 0,0001$ ;  $n=6$  e  $4$ , controle e controle isolado, respectivamente), confirmando os resultados da ontogenia do canto que sugerem trajetórias diferentes de aprendizado. Estes dados indicam que o isolamento social afeta de forma sutil o aprendizado vocal, e confirma observações prévias de que o defeito no aprendizado em animais isolados é devido principalmente a ausência de um modelo acústico, embora existam influências sociais.

Além disso, alguns animais foram pesados semanalmente para verificar possíveis perdas devido a manipulação. Com isso, é possível avaliar que os animais controle isolado não apresentam uma diferença no peso em relação ao grupo controle. Indicando que o procedimento não gerou déficits na saúde dos animais (**Fig. 10H**; Two-way ANOVA,  $p = 0,2327$ ;  $n=4$  e  $5$  para controle e controle isolado respectivamente).

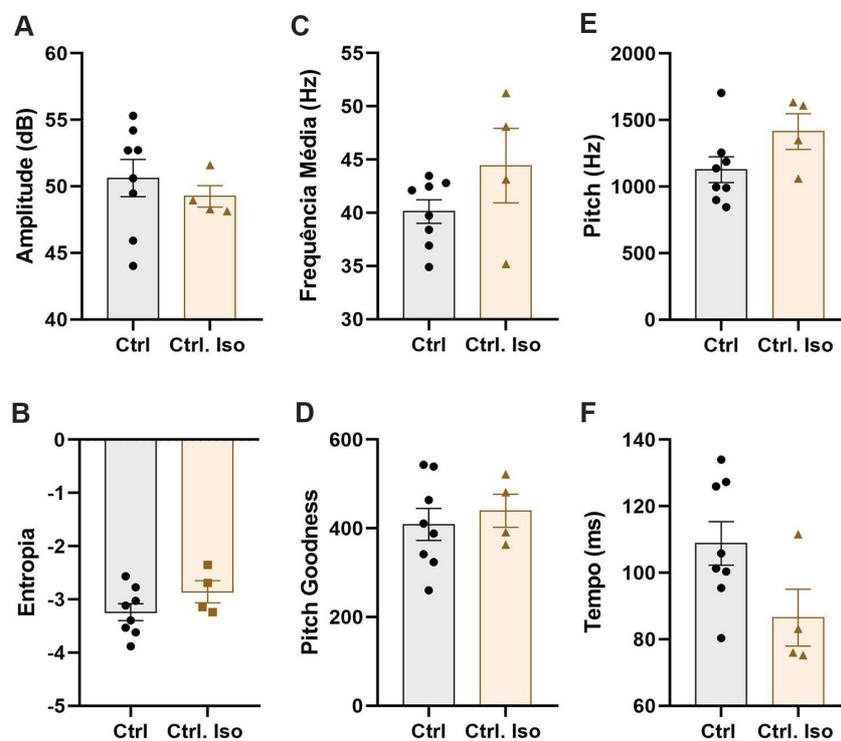


**Figura 10. Experiência social não interfere no aprendizado vocal.**

A) Desenho experimental mostrando a manipulação dos animais; B) Sonogramas comparando o canto do tutor (painel superior) e seu filhote (painel inferior). As letras indicam as sílabas e o percentual indica a similaridade das mesmas com sílabas do tutor; C-D) Aprendizado vocal mostrando a similaridade ao tutor (C) e a autossimilaridade (D) no dia 90 de vida, respectivamente; E-F) Curva de aprendizado vocal (E) e estereotipia do canto (F) ao longo do desenvolvimento, respectivamente; G) Frequência cumulativa demonstrando a estabilidade vocal em dias consecutivos. Linha marrom representa o grupo controle isolado, e linha em preto representa o grupo controle. Linha contínua indica os dias 60x61 e linha pontilhada mostra os dias 90x91; *Inset*, distância de Kolmogorov-Smirnov entre as curvas dos

animais controle e controle isolado aos 60 e 90 dias de idade; H) Peso corporal dos animais experimentais ao longo do desenvolvimento. Ctrl, controle; Ctrl. Iso, controle isolado.

Em seguida, para uma melhor avaliação, foram feitas análises das características espectrais individuais do canto desses animais. É possível observar que não existe uma diferença significativa entre os grupos (Fig. 11A-F; Teste de Mann Whitney, duas caudas,  $p=0,3677$ ;  $p=0,2828$ ;  $p=0,2141$ ;  $p=0,6828$ ;  $p=0,1535$ ;  $p=0,1091$ ; para amplitude, entropia, frequência média, *pitch goodness*, *pitch* e duração da sílaba, respectivamente). Indicando que a manipulação dos animais controle isolados foi de fato bem sucedida.

