



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BRAGANÇA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA AMBIENTAL

PATRICK DOUGLAS CORRÊA PEREIRA

NEUROECOLOGIA DE AVES DA FAMÍLIA CHARADRIIDAE: ESTUDOS  
ARQUITETÔNICOS, ESTEREOLÓGICOS E FILOGENÉTICOS

BRAGANÇA - PA

2017

PATRICK DOUGLAS CORRÊA PEREIRA

NEUROECOLOGIA DE AVES DA FAMÍLIA CHARADRIIDAE: ESTUDOS  
ARQUITETÔNICOS, ESTEREOLÓGICOS E FILOGENÉTICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Ambiental do Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Péricles Sena do Rêgo  
Coorientador: Prof. Dr. Cristovam Guerreiro Diniz

BRAGANÇA - PA

2017

Patrick Douglas Corrêa Pereira



Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Biologia Ambiental: Sistemática e Evolução, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Ambiental, Universidade Federal do Pará/ Campus de Bragança.

Data de aprovação - Bragança/PA: 29/05/2017

Banca Examinadora

Handwritten signature of Péricles Sena do Rêgo in blue ink.

---

Prof. Dr. Péricles Sena do Rêgo (Orientadora)  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Handwritten signature of Cristovam Wanderley Picanço Diniz in blue ink.

---

Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz (Titular)  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Handwritten signature of Cristiana Ramalho Maciel in blue ink.

---

Profa. Dra. Cristiana Ramalho Maciel (Titular)  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Handwritten signature of Juliana Araripe Gomes da Silva in blue ink.

---

Profa. Dra. Juliana Araripe Gomes da Silva (Titular)  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia do IFPA e ao Grupo de Genética e Conservação, Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Biologia Ambiental. Por suas contribuições de infraestrutura e insumos para execução deste trabalho. Agradeço em especial ao Dr. Cristovam Guerreiro Diniz, Dr. Mauro André Damasceno de Melo, Nara Magalhães e Péricles Sena do Rego pela orientação durante a execução deste trabalho, Ediely Pereira Henrique pela ajuda nos procedimentos de imunohistoquímica e análises estereológicas, Cleysian Ney Pinheiro Dias pela ajuda com as análises filogenéticas e Phillipe Figueiredo pela ajuda com a revisão no manuscrito. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento que possibilitou a execução desta pesquisa e Instituto Federal do Pará – Campus Bragança pela infraestrutura disponibilizada. Nvidia Corporation pela doação do Equipamento CUDA Tesla k40c o qual foi utilizado para processamento de Fotomicrografias e outras imagens.

## RESUMO

As espécies *Charadrius semipalmatus* e *Charadrius collaris* pertencem ao grupo das batuíras (Família Charadriidae), que são aves migratória e não migratória respectivamente, que utilizam a costa norte brasileira para forrageio. Nas aves migratórias, o hipocampo é importante para recuperar memórias relacionadas aos locais de parada, bem como os detalhes de ambos os habitats de reprodução e invernada. O hipocampo executa um papel importante no processamento de memória espacial destes organismos, tornando-os excelentes modelos para investigar o efeito do comportamento nesta região. Este trabalho tem o objetivo investigar se as respostas adaptativas do hipocampo ao comportamento migratório estão relacionadas com a migração e/ou com o padrão evolutivo entre espécies migrantes e não migrantes pertencentes ao gênero *Charadrius*. Os indivíduos de *C. collaris* e *C. semipalmatus* foram coletados em ilhas do litoral bragantino utilizando redes de neblina. As aves foram medidas, anestesiadas, identificadas enquanto espécies utilizando suas características morfológicas, tiveram amostras de tecido muscular coletadas e foram perfundidas por via transcardíaca. O encéfalo foi cortado no plano coronal, as secções foram coradas pela técnica de Nissl e imunomarcadas para NeuN, DCX e C-fos. Os números de células, volume da formação hipocampal e volume do soma celular foram estimados através do Fracionador Óptico, Cavalieri Estimator e Nucleator, respectivamente. O DNA total foi extraído para posterior sequenciamento do fragmento citocromo oxidase c subunidade I (COI) para gerar árvores filogenéticas de inferência Bayesiana, máxima verossimilhança, medidas de distância genética e análises dos contrastes filogenéticos. Os resultados mostraram que a anatomia da formação hipocampal observada em *C. semipalmatus* e *C. collaris* corrobora o observado para as aves em geral. Os resultados estereológicos evidenciaram que a espécie migratória possui maior volume da formação hipocampal, número de neurônios maduros e neurogênese, quando comparado a espécie não migratória, entretanto não houve diferença no volume dos somas de neurônios e células em atividade. Os resultados moleculares demonstraram não haver correlação entre as características da formação hipocampal e as distâncias evolutivas entre aves migrantes e não migrantes, indicando que as diferenças no número de células assim como o volume da formação hipocampal não ocorrem em razão da distância filogenética entre as espécies. Diante disso, evidencia-se a existência de diferenças neuroanatômicas na formação hipocampal de aves migrantes e não migrantes. E exclui-se os fatores divergência evolutiva como responsáveis por estes arranjos arquitetônicos.

Palavras chave: *Charadrius*, Estereologia, Filogenia, Migração, Formação hipocampal.

## ABSTRACT

The species *Charadrius semipalmatus* and *Charadrius collaris* are from the Plovers group (Charadriidae Family). These species are migratory and non-migratory birds, respectively. In the migratory birds, the hippocampus is important to recover memories related to the stopping places, details about the breeding and the wintering grounds. The hippocampus plays an important role the processing of spatial memory in these organisms, making them excellent models to investigate the effect of behavior in this brain region. This work aims to investigate whether the hippocampal adaptive responses to migratory behavior are related to the migration and/or evolutionary pattern between migrant and non-migrant species of *Charadrius* genus. The individuals of *C. collaris* and *C. semipalmatus* were collected in islands of the coast using mist nets. The birds were measured, anesthetized, identified at species level using morphological features, had samples of muscle tissue collected and were transcardially perfused. The brain was cut in the coronal plane, the sections were stained by the Nissl technique and immunolabelled for NeuN, DCX and C-fos. Cell numbers, hippocampal volume and cell volume were estimated through the Optical Fractionator, Cavalieri Estimator and Nucleator, respectively. The total DNA was extracted for subsequent sequencing of the cytochrome oxidase c subunit I fragment (COI) to generate phylogenetic trees of Bayesian inference, maximum likelihood, genetic distance measurements and analyzes of phylogenetic independent contrasts. The results showed that the anatomy of the hippocampal formations observed in *C. semipalmatus* and *C. collaris* corroborate that observed for birds in general. The stereological results evidenced that the migratory species had higher volume of hippocampal formation, number of mature neurons and neurogenesis, when compared to non-migratory species, however there was no difference in the volume of neurons and C-fos positive cells. Molecular results showed no correlation between the characteristics of the hippocampal formation and the evolutionary distances between migrant and non-migrant birds, indicating that the differences in the number of cells as well as the volume of hippocampal formation do not occur due to the phylogenetic distance between the species. Therefore, the existence of neuroanatomic differences in the hippocampal formation of migrant birds is evident, excluding evolutionary factors as responsible for these architectural arrangements.

Key words: *Charadrius*, Migration, Phylogeny, Stereology, Hippocampal formation

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1.1. Aves migratórias na costa norte do Brasil.....</b>                               | <b>8</b>  |
| <b>1.2. O hipocampo das aves, memória e migração .....</b>                               | <b>11</b> |
| <b>1.3. Caracterização das áreas e dos objetos de interesse em neuromorfologia. ....</b> | <b>17</b> |
| <b>1.3.1. Caracterização citoarquitetônica.....</b>                                      | <b>17</b> |
| <b>1.3.2. Neurônios na formação hipocampal.....</b>                                      | <b>18</b> |
| <b>1.3.3. Marcadores de Neurogênese .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.3.4. Marcadores de genes de ativação imediata.....</b>                              | <b>21</b> |
| <b>1.4. Estereologia: Números e Volumes na formação hipocampal .....</b>                 | <b>22</b> |
| <b>1.4.1. Estimativas do número de células.....</b>                                      | <b>22</b> |
| <b>1.4.2. Estimativas de volume da formação hipocampal e volume celular .....</b>        | <b>23</b> |
| <b>1.5. Relações filogenéticas entre Scolopacidae e Charadriidae .....</b>               | <b>24</b> |
| <b>1.6. Vieses comparativos e evolução dos caracteres.....</b>                           | <b>27</b> |
| <b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.1. Objetivo Geral.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.1. Autorização para o manuseio de animais silvestres .....</b>                      | <b>30</b> |
| <b>4.2. Área de estudo.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.3. Amostragem .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.4. Processamento, histologia e imunohistoquímica.....</b>                           | <b>31</b> |
| <b>4.4.1. Processamento para identificação e preparo das amostras .....</b>              | <b>31</b> |
| <b>4.4.2. Histologia e imunohistoquímica.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.5. Análises estereológicas.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.5.1. Número de células: Fracionador óptico .....</b>                                | <b>34</b> |
| <b>4.5.2. Medidas de volumes: Estimativa de Cavalieri .....</b>                          | <b>39</b> |
| <b>4.5.3. Volume do soma neuronal: Nucleator.....</b>                                    | <b>41</b> |
| <b>4.6. Análises estatísticas.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.7. Análises filogenéticas .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>4.7.1. Procedimentos laboratoriais .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>4.7.2. Análises computacionais.....</b>   | <b>44</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.7.3. Contrastes Filogenéticos .....   | 45        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>  | <b>45</b> |
| 5.1. Medidas biométricas.....   | 46        |
| 5.2. Limites da formação hipocampal e visualização de células .....                         | 48        |
| 5.3. Resultados estereológicos .....  | 50        |
| 5.3.1. Estimativas de volumes celulares.....  | 50        |
| 5.3.2. Volume da formação hipocampal e telencéfalo .....                                    | 53        |
| 5.3.3. Neurônios imunomarcados por NeuN.....  | 56        |
| 5.3.4. Neurônios recém-gerados imunomarcados por DCX.....                                   | 59        |
| 5.3.5. Células em atividade de síntese imunomarcados por C-Fos .....                        | 62        |
| 5.4. Filogenia e Contrastes filogenéticos .....   | 65        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>71</b> |
| 6.1. Limites citoarquitetônicos.....  | 71        |
| 6.2. Volume e números de células da formação hipocampal .....                               | 74        |
| 6.3. Relações filogenéticas e evolução dos caracteres .....                                 | 77        |
| <b>7. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>78</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>   | <b>93</b> |
| APÊNDICE A – Parâmetros estereológicos.....   | 93        |
| APÊNDICE B – Variâncias médias obtidas das estimativas estereológicas .....                 | 97        |
| APÊNDICE C – Códigos de acesso das sequencias utilizadas nas análises<br>filogenéticas..... | 101       |
| ANEXO 1 – Licença para captura e manuseio de animais silvestres .....                       | 103       |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aves migratórias na costa norte do Brasil.

Na porção norte da costa brasileira existem vários registros de aves marinhas migratórias e não-migratórias, muitas dessas são comumente advindas do hemisfério norte (Gaston *et al.*, 2008; Andres *et al.*, 2012; Turcotte *et al.*, 2013). No Brasil, ao longo da costa do Atlântico existem vários sítios de invernada, sendo estes utilizados pelas aves marinhas como fonte de alimento, troca da plumagem, e ganho de peso (Azevedo Júnior *et al.*, 2001). Os sítios compreendem boa parte da costa do Brasil, desde o Amapá até o Rio Grande do Sul, (Telino-Júnior *et al.*, 2003). Dentro das ilhas costeiras podem existir habitats usados para nidificação ou para pouso por aves que se alimentam no mesolitoral da ilha, ou no ambiente aquático ao redor (Vooren e Brusque, 1999).

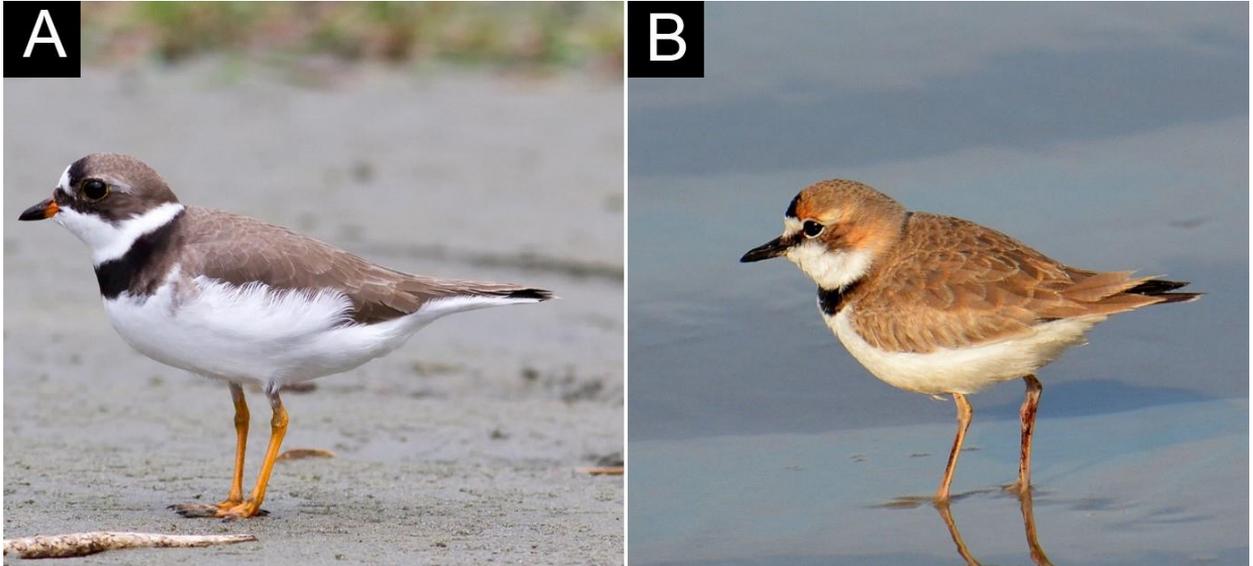
As aves migratórias são aquelas que se deslocam sazonalmente para uma determinada região, utilizando-a como área de invernada ou para a reprodução (Morrison, 1984). O deslocamento das aves migratórias geralmente é uma consequência da chegada do inverno que faz com que milhares de indivíduos abandonem suas áreas de reprodução em busca de melhores temperaturas e maior disponibilidade de alimento. Na maioria das vezes, essas aves chegam aos locais de invernada no período de agosto a setembro, permanecendo até abril (Antas e Nascimento, 1990).

A costa norte do Brasil, principalmente a da Amazônia e toda a zona costeira da região norte são locais de muitos registros de espécies de aves migratórias provenientes do hemisfério norte (Campos *et al.*, 2010). Um aspecto que contribui para tal diversidade é a existência da grande faixa de manguezais, pois estas aves utilizam essas áreas para forrageio, sendo os mesmos caracterizados pela imensa riqueza em nutrientes, principalmente para aquelas que se alimentam de frutas, pequenos insetos, crustáceos e pequenos mamíferos (Spaans, 1978; Lima *et al.*, 2013).

As batuíras (Família Charadriidae) são aves que utilizam a costa norte brasileira para forrageio. A Batuíra-de-bando (*Charadrius semipalmatus* (Bonaparte, 1825)) e a Batuíra de coleira (*Charadrius collaris* (Vieillot, 1818)), são aves limícolas de pequeno porte. Os indivíduos de *C. semipalmatus* em média medem cerca de 18 cm de comprimento, com o topo da cabeça e partes superiores marrons, fronte, garganta, partes inferiores e colar nugal brancos, o bico é curto de base amarelada e tarsos amarelos (**Figura 1 A**). Já os indivíduos de *C. collaris* medem de 14 a 15 cm de comprimento, possuem o bico preto e pernas róseas-claras, possuem

uma faixa preta estreita no peito, faixa frontal preta, faixa horizontal de cor castanha clara na cabeça e pernas amareladas (**Figura 1 B**) (Del Hoyo *et al.*, 1996).

**Figura 1:** (A) Batuíra-de bando (*C. semipalmatus*) e (B) Batuíra de coleira (*C. collaris*).



(A) CRUZ, M. (2012). [WA615956, *Charadrius semipalmatus* Bonaparte, 1825]. Wiki Aves - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/615956>> Acesso em: 05 Abr 2014.

(B) SANTOS, C. R. (2013). [WA1002677, *Charadrius collaris* Vieillot, 1818]. Wiki Aves - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: <<http://www.wikiaves.com/1002677>> Acesso em: 17 Abr 2017.

A Bатуíra-de-bando tem sua distribuição no ártico, Sub-Ártico, América do norte, Central e Caribe ocidental. Esta espécie também é encontrada sazonalmente na América do Sul e Caribe Oriental, seus destinos durante a migração incluem toda a costa brasileira até a Argentina (Del Hoyo *et al.*, 1996; Sick, 1997; Nol e Blanken, 1999). Durante o período de inverno no Sub-Ártico esta espécie migra para o sul e oeste da América do Norte, América Central e América do Sul (**Figura 2**). A batuíra de coleira (*C. collaris*) é uma espécie sedentária (não-migratória) e está distribuída em quase toda América do Sul incluindo o Brasil (**Figura 3**)



## 1.2. O hipocampo das aves, memória e migração

A Neuroecologia e o estudo da variação adaptativa na cognição e no cérebro. Esta técnica caracteriza-se por utilizar vários métodos comparativos para buscar respostas compreensivas sobre a evolução cognição dos animais, especificamente quando se trata de seleção sexual e/ou natural, e verifica a relação entre pressões ecológicas, cognição e estruturas encefálicas (Sherry, 2006). Vários estudos na área da Neuroecologia sugerem que o sistema nervoso sofre alterações neuroanatômicas e neuroquímicas que refletem no comportamento dos organismos que estão submetidos a estímulos ambientais, e estas alterações ocasionam um maior desenvolvimento dos mecanismos neurais subjacentes à percepção e/ou à resposta a esses estímulos (Rosenzweig e Bennett, 1996; Pham *et al.*, 1999; Ickes *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2002).

Como os mecanismos neurais das espécies atuais de vertebrados são resultados de longos processos evolutivos, é provável que a diferença de desenvolvimento entre as áreas que compõem seu encéfalo reflitam as condições ambientais e comportamentais aos quais seu tecido nervoso foi estimulado, tornando possível relacionar os estudos neuroanatômicos comparativos com os estudos comparativos de características ecoetológicas (Bolhuis e Macphail, 2001; Hutcheon *et al.*, 2002; Sherry, 2006; Angelucci *et al.*, 2009).

O hipocampo é uma região que possui uma relação íntima com a memória (Kandel *et al.*, 2014), lesões nessa região comprometem a capacidade de execução de tarefas nas quais o requisito principal é o funcionamento da memória (Scoville e Milner, 1957; Aggleton *et al.*, 1986; Zola-Morgan *et al.*, 1986; Kandel, 2001). Embora os estudos que abordam como se dá a transmissão de informações e como elas ficam armazenadas no hipocampo sejam poucos, alguns autores (Okano *et al.*, 2000) afirmam que as células do hipocampo formam um mapa cognitivo contendo toda a informação necessária para a representação do espaço.

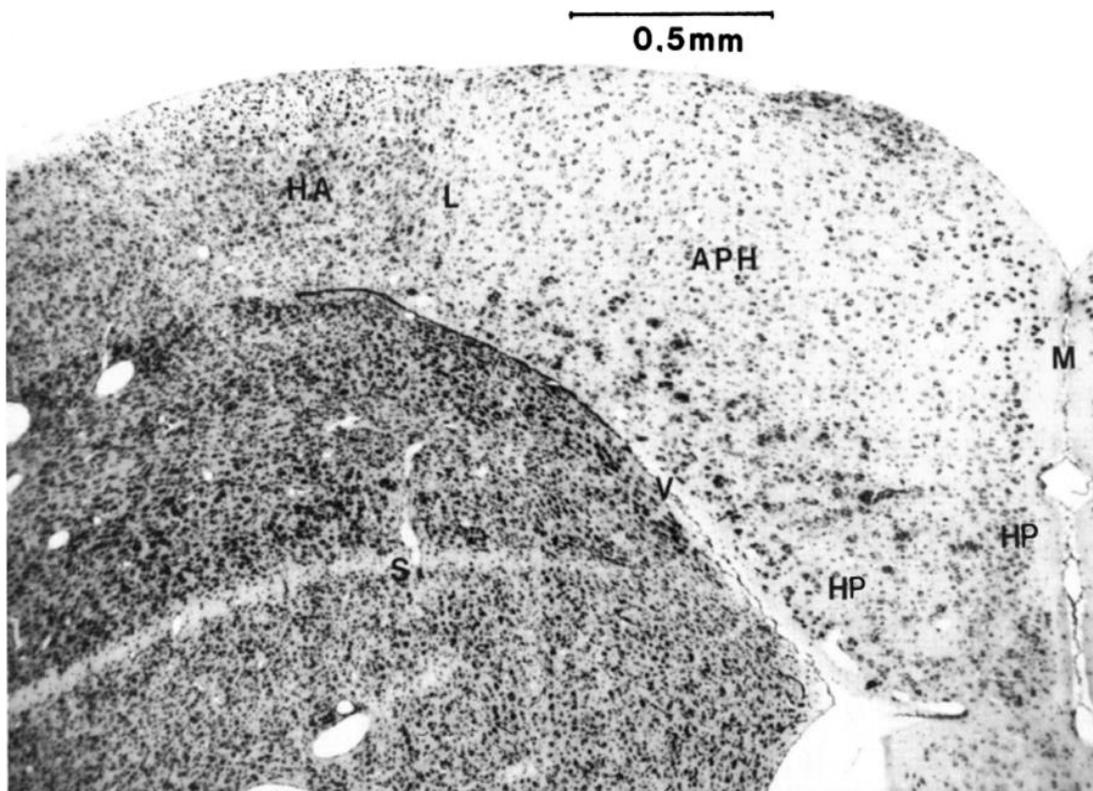
A memória episódica humana é um tipo de memória que nos permite lembrar de forma consciente, empregando a linguagem como instrumento, ou seja, podemos refletir sobre um evento ocorrido através da linguagem. A memória episódica recebe e armazena temporalmente informações sobre episódios ou eventos datados e suas relações espaço-temporais (Tulving, 1972; Feeney *et al.*, 2009). Apesar da memória episódica ser única em seres humanos (Tulving, 1985), existe uma discussão se outros animais realmente possuem essa capacidade. Estudos sobre aves que armazenam alimentos perecíveis e não perecíveis demonstraram que estas possuem uma memória semelhante à memória episódica humana, intitulada “episodic-like

memory” (ELM) (Clayton, Yu, *et al.*, 2001). Estudos mostram que em animais não humanos, o critério comportamental para a ELM é lembrar o quê, onde e quando. (Squire *et al.*, 2007).

Evidências embriológicas, neuroquímicas e anatômicas sugerem que a região dorsomedial do cérebro das aves (hipocampo e área parahipocampal) são equivalentes ao hipocampo dos mamíferos, embora nas aves esta região seja relativamente pequena na maioria das espécies (Sandi *et al.*, 1992; Atoji *et al.*, 2016). Com base na topografia, origem do desenvolvimento e o seu papel no processamento da memória espacial essas áreas podem ser homólogas, entretanto a organização morfológica do hipocampo das aves é muito diferente dos mamíferos e por isso componentes similares para as subdivisões da estrutura de mamíferos não são facilmente identificáveis (D Székely, 1999).

A parte dorsomedial do cérebro das aves é dividida em duas áreas principais: a ventral (hipocampo (HP)) e a posicionada dorsolateralmente chamada de área parahipocampal (APH). A formação hipocampal (FH) das aves é correspondente à junção do HP e APH (Atoji *et al.*, 2002; Atoji *et al.*, 2016) (**Figura 4**).

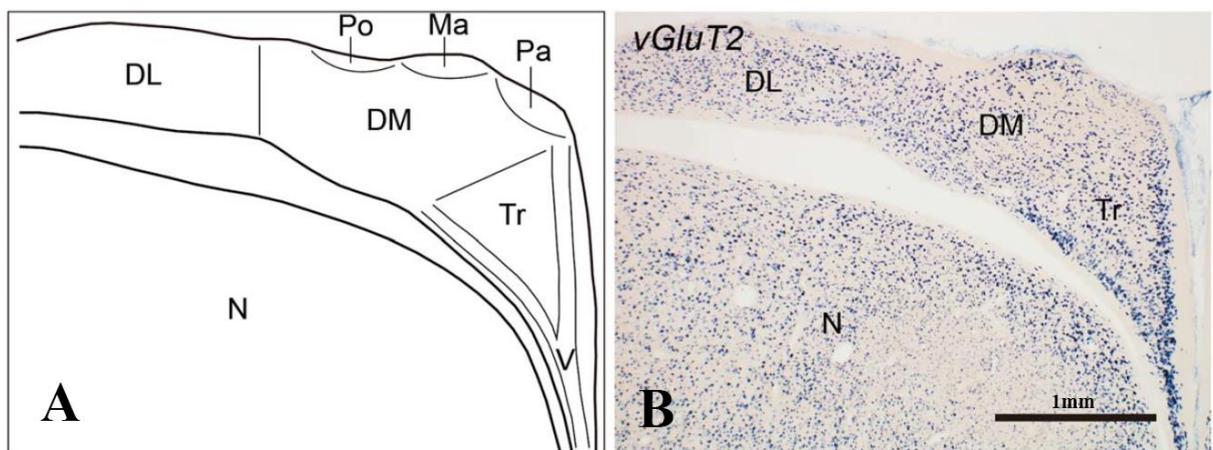
**Figura 4:** Secção cortada no plano coronal mostrando o complexo hipocampal e áreas adjacentes do telencéfalo da ave *Parus palustris*. HP=Hipocampo; APH=Área parahipocampal; L=limite lateral; V= ventrículo; M=Fissura inter-hemisférica; HA=Hiperestriado acessório; S=Striatum.



Fonte: (Krebs *et al.*, 1989)

A FH possui sete subdivisões propostas: Camada em forma de V, área pobre em células, área dorsomedial, dorsolateral, magnocelular, parvocelular e a região triangular (**Figura 5A**) (Atoji e Wild, 2004). Contribuições recentes (Atoji *et al.*, 2016) confirmam a homologia da área dorsomedial e a camada em forma de “V” ao corno de Amon e giro denteado de mamíferos, respectivamente. Estes autores puderam confirmar as subdivisões propostas anteriormente (Atoji e Wild, 2004) (**Figura 5A**).

**Figura 5:** (A) Desenho das sete subdivisões propostas baseadas na imunomarcção para o transportador de glutamato vesicular 2 (vGluT2) em Atoji *et al.* 2016; (B) Expressão de vGluT2 na formação hipocampal do pombo na coordenada 6.00 mostrando um padrão similar ao encontrado em coloração de Nissl;



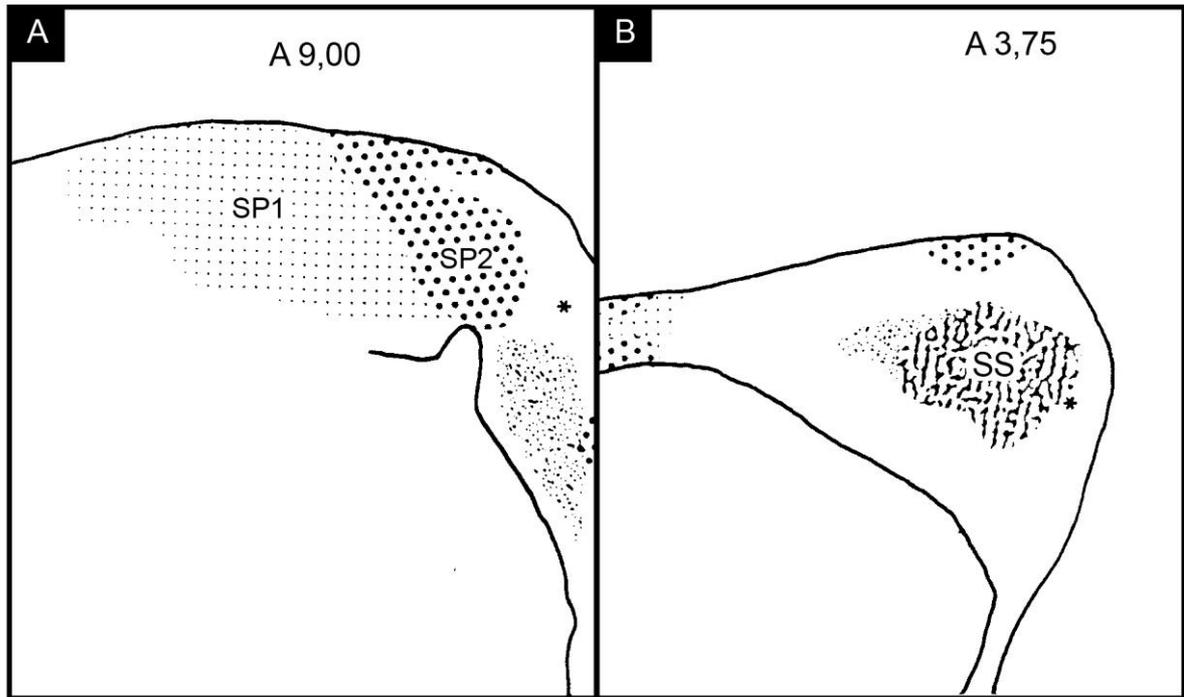
Fonte: (Atoji *et al.*, 2016). Adaptado.

Delimitar a área do hipocampo no encéfalo de mamíferos é fácil tanto em uma escala macroscópica quanto microscópica (Casini *et al.*, 1997). Entretanto, nas aves não é tão clara a linha de separação entre a APH e o limite dorsolateral. Essa região parece ser contínua com o hiperestriado acessório (HA) e em sua porção caudal com a região dorsolateral (D Székely, 1999). Em secções coradas pela técnica de Nissl, a APH e o HP são homogêneos e vistos como continuações da área cortical adjacente. Assim, tem sido um grande desafio encontrar uma forma de definir um limite entre o hipocampo e o restante do telencéfalo.

Em pombos, o neuropeptídeo designado *substancia P* faz o delineamento de alguns campos circunscritos dentro desse complexo (Erichsen *et al.*, 1991). Uma importante descoberta foi o surgimento do núcleo reativo para substancia P (SPF) de disposição alongada rostrocaudalmente. Isto forneceu a resposta direta para definir o limite lateral. Neste padrão de

divisão, a SPF está localizada externamente ao HP e é separada do hiperpalium accessorium (Erichsen *et al.*, 1991) (**Figura 6**).

**Figura 6:** Figura esquemática ilustrando a distribuição do neuropeptídeo substância P na formação hipocampal do pombo (*Columba livia*): (A) Secção rostral; (B) Secção caudal.

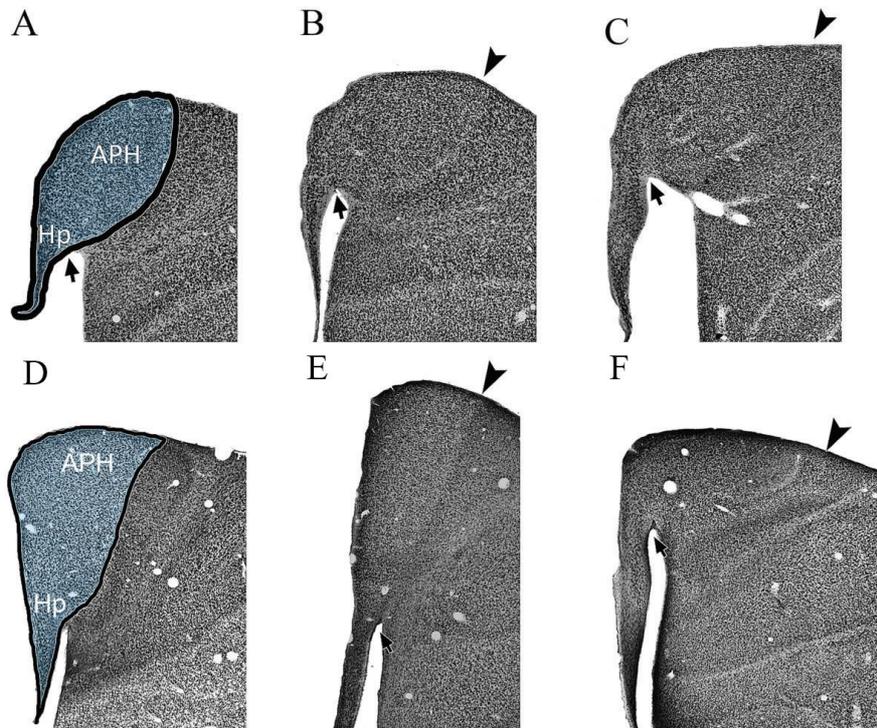


Nota: SP1 e SP2 = Sustância P; SS = Somatostatina

Em pombos o hipocampo é descrito como a área que está localizada entre o ventrículo lateral e a fissura inter-hemisférica sendo lateralmente separado da área parahipocampal, por uma região imunorreativa aos anticorpos anti-SP (substância P), LENK (leucina-encefalina) e TH (tirosina hidroxilase) (Atoji e Wild, 2004). Segundo esta definição, a região coincide com a estabelecida por estudos citoarquitetônicos, os quais utilizaram a coloração de Nissl e imunomarcção por NeuN em outras espécies de aves (Sherry e Vaccarino, 1989; Montagnese *et al.*, 1996; Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016).

Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) demonstraram que os limites da formação hipocampal em aves migratórias marinhas, são claramente definidos em secções imunomarcadas com anti-NeuN e os padrões observados são muito similares ao descritos em pombo (Atoji *et al.*, 2002), zebra finch (Bailey *et al.*, 2002) e black-capped chickadees (Sherry e Vaccarino, 1989). A **Figura 7** mostra secções coronais de duas espécies de aves migratórias marinhas imuno marcadas por Anti-NeuN onde ficam evidentes os limites da formação hipocampal.

**Figura 7:** Serie de secções cortadas no plano coronal, A à C estão no sentido rostro-caudal para *Calidris pusila*; D à F sentido rostro-caudal para *Actitis macularia*.



Fonte: (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016) Adaptado

Muito tem sido investigado no que diz respeito à relação entre os fatores ambientais, a memória e o hipocampo de aves (Sherry, 1984; Tulving, 1985; Zola-Morgan *et al.*, 1986; Sambrook *et al.*, 1989; Healy e Krebs, 1992; Ladage *et al.*, 2011; Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016). Nas aves que armazenam alimentos ou *food-caching birds* (que tem a capacidade comportamental de esconder e recuperar comida em locais específicos) são bons modelos para investigar a relação entre a memória e o comportamento. Para Krebs *et al.* (1989) a recuperação da comida nessas aves depende da integridade do hipocampo que consequentemente afeta a memória espacial. Estes autores demonstraram que lesões no complexo hipocampal comprometeram a precisão de memórias espaciais (as quais estavam relacionadas aos locais de armazenagem do alimento). Este comportamento de armazenagem também provoca um aumento de volume e neurogênese hipocampal (Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003).

Nas aves armazenadoras de alimento o hipocampo é de extrema importância para a localização espacial dos locais, uma vez que essas aves utilizam sua memória espacial e de reconhecimento de padrões para chegar até o alimento. (Sherry e Vaccarino, 1989). Para recuperar a localização exata essas utilizam pontos de referência, relações geométricas entre os locais e as marcas espaciais existentes e também se orientam através da bússola solar que

consiste em utilizar a posição do sol para obter informações de direção durante o voo (Wiltschko e Wiltschko, 2002).

Observações no comportamento das aves *food-cache* mostraram que elas podem lembrar qual o tipo de alimento armazenado em um local específico (Sherry, 1984; Clayton e Dickinson, 1998). Essa capacidade vem da integração entre a informação espacial, o tipo de alimento e o momento em que a comida foi estocada, caracterizando um comportamento semelhante à ELM descrita em mamíferos (Dere *et al.*, 2005) e por conseguinte à memória episódica humana (Tulving, 1985; Clayton, Griffiths, *et al.*, 2001)

Outros estudos têm comparado em nível taxonômico o hipocampo de aves que armazenam e que não armazenam alimentos e sugerem que quando comparadas famílias e subfamílias destas, o hipocampo é maior em aves que exibem esse comportamento (Krebs *et al.*, 1989; Sherry e Vaccarino, 1989) (Krebs *et al.*, 1989; Sherry e Vaccarino, 1989; Healy e Krebs, 1992; Healy *et al.*, 1994; Hampton *et al.*, 1995).

Na Europa e Ásia estudos comparativos de espécies semelhantes mostram que existe uma diferença no volume do hipocampo (aves dessa região possuem hipocampo maior) quando comparados com espécies da América do Norte (que possuem o hipocampo menor). Tais características são válidas tanto para aves armazenadoras de alimento quanto para aves não armazenadoras (Garamszegi e Lucas, 2005). Posteriormente foi identificado que a diferença existente no volume do hipocampo não está relacionada às diferenças continentais, mas poderia estar fortemente relacionada ao grau de especialização da capacidade de esconder alimento entre as espécies (Lucas *et al.*, 2004). Um estudo em grande escala utilizando diferenças filogenéticas mostrou uma relação positiva entre o comportamento de estocagem de alimentos e o volume do hipocampo (Garamszegi e Eens, 2004).

No que diz respeito às aves migratórias, o hipocampo é importante para recuperar memórias relacionadas aos locais de parada para o reabastecimento das reservas de energia, bem como os detalhes de ambos os habitats de reprodução e invernada (Healy *et al.*, 1996; Mettke Hofmann e Gwinner, 2003). Para chegar até estes locais, além do hipocampo as aves utilizam uma variedade de mecanismos de navegação, como pistas geomagnéticas, celestiais, olfativas (Wiltschko e Wiltschko, 1996; Alerstam, 2001; Ritz *et al.*, 2009; Meskenaite *et al.*, 2016).

Tem sido sugerido que as aves migratórias possuem um complexo sistema de navegação em que a aprendizagem e a memória são importantes componentes (Bingman e Cheng, 2005).

Se essas espécies, de fato, possuem maiores exigências em relação à memória, seria razoável esperar um hipocampo ampliado em comparação às não migratórias (Healy *et al.*, 1996).

Um estudo que trata da espécie *Calidris pusilla* que se desloca com voos ininterruptos de aproximadamente 4.000 km sobre o oceano (Brown e Haley, 2014) e *Actitis macularia* que migra na mesma direção com voos interrompidos por paradas múltiplas, em sítios selecionados para repouso e alimentação (Reed *et al.*, 2013) demonstrou que as espécies possuem diferenças marcantes no número e morfologia de células microgliais, bem como no volume da formação hipocampal, isso sugere que as diferentes pressões ambientais podem alterar de formas distintas o complexo hipocampal (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016). As diferenças na memória espacial e no hipocampo das aves migratórias podem ser dependentes da experiência e da crescente pressão de seleção (Healy *et al.*, 1996; Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003; Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016).

Durante a jornada migratória as aves estão expostas a mudanças dramáticas em características ambientais e muitas destas são adquiridas por elas na forma de “*imprints*” os quais funcionam como pistas para a localização da ave no espaço e estimação da distância percorrida assim como da restante até o alvo final da migração (Mouritsen *et al.*, 2016). Nas aves migratórias essas drásticas mudanças do arranjo espacial contribuem para uma série de mudanças fisiológicas nas espécies migrantes como o aumento de hormônios no período da migração (Holberton, 1999) e também alterações nos níveis de neurogênese (Ladage *et al.*, 2011).

Já é bem aceito que o hipocampo das aves executa um importante papel no processamento de memória espacial, as aves migratórias em especial aquelas que migram longas distâncias são uma classe em que os indivíduos estão expostos a diferentes ambientes e, por conseguinte o estímulo visuoespacial é maior (Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003). Assim, em espécies de aves migratórias o hipocampo é um excelente candidato para ser avaliado no que diz respeito às mudanças ocasionadas pelo comportamento da migração (Ladage *et al.*, 2011).

### **1.3. Caracterização das áreas e dos objetos de interesse em neuromorfologia.**

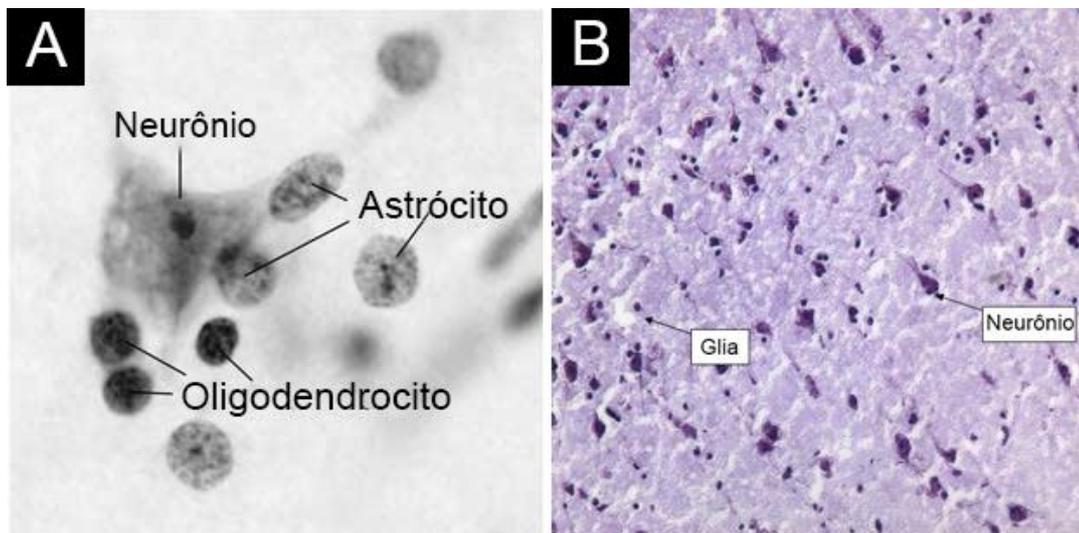
#### **1.3.1. Caracterização citoarquitetônica**

A coloração de Nissl é uma técnica básica amplamente utilizada para revelar a citoarquitetonia das diversas regiões do sistema nervoso, na qual obtém-se a coloração do corpo celular e do retículo endoplasmático. Esta pode ser realizada com vários corantes básicos

(incluindo Violeta de Cresila Acetato) para corar o DNA carregado negativamente e é usado para realçar características estruturais dos neurônios (Nissl, 1892).

Em aves e mamíferos, quando se utiliza a coloração de Nissl, existe certa dificuldade em diferenciar as células da glia entre si. Entretanto baseando-se em alguns critérios morfológicos como sua cor mais clara, forma, ausência de processos dendríticos e cromatina desagregada é possível diferenciar as células gliais dos neurônios (Roth *et al.*, 2013). Estes critérios foram utilizados em estudos com anfíbios (Rosenbluth, 1966), primatas (Boire *et al.*, 2002) e aves (Roth *et al.*, 2013) e também pode ser combinado com técnicas de imunohistoquímica em uma dupla marcação, como por exemplo Coloração de Nissl + NeuN (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2010). Existem também diversos estudos que discutem as mesmas características morfológicas para distinguir neurônios de células da glia em coloração de Nissl (Bowley *et al.*, 2002; Hamidi *et al.*, 2004; Brauch *et al.*, 2006). Exemplos da diferenciação de neurônios e células gliais podem ser vistos nas **Figura 8**.

**Figura 8:** Exemplos de visualização de células em coloração de Nissl: (A) Lâmina de cérebro tratado com coloração de Nissl. Um neurônio e uma célula da glia são indicados na figura; (B) Imagem de uma secção corada pela técnica de Nissl mostrando um neurônio com núcleo bem



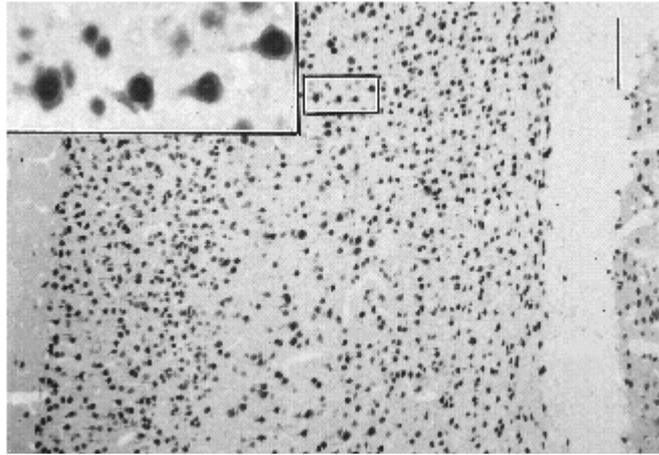
Fonte: (A) Adaptado de Brauch *et al.* (2006); (B) Adaptado de Hamidi *et al.* (2004)

### 1.3.2. Neurônios na formação hipocampal

As técnicas de produção de anticorpos monoclonais e policlonais trazem diversas vantagens na identificação de proteínas que apresentam baixos níveis de expressão, como por exemplo os fatores nucleares reguladores (Bhorjee *et al.*, 1983; Mullen *et al.*, 1992). Uma abordagem proposta por Mullen *et al.* (1992) produz anticorpos monoclonais para identificar

proteínas importantes na regulação do fenótipo neuronal descrita como *Neuronal Nuclei* (NeuN) (**Figura 9**).

**Figura 9:** Células imunomarcadas com NeuN



Fonte: (Mullen et al., 1992) Adaptado.

O NeuN é expresso pelos neurônios no sistema nervoso de muitas espécies de vertebrados incluindo aves, roedores e humanos (Mullen *et al.*, 1992). Em aves, marcadores de proteína específica (NeuN) têm sido utilizados para delimitar o contorno da formação hipocampal e realizar comparações, de números celulares (Sherry e Hoshooley, 2010; Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016). Estudos na espécie *Poecile atricapillus* revelaram que a utilização de reações imunohistoquímicas por NeuN são muito eficazes na marcação seletiva de neurônios em aves exibindo padrões de marcação muito similares aos encontrados em mamíferos (Hoshooley e Sherry, 2004).

Em aves migratórias marinhas a utilização do NeuN como marcador seletivo de neurônios maduros foi utilizada em poucos estudos. Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) demonstraram através da imunomarcação por NeuN que é possível a estimação do número de neurônios na formação hipocampal de aves marinhas. O estudo também demonstrou que usando NeuN foi perfeitamente possível a definição dos limites laterais da formação hipocampal (**Figura 7**).

### 1.3.3. Marcadores de Neurogênese

As aves migratórias oferecem excelentes oportunidades para investigar a neurogênese, pois é possível estudá-las tanto em laboratório quanto na natureza, o que as torna ideais para a investigações de processos neurais subjacentes a aprendizagem (Anat e Vladimir, 2011). Hoje

a ocorrência de neurogênese em animais adultos é amplamente aceita e muito do nosso conhecimento sobre o assunto é baseado em estudos focados em aves (Goldman e Nottebohm, 1983).

Vários estudos demonstram que as espécies/subespécies migratórias têm melhor memória espacial, e isso está associado a volumes hipocâmpais maiores e com mais neurônios quando comparado às residentes (Healy *et al.*, 1996; Cristol *et al.*, 2003; Mettke Hofmann e Gwinner, 2003; Pravosudov *et al.*, 2006). Além disso, um estudo recente mostrou que aves migratórias adultas têm uma neurogênese mais intensa do que os adultos não migrantes (Ladage *et al.*, 2011).

Uma das questões mais importantes sobre a neurogênese adulta é a sua função, e como esta pode causar mudanças diretas na memória. Estudos com intuito de investigar esse processo são necessários para uma melhor compreensão desta (Anat e Vladimir, 2011). Um dos fatores conhecido por afetar a neurogênese é a idade, que também influencia o recrutamento neuronal, de forma que na idade adulta este recrutamento parece diminuir com o passar do tempo (Ling *et al.*, 1997). Em pombos os neurônios gerados na vida adulta são integrados rapidamente ao sistema hipocâmpal, o que poderia ser um resultado do hábito migratório (Meskenaite *et al.*, 2016). Isto e outros indícios indicam que o número de neurônios recém-gerados em regiões cerebrais como o hipocampo pode ser aumentado em situações de maior estimulação hipocâmpal como por exemplo durante a migração. (Fuchs e Gould, 2000).

Durante a fase adulta do desenvolvimento o cérebro reduz a taxa de neurogênese, limitando-se somente a áreas específicas do encéfalo, esta produção de novas células caracteriza a plasticidade do cérebro adulto (Kandel *et al.*, 2014) o que também é observado em aves. (Hampton *et al.*, 1995). A neurogênese em indivíduos adultos é constituída de múltiplas etapas e isso inclui: proliferação de células novas, diferenciação em diversos fenótipos neurais, migração das células para alcançar áreas do cérebro e sua eventual incorporação nos circuitos neuronais existentes. Em algumas espécies de aves que demandam intensas taxas de aprendizagem, o número de neurônios não aumenta com a idade, sugerindo que existe uma adição contínua de novos neurônios representando a substituição das células antigas que são perdidas indicando uma consequente maior utilização de certas áreas do encéfalo (Kirn e Nottebohm, 1993; Lois e Alvarez-Buylla, 1994).

Se a riqueza e variabilidade do ambiente estimula a neurogênese, então os neurônios recém-gerados melhoram as habilidades dos animais adultos para explorar o seu habitat. No entanto, existem inúmeras variáveis potencialmente relevantes no ambiente, sendo difícil

determinar a importância relativa de um estímulo específico para tal plasticidade cerebral (Anat e Vladimir, 2011).

#### **1.3.4. Marcadores de genes de ativação imediata**

O c-Fos pertence à família de genes fos, que são genes de ativação imediata e pode ser utilizado como marcador de atividade funcional dos neurônios tal como previamente descrito (Chaudhuri, 1997; Krukoff, 1998; Zangenehpour e Chaudhuri, 2002). A expressão de c-fos é um indicativo indireto da atividade neuronal, porque o c-fos é frequentemente expresso quando os neurônios acionam potenciais de ação. O mRNA e a proteína c-fos são geralmente os primeiros a serem expressos e por isso são conhecidos como genes de ativação imediata (Hoffman *et al.*, 1993). Na maioria das células, os níveis de expressão de c-Fos são baixos. Entretanto, dependendo da circunstância, as células podem mostrar uma expressão maior desse gene. Nas células neuronais isso pode ocorrer devido ao processo de sinalização que é descrito por exibir altos níveis de expressão desse gene, entretanto outros fatores além da sinalização também podem estar envolvidos nesse processo (Greenberg e Ziff, 1984; Kruijer *et al.*, 1985; Morgan e Curran, 1991).

A indução da transcrição de c-Fos ocorre na presença de inibidores de síntese proteica, sugerindo que todas as proteínas necessárias para a expressão desse gene estão presentes em células não estimuladas e mostrando que estas são ativadas por modificações que ocorrem na fase pós-tradução. Esse processo classifica os genes da família fos como genes de ativação rápida ou de resposta imediata (Lau e Nathans, 1987).

O gene de ativação imediata C-Fos é bastante empregado para mapeamento de regiões do encéfalo que estão sendo influenciadas por estímulos externos ao corpo tais como luz (Beaver *et al.*, 1993), odores (Tronel e Sara, 2002) e até mesmo mecanismos mais complexos atrelados a memórias dependentes de experiências (Guzowski *et al.*, 2001). Sadananda e Bischof (2004) demonstraram que na formação hipocampal de zebra finch o número de células que expressam o gene de ativação imediata C-Fos varia de acordo com os estímulos ambientais a que estão submetidos os indivíduos em estudo. Apesar das estimativas numéricas não serem estereológicas e portanto imprecisas, ficou muito clara a influência de estímulos ambientais na expressão desse marcador.

## **1.4. Estereologia: Números e Volumes na formação hipocampal**

### **1.4.1. Estimativas do número de células**

A análise microscópica é uma ferramenta poderosa para descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos, principalmente se a partir dessa análise for possível gerar números, (Howard e Reed, 2004). É importante destacar que quando se utiliza um microscópio para analisar alguns tipos de tecido, somente uma pequena fração da estrutura de interesse será utilizada na análise detalhada (Schmitz e Hof, 2000).

Em estudos de análises qualitativas, os quais a partir desta expressam valores numéricos acerca de contagem de células, densidade, área e volume apresentam resultados controversos, e isto pode ser atribuído a suposições prévias sobre o tecido e a geometria das células e suas distribuições no plano da secção (Geinisman *et al.*, 1995; Mayhew e Gundersen, 1996). Outros estudos quantitativos introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos nos quais a magnitude é impossível de ser avaliada, qualquer que seja a resolução microscópica: óptica (Gardella *et al.*, 2003; Mandarin-De-Lacerda, 2003; Howard e Reed, 2004), confocal (Peterson, 1999; Kubínová e Janáček, 2001) ou eletrônica (Peterson, 1999; Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007).

A estereologia é um dos ramos da ciência que trabalha com a reconstrução tridimensional de características específicas de objetos, a partir da reconstrução serial de estruturas bidimensionais destes (Weibel, 1989). Nesse método, a sonda e os parâmetros de amostragem em primeiro momento são definidos de maneira independente do volume, da forma ou da orientação espacial da área que será investigada (West, 2002). Com isso, os números que são estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos de volume, número, conectividade, distribuição espacial e volume das estruturas biológicas, sem que seja necessário um estudo prévio a respeito da geometria celular ou da geometria do tecido (Glaser e Glaser, 2000; Schmitz e Hof, 2005).

Nas aves migratórias diversos estudos empregam o método de estereologia para comparar o hipocampo (Chilton, 1995; Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003; Roth *et al.*, 2013; Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016; Magalhães *et al.*, 2017). Apesar destes estudos a literatura a respeito de estimativas estereológicas dedicados a células neurais em aves migratórias marinhas se resume somente a um trabalho realizado por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016), portanto dedicar esforços nessa direção torna-se imprescindível.

#### **1.4.2. Estimativas de volume da formação hipocampal e volume celular**

Estimativas de volumes de estruturas do encéfalo podem ser úteis para responder à algumas questões sobre a plasticidade do cérebro causadas por patógenos (House *et al.*, 2011), perda de volume causadas por doenças neurodegenerativas (Hockly *et al.*, 2002), diferenças em volumes causadas por exposição a diferentes tipos de ambientes e diferentes condições nestes (Roth e Pravosudov, 2009), ou mesmo por diferentes hábitos de forrageio (Clayton e Krebs, 1995).

Em aves tem sido promissores os estudos que tratam da influência ambiental no volume de estruturas do cérebro como a formação hipocampal (Roth e Pravosudov, 2009). É muito discutido que fatores como condições ambientais extremas podem de fato modular a plasticidade hipocampal em aves (Krebs *et al.*, 1989; Sherry e Vaccarino, 1989; Sherry *et al.*, 1992; Roth e Pravosudov, 2009).

Já foi reportado que as aves migratórias que estão expostas a diferentes locais de parada durante sua trajetória tem volumes hipocampais alterados em relação a espécies que realizam voos longos e sem paradas (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016). Aves migratórias são portanto modelos experimentais adequados para ampliar a discussão, sobre o efeito de determinados comportamentos na memória e plasticidade hipocampal (Krebs *et al.*, 1989; Healy *et al.*, 1996; Cristol *et al.*, 2003; Pravosudov *et al.*, 2006; Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016).

Thompson e Brenowitz (2005) demonstram que em algumas espécies, determinadas regiões do encéfalo revelam variações sazonais de volume. Os autores atribuem essa diferença possivelmente a maior atividade de canto das aves em um dos períodos, entretanto outro achado mais “sensível” neste trabalho foi a diferença no tamanho (em volume e área) dos neurônios entre os dois períodos sazonais revelando duas populações de neurônios classificadas pelo volume do soma neuronal. Apesar da diferença significativa no volume dos neurônios, os autores não observaram diferenças nos números de células neuronais.

Apesar dos achados de Thompson e Brenowitz (2005) para verificarmos se de fato uma mudança no volume dos neurônios pode estar ocorrendo como consequência de mudanças ambientais e por conseguinte maior atividade neural, é necessário um estudo mais aprofundado usando diferentes marcadores. O estudo comparativo de espécies que migram e que não migram possibilita uma série de medidas morfométricas do soma neuronal revelando possíveis influências ambientais associadas a essas mudanças.

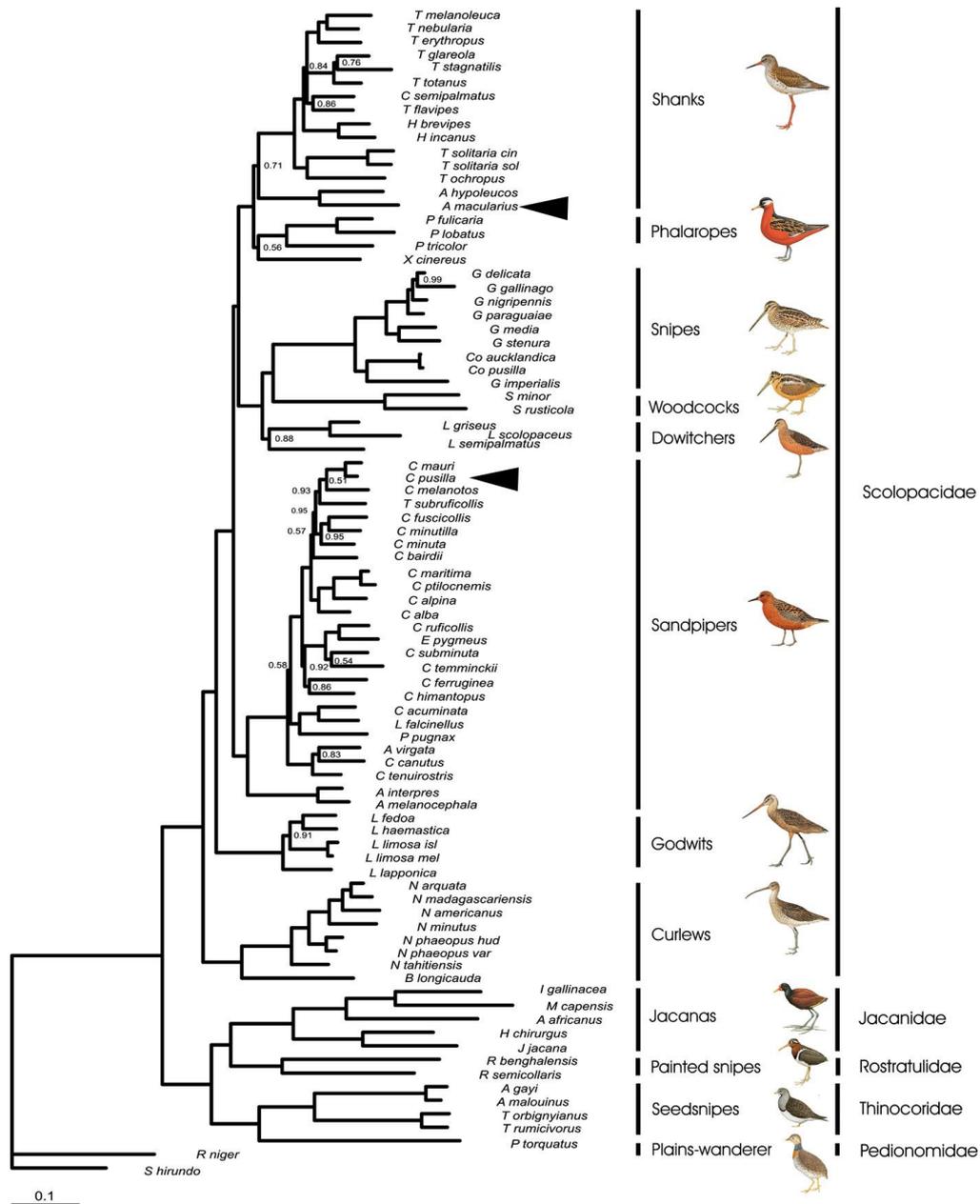
### 1.5. Relações filogenéticas entre Scolopacidae e Charadriidae

Muito da informação filogenética assim como estudos envolvendo a neurobiologia da maioria das espécies de aves marinhas ainda não foram realizados. No que diz respeito às informações filogenéticas para as aves marinhas muita informação está disponível em artigos relativamente recentes tanto para a família Charadriidae (Barth et al., 2013), quanto para a família Scolopacidae (Gibson e Baker, 2012). Entretanto quando se fala das características neuromorfológicas, tais como número de células e/ou volume da formação hipocampal, a pouca literatura deste tipo disponível para este grupo de organismos (aves marinhas) lida com as características neuromorfológicas utilizando duas espécies de aves marinhas (*A. macularia* e *C. pusilla*) para verificar o efeito de características comportamentais na neurobiologia do hipocampo destas aves (Guerreiro-Diniz et al., 2016). Assim a utilização de dados presentes na literatura é de extrema importância para realização das análises comparativas.

Com o auxílio de uma abordagem molecular, utilizando genes mitocondriais e nucleares Gibson e Baker (2012) propuseram as relações filogenéticas entre membros da família Scolopacidae e confirmaram filogenias propostas anteriormente em trabalhos moleculares e morfológicos (Brown e Ward, 1990; Whittingham et al., 2000; Freckleton et al., 2002; Paton et al., 2003; Baker et al., 2007; Gibson e Baker, 2012; Gustafsson e Olsson, 2012; Barth et al., 2013), além de contribuir na definição de parte das relações mal resolvidas através do método de super árvores na filogenia proposta por Thomas et al. (2004) (**Figura 10**). No que diz respeito a família Charadriidae o estudo de Barth et al. (2013) propôs as relações filogenéticas existentes entre os membros da família (**Figura 11**). Os trabalhos de Gibson e Baker (2012) e

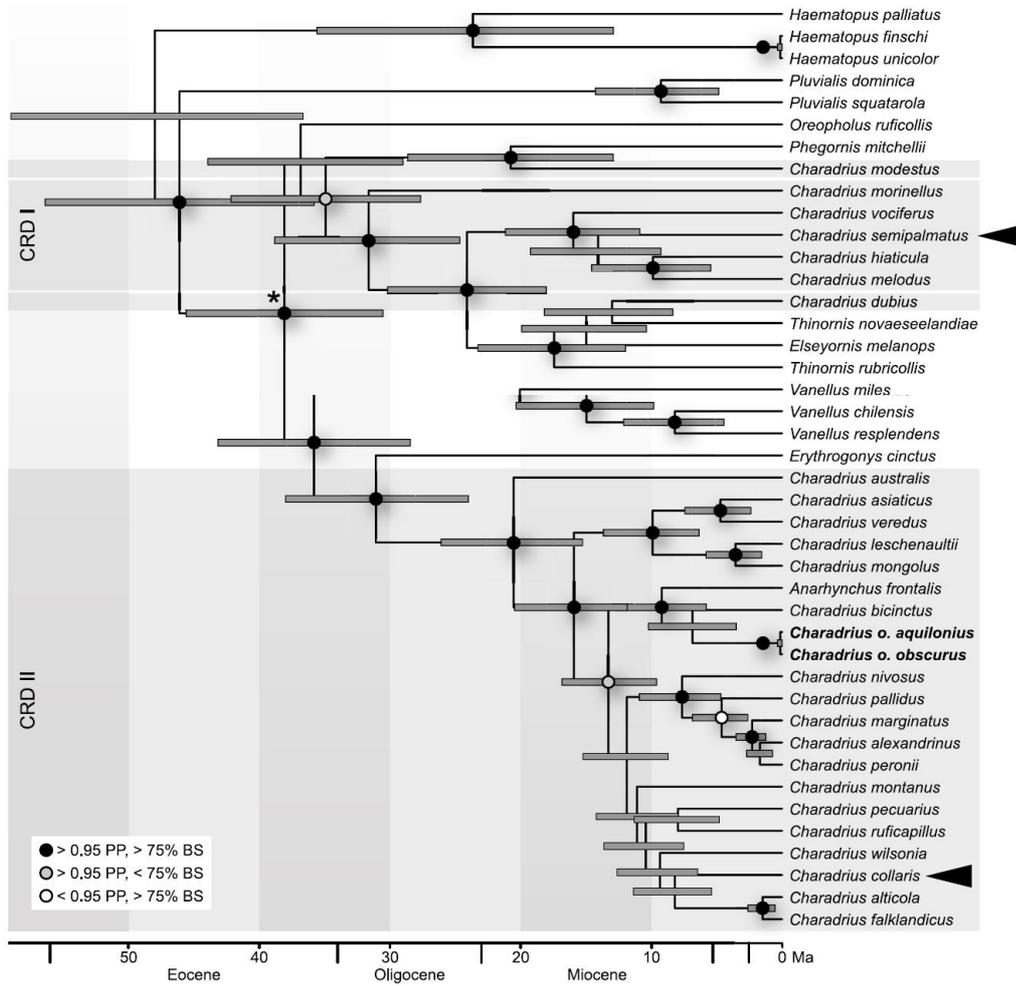
Barth *et al.* (2013) nos permitem analisar de forma mais completa as distâncias evolutivas que envolvem as aves marinhas presentes nestas duas famílias.

**Figura 10:** Filogenia de inferência bayesiana de membros da família Scolopacidae baseada nos genes RAG1, CYT B, 12S, ND2 e COI proposta por (Gibson e Baker, 2012). Todos os nós receberam valores de probabilidade de 1.00 com exceção daqueles que possuem os valores.



Nota: As cabeças de setas indicam as espécies *A. macularia* (*macularius*) e *C. pusilla*.

**Figura 11:** Filogenia da família Charadriidae proposta por Barth *et al.* (2013). Pontos pretos indicam valores de probabilidade da inferência bayesiana (PIB) maiores que 0.95 e valores de Bootstrap (BP) maiores que 75% para máxima verossimilhança; Pontos cinza são valores de PIB maiores que 0.95 e BP menores que 75%; pontos brancos são valores de PIB menores que 0.95 e valores de BP maiores que 75%.



