

NARA GYZELY DE MORAIS MAGALHÃES

ALTERAÇÕES DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DO *Calidris pusilla* ASSOCIADAS
À MIGRAÇÃO OUTONAL DE LONGA DISTÂNCIA

Belém-PA

2017

NARA GYZELY DE MORAIS MAGALHÃES

ALTERAÇÕES DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DO *Calidris pusilla* ASSOCIADAS
À MIGRAÇÃO OUTONAL DE LONGA DISTÂNCIA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de doutora.

Área de concentração em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz
Co-orientador: Cristovam Guerreiro Diniz

Belém-PA
2017

ALTERAÇÕES DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DO *Calidris pusilla* ASSOCIADAS
À MIGRAÇÃO OUTONAL DE LONGA DISTÂNCIA
Nara Gyzely de Moraes Magalhães. Belém, Pará, UFPA/ICB, 2017

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de concentração Neurociências), Universidade Federal do Pará, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:

Presidente:

Professor Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz - Orientador

Departamento de Morfologia, UFPA/ICB

Belém 31 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Professor Dr. João Bento Torres

Departamento Morfologia Campus Belém, UFPA/ICB

Professor Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Departamento de Morfologia Campus Belém, UFPA/ICB

Professor Dr. Mauro André Damasceno de Melo

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Campus de Bragança, IFPA

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Cristovam Moraes Magalhães Guerreiro Diniz,
o bebê mais saudável, colaborativo e bem-humorado que conheço, que pacientemente me esperou
voltar do laboratório todas as noites por meses seguidos.

AGRADECIMENTOS

Existem pessoas que embora não ajudem diretamente no seu trabalho de bancada, lhe dão o suporte que todos honestamente precisamos para conseguir terminar tarefas com dignidade. É por isso que eles são os primeiros a serem lembrados quando o estudo termina.

A minha mãe, Antonia Pereira de Moraes que sempre me apoiou, lutando contra tudo que nos endurece e valorizando o que nos faz mais ternos, e que hoje zela pelo meu filho, para que eu trabalhe com alguma tranquilidade. Ao meu pai (in memoriam) que me deu a base, me ensinou muitas lições e mesmo sem saber talvez tenha sido meu grande incentivador, sempre guardava consigo e hoje as guardo comigo, uma frase que me causaria estímulo positivo.

A minha madrinha, Francisca Pantoja da Silva, que me ensinou valores e sempre tornou meu mundo melhor. Me deu meus primeiros livros e me incentivou a estudar biologia em Bragança. E desde então me deu o apoio e incentivo que eu precisava para estudar e alcançar meus objetivos.

A minha sogra, tia Ana Clotildes Guerreiro Diniz, que me acolheu com todo cuidado e carinho em seu lar, durante os três primeiros anos de doutorado.

Aos professores que se dedicaram a criar o curso de pós-graduação Neurociências e Biologia Celular e aos que hoje mantêm seu padrão. Sabemos que o cenário para a realização de atividades científicas no Pará, ainda não é favorável, o que nos sobra em biodiversidade, nos falta em recursos, além de financeiros, principalmente são escassos os recursos humanos. E encontrar ao alcance de um passo pesquisadores altamente qualificados, e mais importante vestidos com boa vontade e disposição a ensinar com coragem, como fazer o melhor de si com pouco investimento é uma verdadeira sorte.

Ao meu co-orientador professor Dr. Cristovam Guerreiro Diniz por me incluir no seu projeto de pesquisa de doutorado, isso me deu oportunidade de aprender muito. E em seguida pelo convite a aprender mais sobre neurobiologia de aves migratórias e por fazer parecer tudo tão fácil e descomplicado, por sua generosidade em compartilhar comigo o trabalho de uma vida, e pela destreza em me ensinar.