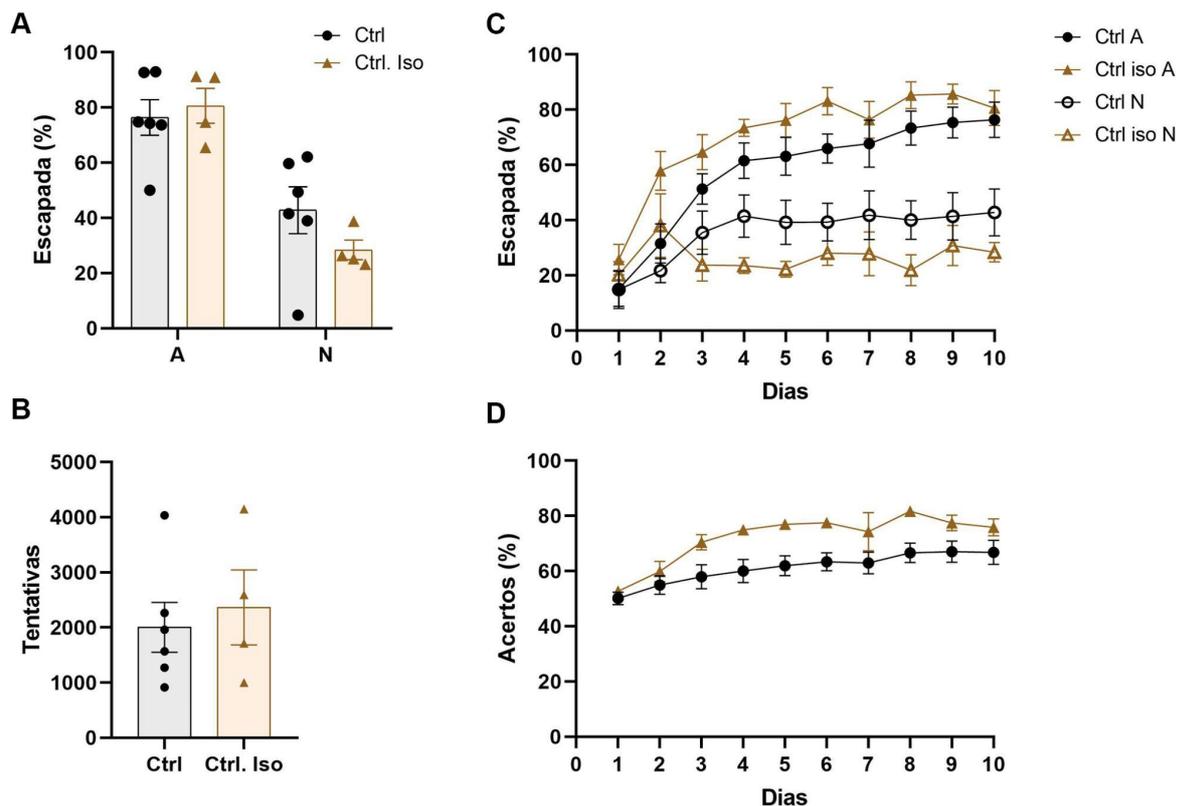


**Figura 11. Características espectrais do canto de mandarins socialmente privados.** Privação social não altera as propriedades acústicas do canto. Amplitude (A), Entropia de Wiener (B), Frequência média (C), *Pitch goodness* (D), *Pitch* (E) e a Duração da sílaba (F).  $n=8$  e  $4$  para controle e controle isolado, respectivamente.

## 5.6. A privação social é suficiente para alterar a discriminação auditiva

Por tudo isso, após confirmar que a manipulação foi bem sucedida, experimentos comportamentais de discriminação auditiva foram realizados. Dessa forma, é possível observar que no último dia de teste tanto o grupo controle quanto o grupo controle isolado apresentam

uma taxa de escapadas similar para os cantos aversivo e neutro (**Fig. 12A**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p > 0,9999$  e  $p = 0,1143$ , para aversivo e neutro respectivamente). Ao analisar a quantidade total de tentativas feitas no teste, nota-se que não existe uma diferença significativa entre os grupos (**Fig. 12B**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p = 0,6095$ ). A taxa de escapadas ao som aversivo ao longo do teste mostra que os animais controle isolado atingem o limiar de 50% já no segundo dia, enquanto que animais controle atingem somente no terceiro dia. Os grupos, no entanto, não são significativamente diferentes (**Fig. 12C**; Two-way ANOVA,  $p < 0,0755$ ). Esta tendência também é evidenciada, pela taxa de escapadas ao som neutro que tende a ser menor no grupo controle isolado (**Fig. 12C**; Two-way ANOVA,  $p = 0,0546$ ). Em contraste, a taxa de discriminação, que considera a resposta a ambos os cantos, é maior que animais controle (**Fig. 12D**; Two-way ANOVA,  $p < 0,0289$ ). Sugerindo que não a ausência do tutor, mas a privação da experiência social durante o desenvolvimento, pode levar a uma melhor performance no teste de discriminação auditiva.