Nota: As cabeças de setas indicam as espécies *C. semipalmatus* e *C. collaris*

## 1.6. Vieses comparativos e evolução dos caracteres

O método comparativo é empregado na maioria dos estudos como uma forma de verificar similaridades/diferenças em características entre espécies ou mesmo grupos de espécies, assim como inferir efeitos provocados por variáveis ambientais nesses caracteres (Felsenstein, 1985b). Nos estudos que envolvem a neuroecologia é comum a discussão sobre um comportamento e seu efeito em uma característica neurobiológica específica (Bingman e Cheng, 2005; Anat e Vladimir, 2011; Chancellor *et al.*, 2011; Bingman e Macdougall-Shackleton, 2017). Quando se trata de aves, vários estudos apontam que a formação hipocampal pode ser afetada por mudanças sazonais (Smulders *et al.*, 1995), envelhecimento (Healy *et al.*, 1996) e comportamento de migração/sedentarismo (Cristol *et al.*, 2003).

Apesar das evidências apoiarem o modelo de “causa e efeito” entre as variáveis ambientais/comportamentais e as alterações neurológicas na formação hipocampal das aves, a simples comparação entre os grupos analisados requer ferramentas estatísticas com uma maior robustez, capazes de levar em consideração as relações evolutivas por trás de cada espécie, já que os caracteres alvo das comparações (por exemplo a formação hipocampal) não são independentes. Estes são advindos de uma modelo hierárquico de evolução e devemos considerar que esses grupos compartilham uma história evolutiva entre si (Eldredge e Cracraft, 1980; Harvey e Pagel, 1991; Martins e Hansen, 1997).

No estudo de Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) várias características foram submetidas à comparação entre duas espécies de gêneros diferentes. Os autores argumentam que diferentes estratégias de migração provocam alterações na quantidade e morfologia de células microgliais e mudanças do volume da formação hipocampal. Apesar do suporte estatístico que indica a diferença entre os grupos analisados, os caracteres foram tratados de forma independente no que diz respeito à relação evolutiva entre as espécies.

Uma proposta interessante para avaliar a evolução de dois ou mais caracteres, considerando a distância evolutiva entre cada componente da comparação, são os Contrastes Filogenéticos propostos por Felsenstein (1985b). Eles nos permitem ponderar a influência evolutiva. Para utilização do método são necessários alguns requisitos: (1) dados de dois ou mais caracteres; (2) As relações cladísticas entre as espécies a serem analisadas; (3) Os comprimentos dos ramos precisam possuir uma unidade que represente a distância entre os táxons, por exemplo distância genética ou mesmo tempo (Felsenstein, 1985b; Garland *et al.*, 1992).

Vários estudos na área da neuroecologia vem utilizado o método proposto por Felsenstein (1985b) para validar seus resultados. Safi e Dechmann (2005) detectaram através dos Contrastes Filogenéticos que em morcegos o volume do hipocampo está correlacionado com a área da asa e verificaram também que em algumas famílias de morcegos o volume do bulbo olfatório também é correlacionado à área da asa. Assim na neuroecologia de aves migratórias o método dos contrastes filogenéticos pode nos auxiliar na avaliação dessa problemática e confirmar se de fato o comportamento de migração provoca as alterações propostas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente na literatura existem várias pesquisas que relacionam estruturas do encéfalo, como o hipocampo, e a memória principalmente em mamíferos (Nguyen *et al.*, 2000; Duffy *et al.*, 2001) e em aves (Sherry e Vaccarino, 1989; Hampton e Shettleworth, 1996; Bird e Burgess, 2008). Apesar disso, pesquisas que trazem como alvo as aves migratórias são escassas. Através de ensaios estereológicos e morfologia tridimensional Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) encontraram diferenças significativas na morfologia neural, relacionada ao volume da formação hipocampal e morfometria de células microgliais. Estes autores utilizaram no modelo experimental espécies que possuem trajetórias de migração diferentes. Entretanto, uma questão que surge é se essas diferenças observadas estão relacionadas aos distintos comportamentos ou se são causadas por fatores atrelados a distância filogenética entre as espécies analisadas. Determinar a influência evolutiva nas características neuromorfológicas é importante para validar essas comparações e descartar um possível “viés filogenético”.

Embora Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) tenham observado que a quantidade de neurônios mostrou-se igual em ambas as espécies analisadas, a quantidade de micróglia e o volume hipocampal foram significativamente maiores em *Actitis macularia*. No entanto, não foi possível afirmar, com base neste conjunto de evidências, se essa relação e suas diferenças estavam ou não associadas à resposta adaptativa expressa no padrão de migração, reforçando a necessidade da realização de mais estudos relacionados a esta temática.

Portanto, estimar de maneira comparativa a relação neurônio/glia, a taxa de neurogênese e expressão de genes de ativação imediata pode nos trazer respostas mais substanciais para saber se o processo comportamental está de fato relacionado às diferenças encontradas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016). Assim as espécies *C. semipalmatus* e *C. collaris* representam

grupos migrante e não migrante que podem ser chave para o estudo do estímulo causado pela migração em regiões como a formação hipocampal.

A utilização de marcadores genéticos capazes de esclarecer as relações de parentesco evolutivo entre estas espécies, não apenas dará suporte às discussões acerca das variações nas taxas de neurônios, glias, neurogênese e marcadores de expressão rápida, mas também possibilitará a identificação da influência evolutiva nos caracteres analisados (número de células e volume da formação hipocampal).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar se as respostas adaptativas do hipocampo ao comportamento migratório de aves em período de invernada estão relacionadas com a migração e/ou com o padrão evolutivo entre as espécies migrantes e não migrantes pertencentes ao gênero *Charadrius*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Descrever a morfologia da formação hipocampal das espécies de aves migratórias e não migratórias *C. semipalmatus* e *C. collaris*, estabelecendo seus limites arquitetônicos.
- Estimar o número de células da glia e de neurônios, imunomarcadas com NeuN, DCX e C-Fos, identificando possíveis variações neste número no hipocampo de cada espécie.
- Comparar o volume do soma neuronal entre as duas espécies.
- Verificar a existência de correlação entre o volume da formação hipocampal e o número de neurônios utilizando espécies das famílias Scolopacidae e Charadriidae.
- Verificar a existência de relação entre as distâncias genética e as características hipocampais (número de células e volume) dos grupos migrante e não migrante.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

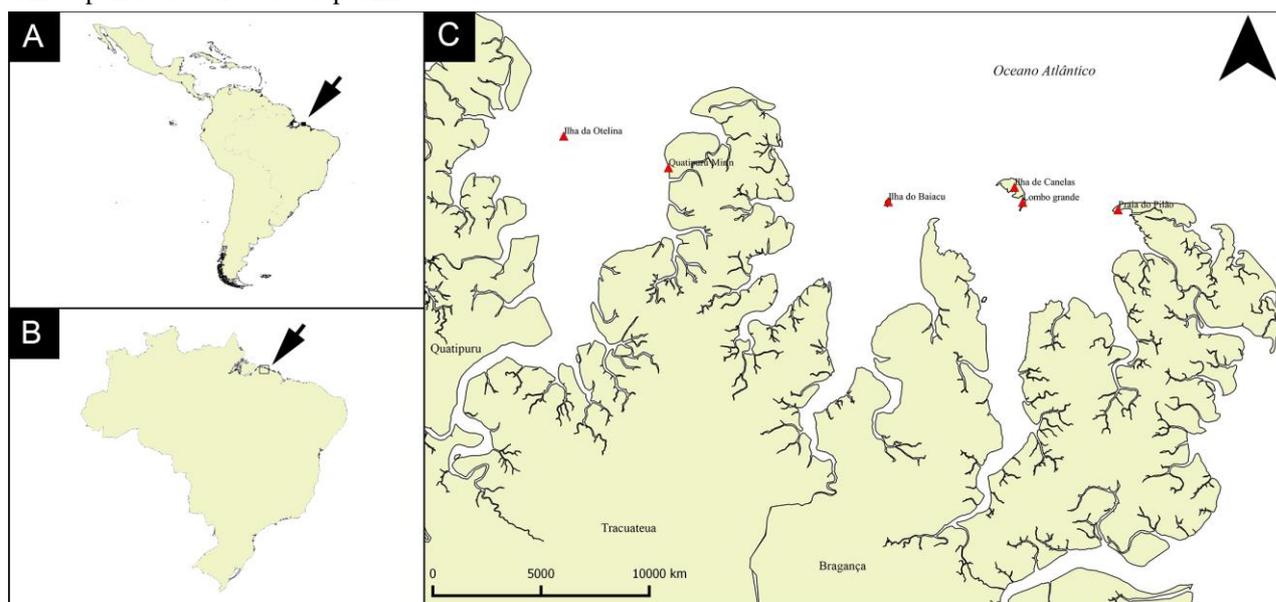
### 4.1. Autorização para o manuseio de animais silvestres

Os animais utilizados no presente estudo foram coletados sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) com número da licença 44551-3 (ANEXO 1 – Licença para captura e manuseio de animais silvestres).

### 4.2. Área de estudo

As coletas dos indivíduos de *C. collaris* e *C. semipalmatus* foram realizadas nas ilhas de Canela (0°47'33.52"S 46°43'8.55"W) e Lombo grande (0°47'33.52"S 46°43'8.55"W), Praia do Pilão (0°47'46.08"S 46°40'29.64"W) Baiacu (0°47'32.55"S 46°46'52.05"W), Quatipuru Mirim (0°46'35.61"S 46°52'57.66"W) e Ilha da Otelina (0°45'42.57"S 46°55'51.86"W), (a **Figura 12** mostra a área de estudo).

**Figura 12:** Mapa indicando os pontos de coleta dos espécimes. (A) América do sul; (B) Brasil; (C) Costa Bragantina com os pontos de coleta dos espécimes.



NOTA: Seta indica posição do quadro C nos quadros A e B

### 4.3. Amostragem

Em cada ponto de coleta foi aberta uma rede de neblina com as dimensões de 12m X 3m, ao entardecer. As redes foram vistoriadas a cada trinta minutos para a retirada das aves capturadas. Ainda *in situ*, foi preenchida uma ficha de muda adaptada de Cardoso (2008) para obter-se informações referentes à identificação da espécie, peso, comprimento total da asa, comprimento da 8ª primária, presença de muda e etc. Foram coletados quatro indivíduos de cada espécie para os estudos estereológicos (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016).

## **4.4. Processamento, histologia e imunohistoquímica**

### **4.4.1. Processamento para identificação e preparo das amostras**

#### **4.4.1.1. Análises biométricas**

Logo após a captura, as aves passaram por uma bateria de medidas biométricas, tais como comprimento do tarso, asa, pena 8<sup>o</sup> primaria e bico. E um ensaio comparativo empregando o Teste t de Student foi feito para medir possíveis diferenças entre os comprimentos médios do tarso, do bico e das asas de *C. semipalmatus* e *C. collaris*. Também realizamos medidas de asa e pena, entretanto Pascual e Senar (1996) argumentam que as penas são muito afetadas pela condição corporal do indivíduo, portanto essa variável foi excluída da análise.

#### **4.4.1.2. Perfusão**

As aves foram anestesiadas utilizando anestésico inalatório (Isoflurano) com tempo de exposição de 90 segundos ou até a ave perder a consciência totalmente. As aves foram perfundidas por via transcardíaca com solução salina de fosfato (Por 10 minutos, seguido de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato (PB), pH 7.2-7.4 por 30 minutos.

Para perfusão, utilizamos um escalpe conectado a um multivia (chave reguladora de fluido que permite alternar entre duas soluções sem trocar o escalpe), o escalpe é inserido no ventrículo esquerdo do coração com o objetivo de levar a primeira solução (solução salina) até o cérebro e depois alternamos para o paraformoldeído 4%.

Após iniciado o fluxo de solução salina é feito um corte na veia jugular do animal para que o fluxo da solução no sentido coração, cérebro e retorno pela veia jugular seja mais intenso, fazendo assim com que o tecido seja melhor permeado.

#### **4.4.1.3. Corte**

O encéfalo foi cortado no plano coronal utilizando um micrótomo de lamina vibratória modelo Vibratome (LeicaVibratomeVT1000S) com as seguintes configurações: Velocidade de 5 mm/s, frequência de 100 Hz e angulação de 15° (graus), a angulação foi testada em estudos anteriores em mamíferos (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2010) e aves (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016), a frequência e a velocidade foi obtida através de testes de cortes com encéfalos de aves padronizados em laboratório. Os cortes foram divididos em 06 partes diferentes, em que cada

uma das partes representa uma poça (1/6); cada poça foi usada para reações imunohistoquímicas assim como para coloração de Nissl.

#### 4.4.2. Histologia e imunohistoquímica

Uma poça de cada um dos 04 animais foi utilizada para coloração de Nissl (**Tabela 1**) e as demais foram reagidas por imunohistoquímica para NeuN, DCX, e C-Fos.

**Tabela 1:** Etapas da Coloração de Nissl com Tempo de Imersão em Cada Reagente

| SOLUÇÃO                           | TEMPO DE IMERSÃO              |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| H <sub>2</sub> O destilada        | 2 mergulhos (03segundos cada) |
| Cresil violeta                    | 20 min                        |
| Álcool 70% mais ácido acético 25% | 35 seg                        |
| Cresil violeta                    | 05 min                        |
| Álcool 70% mais ácido acético 25% | 10 seg                        |
| Álcool 95%                        | 02 min                        |
| Álcool 100%                       | 02 min                        |
| Xilol                             | 10 min                        |

NOTA: Adaptado de (Windle *et al.*, 1943)

Após a realização da perfusão, dissecação, e corte, as seções do tecido cerebral foram armazenadas em paraformoldeído 4% a 4°C (geladeira). A **Tabela 2** mostra todo o passo-a-passo do procedimento de imunohistoquímica. Os reagentes para preparação da solução GND e suas quantidades estão listados na **Tabela 3**.

**Tabela 2:** Passos das Reações de Imunohistoquímica com os tempos de Imersão e Enxagues em cada Reagente

| <b>SOLUÇÃO</b>                       | <b>TEMP (°C)</b> | <b>TEMPO DE IMERSÃO</b> |
|--------------------------------------|------------------|-------------------------|
| Ácido bórico                         | 70               | 60 minutos              |
| Tampão fosfato salina                | TA               | 2x5 minutos             |
| Tampão fosfato salina ®Triton (0,1%) | TA               | 3x5 minutos             |
| Tampão fosfato salina                | TA               | 3x2 minutos             |
| Tris salina                          | TA               | 3x2 minutos             |
| Normal Horse Serum 10%               | 4                | 12 horas                |
| Anticorpo primário                   | 4                | 12 horas                |
| Tampão fosfato salina ®Triton(0,1%)  | TA               | 3x2 minutos             |
| Anticorpo secundário                 | TA               | 1 hora                  |
| Peróxido de hidrogênio 0,3%          | TA               | 15 minutos              |
| Tampão fosfato salina ®Triton(0,1%)  | TA               | 3x2 minutos             |
| Solução ABC                          | TA               | 60 minutos              |
| Tampão fosfato salina ®Triton(0,1%)  | TA               | 3x2 minutos             |
| Revelação com GND                    |                  | Máx. 30 minutos         |
| Glucose oxidase                      | TA               | Máx. 15 segundos        |
| Tampão fosfato salina                | TA               | 3x2 minutos             |

NOTA: TA = Temperatura ambiente

**Tabela 3:** Reagentes e suas quantidades necessárias para preparação da solução GND

| <b>Reagente</b>         | <b>Quantidade (g)</b> |
|-------------------------|-----------------------|
| Diaminobenzidina (DAB)  | 0,006                 |
| Cloreto de Amônio       | 0,004                 |
| Glucose Oxidase         | 0,020                 |
| Nickel ammonium sulfate | 0,250                 |

NOTA: Misturar com 5ml de água destilada e 5ml de tampão acetato pH 0,6

Após o procedimento de imunohistoquímica, os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas, desidratados em séries de etanol (70, 80, 90, 100, 100%) seguido de xilol I e II por 10min cada e selados com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

#### 4.5. Análises estereológicas

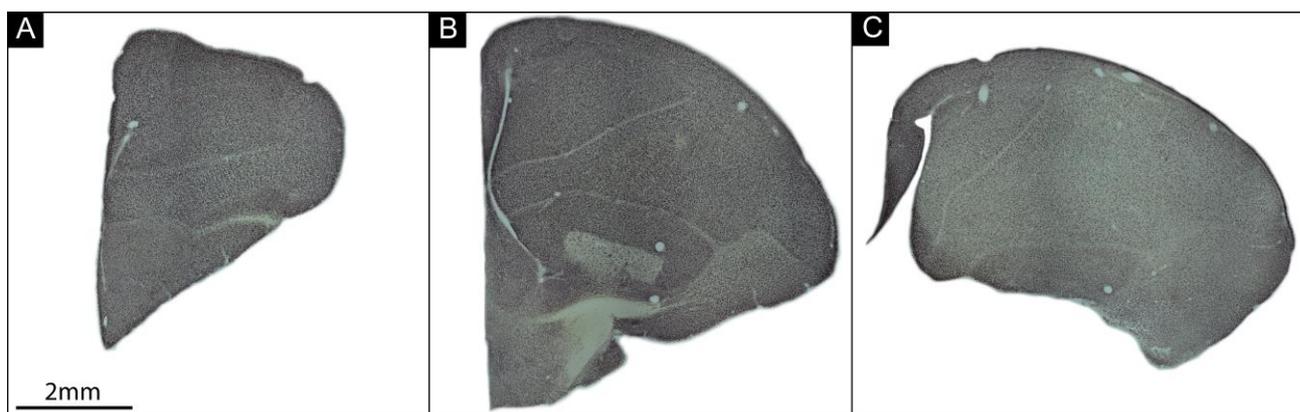
No presente trabalho, adotamos para definir a área de interesse, os limites utilizados por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) em que a formação hipocampal é constituída pelo hipocampo propriamente dito e a área parahipocampal com os seguintes limites: a borda lateral e ventral como sendo definidas pelo ventrículo lateral, as bordas dorsal e caudal como correspondentes à superfície do encéfalo, o limite medial como correspondendo à linha média e o limite inferior como uma mudança robusta na densidade celular em forma de V na vizinhança do septum. A área APH foi definida em posição dorsal e lateral ao hipocampo sendo separada daquele pelo sulco paraventricular. Para as análises definimos dois grupos de indivíduos, o primeiro grupo (**migrante**) foi representado por quatro animais da espécie migratória *C. semipalmatus* e o segundo grupo (**sedentário**) foram quatro indivíduos de *C. collaris*, este representa o grupo da espécie não migrante.

##### 4.5.1. Número de células: Fracionador óptico

Devido aos limites metodológicos, não é possível contar o número total de células existentes numa dada região do encéfalo e muito menos no encéfalo total. Entretanto, é possível realizar estimativas numéricas que se aproximem do número real de células (Cruz-Orive, 1994; Schmitz, 1998). O fracionador óptico é um método que estima o número total de células a partir de amostragem aleatória e sistemática da região que se pretende analisar (Schmitz e Hof, 2000). Este, é a combinação de duas ferramentas principais (dissector óptico e o fracionador de amostras), que dispensa conhecimento prévio sobre o volume, a forma ou mesmo a orientação das partículas a serem estimadas e uma das maiores vantagens é que este método não é afetado pela retração do tecido e não requer definições rigorosas de fronteiras estruturais que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento (West, 2002).

O método do Fracionador óptico consiste em alguns passos específicos (adotamos como sistema estereológico para aplicação do método o software StereoInvestigator 11.03 (MBF Bioscience, Williston, VT USA) ), (1) inicialmente delimitamos nossa região de interesse (no presente estudo adotamos a formação hipocampal) a partir da utilização de câmera acoplada ao microscópio e software especializado para geração dos contornos virtuais empregando objetivas de baixo aumento (4x), e informamos ao programa a espessura de corte do tecido; (2) definimos os parâmetros estereológicos para gerar um “plano de amostragem”. A partir desse plano definimos inicialmente a fração amostral das secções de interesse. Em nosso estudo utilizamos cada seis secções obtidas com o Vibratome. Isso significa que nossa fração amostral é 1/6. Assim, a nossa série anatômica para o primeiro marcador reuniu a 1<sup>a</sup>, a 7<sup>a</sup>, a 13<sup>a</sup> e assim sucessivamente, até o final da formação hipocampal. O segundo marcador foi aplicado a série anatômica composta pela 2<sup>a</sup>, a 8<sup>a</sup>, a 14<sup>a</sup> e assim por diante até o final da formação hipocampal. (Ver **Figura 13**); (3) Definição da área da caixa de contagem (serão os valores relativos aos eixos X e Y em  $\mu\text{m}$ ), definição da área do grid de amostragem (Distância de uma caixa de contagem para a outra no eixo X e Y). Em nosso estudo as dimensões da caixa e do grid variaram, em função do marcador utilizado, já que as estimativas por indivíduos são independentes (Glaser *et al.*, 2007); (4) definição da altura do dissector óptico que será a terceira

**Figura 13:** Fotomicrografias em baixo aumento (4X) do telencéfalo de *C. collaris* imunomarcadas com NeuN. (A) Secção N° 1; (B) Secção N° 43; (C) Secção N° 61.



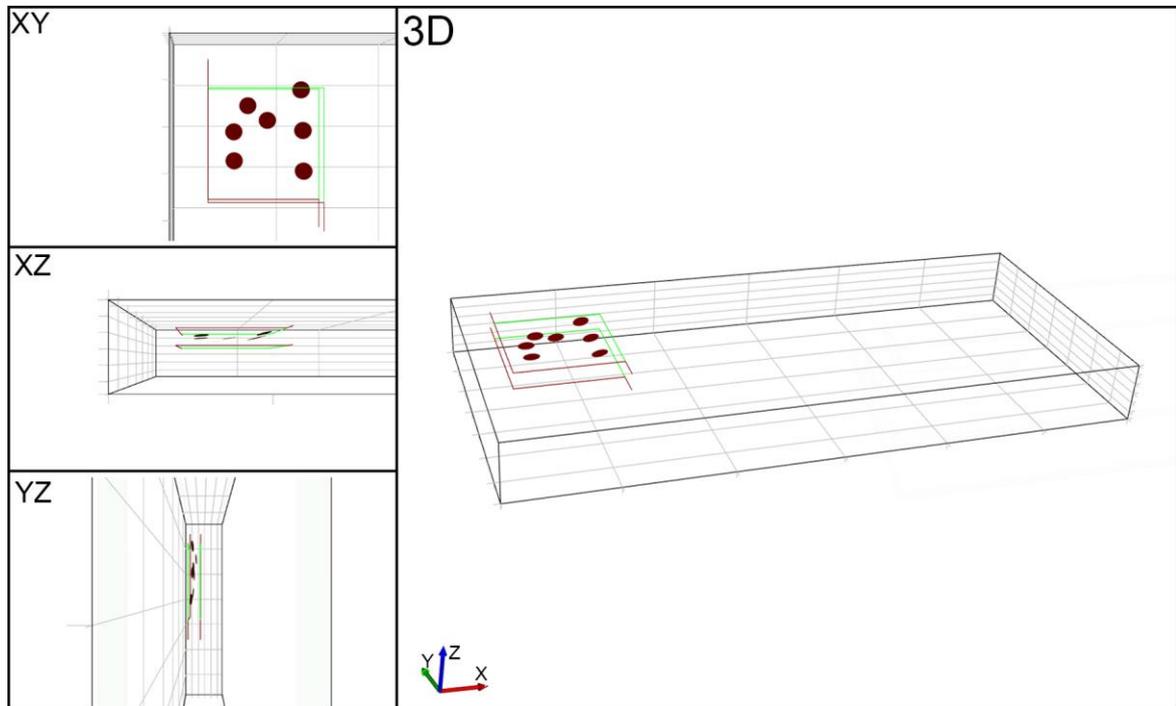
Nota: Mesma barra de escala 2mm para as figuras A, B e C.

dimensão (eixo z) da caixa de contagem (um exemplo da caixa de contagem virtual pode ser visto na **Figura 14**).

Após todos os passos anteriores o software distribui de maneira aleatória (a coordenada onde será colocada a primeira caixa de contagem dentro da região de interesse será aleatória) e ao mesmo tempo sistemática (as caixas de contagem subsequentes à primeira serão todas

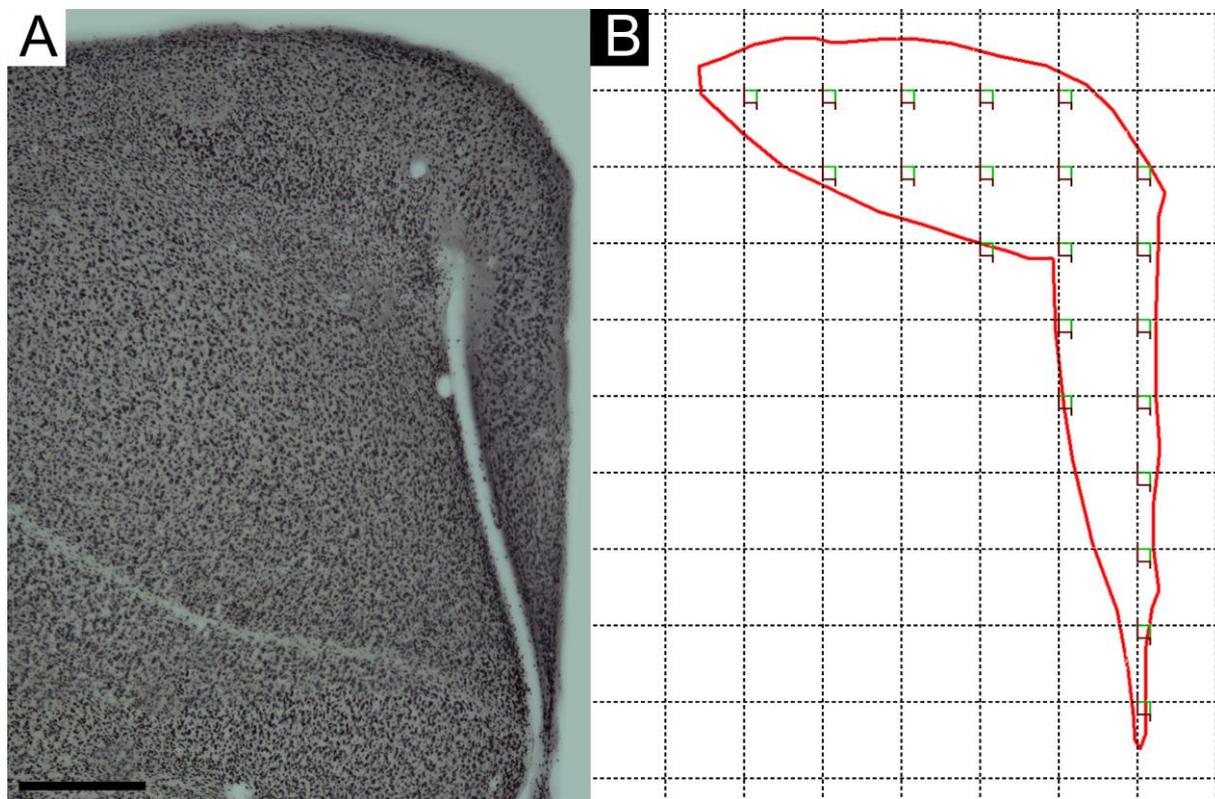
espaçadas por intervalos de dimensão fixa nos eixos X e Y (espaçamento do grid de amostragem) - **Figura 15**) (Howard e Reed, 2005).

**Figura 14:** Figura ilustrando o posicionamento virtual da caixa de contagem em múltiplos planos de foco XY, XZ, YZ e 3D.



Nota: Pontos vermelhos dentro da caixa de contagem representam os objetos contados (células)

**Figura 15:** Representação da distribuição dos locais de contagem. **(A)** Fotomicrografia da formação hipocampal de *C. collaris*, secção imunomarcada com NeuN (Objetiva de 4X); **(B)** Layout do perfil de amostragem do fracionador óptico, linhas tracejadas representam o grid de amostragem (300x300µm) e quadrados formados por linhas vermelhas e verdes representam as caixas de contagem (50x50µm).



Nota: Linha em vermelho claro no quadro B delimita os limites da formação hipocampal da fotomicrografia do quadro A; Barra de escala do quadro A 500µm

No presente trabalho a delimitação da região de interesse foi observada em secções imunomarcadas por NeuN e seus limites foram traçados em imagens de vídeo em um computador acoplado à câmera e microscópio utilizando objetivas de aumento 4x (baixo aumento). A confiabilidade das estimativas do número de objetos a partir de uma fração amostral é obtida utilizando a coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a terceira dimensão (*unbiased stereology*) (Howard e Reed, 2004). Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (Schmitz e Hof, 2005; Glaser *et al.*, 2007).

O sistema estereológico completo foi composto pelo programa StereoInvestigator (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) integrado a um microscópio óptico Nikon modelo Eclipse Ci com platina motorizada para os eixos X e Y, transdutor linear (HEIDENHAIN Corporation) que captura as informações relativas ao eixo Z, Controladora da platina MAC 6000 (Ludl

Electronic Products Ltd.) e um computador, onde o registro dos dados das coordenadas tridimensionais, o controle da platina e a execução do programa foram realizados.

Para estimativa do número total de células multiplica-se o número total de objetos (células) contadas pelos inversos das frações amostrais. As frações amostrais constituem-se: (1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contém a região de interesse “section sampling fraction”(1/6); (2) área das caixas de contagem comparada com a área do grid de amostragem “area sampling fraction”; e 3) da altura do disector óptico comparado com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos “thickness sampling fraction” (**Equação 1**), (Howard e Reed, 2005).

**Equação 1:** Fórmula utilizada para estimativa do número total de objetos no método do fracionador óptico do software StereoInvestigator (MBF Bioscience , Williston, VT, USA)

$$N = \sum Q \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{tsf}$$

N = números de neurônios

$\Sigma Q$  = números de células contadas

ssf – “section sampling fraction” = secções contadas/total de secções

asf – “area sampling fraction” = área bloco/área matriz (x,y)

tsf – “tissue sampling fraction” = altura bloco/espessura da secção

A escolha das dimensões de caixa de contagem, grid de amostragem (matriz de contagem) e da fração amostral de secções de interesse é feita através de um ensaio preliminar (por tentativa e erro) até que a variação observada nas estimativas decorrentes de erros metodológicos não corresponda a mais do que 50% da variação total observada, ou seja, a razão do quadrado da média do coeficiente de erro pelo quadrado do coeficiente de variação ( $CE^2/CV^2$ ) obtidos na análise da região de interesse de todos os espécimes não se apresente maior que 0,05 (Lidow e Song, 2001; Slomianka e West, 2005), como os espécimes apresentam variações na sua estrutura e secções obtidas deles podem ter diferentes áreas e diferentes reações aos protocolos de desidratação, alguns ensaios podem contribuir mais para a incerteza nas estimativas e podem ter sua amostragem aumentada. Os diferentes protocolos de amostragem, porém, não podem ocorrer dentro de uma fração amostral de secções de interesse (MBF Bioscience, 2011)

Várias maneiras de se estimar o erro foram testadas em amostras simuladas por computador de modo a encontrar uma maneira de calcular o coeficiente de erro que se

aproximasse o máximo possível do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (Glaser e Wilson, 1998). Assim, no presente trabalho utilizou-se o coeficiente de Scheaffer como instrumento de medida de erro metodológico. O Coeficiente Scheaffer pode ser obtido através da **Equação 2**

**Equação 2:** Fórmula utilizada para cálculo do coeficiente de Scheaffer

$$CE = \frac{\sqrt{\left(\frac{1}{f} - \frac{1}{F}\right) * \frac{\sum_{i=1}^f (Q_i - \bar{Q})^2}{f-1}}}{\bar{Q}}$$

*CE*: Coeficiente de erro;

*f*: Número de caixas de contagem;

*F*: Número máximo possível de caixas de contagem;

*Q<sub>i</sub>*: Partículas contadas na *i*-ésima caixa de contagem;

$\bar{Q}$ : Média de partículas contadas = total de partículas/total de caixas de contagem.

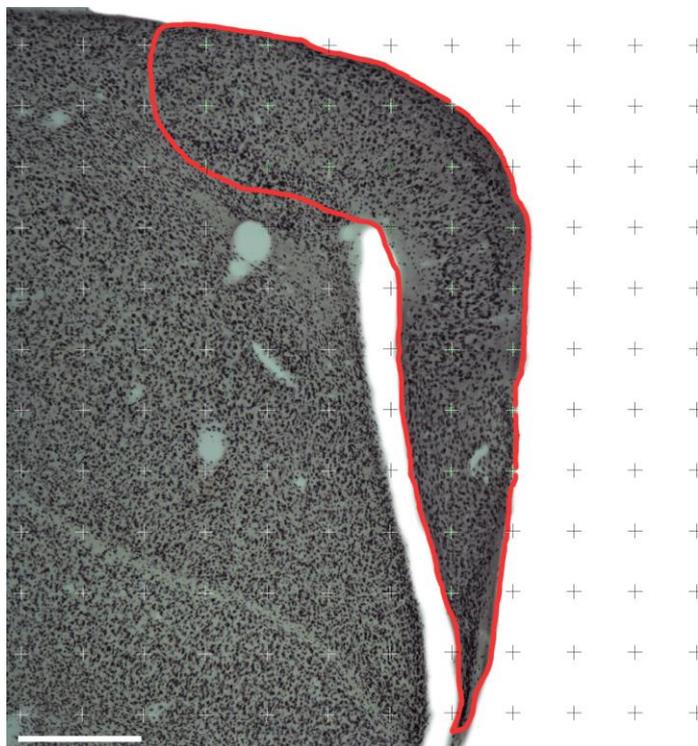
Foi demonstrado que estimativas do número total de objetos de interesse obtidas a partir do fracionador óptico são estatisticamente mais eficientes do que estimativas a partir de volume e densidade (Schmitz e Hof, 2000), o que justifica a escolha do método. Como instrumento de medida do erro, utilizaremos o coeficiente de Scheaffer assumindo como adequados apenas valores menores do que 0,05. Essa escolha baseou-se no fato de que cálculos do coeficiente de erro verdadeiro em grandes amostras foram comparados por diferentes métodos e o que mais se aproximou do erro verdadeiro foi o coeficiente de Scheaffer (Glaser e Wilson, 1998).