Ao meu orientador professor Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz a quem tenho admiração e amor filial, obrigada pela oportunidade de aprender e participar de cada etapa que rege um estudo científico. Pela confiança em me designar tarefas que contribuíram para o meu crescimento profissional. Sem falar, na orientação a cada passo em direção a concretização da tese. E ainda por

ser meu referencial. Foi uma verdadeira honra ter sido aluna e mais que isso foi um verdadeiro privilégio desenvolver esse trabalho com um dos melhores pesquisadores do Brasil. Conviver com a sua generosidade, a de quem sabe muito, resulta em marcas eternas de como fazer o melhor que conseguimos.

Ao professor Phd David Sherry um dos homens mais educados que já conheci, por aceitar realizar o projeto de cooperação internacional. Nos recebeu no Canadá com toda sua atenção e ajudar nas coletas e na redação do paper.

A professora Dra. Aline Andrade por me ensinar as primeiras imunohistoquímicas e juntamente com o professor Dr. Carlos Santos, por me darem oportunidade de aprender ajudando em seus trabalhos.

A professora Dra. Marcia Kronka Sostenes e ao professor Dr. Daniel Guerreiro Diniz pela organização, manutenção do laboratório em condições perfeitas ao desenvolvimentos das nossas atividades científicas.

A direção do IFPA, campus de Bragança e aos professores do Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia, em especial ao professor Dr. Mauro André Damasceno de Melo, por permitirem que realizasse as análises estereológicas dos últimos anos na instituição.

Aos alunos do professor Dr. Cristovam Guerreiro Diniz que participaram direta ou indiretamente das atividades metodológicas desenvolvidas na tese, meu muito obrigada a Ediely Henrique, Patrick Pereira, Lucas Siqueira, Diego Miranda, espero que fazer parte desse estudo tenha sido construtivo para todos vocês.

A Isis Ananda de Matos Moraes por ter me ajudado não somente com nas análises estereológicas no laboratório mas em casa quando minha ausência se tornou rotina por meses seguidos. Sua ajuda foi a mais essencial.

A Seduc-Pa, por conceder licença aprimoramento de 3 anos e bolsa de doutorado por igual período.

A todos os pesquisadores dos laboratórios de Investigação em Neurodegeneração/UFPA e Infecção; Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia/IFPA; Ao AFAR-Advanced Facilities for avian research, UWO. Pelo convívio e cooperação ao longo da execução desse estudo.

A CAPES/DFAIT por financiar o projeto de Cooperação internacional que possibilitou a coleta e processamento dos espécimes objeto de estudo na janela migrante.

Fapespa, Capes pelo financiamento do material permanente e de consumo utilizado para o desenvolvimento desse estudo.

Ao CNPq pelo pagamento das bolsas dos alunos que ajudaram no projeto.

Trabalhar com todos vocês, foi um privilégio.

Sinto-me hoje na obrigação de ser igualmente generosa... portanto, a todos que lerem e tiverem interesse em estudar neurobiologia de aves marinhas o convite está feito.