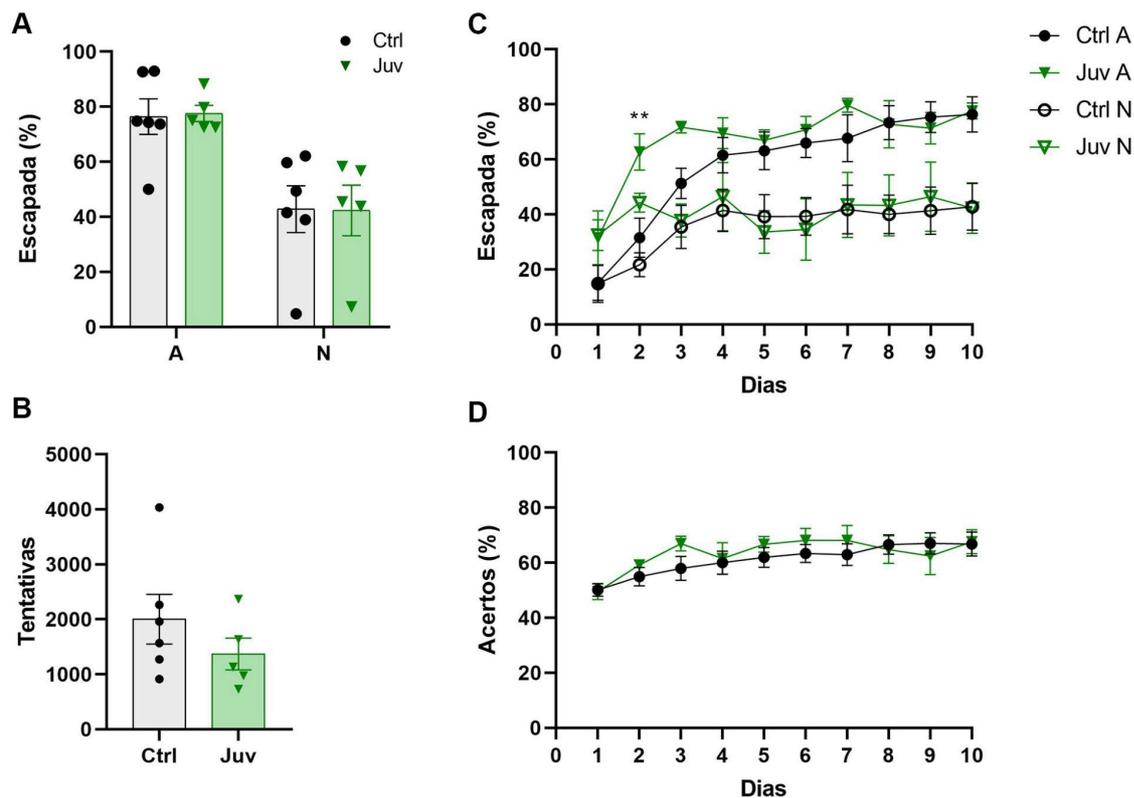


**Figura 12. Privação social pode influenciar a discriminação auditiva.** A) Percentual de escapadas ao som aversivo e neutro no último dia de teste; B) Número total de tentativas durante o período de testes; C) Percentual de escapadas aos sons aversivo e neutro; D) Taxa de discriminação ao longo do experimento. Em C, símbolos abertos representam as escapadas ao som neutro e fechados representam

escapadas ao som aversivo. n=6 e 4 para controle e controle isolado respectivamente. A, aversivo; N, neutro; Ctrl, controle; Ctrl. Iso, controle isolado. \*  $p \leq 0.05$ .

### **5.7. A idade altera a velocidade de aprendizado mas não a discriminação auditiva**

Uma outra hipótese para a melhora da performance em animais privados de contato social, é um possível prolongamento do período crítico auditivo. Para melhor investigar esta questão, criamos um grupo controle juvenil (60 dias de idade), isto é, animais que ainda estão dentro do período crítico, e comparamos com animais controle adultos. É possível observar que as taxas de escapadas aos sons aversivo e neutro no último dia de teste são semelhantes (**Fig. 13A**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,9307$  e  $p>0,9999$ , para aversivo e neutro respectivamente; n=6 e 5 para controle e juvenil respectivamente). Além disso, não existe uma diferença significativa na taxa de tentativas realizadas no teste (**Fig. 13B**; Mann-Whitney, duas caudas,  $p=0,4286$ ). Todavia, a taxa de escapadas ao longo dos dias indica que pássaros juvenis aprendem mais rápido a evitar o som aversivo do que animais adultos (**Fig. 13C**; Two-way ANOVA, Interação grupo vs dia  $p=0,0125$ ). Porém, não existe uma diferença significativa na taxa de escapadas ao som neutro (**Fig. 13C**; Two-way ANOVA, Interação grupo vs dia  $p=0,1894$ ). Contudo, a taxa de discriminação durante o teste mostra que ambos os grupos acertam de forma similar, não apresentando diferenças significativas quando ambas as respostas são consideradas (**Fig. 13D**; Two-way ANOVA, Interação grupo vs dia  $p=,3117$ ). Indicando que a idade não influencia na performance geral do teste de discriminação, embora animais jovens parecem aprender mais rápido.