#### **4.5.2. Medidas de volumes: Estimativa de Cavalieri**

O Método de Cavalieri foi utilizado para realização das estimativas de volume da região da formação hipocampal assim como do telencéfalo a partir das mesmas secções utilizadas para a estimativa de número de células (Gundersen e Jensen, 1987; García-Fiñana *et al.*, 2003; Howard e Reed, 2005).

O Cavalieri Estimator é uma ferramenta disponível no software StereoInvestigator 11.03 (MBF Bioscience, Williston, VT USA) que funciona através do posicionamento de um grid com pontos adimensionais distribuídos aleatoriamente sobre a região de interesse a qual se deseja realizar as estimativas. Como é gerado um grid e este intercepta o tecido o programa coleta as informações de área de cada uma das intercessões formadas pelo grid. Os pontos então são associados a área correspondente a interseção do grid e assim toda coberta pelo grid é amostrada (**Figura 16**).

**Figura 16:** Fotomicrografia em lente de baixo aumento (4X) de secção imunomarcada por NeuN exemplificando a distribuição dos pontos adimensionais da estimativa de Cavalieri no Software Stereo Investigator



Nota: Contorno vermelho representa os limites da formação hipocampal; cruzes brancas representam o grid; cruzes brancas contendo círculos verdes são os pontos que interceptam a região de interesse; Barra de escala 500 $\mu$ m.

Para realização das estimativas de Cavalieri são necessários dois passos: (1) determinar uma distância adequada entre os pontos do grid que serão sobrepostos na região de interesse. Os pontos são associados área ao redor que é equivalente à área de um quadrante da matriz. O espaçamento definido no grid determina o número de marcadores que serão distribuídos sobre os pontos, o espaçamento do grid é determinado pelo usuário e quanto menor o espaçamento do grid mais marcadores serão distribuídos sobre a região de interesse (maior precisão porém maior tempo de execução), de mesma forma quanto maior o espaçamento do grid menos

marcadores interceptam a região de interesse (menos tempo de execução porém menor precisão); (2) Informar ao software a espessura a qual o tecido a ser estimado foi seccionado (Bioscience, 2011) (**Figura 16**). A fórmula utilizada na estimativa de volume do método de Cavalieri pode ser vista na **Equação 3**.

**Equação 3:** Fórmula utilizada para estimativa do volume através do método de Cavalieri no software StereoInvestigator (MBF Bioscience, Williston, VT, USA)

$$\hat{V} = A_p m' \bar{t} \left( \sum_{i=1}^n P_i \right)$$

$\hat{V}$ : Volume estimado

$A_p$ : Área associada ao ponto

$\bar{t}$ : Espessura média da secção

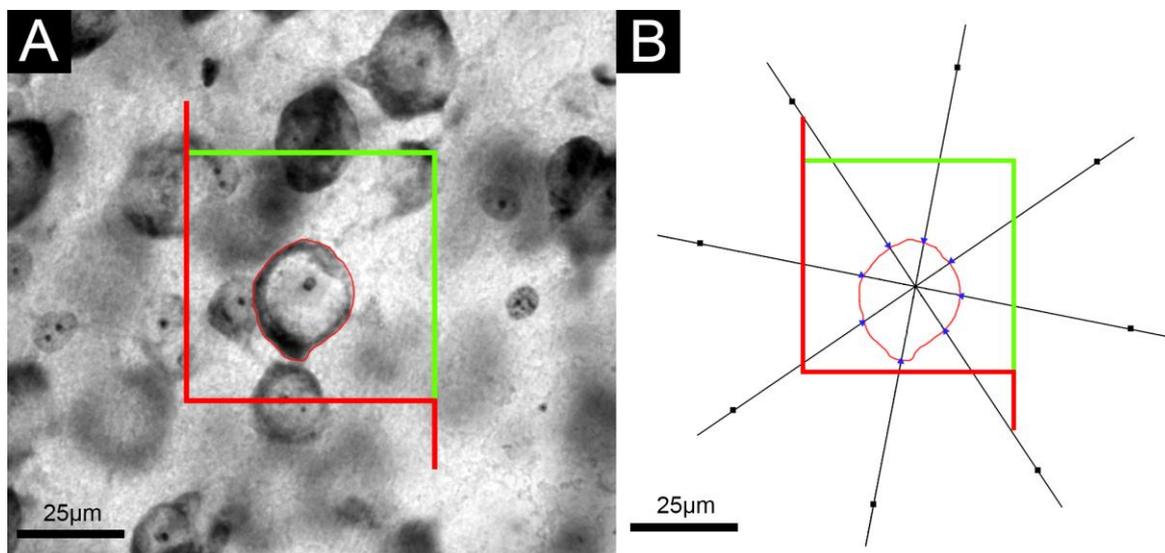
$P_i$ : Número de pontos contado no grid

#### 4.5.3. Volume do soma neuronal: Nucleator

Para diferenciar neurônios de células gliais nós utilizamos um critério morfológico, em que: (1) consideramos como células gliais as células que possuam a cor mais clara, ausência de processos dendríticos e cromatina desagregada, (2) para os neurônios observamos a cromatina agrupada, presença de processos dendríticos e citoplasma claro (Roth *et al.*, 2013).

Para estimar o volume do soma neuronal nós utilizamos o Nucleator (Gundersen, 1988) que funciona junto ao fracionador óptico, e captura informações sobre a área dos objetos (somas dos neurônios) que estão dentro da caixa de contagem através de raios que se estendem do centro do objeto para fora, ao executar o Nucleator alguns passos não necessários: (1) Indicar o centro do objeto (no presente estudo adotamos o núcleo do neurônio visualizado em coloração de Nissl); (2) indicar onde os raios que partem do centro do objeto interceptam os limites externos (em nosso estudo adotados a área do soma neuronal) (**Figura 17**)

**Figura 17:** Figura mostrando o funcionamento do Nucleator para estimativa de volume do soma neuronal. **(A)** Fotomicrografia em aumento 100X mostrando um neurônio corado pela técnica de Nissl dentro da caixa de contagem (50x50µm); **(B)** Ilustração do procedimento de medida do Nucleator sendo executado no Neurônio do quadro A.



Nota: Linha irregular vermelha no quadro (A) representa os limites do soma neuronal; Linhas pretas em várias direções no quadro B representam os raios gerados a partir do nucléolo do neurônio; pequenos pontos azuis no quadro (B) indicam a marcação da área do soma feita nos raios do Nucleator.

Durante o fracionador óptico nós executamos o Nucleator em todas as caixas de contagem mensurando apenas a primeira célula dentro da caixa de contagem a partir do topo, a fórmula para a estimativa de volume pode ser vista na **Equação 4**, a escolha de mensurar apenas o primeiro neurônio a partir do topo é em função do valor do coeficiente de erro que se mantém abaixo de 0,05 (Ver **Tabela 7** à **Tabela 10**). O coeficiente de erro para as estimativas de volume pode ser calculado de acordo com a **Equação 5**.

**Equação 4:** Fórmula para o cálculo da estimativa do volume do soma neuronal no Nucleator através do software Stereo Investigator.

$$\overline{v}_N = \frac{4\pi}{3} \overline{l}_n^3$$

$\overline{v}_N$ : Volume estimado

$l$ : Comprimento dos raios

**Equação 5:** Fórmula para o cálculo do coeficiente de erro do Nucleator através do software Stereo Investigator.

$$estCV(R) = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}}{\bar{R}}$$

$estCV(R)$ : Coeficiente de erro estimado

$n$ : Número de estimativas de Nucleator

$R_i$ : Área dividida pela estimativa do volume medido em cada caixa de contagem

#### 4.6. Análises estatísticas

Uma vez que a variação observada nas estimativas é decorrente de fatores biológicos e erros metodológicos, é possível determinar um coeficiente de variação biológica (CVB) e sua representação percentual em relação ao coeficiente de variação total (CV) sendo este último determinado pela razão do desvio padrão pela média das estimativas. A variância decorrente de fatores biológicos é representada então pela subtração do quadrado da média dos coeficientes de erro em relação ao quadrado do coeficiente de variação total. A representação percentual da variação biológica é obtida pela **Equação 6**

**Equação 6:** Fórmula para calcular o coeficiente de variação biológica

$$CVB^2(\%CV^2) = \frac{(CV^2 - CE^2) * 100}{CV^2}$$

$CVB^2(\%CV^2)$ : Percentual da variância biológica em relação à variância total

$CV^2 - CE^2$ : Variância decorrente de fatores biológicos ( $CVB^2$ )

$CE^2$ : Variância intrínseca a erros metodológicos

$CV^2$ : Variância total

Antes da execução das comparações através de testes estatísticos nós executamos um teste de normalidade para verificar se a distribuição das amostras segue à distribuição normal. O teste de Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965) foi escolhido por ser o teste de normalidade que apresenta maior poder estatístico em relação aos testes de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors, Anderson-Darling e Jarque-Bera (Shuaib, 2015).

A partir das constatações de que os dados de estimativas de números de células (NeuN, DCX e C-Fos), volume da formação hipocampal/telencéfalo e volume do soma neuronal

seguem a distribuição normal (nível de significância  $\geq 0,05$ ) foi possível comparar cada uma das variáveis entre ambos os grupos migrante (*C. semipalmatus*) e sedentário (*C. collaris*) utilizando o teste t de Student, considerando nível de significância de 0,05. Para verificação da existência de correlação entre o volume da formação hipocampal e número de neurônios e seus respectivos contrastes filogenéticos nós executamos o teste de correlação linear de Pearson. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa Microsoft Excel 2016 juntamente com o complemento XLSTAT (Adinsoft Paris, 2016).

Para comparação dos dados de números de células e volume assim como execução da análise dos contrastes filogenéticos de *C. collaris*, *C. semipalmatus*, nós utilizamos dados de Guerreiro-Diniz *et al.* (2016), os quais estudaram as espécies *A. macularia* e *C. pusilla*.

#### **4.7. Análises filogenéticas**

##### **4.7.1. Procedimentos laboratoriais**

O tecido para extração de DNA genômico foi obtido a partir de tecido de musculo peitoral dos animais capturados em rede de neblina. Em laboratório, o DNA total foi extraído seguindo o protocolo padrão descrito por Sambrook *et al.* (1989). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi usada para a amplificação dos fragmentos do gene citocromo oxidase c subunidade I (COI) nas espécies *C. semipalmatus*, *C. collaris*, *C. pusilla* e *A. macularia*, seguindo os protocolos descritos em outros trabalhos (Gibson e Baker, 2012; Barth *et al.*, 2013). O sequenciamento das espécies utilizadas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) foi necessário para execução das análises filogenéticas, já que estes autores disponibilizaram apenas os dados de estimativas estereológicas de números de células e volume da formação hipocampal. As sequências das demais 47 espécies foram obtidas a partir do GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) e seus respectivos códigos de acesso estão no **APÊNDICE C - Tabela 52**. Os produtos da PCR foram purificados e as sequências obtidas por meio do sequenciador automático ABI 3500XL (AppliedBiosystems) seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante.

##### **4.7.2. Análises computacionais**

O alinhamento inicial das sequências foi realizado através do programa BIOEDIT (Hall, 1999) e CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Para identificar o melhor modelo evolutivo nós utilizamos o programa PartitionFinder 2 versão 2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2016). A análise de máxima verossimilhança (MV) foi executada através do programa RAxML (Stamatakis, 2014)

e a análise Bayesiana foi executada com o programa MrBayes versão 3.2.6 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). A robustez da hipótese filogenética obtida foi testada pelo *bootstrap* (Felsenstein, 1985a) com 1000 pseudo-réplicas para MV. O critério adotado para avaliar a robustez foi o valor de *bootstrap* igual ou superior a 90% como estatisticamente significativo. Para avaliar os níveis de distância genética nós executamos uma análise da distância P através do software Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016), entre as espécies *A. macularia*, *C. pusilla*, *C. semipalmatus* e *C. collaris*.

#### 4.7.3. Contrastes Filogenéticos

Utilizamos sequências de nucleotídeos do gene mitocondrial Citocromo Oxidase 1 subunidade c (COI) para estabelecer as relações cladísticas entre as quatro espécies analisadas. Para buscar o modelo evolutivo mais adequado para as sequências utilizamos o programa PartitionFinder 2 versão 2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2016). Para construção da árvore de máxima verossimilhança utilizamos o programa RAxML (Stamatakis, 2014) e para gerar a árvore de inferência Bayesiana o programa MrBayes versão 3.2.6 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). A visualização da árvore e exportação no formato Newick foi feita no programa Figtree 1.4.3 (Rambaut, 2015). Para gerar os valores de contrastes nós utilizamos o pacote do R APE (Paradis *et al.*, 2004).

## 5. RESULTADOS

A **Tabela 4** sumariza os resultados numéricos relacionados as medidas biométricas, números de células, volume celular e volume da formação hipocampal. Os resultados em detalhes podem ser vistos nos tópicos subsequentes (5.1 à 5.3). Os resultados das análises filogenéticas e de Contrastes Filogenéticos estão disponíveis no tópico 5.4

**Tabela 4:** Valores médios dos resultados de número de células imunomarcadas por NeuN, DCX e C-fos, volume celular, volume da formação hipocampal e medidas biométricas

| Número de células      | N° NeuN                            |               | N° DCX                      |             | N° C-fos       |            |       |
|------------------------|------------------------------------|---------------|-----------------------------|-------------|----------------|------------|-------|
| Espécie                | FHD                                | FHE           | FHD                         | FHE         | FHD            | FHE        |       |
| <i>C. semipalmatus</i> | 1.170.661,91*                      | 1.212.708,02* | 269.749,99*                 | 270.616,43* | 684.260,38     | 650.539,13 |       |
| <i>C. collaris</i>     | 504.125,61                         | 420.827,50    | 150.599,70                  | 158.820,38  | 610.305,94     | 620.879,39 |       |
|                        | Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ ) |               | Volume FH ( $\text{mm}^3$ ) |             | Biometria (mm) |            |       |
| Espécie                | FHD                                | FHE           | FHD                         | FHE         | Asa            | Tarso      | Bico  |
| <i>C. semipalmatus</i> | 816,43                             | 889,120       | 12,60*                      | 12,55*      | 128,66         | 22,06      | 12,89 |
| <i>C. collaris</i>     | 889,120                            | 910,619       | 8,78                        | 8,60        | 144,74         | 23,27      | 14,02 |

Nota: \* = Estatisticamente maior; FH = Formação hipocampal; FHD = FH direita; FHE = FH Esquerda.

### 5.1. Medidas biométricas

Não houve diferença significativa entre ambas as espécies no comprimento da asa (**média  $\pm$  desvio padrão**, *C. collaris* 128,66mm  $\pm$  24,6 vs *C. semipalmatus* 144,74mm  $\pm$  7,8; Test t de Student, valor de p = 0,052). Também não houve diferença no comprimento do tarso (*C. collaris* 23,27mm  $\pm$  1,8 vs *C. semipalmatus* 22,06mm  $\pm$  3,1; Test t de Student, valor de p = 0,152), assim como não houve diferença significativa no comprimento do bico (*C. collaris* 14,02mm  $\pm$  1,0 vs *C. semipalmatus* 12,89mm  $\pm$  2,7; Test t de Student, valor de p = 0,203). A **Tabela 5** e **Tabela 6** mostram os valores detalhados das características biométricas avaliadas em *C. semipalmatus* e *C. collaris*

**Tabela 5:** Dados biométricos da espécie *C. collaris*

| Indivíduo | Comprimento (mm) |       |       |
|-----------|------------------|-------|-------|
|           | Asa              | Tarso | Bico  |
| BCCC01    | 100,15           | 22,38 | 13,38 |
| BCCC02    | 105,98           | 21,11 | 12,61 |
| BCCC03    | 122,10           | 24,87 | 14,42 |
| BCCC04    | 106,69           | 24,49 | 15,45 |
| BCCC05    | 124,12           | 23,10 | 14,05 |
| BCCC06    | 107,19           | 24,71 | 14,44 |
| BCCC07    | 158,38           | 24,40 | 14,30 |
| BCCC08    | 158,38           | 24,70 | 13,90 |

|               |               |              |              |
|---------------|---------------|--------------|--------------|
| BCCC09        | 158,38        | 24,30        | 12,20        |
| BCCC10        | 115,49        | 20,11        | 14,20        |
| BCCC11        | 158,38        | 26,25        | 15,24        |
| <b>Média</b>  | <b>128,66</b> | <b>23,67</b> | <b>14,02</b> |
| Desvio padrão | 24,6          | 1,8          | 1,0          |
| Erro padrão   | 7,41          | 0,55         | 0,30         |

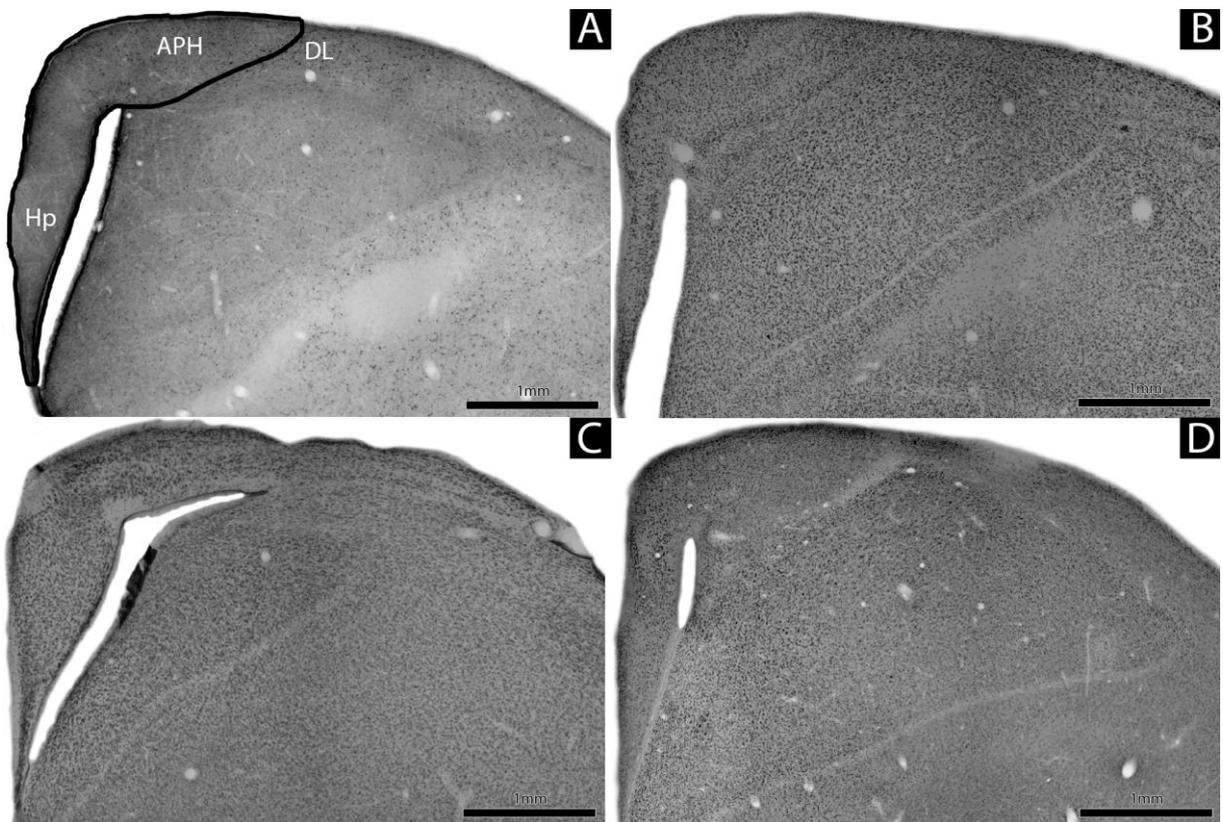
**Tabela 6:** Dados de biométricos da espécie *C. semipalmatus*

| Indivíduo     | Comprimento (mm) |              |              |
|---------------|------------------|--------------|--------------|
|               | Asa              | Tarso        | Bico         |
| BCCs16        | 152,99           | 26,35        | 11,91        |
| BCCs20        | 140,39           | 25,18        | 13,54        |
| BCCs21        | 147,04           | 22,00        | 8,10         |
| BCCs22        | 144,74           | 20,16        | 13,56        |
| BCCs23        | 124,28           | 20,00        | 18,93        |
| BCCs24        | 144,74           | 24,27        | 14,55        |
| BCCs25        | 144,74           | 19,81        | 13,38        |
| BCCs26        | 145,66           | 19,88        | 11,70        |
| BCCs28        | 146,00           | 19,39        | 10,76        |
| BCCs29        | 154,64           | 27,13        | 12,66        |
| BCCs30        | 146,93           | 18,47        | 12,75        |
| <b>Média</b>  | <b>144,74</b>    | <b>22,06</b> | <b>12,89</b> |
| Desvio padrão | 7,8              | 3,1          | 2,7          |
| Erro padrão   | 2,37             | 0,94         | 0,80         |

## 5.2. Limites da formação hipocampal e visualização de células

A formação hipocampal observada em *C. semipalmatus* e *C. collaris*, não foge à regra para as aves em geral, sendo relativamente estreita e localizada na região dorsomedial do telencéfalo. A área parahipocampal nessa espécie é a mais dorsal da formação hipocampal, ocupando larga extensão do eixo rostro-caudal. O sulco paraventricular em ambas as espécies separa o hipocampo da área parahipocampal. Em cortes onde o sulco paraventricular não está claramente definido, os limites entre o hipocampo (Hp) e a área parahipocampal (APH) são imprecisos, limitando-se a alguns neuromarcadores, tais como NeuN, C-Fos DCX e a técnica Nissl, nestas marcações a distinção entre a área parahipocampal e o limite dorsolateral (DL) foi claramente observado através da exibição de padrões celulares distintos. A **Figura 18** mostra as subdivisões encontradas no presente estudo, as fotomicrografias pertencem a espécie *C. collaris*, entretanto os padrões de organização citoarquitetônicos foram muito similares entre ambas as espécies estudadas.

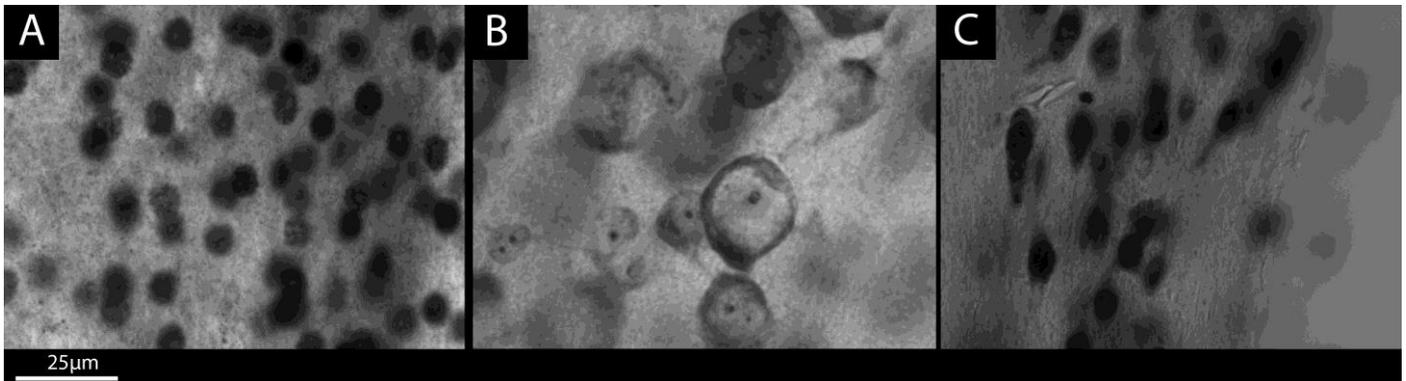
**Figura 18:** Serie de fotomicrografias mostrando os limites nos diferentes marcadores na formação hipocampal em *C. collaris*. (A) Secção imunomarcada por DCX; (B) Secção imunomarcada por NeuN; (C) Secção corada através da técnica de Nissl. (D) Secção imunomarcada por C-Fos.



Nota: Hp = Hipocampo; APH = Área parahipocampal; DL = Limite dorsolateral

Os produtos dos procedimentos de imunohistoquímica, assim como a coloração de Nissl, seguiram um padrão reproduzido sistematicamente, em ambas às espécies, o que indica um bom funcionamento dos protocolos empregados. Em secções imunomarcadas por C-Fos e NeuN as células apresentaram uma aparência escurecida e de fácil diferenciação da matriz extracelular, em NeuN alguns neurônios apresentaram a silhueta dos processos dendríticos. Entretanto apenas o corpo celular foi facilmente observado em todas as células, da mesma forma como a formação hipocampal, a visualização das células não diferiu drasticamente (visualização qualitativa) entre as espécies (**Figura 19**).

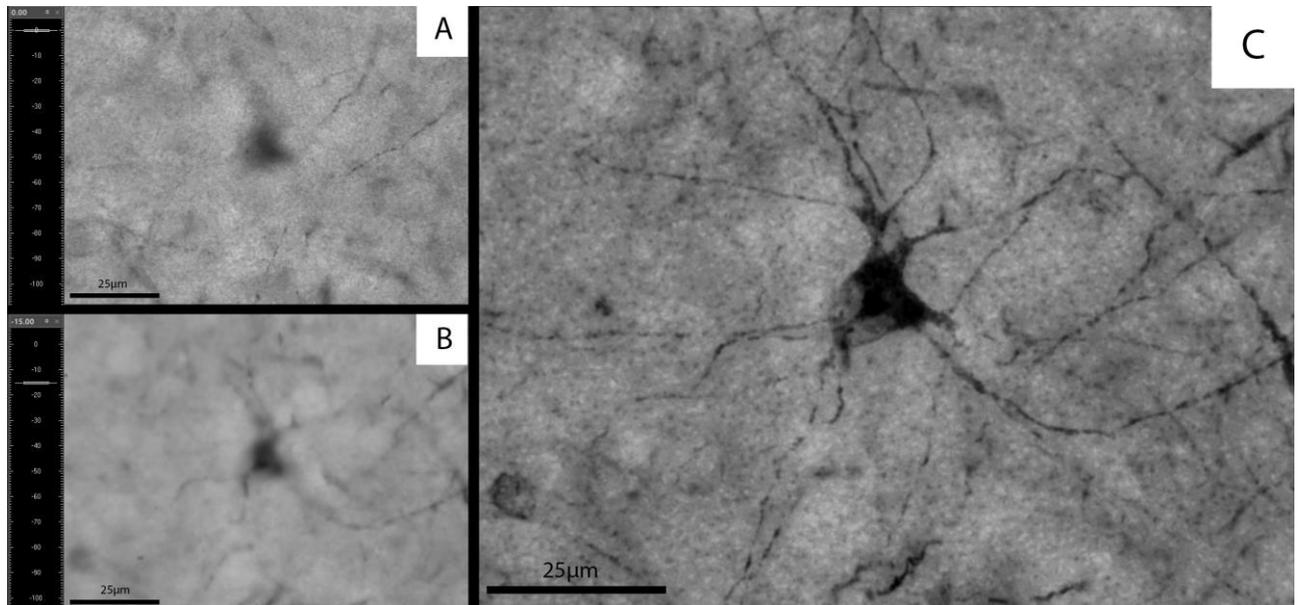
**Figura 19:** Serie de fotomicrografias objetivas de 100x mostrando a visualização de diferentes tipos de células. (A) Células imunomarcadas por C-Fos; (B) Células coradas pela técnica de Nissl; (C) Células imunomarcadas por NeuN.



Nota: A única barra de escala se aplica aos quadros de A à C

Para as células imunomarcadas por DCX observamos a presença comum dos processos dendríticos de Neurônios recém gerados no sistema nervoso, a **Figura 20** permite a visualização da mesma célula em diferentes planos de foco, assim como ilustração da mesma célula composta a partir de fotomicrografias superpostas de 15 planos de foco diferentes.

**Figura 20:** Fotomicrografia com objetiva de 100x de um neurônio recém gerado imunomarcado por DCX. (A) Topo do tecido (0,00 $\mu\text{m}$ ); (B) Área inferior do tecido (-15,00 $\mu\text{m}$ ); (C) imagem mostrando todos os planos de foco composta por 15 fotos mescladas e intervaladas por 1 $\mu\text{m}$  de distância no eixo Z.



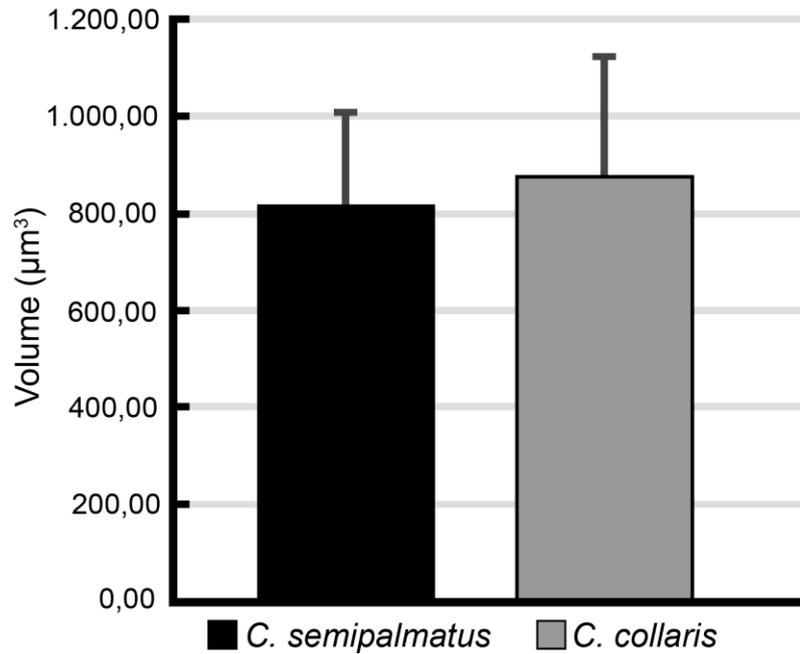
### 5.3. Resultados estereológicos

Os parâmetros estereológicos para as estimativas de células imunomarcadas por NeuN, DCX e C-Fos para as ambas as espécies *C. semipalmatus* e *C. collaris* podem ser vistas no **APÊNDICE A - Tabela 28 à Tabela 39**). As variâncias médias das estimativas de números de células, volume do soma neuronal e volume da formação hipocampal estão no **APÊNDICE B - Tabela 40 à Tabela 51**.

#### 5.3.1. Estimativas de volumes celulares

Através de seções coradas pela técnica de Nissl nós estimamos os volumes dos somas de neurônios entre a espécie migrante (*C. semipalmatus*) e a espécie não-migrante (*C. collaris*). Não encontramos diferenças significativas entre os volumes dos somas de neurônios do hemisfério direito (média  $\pm$  desvio padrão HD *C. semipalmatus*  $816,43 \pm 192,53 \mu\text{m}^3$  Vs HD *C. collaris*  $889,120 \pm 116,4 \mu\text{m}^3$ ; teste t de Student com valor de  $p = 0,736$ ), assim como do hemisfério esquerdo (HE *C. semipalmatus*  $889,120 \pm 116,4 \mu\text{m}^3$  Vs HE *C. collaris*  $910,619 \pm 266,24 \mu\text{m}^3$ ; teste t de Student com valor de  $p = 0,887$ ). O gráfico comparativo dos volumes celulares pode ser visualizado na **Figura 21** e os dados detalhados na **Tabela 7 à Tabela 10**.

**Figura 21:** Gráfico comparativo dos volumes celulares de Neurônios corados pela técnica de Nissl na formação hipocampal de direita de *C. semipalmatus* e *C. collaris*.