Resumo

Após a reprodução na tundra ártica superior, os maçaricos acometidos pela inquietação migratória traçam uma rota preliminar herdada e utilizam bússolas naturais, mapas e marcos visuais, até alcançar, ainda no hemisfério norte, sítios de parada que dispõem dos recursos nutricionais necessários ao rápido e elevado ganho de reservas energéticas, tal como acontece na Baía de Fundy-Canadá. Após esse sítio de parada que é utilizado por 75 % da população de *Calidris pusilla*, a experiência migratória outonal de longa distância continua com voos de 6 dias ininterruptos sem escala sobre o Atlântico até que essas aves chegam a América do Sul e depois na ilha de Canela – Brasil. Para testar a hipótese de que o processo migratório de longa distância influenciaria a neurogênese, número de astrócitos GFAP positivos e a ativação de genes de expressão rápida capturamos 12 indivíduos em plena atividade migratória na Baía de Fundy e 9 indivíduos na Ilha de Canelas no Brasil. Após a imunomarcagem seletiva para neurônios maduros (NeuN), neurônios imaturos (Dcx), astrócitos (GFAP), e ativação neuronal por genes de expressão rápida (c-Fos) quantificamos esses marcadores na formação hipocampal e comparamos resultados dessa quantificação dos indivíduos em migração (Baía de Fundy) com aqueles em período de invernada (Ilha de Canela). Para tanto utilizamos análises estereológicas quantitativas que permitiu estimar o total de células, o número de células ativas, o número total de astrócitos e de neurônios novos e maduros. Para verificar se as diferenças encontradas eram estatisticamente significativas empregamos o teste t Student. Nossos resultados confirmaram que a migração outonal provocou mudanças hipocampais em *Calidris pusilla*. Após a migração detectamos que a formação hipocampal possui volume maior e mais neurônios novos em contrapartida, menos células ativadas e menor número de astrócitos. Entretanto, esse processo não influenciou o número de células totais e de neurônios maduros. Sugerimos que a diferença encontrada entre o volume e número de neurônios novos, dos indivíduos em plena migração e após o processo ter sido concluído, possivelmente ocorreu em função do processo migratório em combinação com as condições encontradas durante o início do período invernada. O presente trabalho demonstra pela primeira vez que as aves marinhas migratórias de longa distância oferecem janela de oportunidade única para investigar muitas questões relacionadas à neurobiologia celular da migração de uma forma geral, e em particular, sobre a plasticidade neural associada à função da neurogênese do hipocampo adulto das aves. Futuramente pretendemos monitorar a neurogênese nessa espécie durante todo o período de invernada.

Palavras chaves: neurogênese, c-Fos, genes de ativação imediata, astrócitos GFAP, duplacortina, hipocampo, aves limícolas.

Abstract

After breeding in the upper Arctic tundra, shorebirds affected by migratory restlessness trace an inherited preliminary route and use compasses, maps and visual landmarks, until they reach, in the northern hemisphere, stopover sites that have the necessary nutritional resources for fast and high gain of energy reserves for migratory journey, as in the Bay of Fundy-Canada. Following this stopover site that is used by 75% of the population of *Calidris pusilla*, the long-distance autumn migratory experience continues with uninterrupted 6-day non-stop flights over the Atlantic until these birds reach South America and then the island of Canela-Brazil. To test the hypothesis that the long-distance migratory process would influence neurogenesis, astrogenesis and activation of earlier-expression genes, we captured 12 individuals in full migratory activity in the Bay of Fundy and 9 individuals in the Island of Canela in Brazil. After selective immunostaining for mature neurons (NeuN), immature neurons (Dcx), astrocytes (GFAP), and neuronal activation by early genes (c-Fos), we quantified these markers in the hippocampal formation and compared the results of this quantification of the individuals in migration (Bay of Fundy) with those of wintering birds (Canela Island). We used quantitative stereological analyzes to estimate the total number of cells of hippocampal formation, number of active cells, total number of astrocytes and young and mature neurons. To verify if the differences found were statistically significant, we used the Student t test. Our results confirmed that autumnal migration alone, caused hippocampal changes in *Calidris pusilla*. After migration, we detected that the hippocampal formation has fewer activated cells and fewer astrocytes, more new neurons and greater relative volume in the quantified hemisphere (left hemisphere). However, this process did not influence the number of total cells and mature neurons. We suggest that the difference found between the volume and number of new neurons, of the full migration and wintering individuals, possibly occurred due to the migratory process in combination with local conditions found during the beginning of the wintering period. Taken together our findings demonstrate long-distance migratory shorebirds offer a unique opportunity to investigate many issues related to the cellular neurobiology of migration in general, and, on the neural plasticity associated with hippocampal neuronal and neurogenesis in adult birds.