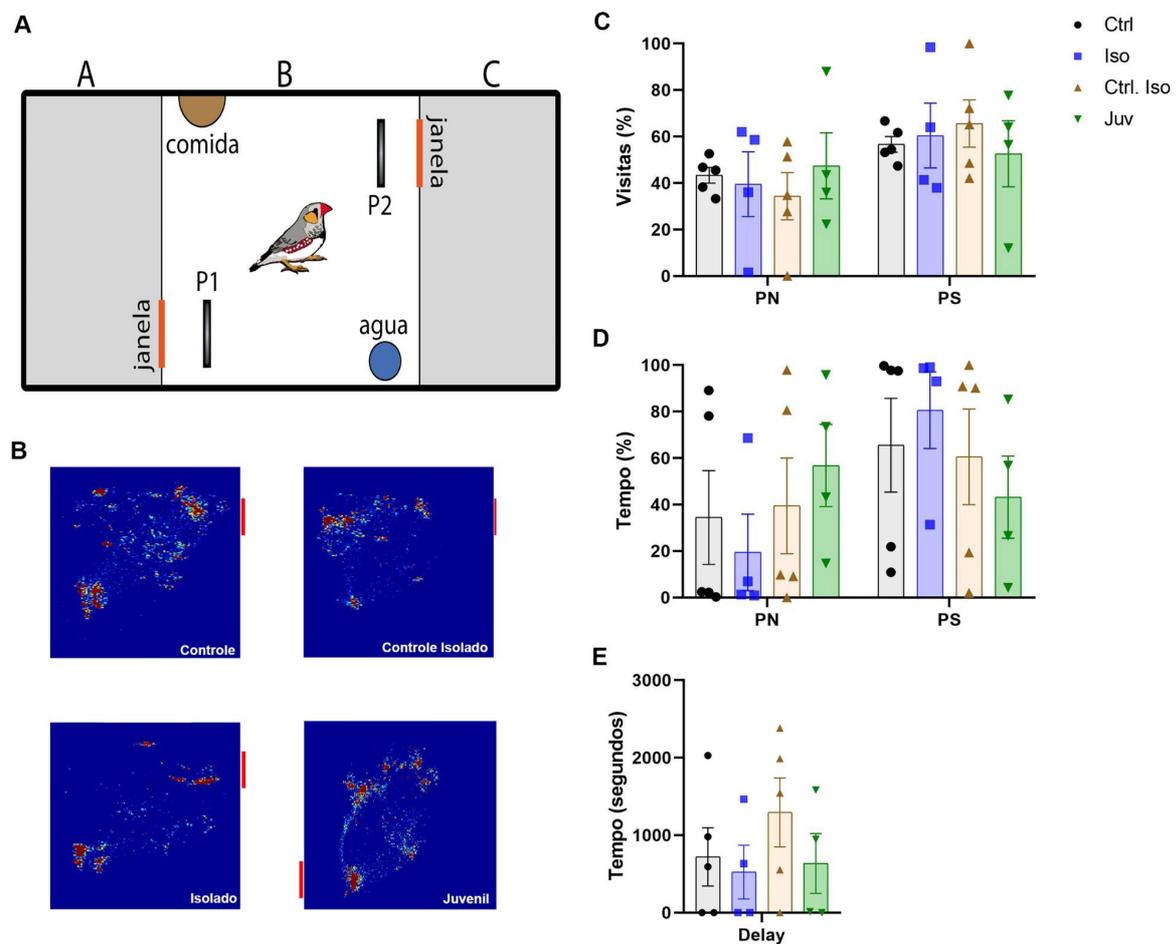


**Figura 13. Idade afeta a velocidade do aprendizado mas não influencia na performance discriminativa.** A) Quantidade de escapadas ao som aversivo ou neutro no último dia de teste; B) Número total de tentativas durante o período de testes; C) Percentual de escapadas aos sons aversivo e neutro; D) Taxa de discriminação ao longo do experimento. Em C, símbolos abertos representam as escapadas ao som neutro e fechados representam escapadas ao som aversivo; n=6 e 5 para controle e juvenil respectivamente. A, aversivo; N, neutro; Ctrl, controle; Juv; juvenil; \*\*  $p \leq 0.01$ .

### 5.8. Motivação social não influencia na performance discriminativa

Mesmo mostrando que não há diferença na quantidade de vezes em que os animais engajam no teste de discriminação, decidimos fazer mais um teste comportamental para melhor compreender os resultados. Para isso nós desenvolvemos um teste de engajamento social. Esse teste consiste em avaliar através de uma combinação de sensores, rastreamento de imagem e aferição manual por vídeo, o tempo e a posição do animal em relação a um estímulo social (poleiro social) ou neutro (poleiro neutro; Ver **Fig. 14A** e métodos para mais detalhes). O rastreamento automático permitiu a geração de mapas de calor que mostram o padrão de atividade de cada indivíduo (**Fig. 14B**). Estes padrões foram confirmados via análise de vídeo e sensores infravermelhos. Com isso, foi possível quantificar de forma precisa o número de visitas e o tempo em cada poleiro, assim como a latência até a primeira visita ao poleiro social.

No entanto, observamos que não há diferenças entre os grupos (**Fig. 14C e D**; Two-way ANOVA,  $p=0,6582$  e  $p=0,3934$ , respectivamente; **Fig. 14**; One-way ANOVA,  $p=0,1418$ ). Juntos, estes dados sugerem que os resultados observados no teste de discriminação provavelmente não são devidos a diferenças motivacionais (motivação social, mais especificamente).



**Figura 14. Privação social não influencia em testes de sociabilidade.** A) Desenho experimental do aparato; B) Mapas de calor da atividade motora dos animais experimentais durante o teste; C) Quantidade de visitas em cada poleiro; D) Tempo gasto em cada poleiro durante o teste; E) Tempo de latência em que o animal demorou para subir no poleiro social. N= 5, 5, 4 e 4 para controle, controle isolado, isolado e juvenil, respectivamente. PN, poleiro neutro; PS, poleiro social; Ctrl, controle; Iso, isolado; Ctrl. iso, controle isolado; Juv, juvenil.