**Tabela 7:** Estimativas de volume do soma neuronal de neurônios da formação hipocampal direita, da espécie *C. semipalmatus* medidos em coloração de Nissl.

| Migrante      | Volume (µm³)  | CE           | CV           |
|---------------|---------------|--------------|--------------|
| BCCS07        | 845,261       | 0,003        | 0,562        |
| BCCS09        | 939,931       | 0,003        | 0,680        |
| BCCS13        | 535,918       | 0,004        | 0,777        |
| BCCS23        | 944,622       | 0,002        | 0,606        |
| <b>Média</b>  | <b>816,43</b> | <b>0,003</b> | <b>0,656</b> |
| Desvio padrão | 192,53        |              |              |
| Erro padrão   | 96,27         |              |              |

Nota: CE = Coeficiente de erro; CV = Coeficiente de variação

**Tabela 8:** Estimativas de volume do soma neuronal de neurônios da formação hipocampal esquerda, da espécie *C. semipalmatus* medidos em coloração de Nissl.

| <b>Migrante</b> | <b>Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b> | <b>CE</b>    | <b>CV</b>    |
|-----------------|--|--------------|--------------|
| BCCS07          | 776,234                                    | 0,004        | 0,560        |
| BCCS09          | 963,336                                    | 0,004        | 0,762        |
| BCCS13          | 804,424                                    | 0,024        | 4,981        |
| BCCS23          | 1.012,484                                  | 0,002        | 0,546        |
| <b>Média</b>    | <b>889,120</b>                             | <b>0,009</b> | <b>1,712</b> |
| Desvio padrão   | 116,4                                      |              |              |
| Erro padrão     | 58,20                                      |              |              |

Nota: CE = Coeficiente de erro; CV = Coeficiente de variação

**Tabela 9:** Estimativas de volume do soma neuronal de neurônios da formação hipocampal direita, da espécie *C. collaris* medidos em coloração de Nissl.

| <b>Sedentário</b> | <b>Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b> | <b>CE</b>    | <b>CV</b>    |
|-------------------|--|--------------|--------------|
| BCCC08            | 1.226,971                                  | 0,003        | 0,643        |
| BCCC17            | 862,580                                    | 0,002        | 0,544        |
| BCCC11            | 700,800                                    | 0,002        | 0,564        |
| BCCC18            | 697,414                                    | 0,003        | 0,609        |
| <b>Média</b>      | <b>871,941</b>                             | <b>0,003</b> | <b>0,590</b> |
| Desvio padrão     | 248,92                                     |              |              |
| Erro padrão       | 124,46                                     |              |              |

Nota: CE = Coeficiente de erro; CV = Coeficiente de variação

**Tabela 10:** Estimativas de volume do soma neuronal de neurônios da formação hipocampal esquerda, da espécie *C. collaris* medidos em coloração de Nissl.

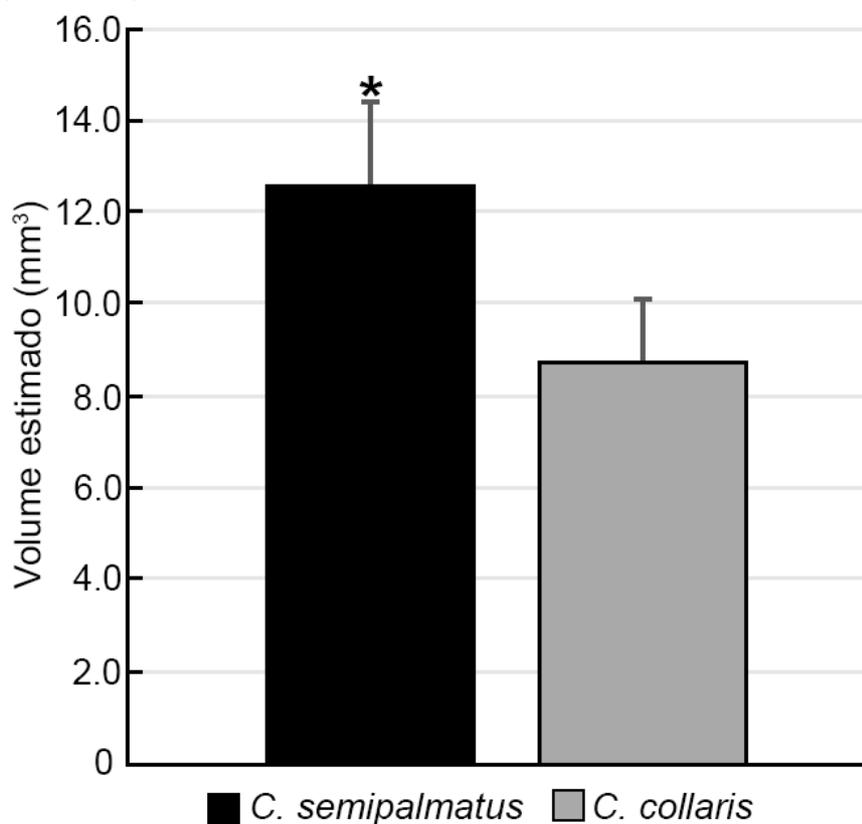
| <b>Sedentário</b> | <b>Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b> | <b>CE</b>    | <b>CV</b>    |
|-------------------|--|--------------|--------------|
| BCCC08            | 1.289,092                                  | 0,003        | 0,670        |
| BCCC17            | 882,653                                    | 0,002        | 0,573        |
| BCCC11            | 675,365                                    | 0,002        | 0,560        |
| BCCC18            | 795,366                                    | 0,004        | 0,500        |
| <b>Média</b>      | <b>910,619</b>                             | <b>0,003</b> | <b>0,576</b> |
| Desvio padrão     | 266,24                                     |              |              |
| Erro padrão       | 133,12                                     |              |              |

Nota: CE = Coeficiente de erro; CV = Coeficiente de variação

### 5.3.2. Volume da formação hipocampal e telencéfalo

Para traçar as regiões da formação hipocampal o imunomarcador NeuN mostrou-se o mais adequado devido a clara separação de sub-regiões dentro do telencéfalo (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016). O volume da formação hipocampal na espécie migrante (*C. semipalmatus*) foi estatisticamente maior quando comparado à espécie não migrante (*C. collaris*) tanto no hemisfério direito (**média  $\pm$  desvio padrão** HD *C. semipalmatus*  $12,60 \text{ mm}^3 \pm 1,8 \text{ mm}^3$  Vs HD *C. collaris*  $8,78 \text{ mm}^3 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ ; teste t de Student com valor de  $p = 0,015$ ) quanto no hemisfério esquerdo (HE *C. semipalmatus*  $12,55 \text{ mm}^3 \pm 1,9 \text{ mm}^3$  Vs HE *C. collaris*  $8,60 \text{ mm}^3 \pm 1,2 \text{ mm}^3$ ; teste t de Student com valor de  $p = 0,012$ ). O gráfico comparativo pode ser visto na **Figura 22** e os dados detalhados na **Tabela 11** à **Tabela 14**.

**Figura 22:** Gráfico comparativo da estimativa de volume da formação hipocampal direita entre os grupos migrante (*C. semipalmatus*) e sedentário (*C. collaris*).



Nota: \* = estatisticamente maior; as barras de erro estão representadas pelo erro padrão.

**Tabela 11:** Estimativas de volume da formação hipocampal direita, telencéfalo direito e a razão entre os volumes das regiões da espécie *C. semipalmatus*.

| Migrante      | Vol. Estimado (mm <sup>3</sup> ) FHD | CE m=1 FHD (Gundersen) | Vol. Estimado (mm <sup>3</sup> ) TD | CE m=1 THD (Gundersen) | Vol. FHD/ Vol. TD |
|---------------|--------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------|
| BCCS02        | 12,744                               | 0,009                  | 190,812                             | 0,007                  | 0,067             |
| BCCS03        | 10,02                                | 0,012                  | 135,545                             | 0,003                  | 0,074             |
| BCCS04        | 14,11                                | 0,012                  | 166,180                             | 0,005                  | 0,085             |
| BCCS05        | 13,50                                | 0,009                  | 160,780                             | 0,004                  | 0,084             |
| <b>Média</b>  | <b>12,60</b>                         |                        |                                     |                        |                   |
| Desvio padrão | 1,8                                  |                        |                                     |                        |                   |
| Erro padrão   | 0,90                                 |                        |                                     |                        |                   |

Nota: FHD = Formação hipocampal direita; CE = Coeficiente de erro; TD = Telencéfalo direito

**Tabela 12:** Estimativas de volume da formação hipocampal esquerda, telencéfalo esquerdo e a razão entre os volumes das regiões entre ambas da espécie *C. semipalmatus*.

| <b>Migrante</b> | <b>Vol. Estimado (mm<sup>3</sup>) FHE</b> | <b>CE m=1 FHD (Gundersen)</b> | <b>Vol. Estimado (mm<sup>3</sup>) TE</b> | <b>CE m=1 THD (Gundersen)</b> | <b>Vol. FHD/ Vol. TD</b> |
|-----------------|---|-------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------|
| BCCS02          | 12,25                                     | 0,010                         | 178,856                                  | 0,008                         | 0,067                    |
| BCCS03          | 10,15                                     | 0,012                         | 134,476                                  | 0,003                         | 0,074                    |
| BCCS04          | 14,58                                     | 0,010                         | 171,744                                  | 0,005                         | 0,085                    |
| BCCS05          | 13,23                                     | 0,010                         | 158,979                                  | 0,002                         | 0,084                    |
| <b>Média</b>    | <b>12,55</b>                              |                               |  |                               |                          |
| Desvio padrão   | 1,9                                       |                               |  |                               |                          |
| Erro padrão     | 0,93                                      |                               |  |                               |                          |

Nota: FHE = Formação hipocampal esquerda; CE = Coeficiente de erro; TD = Telencéfalo esquerdo

**Tabela 13:** Estimativas de volume da formação hipocampal direita, telencéfalo direito e a razão entre ambas as regiões da espécie *C. collaris*.

| <b>Sedentário</b> | <b>Vol. Estimado (mm<sup>3</sup>) FHD</b> | <b>CE m=1 FHD (Gundersen)</b> | <b>Vol. Estimado (mm<sup>3</sup>) TD</b> | <b>CE m=1 TD (Gundersen)</b> | <b>Vol. FHD/ Vol. TD</b> |
|-------------------|---|-------------------------------|--|------------------------------|--------------------------|
| BCCC11            | 10,7                                      | 0,014                         | 140,544                                  | 0,009                        | 0,076132                 |
| BCCC12            | 7,87                                      | 0,020                         | 95,4048                                  | 0,009                        | 0,082490                 |
| BCCC17            | 8,79                                      | 0,014                         | 113,491                                  | 0,005                        | 0,077451                 |
| BCCC13            | 7,76                                      | 0,015                         | 115,56                                   | 0,009                        | 0,067123                 |
| <b>Média</b>      | <b>8,78</b>                               | <b>0,020</b>                  |  |                              |                          |
| Desvio padrão     | 1,4                                       |                               |  |                              |                          |
| Erro padrão       | 0,68                                      |                               |  |                              |                          |

Nota: FHD = Formação hipocampal direita; CE = Coeficiente de erro; TD = Telencéfalo direito

**Tabela 14:** Estimativas de volume da formação hipocampal esquerda, telencéfalo esquerdo e a razão entre ambas as regiões da espécie *C. collaris*.

| <b>Sedentário</b> | <b>Vol. Estimado (mm<sup>3</sup>) FHE</b> | <b>CE m=1 FHE (Gundersen)</b> | <b>Vol. Estimado (mm<sup>3</sup>) TE</b> | <b>CE m=1 TE (Gundersen)</b> | <b>Vol. FHE/ Vol. TE</b> |
|-------------------|---|-------------------------------|--|------------------------------|--------------------------|
| BCCC11            | 10,3                                      | 0,014                         | 132,192                                  | 0,009                        | 0,077                    |
| BCCC12            | 8,45                                      | 0,021                         | 98,380                                   | 0,007                        | 0,085                    |
| BCCC17            | 8,26                                      | 0,014                         | 116,429                                  | 0,007                        | 0,070                    |
| BCCC13            | 7,39                                      | 0,016                         | 272,875                                  | 0,008                        | 0,056                    |
| <b>Média</b>      | <b>8,60</b>                               |                               |  |                              |                          |
| Desvio padrão     | 1,2                                       |                               |  |                              |                          |
| Erro padrão       | 0,61                                      |                               |  |                              |                          |

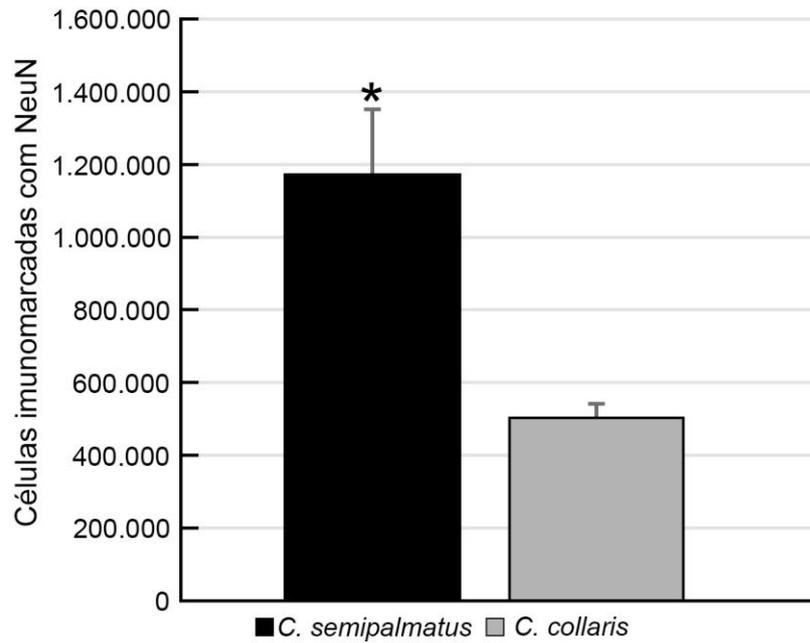
Nota: FHE = Formação hipocampal esquerda; CE = Coeficiente de erro; TD = Telencéfalo esquerdo

### 5.3.3. Neurônios imunomarcados por NeuN

As análises estereológicas exibiram uma diferença estatisticamente significativa entre o número de Neurônios maduros na formação hipocampal entre ambos os grupos migrante e sedentário tanto para hemisfério direito (**média ± desvio padrão** HD *C. semipalmatus* 1.170.661,91 ± 353.719,00 Vs HD *C. collaris* 504.125,61 ± 67.559,90; teste t de Student com valor de p = 0,010) quanto para o hemisfério esquerdo (HE *C. semipalmatus* 1.212.708,02 ± 420.827,50 Vs HE *C. collaris* 475.949,79 ± 91.186,60 teste t de Student com valor de p = 0,014).

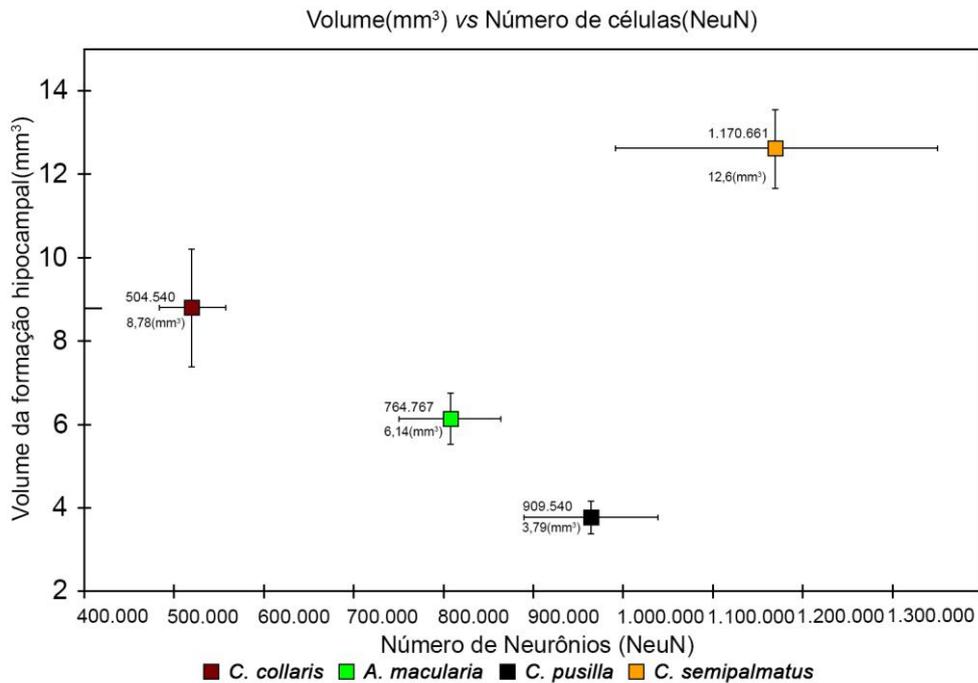
**Tabela 15 à Tabela 18 e Figura 23** mostram os resultados estereológicos para células imunomarcadas por NeuN. A **Figura 24** mostra o volume da formação hipocampal e número de neurônios maduros entre as espécies utilizadas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) e as espécies do presente estudo.

**Figura 23:** Gráfico comparativo para células imunomarcadas por NeuN na formação hipocampal direita entre os grupos migrante (*C. semipalmatus*) vs sedentário (*C. collaris*).



Nota: \* = Diferença significativa maior; As barras de erro representam o erro padrão.

**Figura 24:** Gráfico comparativo mostrando número de neurônios maduros e volume da formação hipocampal das espécies do presente estudo e de espécies estudadas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016)



Nota: barras de erro representam o erro padrão; valores acima dos pontos são os valores médios do número de neurônios maduros e abaixo são valores médios do volume da formação hipocampal.

**Tabela 15:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com NeuN na formação hipocampal direita da espécie *C. semipalmatus*.

| <b>Migrante</b> | <b>Nº NeuN FHD</b>  | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCS02          | 1.182.687,88        | 0,023               | 20,4                  |
| BCCS03          | 712.181,75          | 0,030               | 22,7                  |
| BCCS04          | 1.574.640,25        | 0,028               | 19,7                  |
| BCCS05          | 1.213.137,75        | 0,025               | 21,8                  |
| <b>Média</b>    | <b>1.170.661,91</b> | <b>0,0265</b>       | <b>21,2</b>           |
| Desvio padrão   | 353.719,00          | 0,0033              | 1,4                   |
| Erro padrão     | 176.859,50          |                     |                       |

Nota: CE = Coeficiente de erro; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 16:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com NeuN na formação hipocampal esquerda da espécie *C. semipalmatus*.

| <b>Migrante</b> | <b>Nº NeuN FHE</b>  | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCS02          | 1.223.697,25        | 0,023               | 20,30                 |
| BCCS03          | 737.442,56          | 0,026               | 22,90                 |
| BCCS04          | 1.759.101,75        | 0,025               | 19,90                 |
| BCCS05          | 1.130.590,50        | 0,028               | 23,90                 |
| <b>Média</b>    | <b>1.212.708,02</b> | <b>0,026</b>        | <b>21,75</b>          |
| Desvio padrão   | 420.827,50          | 0,002               | 2,0                   |
| Erro padrão     | 210413,76           |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHE = Formação hipocampal esquerda.

**Tabela 17:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com NeuN na formação hipocampal direita da espécie *C. collaris*.

| Sedentário    | Nº NeuN FHD       | CE Scheaffer | Espessura (µm) |
|---------------|-------------------|--------------|----------------|
| BCCC11        | 596.533,94        | 0,034        | 10,80          |
| BCCC12        | 454.109,88        | 0,041        | 7,90           |
| BCCC13        | 512.540,00        | 0,037        | 8,10           |
| BCCC17        | 453.318,63        | 0,034        | 8,60           |
| <b>Média</b>  | <b>504.125,61</b> | <b>0,040</b> | <b>8,85</b>    |
| Desvio padrão | 67.559,90         | 0,003        | 1,333          |
| Erro padrão   | 33.779,95         |              |                |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 18:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com NeuN na formação hipocampal esquerda da espécie *C. collaris*.

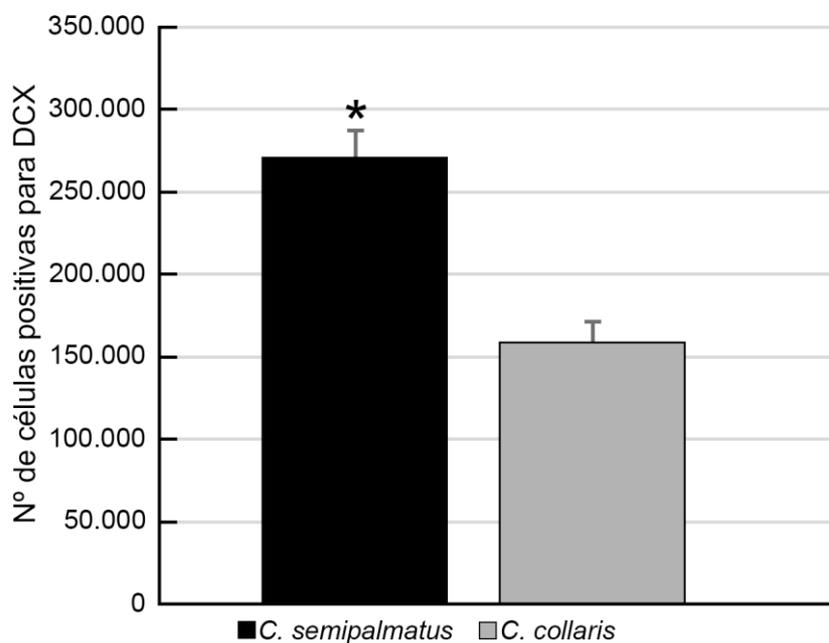
| Sedentário    | Nº NeuN FHE       | CE Scheaffer | Espessura (µm) |
|---------------|-------------------|--------------|----------------|
| BCCC11        | 610.340,75        | 0,032        | 25,00          |
| BCCC12        | 420.663,28        | 0,043        | 23,70          |
| BCCC13        | 455.088,81        | 0,039        | 25,50          |
| BCCC17        | 417.706,31        | 0,036        | 22,80          |
| <b>Média</b>  | <b>475.949,79</b> | <b>0,04</b>  | <b>24,25</b>   |
| Desvio padrão | 91.186,60         | 0,005        | 1,2            |
| Erro padrão   | 45.593,32         |              |                |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHE = Formação hipocampal esquerda.

#### 5.3.4. Neurônios recém-gerados imunomarcados por DCX

As análises estereológicas exibiram uma diferença estatisticamente significativa entre o número de Neurônios recém-gerados (células positivas para DCX) na formação hipocampal entre ambas as espécies tanto para o hemisfério direito (**média ± desvio padrão** HD *C. semipalmatus* 269.749,99 ± 32.264,80 Vs HD *C. collaris* 150.599,70 ± 23.580,30; teste t de Student com valor de p = 0,001) quanto para o hemisfério esquerdo (HE *C. semipalmatus* 270.616,43 ± 40.865,70 Vs HE *C. collaris* 158.820,38 ± 32.752,8 teste t de Student com valor de p = 0,005). **Tabela 19 à Tabela 22 e Figura 25** mostram os resultados estereológicos para células imunomarcadas por DCX.

**Figura 25:** Gráfico comparativo para neurônios recém-gerados imunomarcados por DCX na formação hipocampal direita entre os grupos migrante (*C. semipalmatus*) vs sedentário (*C. collaris*).



Nota: \* = significativamente maior; Barras de erro representam o erro padrão.

**Tabela 19:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com DCX na formação hipocampal direita da espécie *C. semipalmatus* coletado no Brasil

| Migrante      | Nº DCX FHD        | CE Scheaffer | Espessura ( $\mu\text{m}$ ) |
|---------------|-------------------|--------------|-----------------------------|
| BCCS22        | 243.699,44        | 0,021        | 26,0                        |
| BCCS23        | 294.100,00        | 0,026        | 24,0                        |
| BCCS24        | 240.186,00        | 0,031        | 22,0                        |
| BCCS25        | 301.014,53        | 0,028        | 24,7                        |
| <b>Média</b>  | <b>269.749,99</b> | <b>0,030</b> | <b>24,1</b>                 |
| Desvio padrão | 32.264,80         | 0,004        | 1,6                         |
| Erro padrão   | 16.132,41         |              |                             |

Nota: CE = Coeficiente de erro; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 20:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com DCX na formação hipocampal esquerda da espécie *C. semipalmatus* coletado no Brasil.

| <b>Migrante</b> | <b>N° DCX FHE</b> | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-----------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCS22          | 228.427,00        | 0,022               | 27,0                  |
| BCCS23          | 261.332,00        | 0,032               | 23,0                  |
| BCCS24          | 266.194,72        | 0,027               | 22,2                  |
| BCCS25          | 326.512,00        | 0,025               | 24,2                  |
| <b>Média</b>    | <b>270.616,43</b> | <b>0,03</b>         | <b>24,1</b>           |
| Desvio padrão   | 40.865,70         | 0,004               | 2,1                   |
| Erro padrão     | 20.432,85         |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHE = Formação hipocampal esquerda.

**Tabela 21:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com DCX na formação hipocampal direita da espécie *C. collaris*.

| <b>Sedentário</b> | <b>N° DCX FHD</b> | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCC17            | 152.661,69        | 0,036               | 21,2                  |
| BCCC12            | 140.672,41        | 0,031               | 26,2                  |
| BCCC13            | 126.834,33        | 0,032               | 25,6                  |
| BCCC11            | 182.230,36        | 0,029               | 27,3                  |
| <b>Média</b>      | <b>150.599,70</b> | <b>0,03</b>         | <b>25,08</b>          |
| Desvio padrão     | 23.580,30         | 0,003               | 2,7                   |
| Erro padrão       | 11790,16          |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 22:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com DCX na formação hipocampal esquerda da espécie *C. collaris*.

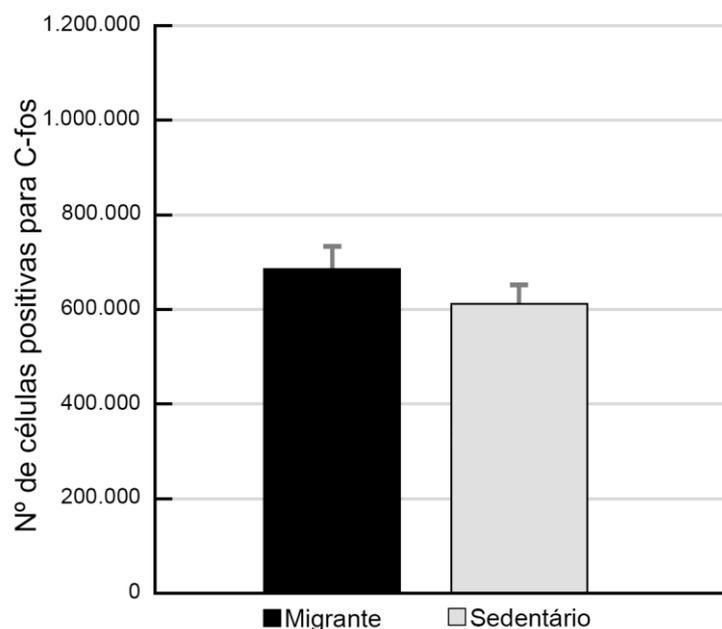
| <b>Sedentário</b> | <b>Nº DCX FHE</b> | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCC17            | 165.660,53        | 0,034               | 21,10                 |
| BCCC12            | 147.656,97        | 0,029               | 26,60                 |
| BCCC13            | 122.011,00        | 0,032               | 25,10                 |
| BCCC11            | 199.953,03        | 0,027               | 27,10                 |
| <b>Média</b>      | <b>158.820,38</b> | <b>0,03</b>         | <b>24,98</b>          |
| Desvio padrão     | 32.752,8          | 0,003               | 2,7                   |
| Erro padrão       | 16376,39          |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHE = Formação hipocampal esquerda.

### 5.3.5. Células em atividade de síntese imunomarcadas por C-Fos

Para as análises do imunomarcador C-Fos não encontramos diferenças significativas entre as estimativas do número de células em atividade de síntese proteica (células positivas para C-Fos) na formação hipocampal quando comparado tanto o hemisfério direito (HD migrante *C. semipalmatus*  $684.260,38 \pm 98.087,00$  vs HD sedentário *C. collaris*  $610.305,94 \pm 80885,9$ ; teste t de Student com valor de  $p = 0,289$ ) quanto o hemisfério esquerdo (HE migrante em repouso *C. semipalmatus*  $650.539,13 \pm 123.293,80$  vs HE sedentário *C. collaris*  $620.879,39 \pm 122.171,10$ ; teste t de Student com valor de  $p = 0,744$ ). Os resultados estereológicos para estimativas estão listados da **Tabela 23** à **Tabela 26**. O gráfico comparativo para os dois grupos pode ser visualizado na **Figura 26**.

**Figura 26:** Gráfico comparativo do número de células imunomarcadas por C-Fos entre os grupos migrante e sedentário.



Nota: As barras de erro representam o erro padrão.

**Tabela 23:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com C-Fos na formação hipocampal direita do grupo migrante (*C. semipalmatus*).

| <b>Migrante</b> | <b>Nº C-Fos FHD</b> | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCS22          | 620.656,25          | 0,034               | 16,10                 |
| BCCS23          | 605.048,81          | 0,034               | 14,80                 |
| BCCS24          | 820.263,25          | 0,032               | 16,30                 |
| BCCS25          | 691.073,19          | 0,033               | 15,70                 |
| <b>Média</b>    | <b>684.260,38</b>   | <b>0,03</b>         | <b>15,73</b>          |
| Desvio padrão   | 98.087,00           | 0,001               | 0,67                  |
| Erro padrão     | 49.043,48           |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 24:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com C-Fos na formação hipocampal esquerda do grupo migrante (*C. semipalmatus*).

| <b>Migrante</b> | <b>Nº C-Fos FHE</b> | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCS22          | 580.992,13          | 0,039               | 16,40                 |
| BCCS23          | 514.438,59          | 0,037               | 14,90                 |
| BCCS24          | 776.798,56          | 0,035               | 16,30                 |
| BCCS25          | 729.927,25          | 0,029               | 15,50                 |
| <b>Média</b>    | <b>650.539,13</b>   | <b>0,04</b>         | <b>15,78</b>          |
| Desvio padrão   | 123.293,8           | 0,004               | 0,7                   |
| Erro padrão     | 61.646,88           |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHE = Formação hipocampal esquerda.

**Tabela 25:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com C-Fos na formação hipocampal direita do grupo sedentário (*C. collaris*).

| <b>Sedentário</b> | <b>Nº C-Fos FHD</b> | <b>CE Scheaffer</b> | <b>Espessura (µm)</b> |
|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| BCCC11            | 535.654,63          | 0,039               | 20,00                 |
| BCCC12            | 718.641,75          | 0,037               | 22,80                 |
| BCCC13            | 563.876,44          | 0,039               | 19,00                 |
| BCCC17            | 623.050,94          | 0,042               | 17,30                 |
| <b>Média</b>      | <b>610.305,94</b>   | <b>0,040</b>        | <b>19,78</b>          |
| Desvio padrão     | 80.885,90           | 0,002               | 2,3                   |
| Erro padrão       | 40.442,96           |                     |                       |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 26:** Resultados estereológicos para células imunomarcadas com C-Fos na formação hipocampal esquerda do grupo sedentário (*C. collaris*).

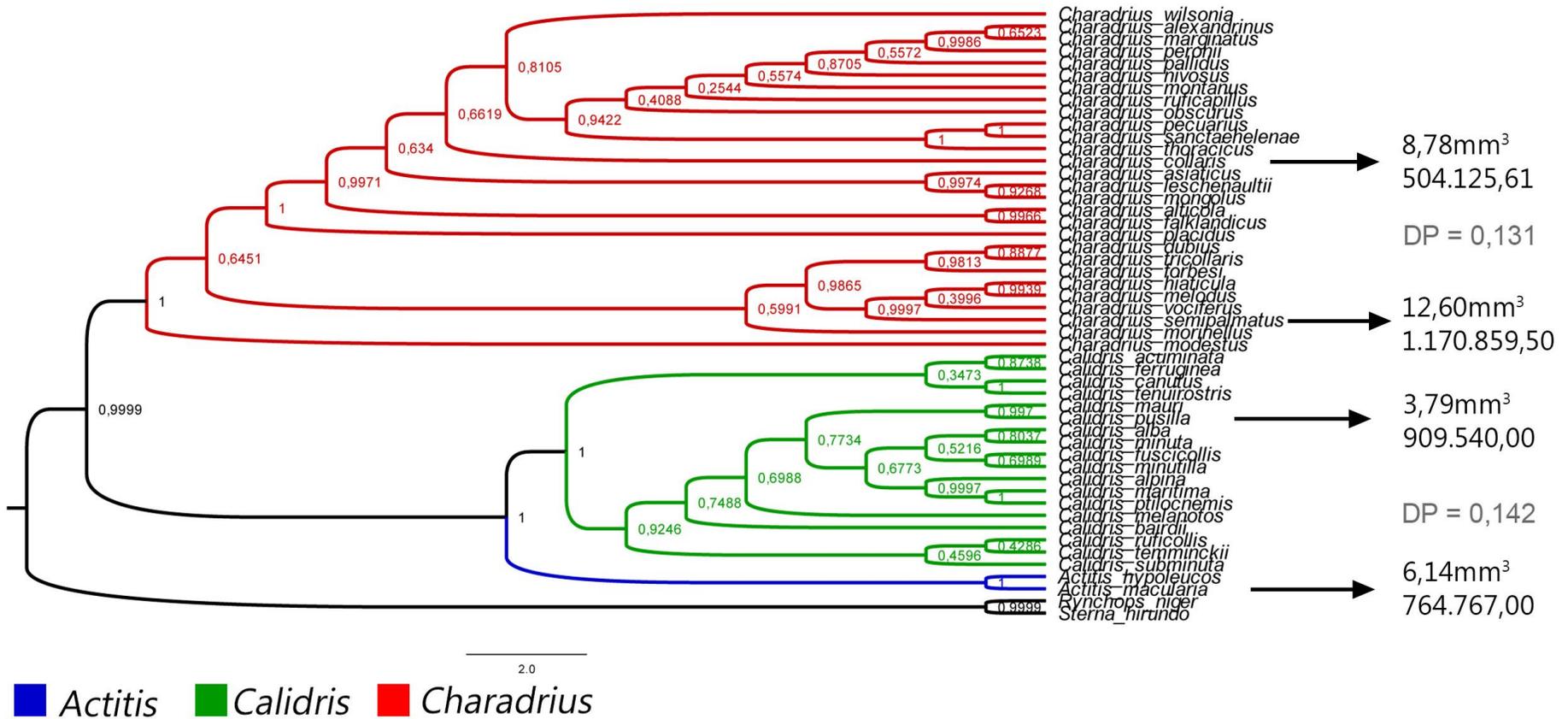
| Sedentário    | Nº C-Fos FHE      | CE Scheaffer | Espessura (µm) |
|---------------|-------------------|--------------|----------------|
| BCCC11        | 571.232,38        | 0,036        | 19,50          |
| BCCC12        | 774.243,25        | 0,035        | 22,60          |
| BCCC13        | 487.126,31        | 0,045        | 18,70          |
| BCCC17        | 650.915,63        | 0,040        | 17,10          |
| <b>Média</b>  | <b>620.879,39</b> | <b>0,04</b>  | <b>19,48</b>   |
| Desvio padrão | 122.171,10        | 0,005        | 2,3            |
| Erro padrão   | 61.085,57         |              |                |

Nota: CE: Coeficiente de erro; FHE = Formação hipocampal esquerda.