## 6. DISCUSSÃO

Com o intuito de determinar se a experiência auditiva e da prática do canto influenciam na capacidade discriminativa de mandarins, este estudo contemplou manipulações ambientais e motoras, *i.e.*, isolamento visual e impedimento do canto, e subsequentes testes de discriminação de vocalizações coespecíficas. Nossos resultados confirmam que a falta de estímulo social ou da prática motora durante o aprendizado vocal de fato alteraram o desenvolvimento do canto em mandarins. Estas alterações são consistentes com a ideia de um prolongamento do período crítico, e atraso na maturação vocal. Mais importante, parece influenciar na capacidade de discriminação dos indivíduos privados de convívio social, os quais apresentaram uma performance superior aos animais controle. Estes resultados não podem ser simplesmente explicados por componentes motivacionais, uma vez que *(i)* animais isolados não possuem uma maior motivação quando apresentados a um estímulo social, e *(ii)* animais expostos ao tutor e subsequentemente isolados apresentam uma performance também superior ao controle. Juntas, estas observações sugerem que a experiência social pós-natal (contato visual e auditivo com outros animais), pode influenciar o nível da capacidade discriminatória em animais adultos, independentemente da existência ou não de um modelo auditivo ou da consolidação do canto.

### 6.1. Prática vocal e discriminação auditiva

A manipulação para limitar a prática vocal durante o desenvolvimento foi relativamente efetiva (**Fig. 4-5**). Ao todo, 7 animais apresentaram, em média, menos do que 320 cantos por dia. Além disso, eles apresentaram uma similaridade com o tutor abaixo de 50% aos 85 dias de vida, e vocalizações altamente variáveis, consistentes com cantos imaturos. É importante notar que, dois animais foram excluídos do experimento por produzirem mais de 580 cantos por dia. Ou seja, mais da metade da média total de cantos produzidos por animais controle ( $1010 \pm 87,60$ , média  $\pm$  Erro Padrão). Corroborando assim com os achados do Hayase e colaboradores (2018), apontando que a manipulação não é 100% efetiva, ou seja, mesmo submetidos à manipulação alguns animais conseguem praticar e desenvolver o canto normalmente.

A limitação da prática vocal não influencia na performance discriminatória dos mandarins. Pois, assim como o grupo controle, o grupo impedido conseguiu discriminar normalmente os dois cantos na tarefa. Sobretudo, estes animais mostram uma trajetória comparável com o grupo controle no teste de discriminação (**Fig. 6**). Sugerindo então que a prática vocal, mesmo que limitada, não parece interferir na velocidade de aquisição da tarefa nem na performance final.

Outro ponto importante é que o grupo impedido engajou menos no teste, e mesmo assim obteve resultados semelhantes ao controle, indicando que o número de tentativas não parece ser um fator determinante na performance desta tarefa.

## **6.2. Privação social e discriminação auditiva**

Como esperado, nossos resultados obtidos a partir da manipulação do ambiente social, reafirmaram que animais não expostos ao tutor apresentam um déficit no aprendizado vocal, produzindo cantos com baixa amplitude e sílabas altamente variáveis (**Fig. 7-8**). Estes cantos anormais são principalmente devido a ausência de um modelo acústico, porque animais expostos ao tutor e subsequentemente crescidos em isolamento, *i.e.*, controle isolado, não apresentam defeitos de aprendizado. Estes animais, no entanto, mostram uma tendência a apresentarem cópias menos acuradas do canto do tutor e trajetórias de desenvolvimento levemente diferentes. Estes achados argumentam que outros fatores sociais, como por exemplo a presença de fêmeas (CAROUSO-PECK & GOLDSTEIN, 2019) e do próprio tutor, podem estar influenciando no desenvolvimento do canto destes animais. No entanto, dado a semelhança na taxa de aprendizado entre o grupo controle e grupo controle isolado, a presença da fêmea não parece exercer uma grande influência no resultado final. Apesar disso, mais experimentos serão necessários para esclarecer estas diferenças. Como por exemplo, determinar o aprendizado vocal em animais expostos a um modelo auditivo e mantidos somente com uma fêmea ou com o tutor, comparados a animais controles.

Já os nossos experimentos de discriminação demonstram que os animais privados de contato social apresentam uma melhor capacidade discriminatória quando comparados aos controles, independentemente da idade. Especificamente, o grupo isolado além de obter a menor taxa de escapadas no som neutro que os demais grupos, possui a maior taxa de acertos a partir do quinto dia de teste (**Fig. 9**). Estes resultados corroboram as observações de Braaten e colaboradores (2006), indicando que animais juvenis e adultos possuem capacidades discriminatórias semelhantes. Por outro lado, estes resultados diferem de Sturdy e colaboradores (2001), que sugerem uma perda sutil na performance discriminatória em animais isolados. Não obstante, apesar de utilizarem o mesmo princípio de avaliação, *i.e.*, teste *go/no go*, ambos estudos apresentam diferenças experimentais com o presente trabalho. Mais especificamente, foram usados estímulos artificiais (STURDY et al., 2001) e cantos modificados (BRAATEN; PETZOLDT; COLBATH, 2006), além disso em ambos os casos os animais não estavam

completamente isolados, pois podiam ver e ouvir entre si. Em contrapartida, os animais considerados isolados neste trabalho não tiveram contato visual com qualquer outro indivíduo, permitindo avaliar de fato o efeito da privação social na discriminação de sinais vocais naturais, o que não pode ser concluído nos estudos anteriores.

É importante ressaltar que a motivação para o engajamento na tarefa de discriminação é interagir socialmente, vendo outro animal e ouvindo cantos coespecíficos (TOKAREV & TCHERNICHOVSKI, 2014). Logo, uma possível explicação para as diferenças observadas nesta tarefa se deve a uma extensão do período crítico, ou à uma maior motivação para interagir socialmente. Nossos resultados, entretanto, sugerem que animais juvenis, ou seja, ainda dentro do período crítico para o aprendizado sensório-motor, possuem um desempenho semelhante ao de animais adultos. Além disso, testes de interação social apontam que animais privados de contato social não apresentam uma predileção para interagir visualmente com outro indivíduo. Ou seja, esses animais não apresentam uma diferença de motivação no quesito social, quando comparados a animais controle.

A experiência social, por outro lado, parece moldar as respostas de neurônios auditivos em pássaros. Uma possível explicação para as diferenças nos testes de discriminação aqui observadas, é o fato de que as respostas auditivas se tornam mais específicas com a idade (MOORE; WOOLLEY, 2019; PHAN; PYTTE; VICARIO, 2006; YANAGIHARA; YAZAKI-SUGIYAMA, 2019). Isto é, respondem mais especificamente a estímulos armazenados durante o aprendizado do canto. Em contraste, este aumento na especificidade não é observado em animais desprovidos de experiência social (COUSILLAS et al., 2004). Ou seja, é possível que a falta de experiência durante o desenvolvimento, além de alterar as respostas auditivas, influencia na capacidade discriminativa do animal. Propiciando respostas auditivas mais generalizadas e menos específicas que possivelmente facilitem a discriminação de estímulos coespecíficos. É importante salientar, que esse fenômeno é claramente observado em humanos durante o aprendizado vocal, onde há um compromisso neural que leva a perdas perceptuais.

## CONCLUSÃO E PRÓXIMAS ETAPAS

Este trabalho avaliou os possíveis efeitos da privação social e da prática motora na capacidade discriminativa de mandarins (*Taeniopygia guttata*). Foi possível observar que animais privados de um modelo auditivo, ou de contato social durante o aprendizado do canto, discriminam melhor cantos coespecíficos comparados a animais controle. Enquanto que, animais com limitação da prática vocal não apresentam uma perda na capacidade de discriminação. Esses resultados suportam a hipótese de que a falta de experiência social durante o aprendizado vocal pode influenciar na capacidade discriminatória do indivíduo. Possivelmente tornando-os mais eficientes na discriminação de diferentes tipos de estímulos utilizados na comunicação vocal quando finalmente expostos. Mais experimentos, no entanto, são fundamentais para dar suporte a esta hipótese. Por exemplo, seria de grande interesse testar os animais experimentais deste trabalho com outros estímulos, como chamados (*calls*) e cantos modificados. Além disso, a criação de um grupo completamente isolado, ou seja, sem estímulo visual e auditivo, poderia contribuir para a confirmação da hipótese. Ademais, para melhor investigar a influência da prática do canto na discriminação auditiva, seria interessante desenvolver animais completamente impossibilitados de cantar (por meios irreversíveis através de lesões no órgão vocal, e reversíveis através canulação do saco aéreo ou aplicação de toxina botulínica). Este tipo de animal iria permitir avaliar mais especificamente a capacidade discriminativa em pássaros que de fato nunca cantaram.

## REFERÊNCIAS

- BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; MAFFEI, L. Critical periods during sensory development. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 1, p. 138–145, 2000.
- BERWICK, R. C. et al. Songs to syntax : the linguistics of birdsong. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 3, p. 113–121, 2011.
- BÖHNER, J. Song learning in the zebra finch (*taeniopygia guttata*): Selectivity in the choice of a tutor and accuracy of song copies. **Animal Behaviour**, v. 31, n. 1, p. 231–237, fev. 1983.
- BÖHNER, J. Early acquisition of song in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. **Animal Behaviour**, v. 39, n. 2, p. 369–374, 1990.
- BOLHUIS, J. J.; MOORMAN, S. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Birdsong memory and the brain : In search of the template. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 50, p. 41–55, 2015.
- BOLHUIS, J. J.; OKANOYA, K.; SCHARFF, C. Twitter evolution: converging mechanisms in birdsong and human speech. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 747–759, nov. 2010.
- BOTTJER, S. W. et al. Axonal connections of a forebrain nucleus involved with vocal learning in zebra finches. **Journal of Comparative Neurology**, v. 279, n. 2, p. 312–326, 1989.
- BRAATEN, R. F.; PETZOLDT, M.; COLBATH, A. Song perception during the sensitive period of song learning in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 120, n. 2, p. 79–88, 2006.
- BRAINARD, M. S.; DOUPE, A. J. What songbirds teach us about learning. **Nature**, v. 417, n. 6886, p. 351–358, maio 2002.
- CAMPBELL, D. L. M.; HAUBER, M. E. Cross-fostering diminishes song discrimination in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). **Animal Cognition**, v. 12, n. 3, p. 481–490, 2009a.