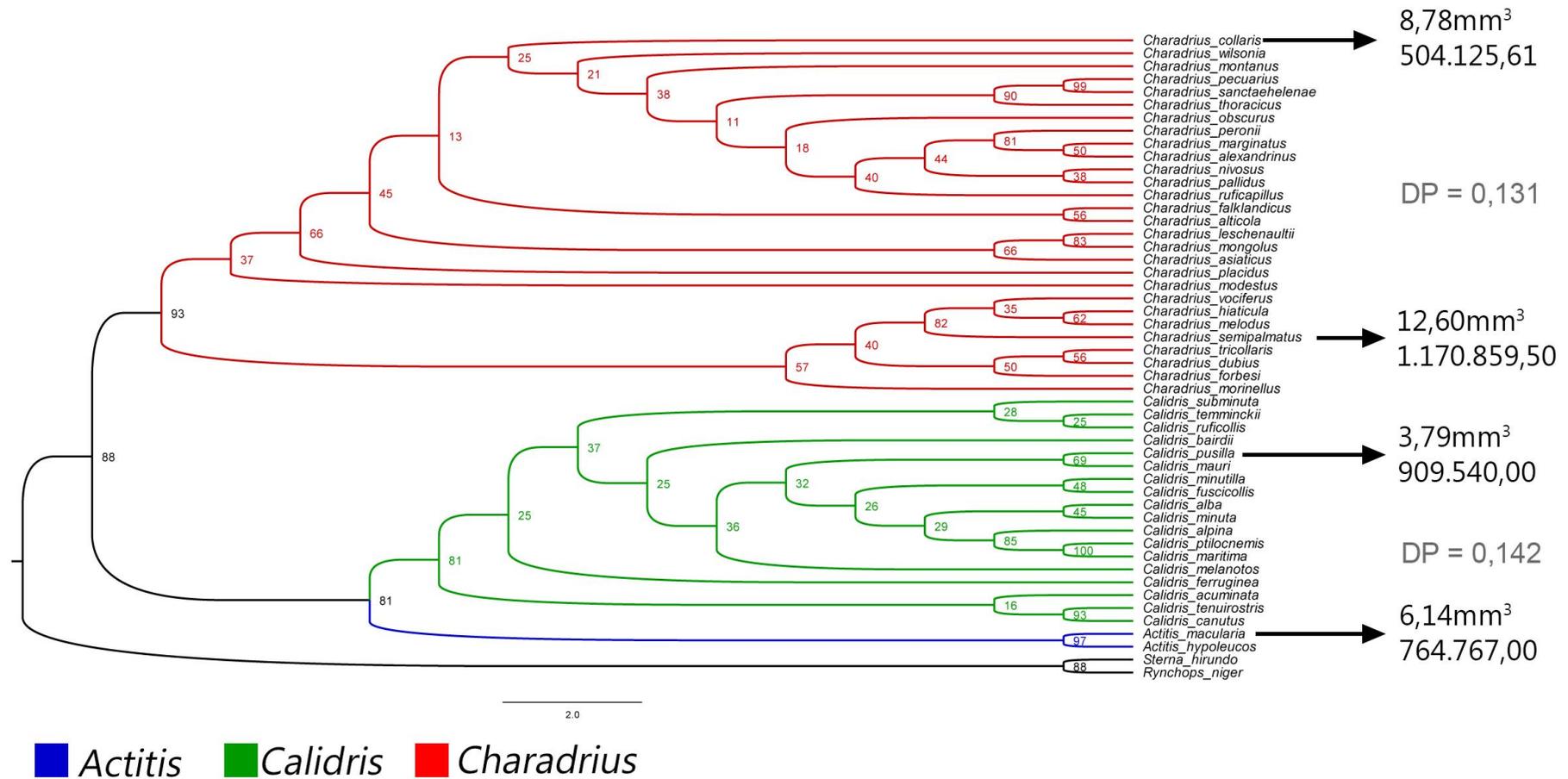
#### 5.4. Filogenia e Contrastes filogenéticos

Através das análises filogenéticas nós descrevemos as relações de parentesco evolutivo entre as espécies dos gêneros *Actitis*, *Calidris* e *Charadrius* utilizando o gene COI. As espécies utilizadas no presente estudo (*C. collaris* e *C. semipalmatus*) pertencem a um único grupo formado pelas espécies do gênero *Charadrius* assim como as espécies *A. macularia* e *C. pusilla* claramente separadas em seus respectivos gêneros apoiados por valores de suporte aceitáveis, tanto para inferência bayesiana quanto para máxima verossimilhança. Os valores do cálculo de distância P (DP) utilizando o gene COI, mostraram que *A. macularia* e *C. pusilla* (DP = 0,142) apresentam maior diferença entre si quando comparadas a *C. collaris* e *C. semipalmatus* (DP = 0,131). A árvore filogenética de inferência bayesiana e máxima verossimilhança podem ser vistas nas **Figura 27** e **Figura 28**, respectivamente.

**Figura 27:** Árvore filogenética de inferência bayesiana do gene COI exibindo as relações entre as espécies dos gêneros *Actitis*, *Calidris* e *Charadrius*. Números nos ramos representam os valores de probabilidade. Os valores indicados pelas setas são volumes da formação hipocampal e número de células; os valores em cinza são os valores de distância P entre as espécies.



**Figura 28:** Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI exibindo as relações entre as espécies dos gêneros *Actitis*, *Calidris* e *Charadrius*. Números nos ramos representam os valores de bootstrap. Os valores indicados pelas setas são volumes da formação hipocampal e número de células. Os valores em cinza são os valores de distância P entre as espécies.



Nota: DP = Valor de Distância P

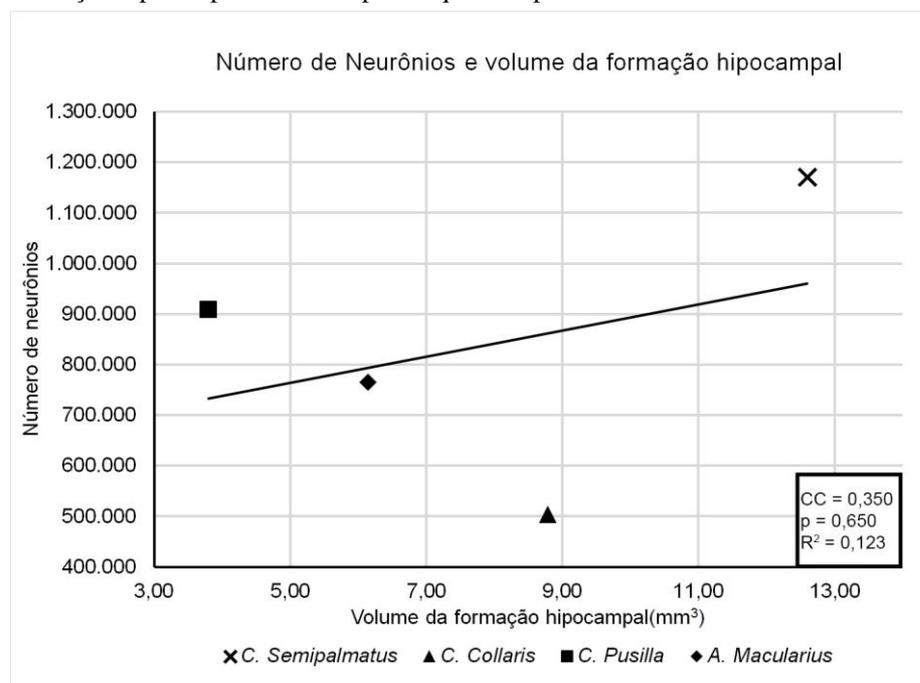
No que diz respeito aos contrastes filogenéticos, não houve correlação entre o volume da formação hipocampal e o número de neurônios maduros entre as espécies estudadas por (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016) (*A. macularia*, *C. pusilla*) e as espécies do presente estudo (*C. semipalmatus* e *C. collaris*) (**Figura 29** e **Tabela 27**). Os Contrastes filogenéticos (**Figura 31** e **Figura 33**) mostraram que de fato não existe correlação entre número de células e o volume da formação hipocampal mesmo se ponderarmos o peso evolutivo entre as quatro espécies (**Figura 30** e **Figura 32**).

**Tabela 27:** Dados dos caracteres utilizados para a análise de Contrastes Filogenéticos de Felsenstein (1985b).

| Espécie                | Número de Neurônios (NeuN) | Volume da formação hipocampal (mm <sup>3</sup> ) |
|------------------------|----------------------------|--|
| <i>C. semipalmatus</i> | 1.170.661,91               | 12,600   |
| <i>C. collaris</i>     | 504.125,61                 | 8,780  |
| <i>C. pusilla</i> *    | 909.540,00                 | 3,796  |
| <i>A. macularia</i> *  | 764.767,00                 | 6,145  |

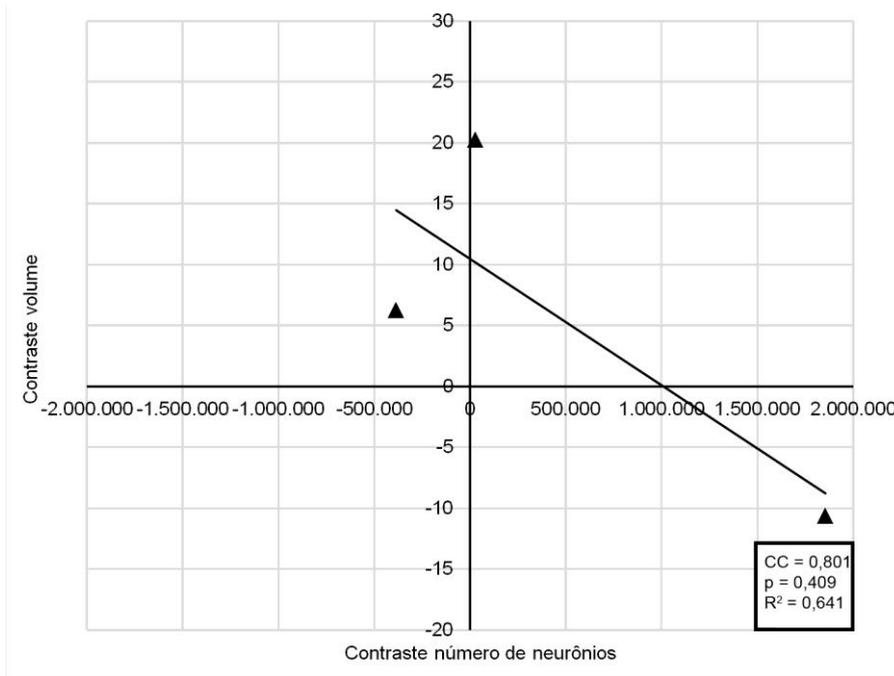
Nota: \* = Dados de (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016)

**Figura 29:** Correlação linear de Pearson entre número de neurônios e volume da formação hipocampal entre as espécies quatro espécies de aves marinhas.



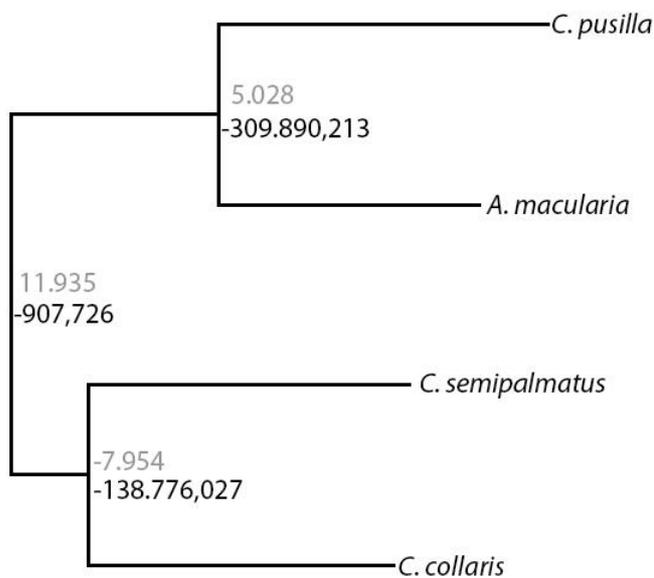
Nota: CC = Coeficiente de correlação de Pearson; p = valor de p; R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação.

**Figura 30:** Correlação linear de Pearson para os valores de contrastes filogenéticos utilizando dados de volume da formação hipocampal, número de neurônios e arranjo filogenético da árvore de máxima verossimilhança do COI (**Figura 31**).



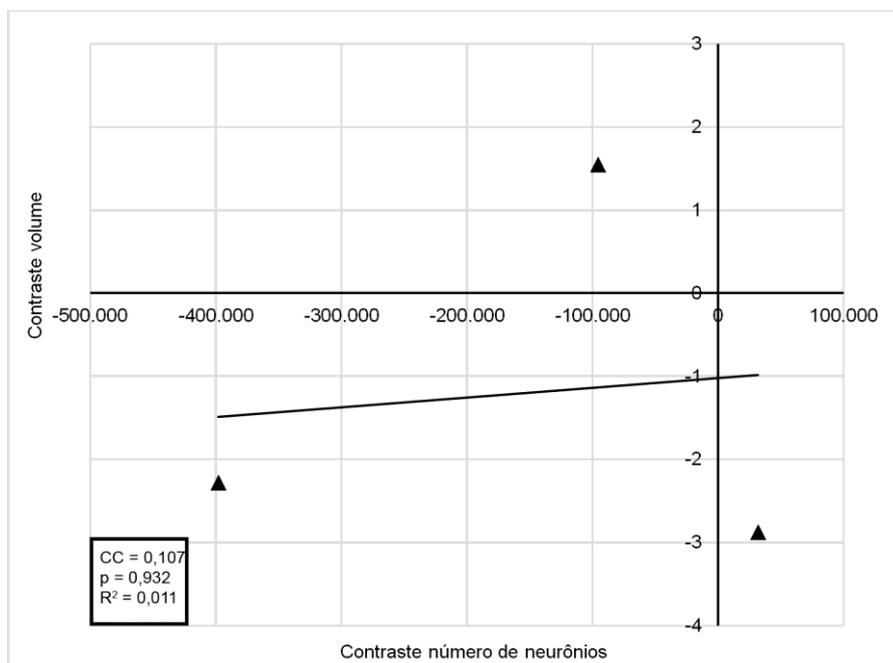
Nota: CC = Coeficiente de correlação de Pearson; p = valor de p; R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação.

**Figura 31:** Arvore de máxima verossimilhança baseada no gene COI e valores de contraste filogenéticos (**Tabela 27**).



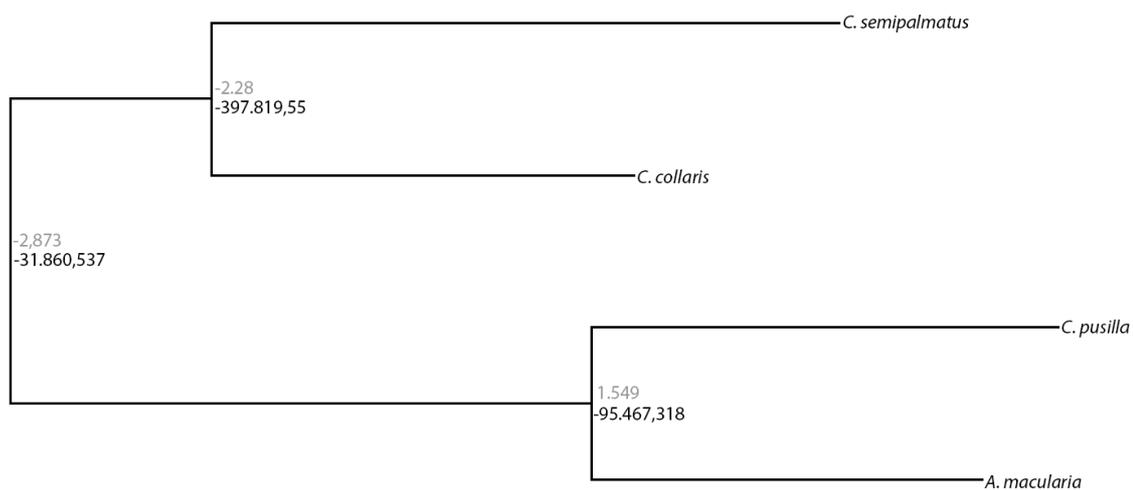
Nota: valores em cinza e preto são os contrastes de volume da formação hipocámpal e número de neurônios respectivamente.

**Figura 32:** Correlação linear de Pearson para os valores de contrastes filogenéticos utilizando dados de volume da formação hipocampal, número de neurônios e arranjo filogenético da inferência bayesiana do COI (**Figura 33**).



Nota: CC = Coeficiente de correlação de Pearson; p = valor de p; R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinação.

**Figura 33:** Arvore de inferência bayesiana baseada no gene COI e valores de contraste filogenéticos (**Tabela 27**).



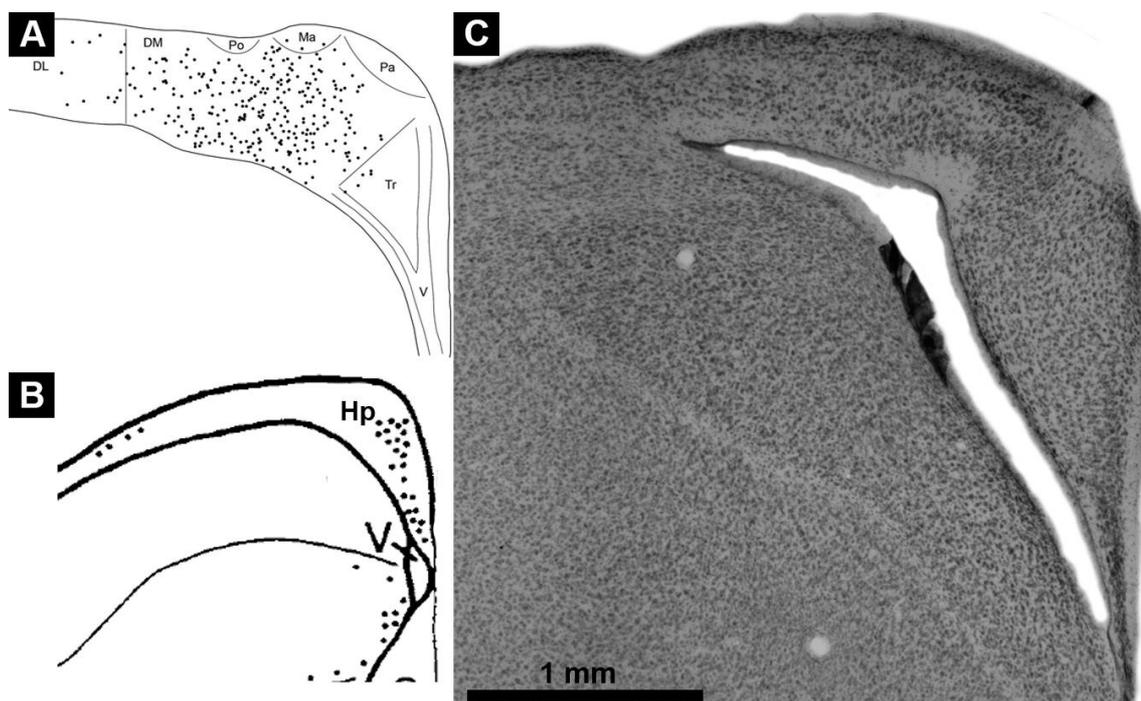
Nota: valores em cinza e preto são os contrastes de volume da formação hipocampal e número de neurônios respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Limites citoarquitetônicos

Quando comparados à outros trabalhos tanto *C. collaris* quanto *C. semipalmatus*, os limites citoarquitetônicos são similares aos descritos para pombos (Atoji e Wild, 2006; Atoji *et al.*, 2016) e zebra finch (Shen *et al.*, 1995)(**Figura 34**).

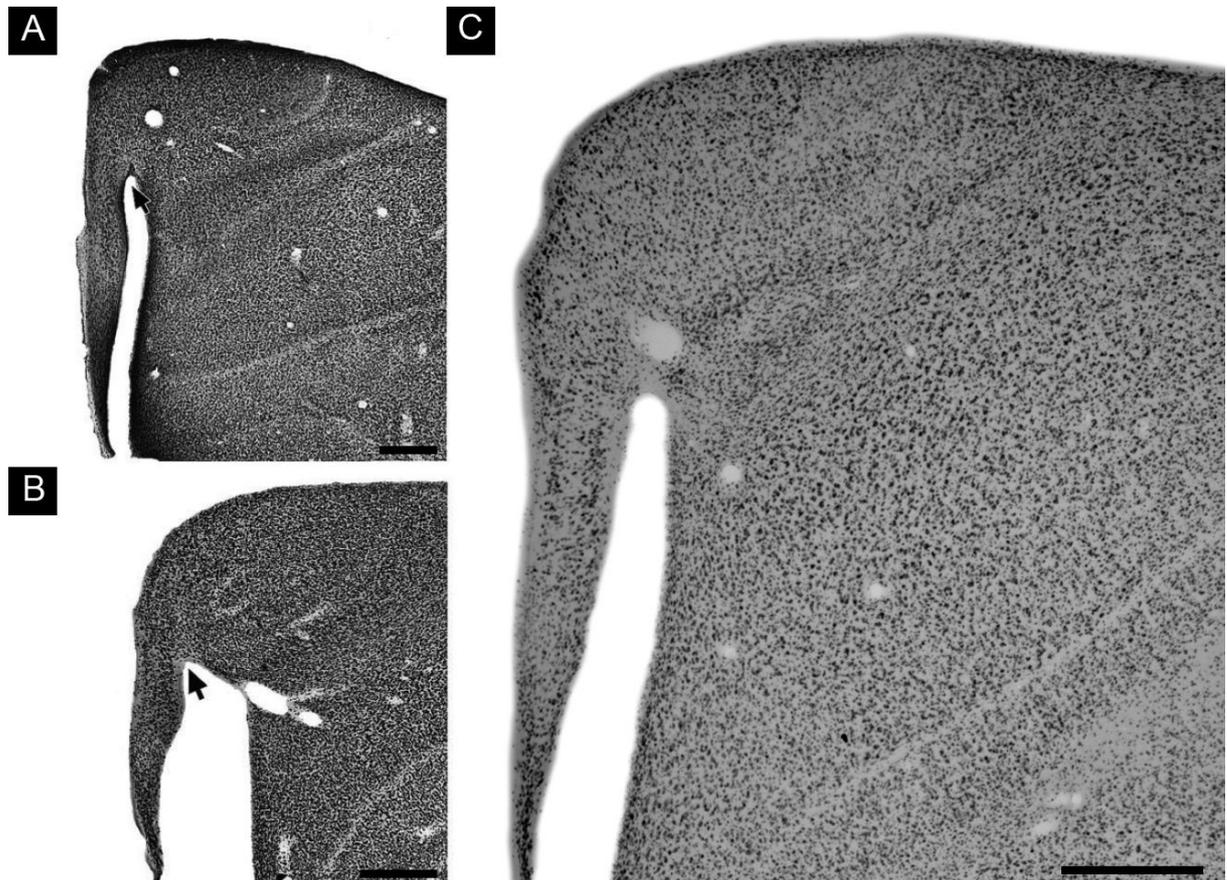
**Figura 34:** Figura comparativa da formação hipocampal de *C. collaris* com outros estudos. **(A)** Anatomia da formação hipocampal do pombo proposta por Atoji *et al.* (2016); **(B)** Anatomia da formação hipocampal de Zebra finch proposta por Shen *et al.* (1995); **(C)** Formação hipocampal de *C. collaris* observada neste estudo.



Quanto a definição dos limites citoarquitetônicos nossos resultados reproduzem de perto aqueles propostos previamente para o hipocampo das aves marinhas *A. macularia*, e *C. pusilla* (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016) (**Figura 35**). Mimetiza ide perto a proposta de parcelamento citoarquitetônico para outras aves empregando outros marcadores (e.g. Atoji *et al.*, 2016). O melhor imunomarcador para delimitar com o mínimo possível de ambiguidades o limite interno entre a área parahipocampal e as adjacências foi o NeuN. Essa conspicuidade da definição citoarquitetônica empregando NeuN, corre por conta da distinção entre corpos celulares que se agrupam em maior ou menor densidade nas diferentes sub-regiões. Os limites citoarquitetônicos são similares aos descritos para pombos (Atoji *et al.*, 2016), maçaricos (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016; De Moraes Magalhaes *et al.*, 2017) e zebra finch (Shen

*et al.*, 1995). Dessa forma a formação hipocampal também se localiza na porção dorsomedial do telencéfalo.

**Figura 35:** Comparação entre a formação hipocampal observada no presente estudo com outras aves migratórias marinhas. (A) *Actitis macularia*; (B) *Calidris pusilla* (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016); (C) Formação hipocampal observada em *C. collaris*.



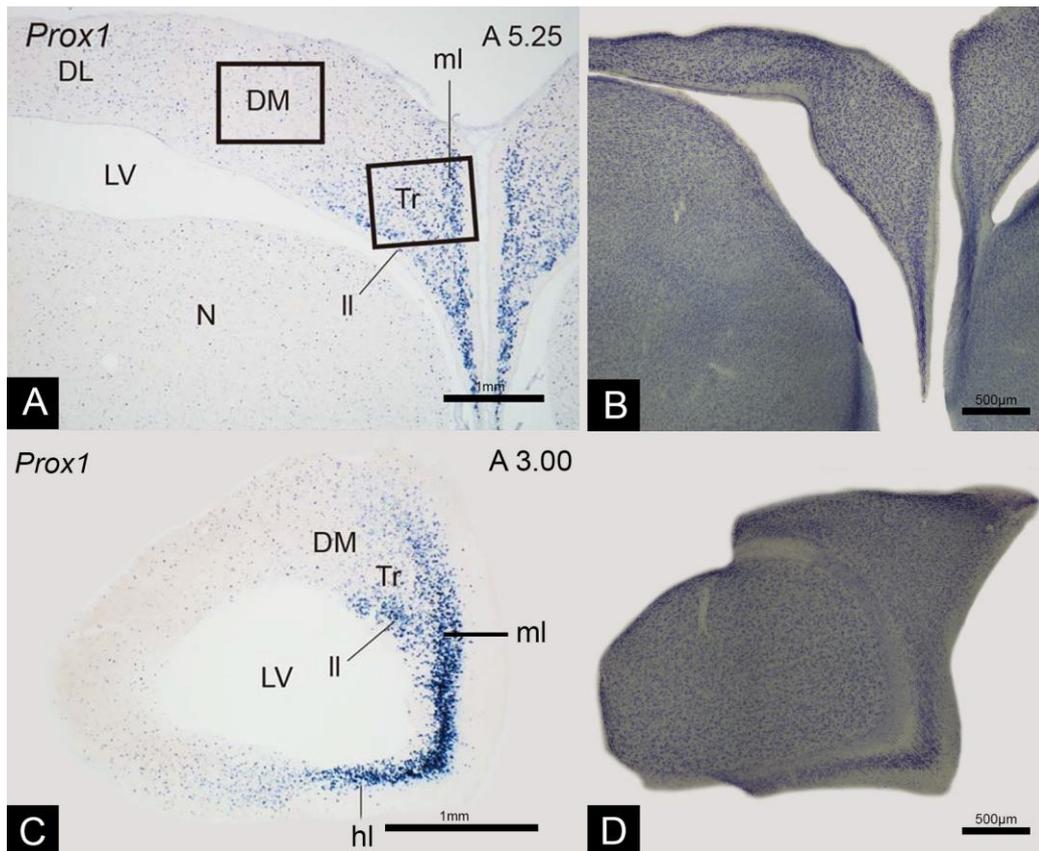
Nota: Barras de escala 500µm

Recentemente Atoji *et al.* (2016) propuseram a homologia entre a subdivisão dorsomedial (APH) e a camada em forma de “V” das aves ao corno de Amon e o giro denteado de mamíferos, respectivamente. No presente estudo a sub-estruturação dentro da formação hipocampal proposta por Atoji *et al.* (2016) foi facilmente observada em alguns imunomarcadores tais como NeuN e C-Fos e também em corantes básicos como a técnica de Nissl (**Figura 36**). Entretanto, o imunomarcador DCX não exibiu padrões celulares distintos que possam indicar subregiões da formação hipocampal. Os autores Atoji *et al.* (2016) utilizaram como marcador citoarquitetônico a expressão de *Prox1* na delimitação da formação hipocampal do pombo, sugerindo uma possível homologia entre a área parahipocampal (subdivisão dorsomedial) e a camada em forma de “V” ao corno de Amon e giro denteado de

mamíferos respectivamente já que *Prox1* é uma proteína bem reconhecida por fazer parte do processo de diferenciação de células granulares no giro denteado de mamíferos (Zhou *et al.*, 2004; Iwano *et al.*, 2012; Abellán *et al.*, 2014).

As secções marcadas por *Prox1* na formação hipocampal do pombo se concentram no V hipocampal e sua distribuição compacta nas bordas e na extremidade do v mimetizam similar compactação de células identificadas nas secções coradas pela técnica de Nissl tanto em *C. collaris* quanto em *C. semipalmatus*, possibilitando com bastante clareza a definição do limite dorsolateral (Corno de Amon em mamíferos e área parahipocampal em aves) e onde termina a formação hipocampal e começa o as outras regiões do telencéfalo das espécies analisadas. (Figura 36).

**Figura 36:** Figura comparando a estrutura da formação hipocampal sugerida por Atoji *et al.* (2016) (A e C) da formação hipocampal do pombo com a encontrada no presente estudo (B e D); (A) e (C) secções mostrando a expressão de *Prox1* na região dorsomedial (DM) e camada em forma de V; (B) e (D) Seções coradas com técnica de Nissl da formação hipocampal de *C. collaris*.



Nota: Fonte A e C (Atoji *et al.*, 2016)

## 6.2. Volume e números de células da formação hipocampal

Estudos prévios indicam que existe uma clara diferença entre o processamento de pistas visuais entre ambos os hemisférios em algumas espécies de aves (Rashid e Andrew, 1989; Clayton e Krebs, 1994). Em indivíduos jovens da espécie *Gallus gallus* o hemisfério direito processa informação espacial e o hemisfério esquerdo permite que a ave aprenda mais rapidamente a diferenciar objetos comestíveis de objetos não comestíveis (Mench e Andrew, 1986). Apesar das evidências do processamento assimétrico entre ambos os hemisférios cerebrais, em *C. semipalmatus* assim como em *C. collaris* as estimativas de volume para os hemisférios esquerdo e direito não são estatisticamente diferentes. Esses resultados simulam resultados anteriores na espécie *Parus atricapillus* que também não exibiu diferença significativa entre ambos os hemisférios da formação hipocampal (Smulders *et al.*, 1995).

Healy *et al.* (1996) demonstraram que indivíduos da espécie migratória *Silvia borin* são afetados em seus volumes hipocampais absolutos e que essa diferença (grupos de jovens vs adultos) pode ser causada por uma combinação entre idade e experiência migratória. Estes autores demonstraram através de vários grupos comparativos que apenas a idade, experiência ou privação ambiental (animais mantidos em cativeiro) não afetam o volume hipocampal dessa espécie.