- CAMPBELL, D. L. M.; HAUBER, M. E. The Disassociation of Visual and Acoustic Conspecific Cues Decreases Discrimination by Female Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 123, n. 3, p. 310–315, 2009b.
- CAROUSO-PECK, S.; GOLDSTEIN, M. H. Female Social Feedback Reveals Non-imitative Mechanisms of Vocal Learning in Zebra Finches. **Current Biology**, v. 29, n. 4, p. 631-636.e3, 2019.
- CHEN, Y.; MATHESON, L. E.; SAKATA, J. T. Mechanisms underlying the social enhancement of vocal learning in songbirds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 24, p. 6641–6646, 2016.
- CHIRATHIVAT, N.; RAJA, S. C.; GOBES, S. M. H. Hemispheric dominance underlying the neural substrate for learned vocalizations develops with experience. **Nature Publishing Group**, n. May, p. 1–9, 2015.
- CLAYTON, N. S. Song tutor choice in zebra finches. **Animal Behaviour**, v. 35, n. 3, p. 714–721, 1987.
- CLAYTON, N. S. Song discrimination learning in zebra finches. **Animal Behaviour**, v. 36, n. 4, p. 1016–1024, 22 ago. 1988.
- COUSILLAS, H. et al. Experience-dependent neuronal specialization and functional organization in the central auditory area of a songbird. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 3343–3352, 2004.
- DERÉGNAUCOURT, S. et al. Comparisons of different methods to train a young zebra finch (*Taeniopygia guttata*) to learn a song. **Journal of Physiology-Paris**, v. 107, n. 3, p. 210–218, 2013.
- DOUPE, A. J.; FRANCISCO, S. Song- and Order-Selective Neurons in the Songbird Anterior Forebrain and their Emergence during Vocal Development. v. 17, n. 3, p. 1147–1167, 1997.
- EALES, L. A. Song learning in zebra finches: some effects of song model availability on what is learnt and when. **Animal Behaviour**, v. 33, n. 4, p. 1293–1300, 1985.

- FEHÉR, O. et al. De novo establishment of wild-type song culture in the zebra finch. **Nature**, v. 459, n. 7246, p. 564–568, 2009.
- FOX, S. E.; III, C. A. N. How the Timing and Quality of Early Experiences Influence the Development of Brain Architecture. v. 81, n. 1, p. 28–40, 2010.
- FUNABIKI, Y.; KONISHI, M. Long Memory in Song Learning by Zebra Finches. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 17, p. 6928–6935, 2003.
- GARST-OROZCO, J.; BABADI, B.; ÖLVECZKY, B. P. A neural circuit mechanism for regulating vocal variability during song learning in zebra finches. **eLife**, v. 3, p. e03697, 2014.
- GOBES, S. M. H.; ZANDBERGEN, M. A.; BOLHUIS, J. J. Memory in the making : localized brain activation related to song learning in young songbirds. n. June, p. 3343–3351, 2010.
- GOLDSTEIN, M. H.; KING, A. P.; WEST, M. J. Social interaction shapes babbling: Testing parallels between birdsong and speech. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 8030–8035, 2003.
- HAUSER, M. D. & KONISHI, M. *The Design of Animal Communication*. Cambridge, Mass. A Bradford Book; Reprint edition, 2003.
- HAYASE, S. et al. Vocal practice regulates singing activity–dependent genes underlying age-independent vocal learning in songbirds. **PLoS Biology**, v. 16, n. 9, p. 1–25, 2018.
- HOESE, W. J. et al. Vocal tract function in birdsong production: experimental manipulation of beak movements. **The Journal of experimental biology**, v. 203, n. Pt 12, p. 1845–55, jun. 2000.
- ISSA, N. P. et al. The critical period for ocular dominance plasticity in the Ferret’s visual cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 16, p. 6965–6978, 1999.
- JARVIS, E. D. Neural systems for vocal learning in birds and humans: a synopsis. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. S1, p. 35–44, 6 dez. 2007.
- KNUDSEN, E. I. Sensitive periods in the development of the brain and behavior. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 1412–1425, 2004.

- KONOPKA, G.; ROBERTS, T. F. Insights into the Neural and Genetic Basis of Vocal Communication. *Cell*, v. 164, n. 6, p. 1269–1276, mar. 2016.
- KUHL, P. K. Infants' Perception and Representation of Speech: Development of a New Theory. **Second International Conference on Spoken Language Processing (ICSLP'92), International Conference Centre, Banff, Alberta, Canada, October 12-16, sponsored by the University of Alberta in conjunction with Acoustical Society of America**, p. 449–456, 1992.
- KUHL, P. K. A new view of language acquisition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 22, p. 11850–11857, 2000.
- KUHL, P. K. Human speech and birdsong: Communication and the social brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9645–9646, 2003.
- Kuhl, P., Tsao, F. and Liu, H. Foreign-language experience in infancy: Effects of short-term exposure and social interaction on phonetic learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(15), pp.9096-9101, 2003.
- KUHL, P. K. Implications for Education. v. 5, n. 3, p. 128–142, 2012.
- KUHL, P. K.; MELTZOFF, A. N. Infant vocalizations in response to speech: Vocal imitation and developmental change. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 100, n. 4, p. 2425–2438, out. 1996.
- KUHL, P.; RIVERA-GAXIOLA, M. Neural Substrates of Language Acquisition. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 511–534, 2008.
- LONG, M. A.; FEE, M. S. Using temperature to analyse temporal dynamics in the songbird motor pathway. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 189–194, 2008.
- MARLER, P. A comparative approach to vocal learning: Song development in white-crowned sparrows. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 71, n. 2 PART 2, p. 1–25, 1970.
- MARLER, P. Innateness and the instinct to learn. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 76, n. 2, p. 189–200, 2004.

- MELLO, C. V. et al. Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 395, n. 2, p. 137–160, 1998.
- MELLO, C. V. The Zebra Finch, *Taeniopygia guttata* : An Avian Model for Investigating the Neurobiological Basis of Vocal Learning. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 12, p. pdb.emo084574, dez. 2014.
- MELTZOFF, A. et al. Foundations for a New Science of Learning. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 284–288, 2009.
- MILLER-SIMS, V. C.; BOTTJER, S. W. Development of Auditory-Vocal Perceptual Skills in Songbirds. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- MOONEY, R. Neural mechanisms for learned birdsong. **Learning & Memory**, v. 16, n. 11, p. 655–669, 22 out. 2009.
- MOORE, J. M.; WOOLLEY, S. M. N. Emergent tuning for learned vocalizations in auditory cortex. **Nature Neuroscience**, 2019.
- MOORMAN, S. et al. Human-like brain hemispheric dominance in birdsong learning. 2012.
- MORI, C.; WADA, K. Songbird : a unique animal model for studying the molecular basis of disorders of vocal development and communication. v. 64, n. 5, p. 221–230, 2015.
- MORRISON, R. G.; NOTTEBOHM, F. Role of a telencephalic nucleus in the delayed song learning of socially isolated zebra finches. **Journal of Neurobiology**, v. 24, n. 8, p. 1045–1064, 1993.
- NORDEEN, K. W.; NORDEEN, E. J. Auditory feedback is necessary for the maintenance of stereotyped song in adult zebra finches. **Behavioral and Neural Biology**, v. 57, n. 1, p. 58–66, 1992.
- NOTTEBOHM, F.; STOKES, T. M.; LEONARD, C. M. Central control of song in the canary. **Journal of Comparative Neurology**, v. 165, p. 457–486, 1976.
- PATTERSON, M. M.; FEE, M. S. **Chapter 23 - Zebra Finches in Biomedical Research**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

- PHAN, M. L.; PYTTE, C. L.; VICARIO, D. S. Early auditory experience generates long-lasting memories that may subserve vocal learning in songbirds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 4, p. 1088–1093, 2006.
- PRATHER, J. F.; OKANOYA, K.; BOLHUIS, J. J. Brains for birds and babies: Neural parallels between birdsong and speech acquisition. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 81, p. 225–237, 2017.
- PRICE, P. H. Developmental determinants of structure in zebra finch song. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 93, n. 2, p. 260–277, 1979.
- PYTTE, C. L.; SUTHERS, R. A. A bird's own song contributes to conspecific song perception. **NeuroReport**, v. 10, n. 8, p. 1773–1778, 1999.
- RIEBEL, K.; SMALLEGANGE, I. M. Does Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*) Preference for the (Familiar) Father's Song Generalize to the Songs of Unfamiliar Brothers? **Journal of Comparative Psychology**, v. 117, n. 1, p. 61–66, 2003.
- ROBERTS, T. F.; MOONEY, R. Motor circuits help encode auditory memories of vocal models used to guide vocal learning. **Hearing Research**, v. 303, p. 48–57, set. 2013.
- ROSS, M. T. et al. Neuronal Intrinsic Physiology Changes During Development of a Learned Behavior. v. 4, n. October, p. 1–16, 2017.
- RUTTER, M. et al. Developmental catch-up, and deficit, following adoption after severe global early privation. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 39, n. 4, p. 465–476, 1998.
- 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. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 2896–2913, 1991.
- SCHWABL, H. Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11446–11450, 1993.

- SOLIS, M. M.; DOUPE, A. J. Contributions of Tutor and Bird's Own Song Experience to Neural Selectivity in the Songbird Anterior Forebrain. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 4559–4584, 1999.
- STRIPLING, R. et al. Rapidly learned song-discrimination without behavioral reinforcement in adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 1, p. 41–50, 2003.
- STURDY, C. B. et al. Reduced social contact causes auditory perceptual deficits in zebra finches, *Taeniopygia guttata*. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 6, p. 1207–1218, 2001.
- TCHERNICHOVSKI, O. et al. A procedure for an automated measurement of song similarity. **Animal Behaviour**, v. 59, n. 6, p. 1167–1176, 2000.
- TCHERNICHOVSKI, O.; NOTTEBOHM, F. Social inhibition of song imitation among sibling male zebra finches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8951–8956, 1998.
- TER HAAR, S. M. et al. The interplay of within-species perceptual predispositions and experience during song ontogeny in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1796, 2014.
- TOKAREV, K.; TCHERNICHOVSKI, O. A novel paradigm for auditory discrimination training with social reinforcement in songbirds. p. 0–3, 2014.
- VATES, G. E. et al. Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 366, n. 4, p. 613–642, 1996.
- VELHO, T.; MELLO, C. Transcriptional Regulation of Activity-Dependent Genes by Birdsong. Chapter 1; S.M. Dudek (ed.), **Transcriptional Regulation by Neuronal Activity**. Springer, 2008.
- WANG, Y.; BRZOZOWSKA-PRECHTL, A.; KARTEN, H. J. Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 28, p. 12676–12681, 13 jul. 2010.

- WILBRECHT, L.; NOTTEBOHM, F. Vocal learning in birds and humans. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 9, n. 3, p. 135–148, 2003.
- WILLIAMS, H. Birdsong and singing behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1016, n. 2004, p. 1–30, 2004.
- WOOLLEY, S. M. N. The Songbird Auditory System. n. June, 2016.
- YANAGIHARA, S.; YAZAKI-SUGIYAMA, Y. Social interaction with a tutor modulates responsiveness of specific auditory neurons in juvenile zebra finches. **Behavioural Processes**, v. 163, n. April, p. 32–36, 2019.
- ZANN, RA. The Zebra Finch: a synthesis of field and laboratory studies. **Oxford University Press**; 1996.