Estudos utilizando subespécies de aves migratórias (*Junco hyemalis hyemalis*) e não-migratórias (*Junco hyemalis carolinensis*) demonstraram que apesar de proximamente relacionadas, estas subespécies não possuem volumes hipocampais significativamente diferentes (Cristol *et al.*, 2003), entretanto na subespécie migratória *Zonotrichia leucophrys gambelii* o volume da formação hipocampal é significativamente maior quando comparado a subespécie não migrante *Zonotrichia leucophrys nutalli* (Pravosudov *et al.*, 2006). Bingman e Macdougall-Shackleton (2017) sugerem que apesar da “recente” divergência evolutiva entre as espécies utilizadas por Healy *et al.* (1996) não foi observado diferença no volume, já que podemos observar volumes hipocampais equivalentes em espécies proximamente relacionadas (Healy *et al.*, 1996), volumes hipocampais diferentes também em espécies proximamente relacionadas (Pravosudov *et al.*, 2006) assim como observamos diferenças em volumes hipocampais entre espécies não tão proximamente relacionadas (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016). Isto pode sugerir que as diferenças nos volumes hipocampais entre as espécies migratórias e

não migratórias podem ser de fato dependentes da experiência/idade e não estarem necessariamente atreladas à distância evolutiva entre as espécies estudadas até então.

No presente trabalho reportamos uma diferença estatisticamente significativa entre o volume da formação hipocampal entre duas espécies, migratória (*C. semipalmatus*) e não migratória (*C. collaris*), sendo um indicio de que as aves migratórias podem ter um volume hipocampal maior devido a experiência migratória e uma maior exposição a estímulos visuoespaciais quando comparados com espécies não migratórias. Além disso, o volume da formação hipocampal de *C. collaris* é significativamente menor quando comparado com outras espécies de aves migratórias marinhas analisadas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) e *C. semipalmatus* não diferiu das espécies analisadas por este autor.

O estudo de Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) comparou o número de neurônios maduros de duas espécies de aves marinhas, ambas migrantes, no entanto com estratégias de migração distintas. O estudo analisou *Actitis macularia* que possui uma rota migratória com inúmeras paradas para reabastecimento de energia e por isso estaria seria exposta a diversos tipos de estímulos visuoespaciais em cada uma dessas paradas, já *Calidris pusilla* realiza sua migração em direção ao hemisfério sul inteiramente sobre a água e para apenas em seu destino final. Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) argumenta que esses diferentes perfis de estímulos visuoespaciais podem provocar a diferença no volume hipocampal encontrado, mas não provoca diferença no número de neurônios maduros. Quando se fala de comparação entre aves migrantes e não migrantes, as aves migratórias tem uma densidade maior de neurônios na formação hipocampal quando comparado a subespécies que não realizaram migração (Cristol *et al.*, 2003).

No presente estudo detectamos que *C. semipalmatus* tem maior número de neurônios maduros (NeuN) quando comparado a *C. collaris*, isso pode estar relacionado ao hábito migratório, já que *C. collaris* é uma espécie sedentária e em tese não necessitaria de uma grande quantidade de neurônios na formação hipocampal devido à menor demanda por reconhecimento e memória espacial quando comparado a espécie migratória. Em comparação com outras espécies de aves migratórias marinhas a espécie sedentária *C. collaris* tem significativamente menos neurônios maduros quando comparado com *A. macularia* e *C. pusilla*, já *C. semipalmatus* não possui diferença significativa no número de neurônios quando comparado a estas duas espécies. Como pudemos observar *C. collaris* possui um volume da formação hipocampal significativamente maior do que *C. pusilla* e *A. macularia* enquanto que *C. semipalmatus* possui o volume significativamente maior que as estas três últimas espécies (Ver

**Figura 24** para comparação entre números de neurônios maduros e volume da formação hipocampal com dados de Guerreiro-Diniz *et al.* (2016)).

Já é conhecido que em mamíferos, as mudanças anatômicas e fisiológicas bruscas causadas por estímulos visuoespaciais diferenciados, podem provocar alterações na expressão de genes de ativação imediata, também sabemos que os genes de ativação imediata podem estar envolvidos com uma cascata de ativação de outros genes, atuando como “pontapé” inicial para a ativação de genes de expressão tardia (Sheng e Greenberg, 1990; Beaver *et al.*, 1993). É de interesse notar que os genes de ativação imediata, como é o caso do C-Fos, parecem estar envolvidos em diferentes formas de memória e aprendizado e na modificação de sinapses (Guzowski *et al.*, 2001; Fleischmann *et al.*, 2003).

Apesar da diferença marcante no volume da formação hipocampal em *C. semipalmatus* e *C. collaris*, não houve diferença significativa entre as estimativas de células imunomarcadas por C-Fos. Isto possivelmente ocorre porque os indivíduos de ambos os grupos foram coletados nas mesmas condições ambientais (invernada), indicando que devido aos estímulos visuoespaciais similares a atividade celular na formação hipocampal permanece equivalente entre as espécies, e essa ativação parece ser consequência dos estímulos (migrante vs sedentário).

Nossos resultados demonstraram que a espécie migratória (*C. semipalmatus*) tem significativamente mais neurônios recém gerados quando comparado a espécie sedentária do mesmo gênero (*C. collaris*), corroborando a ideia de que nas aves migrantes há maior demanda por aprendizado, memória espacial, bem como diferentes estímulos visuoespaciais e estes causam um acréscimo nas taxas de neurogênese tornando-se maior que em espécies sedentárias (Ling *et al.*, 1997; Ladage *et al.*, 2011).

Apesar da diferença marcante no número neurônios maduros e taxas de neurogênese entre ambas as espécies, uma análise em nível celular do volume do soma neuronal não exibiu diferença significativa entre *C. semipalmatus* e *C. collaris* o que pode sugerir que as células neuronais possuem o mesmo número de conexões por célula, já que em mamíferos um maior número de conexões realizado por um neurônio pode aumentar o volume de seu soma (Chareyron *et al.*, 2016). Assim, com a maior demanda de trabalho devido aos estímulos ambientais essas células aumentariam em número e conseqüentemente aumentaria o número de conexões ao invés de aumentar seu volume.

Pascual e Senar (1996) relatam que características biométricas podem ser uteis para estimar as dimensões de espécies de aves, assim foi possível comparar as características

biométricas (comprimento de bico e tarso) entre ambas as espécies estudadas neste trabalho (ver Pag. 46). Não houve diferença nos comprimentos de bicos e asas dos indivíduos analisados, o que exclui um possível viés associado às diferenças biométricas na comparação dos volumes hipocâmpais entre ambas as espécies.

### **6.3. Relações filogenéticas e evolução dos caracteres**

No estudo de Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) várias características relacionadas à neuromorfologia foram analisadas entre duas espécies de aves migratórias marinhas. Neste estudo uma característica em especial é afetada pela diferença comportamental (volume da formação hipocâmpal). Diante disso, surge a pergunta se os diferentes comportamentos migratórios de fato provocam alterações neuromorfológicas na formação hipocâmpal ou se tais diferenças são oriundas da distância evolutiva entre os grupos. Nesse caso em especial apesar de ser amplamente aceito que a formação hipocâmpal pode ser afetada de diferentes formas, por variáveis ambientais (Chancellor *et al.*, 2011; Ladage *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2013; Druzian *et al.*, 2015), é prudente considerar as relações evolutivas que envolvem essas características.

A ausência de correlação dos valores de contrastes filogenéticos nos mostrou que não há correlação entre número de células e o volume da formação hipocâmpal entre as quatro espécies (**Tabela 27**, **Figura 30** e **Figura 32**), indicando que estas características não estão sendo influenciadas pelas distâncias evolutivas entre os táxons, eliminado assim um possível viés causado pela distância genética entre as espécies comparadas (*C. collaris* e *C. semipalmatus*). Também podemos observar através de filogenias e medidas de distância genética (Distância P) que as diferenças no número de células assim como no volume da formação hipocâmpal não ocorrem em razão da distância filogenética entre as espécies. Se observamos a **Figura 27** e **Figura 28** **Figura 36** veremos que as espécies estudadas por Guerreiro-Diniz *et al.* (2016) que exibem diferença significativa no volume da formação hipocâmpal possuem a distância genética (distância P = 1,142) equivalente a *C. collaris* e *C. semipalmatus* (distância P = 1,131), da mesma forma o autor não encontrou diferença significativa no número de neurônios maduros. Nas espécies do presente estudo, entretanto observamos a diferença significativa tanto no volume quanto no número de neurônios maduros o que deixa claro a não existência de um padrão genético atrelado as diferenças observadas. Apesar disso apenas os valores de distância genética não podem responder definitivamente esta questão, mas em conjunto aos dados neuromorfológicas sugerem que o comportamento migratório provoca alterações na formação hipocâmpal de espécies de aves migrantes e não migrantes.

## 7. CONCLUSÕES

A espécie migratória *C. semipalmatus* possui maior número de neurônios do que a espécie não migrante sugerindo que essa diferença pode estar relacionada ao comportamento migratório.

A neurogênese mais intensa na espécie *C. semipalmatus* indica um efeito da migração sobre a formação hipocampal.

A atividade de síntese na formação hipocampal não é diferente entre ambas as espécies o que provavelmente ocorre por conta das condições ambientais similares.

Diferentes comportamentos migratórios podem não alterar volume do soma neuronal.

Como as diferenças neuroanatômicas encontradas na formação hipocampal das espécies migrante não migrante não guardaram correlação com a distância evolutiva, é razoável supor que sua contribuição para explicar as diferenças não seja suficiente.

## 8. REFERÊNCIAS

ABELLÁN, A.; DESFILIS, E.; MEDINA, L. Combinatorial expression of Lef1, Lhx2, Lhx5, Lhx9, Lmo3, Lmo4, and Prox1 helps to identify comparable subdivisions in the developing hippocampal formation of mouse and chicken. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 8, p. 59, 2014. ISSN 1662-5129.

ADINSOFT, S. XLSTAT-software, version 2016. **Addinsoft, Paris, France**, 2016.

AGGLETON, J.; HUNT, P.; RAWLINS, J. The effects of hippocampal lesions upon spatial and non-spatial tests of working memory. **Behavioural brain research**, v. 19, n. 2, p. 133-146, 1986. ISSN 0166-4328.

ALERSTAM, T. Detours in bird migration. **Journal of Theoretical Biology**, v. 209, n. 3, p. 319-331, 2001. ISSN 0022-5193.

ANAT, B.; VLADIMIR, P. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 884-907, 2011. ISSN 1460-9568.

ANDRES, B. A. et al. Population estimates of North American shorebirds, 2012. **Wader Study Group Bull**, v. 119, n. 3, p. 178-194, 2012.

ANGELUCCI, F. et al. Increased concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat cerebellum after exposure to environmental enrichment. **The Cerebellum**, v. 8, n. 4, p. 499-506, 2009. ISSN 1473-4222.

ANTAS, P.; NASCIMENTO, I. Análise dos dados de anilhamento de *Calidris pusilla* no Brasil. **Anais do IV encontro nacional de anilhadores de aves. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 151p**, p. 6-19, 1990.

ATOJI, Y.; SARKAR, S.; WILD, J. M. Proposed homology of the dorsomedial subdivision and V - shaped layer of the avian hippocampus to Ammon's horn and dentate gyrus, respectively. **Hippocampus**, v. 26, n. 12, p. 1608-1617, Dec 2016. ISSN 1098-1063. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27657725> >.

ATOJI, Y.; WILD, J. M. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the pigeon as revealed by tract tracing and kainic acid lesions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 475, n. 3, p. 426-461, 2004. ISSN 1096-9861.

\_\_\_\_\_. Anatomy of the avian hippocampal formation. **Reviews in the neurosciences**, v. 17, n. 1-2, p. 3-16, 2006. ISSN 2191-0200.

ATOJI, Y. et al. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 447, n. 2, p. 177-199, 2002. ISSN 1096-9861.

AZEVEDO JÚNIOR, S. M. et al. Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. 2001.

BAILEY, D. J.; ROSEBUSH, J. C.; WADE, J. The hippocampus and caudomedial neostriatum show selective responsiveness to conspecific song in the female zebra finch. **Journal of neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 43-51, 2002. ISSN 1097-4695.

BAKER, A. J.; PEREIRA, S. L.; PATON, T. A. Phylogenetic relationships and divergence times of Charadriiformes genera: multigene evidence for the Cretaceous origin of at least 14 clades of shorebirds. **Biology Letters**, v. 3, n. 2, p. 205-210, 2007. ISSN 1744-9561.

BARTH, J. M.; MATSCHINER, M.; ROBERTSON, B. C. Phylogenetic position and subspecies divergence of the endangered New Zealand Dotterel (*Charadrius obscurus*). **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e78068, 2013. ISSN 1932-6203.

BEAVER, C.; MITCHELL, D.; ROBERTSON, H. Immunohistochemical study of the pattern of rapid expression of c - fos protein in the visual cortex of dark - reared kittens following initial exposure to light. **Journal of Comparative Neurology**, v. 333, n. 4, p. 469-484, 1993. ISSN 1096-9861.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D36-D42, 2013. ISSN 0305-1048.

BHORJEE, J. S. et al. Monoclonal antibodies specific for tight-binding human chromatin antigens reveal structural rearrangements within the nucleus during the cell cycle. **The Journal of cell biology**, v. 97, n. 2, p. 389-396, 1983. ISSN 0021-9525.

BINGMAN, V.; CHENG, K. Mechanisms of animal global navigation: comparative perspectives and enduring challenges. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 17, n. 4, p. 295-318, 2005. ISSN 0394-9370.

BINGMAN, V. P.; MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A. The avian hippocampus and the hypothetical maps used by navigating migratory birds (with some reflection on compasses and migratory restlessness). **Journal of Comparative Physiology A**, p. 1-10, 2017. ISSN 0340-7594.

BIOSCIENCE, M. **Stereo Investigator 10 Users Guide**. Mbf Bioscience, 2011. ISBN 9780978647148. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=DiD5ygAACAAJ> >.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 182-194, 2008. ISSN 1471-003X.

BOIRE, D.; THÉORET, H.; PTITO, M. Stereological evaluation of neurons and glia in the monkey dorsal lateral geniculate nucleus following an early cerebral hemispherectomy. **Experimental brain research**, v. 142, n. 2, p. 208-220, 2002. ISSN 0014-4819.

BOLHUIS, J. J.; MACPHAIL, E. M. A critique of the neuroecology of learning and memory. **Trends in cognitive sciences**, v. 5, n. 10, p. 426-433, 2001. ISSN 1364-6613.

BOWLEY, M. P. et al. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 5, p. 404-412, 2002. ISSN 0006-3223.

BRAUCH, R. A. et al. Glial cell number and neuron/glial cell ratios in postmortem brains of bipolar individuals. **Journal of affective disorders**, v. 91, n. 1, p. 87-90, 2006. ISSN 0165-0327.

BROWN, C.; WARD, D. The morphology of the syrinx in the Charadriiformes (Aves): possible phylogenetic implications. **Bonner Zoologische Beiträge**, v. 41, p. 95-107, 1990.

BROWN, S.; HALEY, J. First Ever Geolocator Results For A Semipalmated Sandpiper Show Remarkable Year-Long Odyssey. 2014. Disponível em: < <https://www.manomet.org/newsletter/first-ever-geolocator-results-semipalmated-sandpiper-show-remarkable-year-long-odyssey> >. Acesso em: 14 of September.

CAMPOS, C. E.; NAIFF, R. H.; DE ARAÚJO, A. S. Censo de aves migratórias (Charadriidae e Scolopacidae) da Porção Norte da Bacia Amazônica, Macapá, Amapá, Brasil. **Ornithologia**, v. 3, n. 1, p. 38-46, 2010. ISSN 1809-2969.

CARDOSO, H. Introdução ao estudo da muda em Passeriformes europeus. **Associação Portuguesa de Anilhadores de Aves, Carvalhal**, 2008.

CASINI, G. et al. The neuroethology of cognitive maps: contributions from research on the hippocampus and homing pigeon navigation. **Archives italiennes de biologie**, v. 135, n. 1, p. 73-92, 1997. ISSN 0003-9829.

CHANCELLOR, L. V. et al. The effect of environmental harshness on neurogenesis: A large - scale comparison. **Developmental neurobiology**, v. 71, n. 3, p. 246-252, 2011. ISSN 1932-846X.

CHAREYRON, L. J.; AMARAL, D. G.; LAVENEX, P. Selective lesion of the hippocampus increases the differentiation of immature neurons in the monkey amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201604288, 2016. ISSN 0027-8424.

CHAUDHURI, A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. **Neuroreport**, v. 8(16), 1997.

CHILTON, H. Partners in practice: Riding the waves of change. **Canadian Journal of Occupational Therapy**, v. 62, n. 4, p. 183-187, 1995. ISSN 0008-4174.

CLAYTON, N. S.; DICKINSON, A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 272-274, 1998. ISSN 0028-0836.

CLAYTON, N. S. et al. Elements of episodic-like memory in animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1413, p. 1483-1491, 2001. ISSN 0962-8436.

CLAYTON, N. S.; KREBS, J. R. Memory for spatial and object-specific cues in food-storing and non-storing birds. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 174, n. 3, p. 371-379, 1994. ISSN 0340-7594.

CLAYTON, N. S.; KREBS, J. R. Memory in food-storing birds: from behaviour to brain. **Current opinion in neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 149-154, 1995. ISSN 0959-4388.

CLAYTON, N. S.; YU, K. S.; DICKINSON, A. Scrub Jays (*Aphelocoma coerulescens*) Form Integrated Memories of the Multiple Features of Caching Episodes. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 27, n. 1, p. 17, 2001. ISSN 1939-2184.

CRISTOL et al. Migratory dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*, have better spatial memory and denser hippocampal neurons than non migratory conspecifics. **ANIMAL BEHAVIOUR**, v. 66, n. 2, p. 317-328, 2003. ISSN 00033472.

CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiol Aging**, v. 15, n. 3, p. 377-8; discussion 379-80, May-Jun 1994. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7936068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7936068)>.

D SZÉKELY, A. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. **Behavioural brain research**, v. 98, n. 2, p. 219-225, 1999. ISSN 0166-4328.

DE MORAIS MAGALHAES, N. G. et al. Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*). **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179134, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28591201> >.

DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. Handbook of the Birds of the World. Barcelona: Lynx Editions. v. 3 Hoatzun to Auks, 1996.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 84, n. 3, p. 214-221, 2005. ISSN 1074-7427.

DRUZIAN, A. F.; MELO, J. A. D. O.; SOUZA, A. S. D. The influence of enriched environment on spatial memory in Swiss mice of different ages. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 73, n. 8, p. 692-697, 2015. ISSN 0004-282X.

DUFFY, S. N. et al. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. **Learning & Memory**, v. 8, n. 1, p. 26-34, 2001. ISSN 1072-0502.

ELDRIDGE, N.; CRACRAFT, J. **Phylogenetic patterns and the evolutionary process. Method and theory in comparative biology**. New York.: Columbia Univ. Press, 1980.

ERICHSEN, J. T.; BINGMAN, V. P.; KREBS, J. R. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 314, n. 3, p. 478-492, 1991. ISSN 1096-9861.

FEENEY, M. C.; ROBERTS, W. A.; SHERRY, D. F. Memory for what, where, and when in the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*). **Animal cognition**, v. 12, n. 6, p. 767-777, 2009. ISSN 1435-9448.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985a. ISSN 0014-3820. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985APJ8100007 >.

\_\_\_\_\_. Phylogenies and the comparative method. **The American Naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985b. ISSN 0003-0147.

FLEISCHMANN, A. et al. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 27, p. 9116-9122, 2003. ISSN 0270-6474.

FRECKLETON, R. P.; HARVEY, P. H.; PAGEL, M. Phylogenetic analysis and comparative data: a test and review of evidence. **The American Naturalist**, v. 160, n. 6, p. 712-726, 2002. ISSN 0003-0147.

FUCHS, E.; GOULD, E. In vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2211-2214, 2000. ISSN 1460-9568.

GARAMSZEGI, L. Z.; EENS, M. The evolution of hippocampus volume and brain size in relation to food hoarding in birds. **Ecology Letters**, v. 7, n. 12, p. 1216-1224, 2004. ISSN 1461-0248.

GARAMSZEGI, L. Z.; LUCAS, J. R. Continental variation in relative hippocampal volume in birds: the phylogenetic extent of the effect and the potential role of winter temperatures. **Biology letters**, v. 1, n. 3, p. 330-333, 2005. ISSN 1744-9561.

GARCÍA-FIÑANA, M. et al. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. **Neuroimage**, v. 18, n. 2, p. 505-516, 2003. ISSN 1053-8119.

GARDELLA, D. et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. **Journal of neuroscience methods**, v. 124, n. 1, p. 45-59, 2003. ISSN 0165-0270.

GARLAND, T.; HARVEY, P. H.; IVES, A. R. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. **Systematic biology**, v. 41, n. 1, p. 18-32, 1992. ISSN 1063-5157.

GASTON, A. et al. Canadian Atlas of bird banding. **Volume**, v. 2, p. 1921-1995, 2008.

GEINISMAN, Y. et al. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. **Progress in neurobiology**, v. 45, n. 3, p. 223-252, 1995. ISSN 0301-0082.

GIBSON, R.; BAKER, A. Multiple gene sequences resolve phylogenetic relationships in the shorebird suborder Scolopaci (Aves: Charadriiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 66-72, 2012. ISSN 1055-7903.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **Journal of Microscopy**, v. 192, n. Pt 2, p. 163  
171, Nov 1998. ISSN 0022-2720 (Print)  
0022-2720 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853373> >.

GLASER, J.; GREENE, G.; HENDRICKS, S. **Stereology for biological research: with a focus on neuroscience**. mbf Press, 2007. ISBN 0978647114.

GLASER, J. R.; GLASER, E. M. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 20, n. 1, p. 115-126, 2000. ISSN 0891-0618.

GOLDMAN, S. A.; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 8, p. 2390-2394, 1983. ISSN 0027-8424.

GREENBERG, M. E.; ZIFF, E. B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. **Nature**, v. 311, n. 5985, p. 433, 1984. ISSN 0028-0836.

GUERREIRO-DINIZ, C. et al. Hippocampus and Dentate Gyrus of the Cebus Monkey: Architectonic and Stereological Study **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 40, n. 2, p. 148-59, Oct 2010. ISSN 1873-6300 (Electronic) 0891-0618 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558278> >.

GUERREIRO-DINIZ, C. et al. Microglia and Neurons in the Hippocampus of Migratory Sandpipers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 29, 2016.

GUNDERSEN, H.-J. G. The nucleator. **Journal of microscopy**, v. 151, n. 1, p. 3-21, 1988. ISSN 1365-2818.

GUNDERSEN, H.; JENSEN, E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of microscopy**, v. 147, n. 3, p. 229-263, 1987. ISSN 1365-2818.

GUSTAFSSON, D. R.; OLSSON, U. Flyway homogenisation or differentiation? Insights from the phylogeny of the sandpiper (Charadriiformes: Scolopacidae: Calidrinae) wing louse genus *Lunaceps* (Phthiraptera: Ischnocera). **International journal for parasitology**, v. 42, n. 1, p. 93-102, 2012. ISSN 0020-7519.

GUZOWSKI, J. F. et al. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5089-5098, 2001. ISSN 0270-6474.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 1999. p.95-98.

HAMIDI, M.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. **Biological psychiatry**, v. 55, n. 6, p. 563-569, 2004. ISSN 0006-3223.

HAMPTON, R. R. et al. Hippocampal volume and food-storing behavior are related in parids. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 45, n. 1, p. 54-61, 1995. ISSN 1421-9743.

HAMPTON, R. R.; SHETTLEWORTH, S. J. Hippocampus and memory in a food-storing and in a nonstoring bird species. **Behavioral neuroscience**, v. 110, n. 5, p. 946, 1996. ISSN 1939-0084.

HARVEY, P. H.; PAGEL, M. D. **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford university press Oxford, 1991.

HEALY, S.; CLAYTON, N.; KREBS, J. Development of hippocampal specialisation in two species of tit (< i> Parus spp.</i>). **Behavioural brain research**, v. 61, n. 1, p. 23-28, 1994. ISSN 0166-4328.

- HEALY, S. D.; GWINNER, E.; KREBS, J. R. Hippocampal volume in migratory and non-migratory warblers: effects of age and experience. **Behav Brain Res**, v. 81, n. 1-2, p. 61-8, Nov 1996. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8950002](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8950002)>.
- HEALY, S. D.; KREBS, J. R. Food storing and the hippocampus in Corvids amount and volume are correlated. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 248, n. 1323, p. 241-245, 1992. ISSN 0962-8452.
- HOCKLY, E. et al. Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. **Annals of neurology**, v. 51, n. 2, p. 235-242, 2002. ISSN 1531-8249.
- HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 14, n. 3, p. 173-213, 1993. ISSN 0091-3022.
- HOLBERTON, R. L. Changes in patterns of corticosterone secretion concurrent with migratory fattening in a Neotropical migratory bird. **General and comparative endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 49-58, 1999. ISSN 0016-6480.
- HOSHOOLEY, J. S.; SHERRY, D. F. Neuron production, neuron number, and structure size are seasonally stable in the hippocampus of the food-storing black-capped chickadee (*Parus atricapillus*). **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 345, 2004. ISSN 1939-0084.
- HOSSEINI-SHARIFABAD, M.; NYENGAARD, J. R. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **Journal of neuroscience methods**, v. 162, n. 1, p. 206-214, 2007. ISSN 0165-0270.
- HOUSE, P. K.; VYAS, A.; SAPOLSKY, R. Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of *Toxoplasma gondii* infected rats. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23277, 2011. ISSN 1932-6203.
- HOWARD, C.; REED, M. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. 2005. ISSN 1859960898.
- HOWARD, V.; REED, M. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. Garland Science, 2004. ISBN 1135331685.
- HUTCHEON, J. M.; KIRSCH, J. A.; GARLAND JR, T. A comparative analysis of brain size in relation to foraging ecology and phylogeny in the Chiroptera. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 60, n. 3, p. 165-180, 2002. ISSN 1421-9743.
- ICKES, B. R. et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental neurology**, v. 164, n. 1, p. 45-52, 2000. ISSN 0014-4886.

IWANO, T. et al. Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. **Development**, v. 139, n. 16, p. 3051-3062, 2012. ISSN 0950-1991.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001. ISSN 0036-8075.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of neural science**. 5<sup>a</sup>. 2014.

KIRN, J.; NOTTEBOHM, F. Direct evidence for loss and replacement of projection neurons in adult canary brain. **The Journal of neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 1654-1663, 1993. ISSN 0270-6474.

KREBS, J. R. et al. Hippocampal specialization of food-storing birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 4, p. 1388-1392, 1989. ISSN 0027-8424.

KRUIJER, W.; SCHUBERT, D.; VERMA, I. M. Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 21, p. 7330-7334, 1985. ISSN 0027-8424.

KRUKOFF, T. L. c-fos expression as a marker of functional activity in the brain. **Neuromethods**, v. 33, p. 213-230, 1998.

KUBÍNOVÁ, L.; JANÁČEK, J. Confocal microscopy and stereology: Estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three - dimensional images. **Microscopy research and technique**, v. 53, n. 6, p. 425-435, 2001. ISSN 1097-0029.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016. ISSN 0737-4038.

LADAGE, L. D.; ROTH, T. C.; PRAVOSUDOV, V. V. Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behaviour in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* ssp.). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1702, p. 138-143, 2011. ISSN 0962-8452.

LANFEAR, R. et al. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, p. msw260, 2016. ISSN 0737-4038.

LAU, L. F.; NATHANS, D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 5, p. 1182-1186, 1987. ISSN 0027-8424.

LIDOW, M. S.; SONG, Z. M. Primates exposed to cocaine in utero display reduced density and number of cerebral cortical neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 435, n. 3, p. 263-275, 2001. ISSN 1096-9861.

LIMA, L. M. et al. Distribution, abundance and seasonality of Laughing Gulls, *Leucophaeus atricilla* (Charadriiformes: Laridae) in Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology**, v. 18, n. 41, p. 8, 2013. ISSN 2178-7875.

LING, C. et al. Neurogenesis in juvenile and adult ring doves. **Journal of Comparative Neurology**, v. 379, n. 2, p. 300-312, 1997. ISSN 1096-9861.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1145-1148, 1994. ISSN 0036-8075.

LUCAS, J. R. et al. Does hippocampal size correlate with the degree of caching specialization? **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1556, p. 2423-2429, 2004. ISSN 0962-8452.

MAGALHÃES, N. G. D. M. et al. **Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*)** 2017.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003. ISSN 0001-3765.

MARTINS, E. P.; HANSEN, T. F. Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. **The American Naturalist**, v. 149, n. 4, p. 646-667, 1997. ISSN 0003-0147.

MAYHEW, T.; GUNDERSEN, H. 'If you assume, you can make an ass out of u and me': A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of anatomy**, v. 188, n. Pt 1, p. 1, 1996.

MBF BIOSCIENCE, W., VT USA. **Stereo Investigator 11.03** 2014.

MENCH, J.; ANDREW, R. Lateralization of a food search task in the domestic chick. **Behavioral and neural biology**, v. 46, n. 2, p. 107-114, 1986. ISSN 0163-1047.

MESKENAITE, V.; KRACKOW, S.; LIPP, H.-P. Age-Dependent Neurogenesis and Neuron Numbers within the Olfactory Bulb and Hippocampus of Homing Pigeons. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, 2016.

METTKE-HOFMANN, C.; GWINNER, E. Long-term memory for a life on the move. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5863-5866, 2003. ISSN 0027-8424.

METTKE HOFMANN, C.; GWINNER, E. Long-term memory for a life on the move. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5863-6, May 13 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719527> >.

MONTAGNESE, C.; KREBS, J.; MEYER, G. The dorsomedial and dorsolateral forebrain of the zebra finch, *Taeniopygia guttata*: a Golgi study. **Cell and tissue research**, v. 283, n. 2, p. 263-282, 1996. ISSN 0302-766X.

- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual review of neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 421-451, 1991. ISSN 0147-006X.
- MORRISON, R. Migration systems of some New World shorebirds. 1984.
- MOURITSEN, H.; HEYERS, D.; GÜNTÜRKÜN, O. The neural basis of long-distance navigation in birds. **Annual review of physiology**, v. 78, p. 133-154, 2016. ISSN 0066-4278.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-211, 1992. ISSN 0950-1991.
- NATURESERVE, B. I. A. **Bird species distribution maps of the world. Version 3.0.** BirdLife International, Cambridge, UK and NatureServe, Arlington, USA. 2016.
- NGUYEN, P. V. et al. Strain-dependent differences in LTP and hippocampus-dependent memory in inbred mice. **Learning & Memory**, v. 7, n. 3, p. 170-179, 2000. ISSN 1072-0502.
- NISSL, F. Ueber die veränderungen der ganglienzellen am facialiskern des kaninchens nach ausreissung der nerven. **Allg Z Psychiat**, v. 48, p. 197-198, 1892.
- NOL, E.; BLANKEN, M. S. Semipalmated Plover(*Charadrius semipalmatus*). **The birds of North America**, n. 444, p. 24, 1999. ISSN 1061-5466.
- OKANO, H.; HIRANO, T.; BALABAN, E. Learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12403-12404, Nov 07 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035781> >.
- PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 289-290, Jan 22 2004. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734327> >.
- PASCUAL, J.; SENAR, J. C. What are different biometric measurements of avian body size actually measuring? **Butlletí del Grup Català d'Anellament**, v. 13, p. 1-8, 1996. ISSN 2340-3772.
- PATON, T. A. et al. RAG-1 sequences resolve phylogenetic relationships within Charadriiform birds. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 29, n. 2, p. 268-278, 2003. ISSN 1055-7903.
- PETERSON, D. A. Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. **Methods**, v. 18, n. 4, p. 493-507, 1999. ISSN 1046-2023.
- PHAM, T. M. et al. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. **Neuroscience**, v. 94, n. 1, p. 279-286, 1999. ISSN 0306-4522.

PHAM, T. M. et al. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 167-175, 2002. ISSN 0091-3057.

PRAVOSUDOV, V. V.; KITAYSKY, A. S.; OMANSKA, A. The relationship between migratory behaviour, memory and the hippocampus: an intraspecific comparison. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1601, p. 2641-2649, 2006. ISSN 0962-8452.

RAMBAUT, A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. 2007. 2015.

RASHID, N.; ANDREW, R. Right hemisphere advantage for topographical orientation in the domestic chick. **Neuropsychologia**, v. 27, n. 7, p. 937-948, 1989. ISSN 0028-3932.

REED, J. M.; ORING, L. W.; GRAY, E. M. Spotted Sandpiper (*Actitis macularius*). **The Birds of North America Online. Ithaca, NY: Cornell Lab of Ornithology**, 2013.

RITZ, T. et al. Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. **Biophysical journal**, v. 96, n. 8, p. 3451-3457, 2009. ISSN 0006-3495.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003. ISSN 1367-4803.

ROSENBLUTH, J. Redundant myelin sheaths and other ultrastructural features of the toad cerebellum. **The Journal of cell biology**, v. 28, n. 1, p. 73-93, 1966. ISSN 0021-9525.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural brain research**, v. 78, n. 1, p. 57-65, 1996. ISSN 0166-4328.

ROTH, T. C. et al. Variation in hippocampal glial cell numbers in food - caching birds from different climates. **Developmental neurobiology**, v. 73, n. 6, p. 480-485, 2013. ISSN 1932-846X.

ROTH, T. C.; PRAVOSUDOV, V. V. Hippocampal volumes and neuron numbers increase along a gradient of environmental harshness: a large-scale comparison. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1656, p. 401-405, 2009. ISSN 0962-8452.

SADANANDA, M.; BISCHOF, H. J. c - fos is induced in the hippocampus during consolidation of sexual imprinting in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). **Hippocampus**, v. 14, n. 1, p. 19-27, 2004. ISSN 1098-1063.

SAFI, K.; DECHMANN, D. K. Adaptation of brain regions to habitat complexity: a comparative analysis in bats (Chiroptera). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1559, p. 179-186, 2005. ISSN 0962-8452.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. Cold spring harbor laboratory press New York, 1989.

SANDI, C.; ROSE, S. P.; PATTERSON, T. A. Unilateral hippocampal lesions prevent recall of a passive avoidance task in day-old chicks. **Neuroscience letters**, v. 141, n. 2, p. 255-258, 1992. ISSN 0304-3940.

SCHMITZ, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. **Anat Embryol (Berl)**, v. 198, n. 5, p. 371-97, Nov 1998. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9801058](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9801058) >.

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **J Chem Neuroanat**, v. 20, n. 1, p. 93-114, Oct 2000. ISSN 0891-0618 (Print)  
0891-0618 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11074347](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11074347) >.

\_\_\_\_\_. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 813-31, 2005. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15652981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15652981) >.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11, 1957.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965. ISSN 0006-3444. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19657091600025 >.

SHEN, P. et al. An atlas of aromatase mRNA expression in the zebra finch brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, n. 1, p. 172-184, 1995. ISSN 1096-9861.

SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, n. 4, p. 477-485, 1990. ISSN 0896-6273.

SHERRY, D. F. What food-storing birds remember. **Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie**, v. 38, n. 2, p. 304, 1984. ISSN 0008-4255.

\_\_\_\_\_. Neuroecology. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 57, p. 167-197, 2006. ISSN 0066-4308.

SHERRY, D. F.; HOSHOOLEY, J. S. Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1542, p. 933-943, 2010. ISSN 0962-8436.

SHERRY, D. F.; JACOBS, L. F.; GAULIN, S. J. Spatial memory and adaptive specialization of the hippocampus. **Trends in neurosciences**, v. 15, n. 8, p. 298-303, 1992. ISSN 0166-2236.

SHERRY, D. F.; VACCARINO, A. L. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 308, 1989. ISSN 1939-0084.

SHUAIB, M. **A Comparison of Power of Normality Tests: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors, Anderson-Darling and Jarque-Bera Tests.** 2015. University of Dhaka

SICK, H. **Ornitologia Brasileira, edição revista e ampliada por José Fernando Pacheco.** 1997.

SLOMIANKA, L.; WEST, M. J. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience**, v. 136, n. 3, p. 757-767, 2005. ISSN 0306-4522.

SMULDERS, T.; SASSON, A.; DEVOOGD, T. Seasonal variation in hippocampal volume in a food - storing bird, the black - capped chickadee. **Journal of neurobiology**, v. 27, n. 1, p. 15-25, 1995. ISSN 1097-4695.

SPAANS, A. L. Status and numerical fluctuations of some North American waders along the Surinam coast. **The Wilson Bulletin**, p. 60-83, 1978. ISSN 0043-5643.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 872-883, 2007. ISSN 1471-003X.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014. ISSN 1367-4803.

TELINO-JÚNIOR, W. R.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. D.; LYRA-NEVES, R. M. D. Census of shorebirds and Seabirds (Charadriidae, Scolopacidae and Laridae) in the Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 3, p. 451-456, 2003. ISSN 0101-8175.

THOMAS, G. H.; WILLS, M. A.; SZÉKELY, T. A supertree approach to shorebird phylogeny. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, n. 1, p. 28, 2004. ISSN 1471-2148.

THOMPSON, C. K.; BRENOWITZ, E. A. Seasonal change in neuron size and spacing but not neuronal recruitment in a basal ganglia nucleus in the avian song control system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 481, n. 3, p. 276-283, 2005. ISSN 1096-9861.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994. ISSN 0305-1048.

TRONEL, S.; SARA, S. J. Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. **Learning & Memory**, v. 9, n. 3, p. 105-111, 2002. ISSN 1072-0502.

TULVING, E. Episodic and semantic memory. **Organization of Memory. London: Academic**, v. 381, p. e402, 1972.

\_\_\_\_\_. Elements of episodic memory. 1985.

TURCOTTE, Y.; LAMARRE, J.-F.; BÊTY, J. Staging ecology of Semipalmated Plover (*Charadrius semipalmatus*) and Semipalmated Sandpiper (*Calidris pusilla*) juveniles in the St. Lawrence River Estuary during fall migration. **Canadian Journal of Zoology**, v. 91, n. 11, p. 802-809, 2013. ISSN 0008-4301.

VOOREN, C. M.; BRUSQUE, L. F. As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação. **Fundação Universidade Federal de Rio Grande. Departamento de Oceanografia. Laboratório de Elasmobrânquios e Aves Marinhas**, 1999.

WEIBEL, E. R. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. **Journal of microscopy**, v. 155, n. 3, p. 393-403, 1989. ISSN 1365-2818.

WEST, M. J. Design-based stereological methods for counting neurons. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 43-51, 2002. ISSN 0079-6123 (Print) 0079-6123 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12143362> >.

WHITTINGHAM, L. A.; SHELDON, F. H.; EMLEN, S. T. Molecular phylogeny of jacanas and its implications for morphologic and biogeographic evolution. **The Auk**, v. 117, n. 1, p. 22-32, 2000. ISSN 1938-4254.

WILTSCHKO, W.; WILTSCHKO, R. Magnetic orientation in birds. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, n. Pt 1, p. 29-38, 1996. ISSN 1477-9145 (Electronic) 0022-0949 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317275> >.

WILTSCHKO, W.; WILTSCHKO, R. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 10, p. 445-452, 2002. ISSN 0028-1042.

WINDLE, W. F.; RHINES, R.; RANKIN, J. A Nissl method using buffered solutions of thionin. **Stain Technology**, v. 18, n. 2, p. 77-86, 1943. ISSN 0038-9153.

ZANGENEHPOUR, S.; CHAUDHURI, A. Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. **Molecular Brain Research**, v. 109, n. 1, p. 221-225, 2002. ISSN 0169-328X.

ZHOU, C.-J.; ZHAO, C.; PLEASURE, S. J. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 121-126, 2004. ISSN 0270-6474.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 2950-2967, 1986. ISSN 0270-6474.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Parâmetros estereológicos

Os parâmetros estereológicos para as estimativas de volume da formação hipocampal foram grid de 200 $\mu$ m e a quantidade de raios utilizados durante execução do Nucleator para mediadas de volume do soma neuronal foi 8.

Parâmetros estereológicos para neurônios imunomarcados por NeuN.

**Tabela 28:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcados por NeuN no hemisfério Direito de *C. semipalmatus*.

| Migrante | A(frame) ( $\mu$ m) | A(x,y step) ( $\mu$ m) | N° Secções | $\Sigma$ Q- | ASF    | SSF   | TSF   |
|----------|---------------------|------------------------|------------|-------------|--------|-------|-------|
| BCCS02   | 50x50               | 350x350                | 22         | 4040        | 0,0277 | 0,166 | 0,738 |
| BCCS03   | 50x50               | 350x350                | 16         | 2192        | 0,0277 | 0,166 | 0,663 |
| BCCS04   | 50x50               | 350x350                | 21         | 2680        | 0,0204 | 0,166 | 0,500 |
| BCCS05   | 50x50               | 350x350                | 12         | 1881        | 0,0277 | 0,166 | 0,485 |

Nota:  $\Sigma$ Q- = Número de objetos contados no dissector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 29:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcados por NeuN no hemisfério esquerdo de *Charadrius semipalmatus*

| Migrante | A(frame) ( $\mu$ m) | A(x,y step) ( $\mu$ m) | N° Secções | $\Sigma$ Q- | ASF   | SSF   | TSF   |
|----------|---------------------|------------------------|------------|-------------|-------|-------|-------|
| BCCS02   | 50x50               | 350x350                | 22         | 4197        | 0,027 | 0,166 | 0,742 |
| BCCS03   | 50x50               | 350x350                | 16         | 2252        | 0,027 | 0,166 | 0,660 |
| BCCS04   | 50x50               | 350x350                | 23         | 2993        | 0,020 | 0,166 | 0,500 |
| BCCS05   | 50x50               | 350x350                | 13         | 1837        | 0,027 | 0,166 | 0,456 |

Nota:  $\Sigma$ Q- = Número de objetos contados no dissector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHE = Formação hipocampal esquerda.

**Tabela 30:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por NeuN no hemisfério Direito de *C. collaris*.

| Sedentário | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | Nº Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCC11     | 50x50                      | 300x300                       | 14         | 1717              | 0,027 | 0,166 | 0,622 |
| BCCC12     | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1326              | 0,027 | 0,166 | 0,630 |
| BCCC13     | 50x50                      | 300x300                       | 13         | 1373              | 0,027 | 0,166 | 0,579 |
| BCCC17     | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 1367              | 0,027 | 0,166 | 0,652 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no disector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 31:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por NeuN no hemisfério esquerdo de *C. collaris*.

| Sedentário | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | Nº Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCC11     | 50x50                      | 300x300                       | 14         | 1674              | 0,027 | 0,166 | 0,592 |
| BCCC12     | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1216              | 0,027 | 0,166 | 0,625 |
| BCCC13     | 50x50                      | 300x300                       | 13         | 1219              | 0,027 | 0,166 | 0,579 |
| BCCC17     | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 1256              | 0,027 | 0,166 | 0,649 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no disector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHE = Formação hipocampal esquerda.

Parâmetros estereológicos para neurônios recém gerados imunomarcados por DCX

**Tabela 32:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por DCX no hemisfério direito de *C. semipalmatus* coletados no Brasil

| Migrante | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | Nº Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|----------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCS22   | 75x75                      | 200x200                       | 12         | 3326              | 0,140 | 0,166 | 0,581 |
| BCCS23   | 75x75                      | 300x300                       | 11         | 1925              | 0,062 | 0,166 | 0,627 |
| BCCS24   | 75x75                      | 300x300                       | 11         | 1670              | 0,062 | 0,166 | 0,666 |
| BCCS25   | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 1915              | 0,062 | 0,166 | 0,609 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no disector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 33:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por DCX no hemisfério esquerdo de *C. semipalmatus* coletados no Brasil

| Migrante | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | Nº Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|----------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCS22   | 75x75                      | 200x200                       | 12         | 3027              | 0,140 | 0,166 | 0,566 |
| BCCS23   | 75x75                      | 300x300                       | 11         | 1738              | 0,062 | 0,166 | 0,638 |
| BCCS24   | 75x75                      | 300x300                       | 12         | 1884              | 0,062 | 0,166 | 0,678 |
| BCCS25   | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 2116              | 0,062 | 0,166 | 0,622 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no dissecor óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHE = Formação hipocampal esquerda.

**Tabela 34:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por DCX no hemisfério direito de *C. collaris*

| Sedentário | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | Nº Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCC11     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 1038              | 0,062 | 0,166 | 0,547 |
| BCCC12     | 75x75                      | 300x300                       | 13         | 813               | 0,062 | 0,166 | 0,555 |
| BCCC13     | 75x75                      | 300x300                       | 11         | 752               | 0,062 | 0,166 | 0,568 |
| BCCC17     | 75x75                      | 300x300                       | 13         | 1133              | 0,062 | 0,166 | 0,710 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no dissecor óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 35:** Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por DCX no hemisfério esquerdo de *C. collaris*

| Sedentário | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | Nº Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCC11     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 1160              | 0,062 | 0,166 | 0,557 |
| BCCC12     | 75x75                      | 300x300                       | 13         | 850               | 0,062 | 0,166 | 0,553 |
| BCCC13     | 75x75                      | 300x300                       | 11         | 754               | 0,062 | 0,166 | 0,592 |
| BCCC17     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 1229              | 0,062 | 0,166 | 0,710 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no dissecor óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHE = Formação hipocampal esquerda.

Parâmetros estereológicos para células em atividade de síntese proteica imunomarcadas por C-Fos

**Tabela 36: Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por C-Fos no hemisfério direito de *C. semipalmatus* coletados no Brasil**

| Migrante | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | N° Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|----------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCS22   | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 1755              | 0,027 | 0,166 | 0,609 |
| BCCS23   | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1601              | 0,027 | 0,166 | 0,671 |
| BCCS24   | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 2315              | 0,027 | 0,166 | 0,609 |
| BCCS25   | 50x50                      | 300x300                       | 13         | 2052              | 0,027 | 0,166 | 0,641 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no dissector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 37: Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por C-Fos no hemisfério esquerdo de *C. semipalmatus* coletados no Brasil**

| Migrante | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | N° Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|----------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCS22   | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 1663              | 0,027 | 0,166 | 0,617 |
| BCCS23   | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1903              | 0,027 | 0,166 | 0,680 |
| BCCS24   | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 2191              | 0,027 | 0,166 | 0,609 |
| BCCS25   | 50x50                      | 300x300                       | 13         | 2196              | 0,027 | 0,166 | 0,649 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no dissector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHE = Formação hipocampal esquerda.

**Tabela 38: Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por C-Fos no hemisfério direito de *C. collaris***

| Sedentário | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | N° Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCC11     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 4056              | 0,062 | 0,166 | 0,728 |
| BCCC12     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 4951              | 0,062 | 0,166 | 0,660 |
| BCCC13     | 50x50                      | 300x300                       | 12         | 1385              | 0,027 | 0,166 | 0,531 |
| BCCC17     | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1743              | 0,027 | 0,166 | 0,606 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no dissector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHD = Formação hipocampal direita.

**Tabela 39: Parâmetros estereológicos para células imunomarcadas por C-Fos no hemisfério esquerdo de *C. collaris***

| Sedentário | A(frame) ( $\mu\text{m}$ ) | A(x,y step) ( $\mu\text{m}$ ) | N° Secções | $\Sigma\text{Q-}$ | ASF   | SSF   | TSF   |
|------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|-------|-------|
| BCCC11     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 4507              | 0,062 | 0,166 | 0,757 |
| BCCC12     | 75x75                      | 300x300                       | 14         | 5392              | 0,062 | 0,166 | 0,669 |
| BCCC13     | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1206              | 0,027 | 0,166 | 0,534 |
| BCCC17     | 50x50                      | 300x300                       | 11         | 1813              | 0,027 | 0,166 | 0,602 |

Nota:  $\Sigma\text{Q-}$  = Número de objetos contados no disector óptico; SSF = Section Sampling Fraction; ASF = Area Sampling Fraction; TSF = Thickness Sampling Fraction; A(frame) = Área da caixa de contagem; A(x,y step) = Área do grid; FHE = Formação hipocampal esquerda.

## APÊNDICE B – Variâncias médias obtidas das estimativas estereológicas

Variâncias médias obtidas das estimativas de número de células

**Tabela 40: Variâncias médias das estimativas para células imunomarcadas por NeuN, DCX e C-Fos na formação hipocampal direita de *C. semipalmatus***

| <i>Migrante</i> | $\text{CV}^2$ | $\text{CE}^2$ | $\text{CE}^2/\text{CV}^2$ | $\text{CVB}^2$ | $\text{CVB}^2 (\% \text{CV}^2)$ |
|-----------------|---------------|---------------|---------------------------|----------------|---------------------------------|
| NeuN            | 0,091296      | 0,000702      | 0,007691                  | 0,090594       | 99,230802                       |
| C-Fos           | 0,020548      | 0,001106      | 0,053803                  | 0,019443       | 94,619736                       |
| DCX             | 0,014307      | 0,000702      | 0,049086                  | 0,013604       | 95,091416                       |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 41: Variâncias médias das estimativas para células imunomarcadas por NeuN, DCX, C-Fos e coradas pela técnica de Nissl para formação hipocampal esquerda de *C. semipalmatus***

| <i>Migrante</i> | $\text{CV}^2$ | $\text{CE}^2$ | $\text{CE}^2/\text{CV}^2$ | $\text{CVB}^2$ | $\text{CVB}^2 (\% \text{CV}^2)$ |
|-----------------|---------------|---------------|---------------------------|----------------|---------------------------------|
| NeuN            | 0,120419      | 0,000650      | 0,005400                  | 0,119769       | 99,460011                       |
| C-Fos           | 0,035919      | 0,001225      | 0,034104                  | 0,034695       | 96,589636                       |
| DCX             | 0,022804      | 0,000702      | 0,030795                  | 0,022102       | 96,920485                       |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 42:** Variâncias médias das estimativas para células imunomarcadas por NeuN, DCX, C-Fos e coradas pela técnica de Nissl para formação hipocampal direita de *C. collaris*

| <i>Sedentário</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2/CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-------------------|----------|----------|-------------|----------|------------------|
| NeuN              | 0,017960 | 0,001332 | 0,074180    | 0,016628 | 92,582029        |
| C-Fos             | 0,017565 | 0,001541 | 0,087706    | 0,016025 | 91,229414        |
| DCX               | 0,024516 | 0,001024 | 0,041768    | 0,023492 | 95,823151        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 43:** Variâncias médias das estimativas para células imunomarcadas por NeuN, DCX, C-Fos e coradas pela técnica de Nissl para formação hipocampal esquerda de *C. collaris*

| <i>Sedentário</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2/CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-------------------|----------|----------|-------------|----------|------------------|
| NeuN              | 0,036706 | 0,001406 | 0,038311    | 0,035300 | 96,168910        |
| C-Fos             | 0,038719 | 0,001521 | 0,039283    | 0,037198 | 96,071684        |
| DCX               | 0,042529 | 0,000930 | 0,021873    | 0,041599 | 97,812663        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

Variâncias médias obtidas das estimativas volume da formação hipocampal

A seguir as variâncias médias das estimativas de volume da formação hipocampal e do telencéfalo definidos a partir de secções imunomarcadas por NeuN para *C. semipalmatus* e *C. collaris* (**Tabela 44** à **Tabela 47**).

**Tabela 44:** Variâncias médias das estimativas de volume da formação hipocampal direita de *C. semipalmatus*

| <i>Migrante</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2/CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-----------------|----------|----------|-------------|----------|------------------|
| FHD             | 0,020533 | 0,000110 | 0,005369    | 0,020423 | 99,463059        |
| TEL HD          | 0,019267 | 0,000023 | 0,001171    | 0,019244 | 99,882895        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 45:** Variâncias médias das estimativas para volume da formação hipocampal esquerda de *C. semipalmatus*

| <i>Migrante</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-----------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| FHE             | 0,022103 | 0,000110 | 0,004988      | 0,021993 | 99,501196        |
| TEL HE          | 0,014681 | 0,000020 | 0,001379      | 0,014661 | 99,862072        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 46:** Variâncias médias das estimativas para volume da formação hipocampal direita de *C. collaris*

| <i>Sedentário</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-------------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| FHD               | 0,024053 | 0,000248 | 0,010313      | 0,023805 | 98,968670        |
| TEL HD            | 0,025475 | 0,000064 | 0,002512      | 0,025411 | 99,748773        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 47:** Variâncias médias das estimativas para volume da formação hipocampal esquerda de *C. collaris*

| <i>Sedentário</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-------------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| FHE               | 0,020221 | 0,000264 | 0,013058      | 0,019958 | 98,694177        |
| TEL HE            | 0,017469 | 0,000060 | 0,003438      | 0,017409 | 99,656177        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

Variâncias médias obtidas das estimativas volumes do soma de neurônios corados pela técnica de Nissl

A seguir as variâncias médias dos dados de volume do soma neuronal estimado a partir de células coradas pela técnica de Nissl (**Tabela 48** à **Tabela 51**)

**Tabela 48:** Variâncias médias das estimativas de volume do soma neuronal na formação hipocampal direita de *C. semipalmatus*

| <i>Migrante</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-----------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| Volume do soma  | 0,055611 | 0,000009 | 0,000162      | 0,055602 | 99,983816        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 49:** Variâncias médias das estimativas de volume do soma neuronal na formação hipocampal esquerda de *C. semipalmatus*

| <i>Migrante</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-----------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| Volume do soma  | 0,017138 | 0,000072 | 0,004216      | 0,017065 | 99,578410        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 50:** Variâncias médias das estimativas de volume do soma neuronal na formação hipocampal direita de *C. collaris*

| <i>Sedentário</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-------------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| Volume do soma    | 0,081497 | 0,000006 | 0,000077      | 0,081491 | 99,992331        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

**Tabela 51:** Variâncias médias das estimativas de volume do soma neuronal na formação hipocampal esquerda de *C. collaris*

| <i>Sedentário</i> | $CV^2$   | $CE^2$   | $CE^2 / CV^2$ | $CVB^2$  | $CVB^2 (\%CV^2)$ |
|-------------------|----------|----------|---------------|----------|------------------|
| Volume do soma    | 0,085482 | 0,000008 | 0,000088      | 0,085474 | 99,991153        |

Nota: CV = Coeficiente de variação; CE = Coeficiente de erro; CVB = Coeficiente de variação biológica

## APÊNDICE C – Códigos de acesso das sequências utilizadas nas análises filogenéticas.

**Tabela 52:** Códigos de acesso das sequências obtidas a partir da base de dados do GenBank(National Center for Biotechnology Information (NCBI)).

| Espécie                         | Gênero            | Código de acesso | Gene |
|---------------------------------|-------------------|------------------|------|
| <i>Actitis hypoleucos</i>       | <i>Actitis</i>    | JF499075.1       | COI  |
| <i>Calidris acuminata</i>       | <i>Calidris</i>   | KF009518.1       | COI  |
| <i>Calidris alba</i>            | <i>Calidris</i>   | KF009519.1       | COI  |
| <i>Calidris alpina</i>          | <i>Calidris</i>   | GU571777.1       | COI  |
| <i>Calidris bairdii</i>         | <i>Calidris</i>   | AY666355.1       | COI  |
| <i>Calidris canutus</i>         | <i>Calidris</i>   | GU571779.1       | COI  |
| <i>Calidris ferruginea</i>      | <i>Calidris</i>   | GU571781.1       | COI  |
| <i>Calidris fuscicollis</i>     | <i>Calidris</i>   | KF009522.1       | COI  |
| <i>Calidris maritima</i>        | <i>Calidris</i>   | GU571303.1       | COI  |
| <i>Calidris mauri</i>           | <i>Calidris</i>   | JQ251239.1       | COI  |
| <i>Calidris melanotos</i>       | <i>Calidris</i>   | KM894294.1       | COI  |
| <i>Calidris minuta</i>          | <i>Calidris</i>   | KF009525.1       | COI  |
| <i>Calidris minutilla</i>       | <i>Calidris</i>   | KF009526.1       | COI  |
| <i>Calidris ptilocnemis</i>     | <i>Calidris</i>   | DQ433414.1       | COI  |
| <i>Calidris ruficollis</i>      | <i>Calidris</i>   | KF009527.1       | COI  |
| <i>Calidris subminuta</i>       | <i>Calidris</i>   | KF009528.1       | COI  |
| <i>Calidris temminckii</i>      | <i>Calidris</i>   | KF009529.1       | COI  |
| <i>Calidris tenuirostris</i>    | <i>Calidris</i>   | KF009530.1       | COI  |
| <i>Charadrius alexandrinus</i>  | <i>Charadrius</i> | JF499112.1       | COI  |
| <i>Charadrius alticola</i>      | <i>Charadrius</i> | FJ027341.1       | COI  |
| <i>Charadrius asiaticus</i>     | <i>Charadrius</i> | KM001264.1       | COI  |
| <i>Charadrius dubius</i>        | <i>Charadrius</i> | JF499113.1       | COI  |
| <i>Charadrius falklandicu</i>   | <i>Charadrius</i> | FJ027346.1       | COI  |
| <i>Charadrius forbesi</i>       | <i>Charadrius</i> | KM001271.1       | COI  |
| <i>Charadrius hiaticula</i>     | <i>Charadrius</i> | GU571812.1       | COI  |
| <i>Charadrius leschenaultii</i> | <i>Charadrius</i> | GQ481569.1       | COI  |
| <i>Charadrius marginatus</i>    | <i>Charadrius</i> | KX371162.1       | COI  |
| <i>Charadrius melodus</i>       | <i>Charadrius</i> | AY666273.1       | COI  |

|                                  |                   |            |     |
|----------------------------------|-------------------|------------|-----|
| <i>Charadrius modestus</i>       | <i>Charadrius</i> | KM001282.1 | COI |
| <i>Charadrius mongolus</i>       | <i>Charadrius</i> | GQ481572.1 | COI |
| <i>Charadrius montanus</i>       | <i>Charadrius</i> | AY666259.1 | COI |
| <i>Charadrius morinellus</i>     | <i>Charadrius</i> | GU571814.1 | COI |
| <i>Charadrius nivosus</i>        | <i>Charadrius</i> | KM001288.1 | COI |
| <i>Charadrius obscurus</i>       | <i>Charadrius</i> | KM001291.1 | COI |
| <i>Charadrius pallidus</i>       | <i>Charadrius</i> | KX371168.1 | COI |
| <i>Charadrius pecuarius</i>      | <i>Charadrius</i> | KX371158.1 | COI |
| <i>Charadrius peronii</i>        | <i>Charadrius</i> | KM001299.1 | COI |
| <i>Charadrius placidus</i>       | <i>Charadrius</i> | KM001303.1 | COI |
| <i>Charadrius ruficapillus</i>   | <i>Charadrius</i> | KM001309.1 | COI |
| <i>Charadrius sanctaehelenae</i> | <i>Charadrius</i> | KM001310.1 | COI |
| <i>Charadrius thoracicus</i>     | <i>Charadrius</i> | KM001316.1 | COI |
| <i>Charadrius tricollaris</i>    | <i>Charadrius</i> | KX371149.1 | COI |
| <i>Charadrius veredus</i>        | <i>Charadrius</i> | KM001332.1 | COI |
| <i>Charadrius vociferus</i>      | <i>Charadrius</i> | DQ385167.1 | COI |
| <i>Charadrius wilsonia</i>       | <i>Charadrius</i> | AY666175.1 | COI |
| <i>Rynchops niger</i>            | <i>Rynchops</i>   | DQ385179.1 | COI |
| <i>Sterna hirundo</i>            | <i>Sterna</i>     | GU572097.1 | COI |

---

# ANEXO 1 – Licença para captura e manuseio de animais silvestres



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

|                        |  |   |
|------------------------|--|---|
| <b>Número: 44551-3</b> | <b>Data da Emissão: 03/02/2016 19:01</b> | <b>Data para Revalidação*: 04/03/2017</b> |
|------------------------|--|---|

\* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

### Dados do titular

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Nome: CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ   | CPF: 518.352.742-34      |
| Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contrastantes, Respostas Adaptativas e Mecanismos Neurais Subjacentes. |                          |
| Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará  | CNPJ: 09.021.003/0001-86 |

### Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade  | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|---|------------------|---------------|
| 1 | Coleta dos espécimes e de sangue, assim como marcação dos mesmos. | 08/2014          | 08/2018       |

### Observações e ressalvas

|   |   |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.  |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.   |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).  |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.  |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.  |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .   |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.   |

### Outras ressalvas

|   |  |
|---|--|
| 1 | (1) Comunicar ida a campo com antecedência mínima de 15 dias ( <a href="mailto:paulo.oliveira@icmbio.gov.br">paulo.oliveira@icmbio.gov.br</a> / (91) 3425.4642); (2) para a coleta, fazer-se acompanhar por extrativista indicado pela Chefia da UC e AUREMAT; (3) apresentar a proposta de pesquisa e os seus resultados para as comunidades que vivem na área onde haverá a coleta de material, além do Conselho Deliberativo da Resex Marinha de Tracuateua; e, (4) disponibilizar cópia dos produtos da pesquisa para a administração da Resex Marinha de Tracuateua   |
| 2 | A quantidade máxima de sangue coletado de um indivíduo não deve ultrapassar 1% de seu peso corporal.   |
| 3 | Comunicar por email: <a href="mailto:resexcaete@icmbio.gov.br">resexcaete@icmbio.gov.br</a> , ou pelo tel: (91)34251574, ou pessoalmente em nosso escritório em Bragança, as datas de coleta de fauna e flora no interior da UC, ou nos estuários do rio Caeté e Taperauçu com certa antecedência; Disponibilizar cópia dos resultados e produtos gerados com os dados coletados no interior da Unidade; Disponibilizar um membro da equipe para esclarecimento do projeto, caso seja necessário, junto ao Conselho Deliberativo, ou em alguma comunidade específica da RESEX que possa ter interesse nos resultados da pesquisa desenvolvida. |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 28969837



Página 1/4



## Autorização para atividades com finalidade científica

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>Número: 44551-3</b>   | <b>Data da Emissão: 03/02/2016 19:01</b> | <b>Data para Revalidação*: 04/03/2017</b> |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. |  |   |

### Dados do titular

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Nome: CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ   | CPF: 518.352.742-34      |
| Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contrastantes, Respostas Adaptativas e Mecanismos Neurais Subjacentes. |                          |
| Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará  | CNPJ: 09.021.003/0001-86 |

|   |   |
|---|---|
| 4 | Comunicar por email: claudia.alves@icmbio.gov.br, ou pelo tel: (91)34251574, ou pessoalmente em nosso escritório em Bragança, as datas de coleta de fauna e flora no interior da UC, ou nos estuários do rio Gurupi e Piriá com certa antecedência; Disponibilizar cópia dos resultados e produtos gerados com os dados coletados no interior da Unidade; Disponibilizar um membro da equipe para esclarecimento do projeto, caso seja necessário, junto ao Conselho Deliberativo, ou em alguma comunidade específica da RESEX que possa ter interesse nos resultados da pesquisa desenvolvida. |
|---|---|

### Equipe

| # | Nome                              | Função          | CPF            | Doc. Identidade    | Nacionalidade |
|---|-----------------------------------|-----------------|----------------|--------------------|---------------|
| 1 | Nara Gyzely de Moraes Magalhães   | Pesquisadora    | 802.988.772-87 | 4252689 SEGUP-PA   | Brasileira    |
| 2 | Cristovam Wanderley Picanço Diniz | Pesquisador     | 019.498.962-34 | 5525405 SEGUP-PA   | Brasileira    |
| 3 | Mauro André Damasceno de Melo     | Pesquisador     | 634.232.192-20 | 3266810 SEGUP-PA   | Brasileira    |
| 4 | Dario Carvalho Paulo              | Pesquisador     | 957.481.132-87 | 4309560 P.Civil-PA | Brasileira    |
| 5 | Patrick Douglas Corrêa Perera     | Aluno Graduação | 019.588.392-64 | 6903296 SSP-PA     | Brasileira    |

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local                             | Tipo       |
|---|-----------|----|--|------------|
| 1 |           | PA | RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA DE CAETÉ-TAPERACU | UC Federal |
| 2 |           | PA | RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA DE GURUPI-PIRIÁ   | UC Federal |
| 3 |           | PA | RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA DE TRACUATEUA     | UC Federal |

### Atividades X Táxons

| # | Atividade   | Táxons  |
|---|---|---|
| 1 | Captura de animais silvestres in situ                         | Actitis macularia, Charadrius wilsonia, Charadrius semipalmatus, Charadrius collaris, Calidris pusilla                        |
| 2 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ              | Charadrius semipalmatus, Calidris pusilla, Actitis macularia, Charadrius wilsonia, Charadrius collaris                        |
| 3 | Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ     | Actitis macularia (*Qtde: 5), Charadrius semipalmatus (*Qtde: 5), Calidris pusilla (*Qtde: 2), Charadrius collaris (*Qtde: 5) |
| 4 | Observação e gravação de imagem ou som de taxon em UC federal | Calidris pusilla, Actitis macularia, Charadrius collaris, Charadrius semipalmatus, Charadrius wilsonia                        |

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

### Material e métodos

|   |                                 |   |
|---|---------------------------------|---|
| 1 | Amostras biológicas (Aves)      | Sangue, Penas, Regurgitação/conteúdo estomacal, Fragmento de tecido/órgão                 |
| 2 | Método de captura/coleta (Aves) | Rede de neblina, Outros métodos de captura/coleta(Procura com lanterna. (Night-Lighting)) |

### Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino   | Tipo Destino |
|---|--|--------------|
| 1 | Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará | coleção      |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 28969837**





### Autorização para atividades com finalidade científica

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>Número: 44551-3</b>   | <b>Data da Emissão: 03/02/2016 19:01</b> | <b>Data para Revalidação*: 04/03/2017</b> |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. |  |   |

#### Dados do titular

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Nome: CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ   | CPF: 518.352.742-34      |
| Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contrastantes, Respostas Adaptativas e Mecanismos Neurais Subjacentes. |                          |
| Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará  | CNPJ: 09.021.003/0001-86 |

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

| Táxon* | Qtde. | Tipo de amostra | Qtde. | Data |
|--------|-------|-----------------|-------|------|
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |
|        |       |                 |       |      |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 28969837**





### Autorização para atividades com finalidade científica

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>Número: 44551-3</b>   | <b>Data da Emissão: 03/02/2016 19:01</b> | <b>Data para Revalidação*: 04/03/2017</b> |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. |  |   |

#### Dados do titular

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Nome: CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ   | CPF: 518.352.742-34      |
| Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contrastantes, Respostas Adaptativas e Mecanismos Neurais Subjacentes. |                          |
| Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará  | CNPJ: 09.021.003/0001-86 |

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 28969837**