Key words: neurogenesis, c-Fos, early expression genes, GFAP astrocyte, doublecortin, hippocampus, sandpiper.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<p>Figura 1. A espécie estudada, no sítio de parada Bay of Fundy – CA (A) e no sítio de invernada Ilha de Canela – BR, escala 2cm, (B). Foto David Sherry. (C) Mapa com rota migratória (linha tracejada) e os pontos de captura (círculos preenchidos) .</p>	16
<p>Figura 2. Vias para o hipocampo que pode armazenar, integrar e recuperar informações sobre diferentes fluxos sensoriais (visão, olfação, magnético) bem como mapas (magnético) e bússolas (celestes-sol/estrelas e magnética).</p>	17
<p>Figura 3. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do Telencéfalo de <i>Calidris pusilla</i> (80 µm), com destaque em verde para contorno da formação hipocampal esquerda, escala 25µm. (B) Contorno da formação hipocampal esquerda, mostrando a disposição das caixas de contagens de 50x50µm dispostas num grid de 250x250, escala 500µm.</p>	34
<p>Figura 4. Estimativa estereológica do número total de células c-Fos positivas na formação hipocampal direita (FHD) e esquerda (FHE), durante a migração e após a migração, em <i>Calidris pusilla</i>. (*) indica diferença significativa ($p < 0,02$) entre o período migratório e pós-migratório.</p>	36
<p>Figura 5. Fotomicrografias de secção coronal da formação hipocampal do maçarico <i>Calidris pusilla</i>. (A) Baixo aumento, coloração de Nissl hemisfério direito, escala 500 µm (B) Grande aumento–objetiva 100x coloração de Nissl, escala 25 µm. (C) Baixo aumento, imunohistoquímica c-Fos hemisfério esquerdo, escala 500 µm. (D) Baixo aumento, imunohistoquímica c-Fos hemisfério esquerdo, escala 25 µm.</p>	37
<p>Figura 6. A. Estimativa do volume médio do telencéfalo de <i>Calidris pusilla</i> adulto. Mostrando que não há diferenças significativas entre as diferentes fases do processo migratório (durante a migração sul, barras escuras e durante a pós-migração, barras claras), entre os hemisférios TE: Telencéfalo esquerdo, TD: Telencéfalo direito. B. Volume médio da Formação hipocampal de <i>Calidris pusilla</i> adulto. Mostrando as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes fases do processo migratório (durante a migração sul, barras escuras e durante invernada, barras claras). Mas não entre os hemisférios de uma mesma janela FHE: Formação hipocampal esquerda FHD: Formação hipocampal direita C. Razão entre os volumes do telencéfalo e da formação hipocampal. T: telencéfalo.</p>	38
<p>Figura 7. Neurônios imunomarcados com duplacortina na formação hipocampal. (A) Fotomicrografias da formação de hipocampal no período de pós-migração, objetiva de 4x (B) objetiva de 10x, (C) de objetiva 20x e (D) objetiva de 100x. (E) Fotomicrografias da formação hipocampal no período migratório (F) Objetiva de 4x, (F) Objetiva de 10x (G) Objetiva de 20x (H) Objetiva de 100x. Barras de escala: A e E - 500 µm; B e F - 250 µm; C e G - 125 µm; D e H - 25 µm.</p>	40
<p>Figura 8. Estimativa do valor médio do número de neurônios expressando duplacortina amostrados na FH de <i>Calidris pusilla</i> adulto. Mostrando as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes fases do processo</p>	41

migratório (durante a migração sul, barras escuras e durante invernada, barras claras. Mas não entre os hemisférios de uma mesma janela, FHE: Formação hipocampal esquerda, FHD: Formação hipocampal direita.....

Figura 9. Fotomicrografias de secção coronal da formação hipocampal do *Calidris pusilla* coletados durante a migração, mostrando neurônios maduros NeuN positivos. (A) Em baixo aumento, Objetiva 4x, escala 500 µm. (B) Em grande aumento, Objetiva 100 x, escala 25µm.....

41:

Figura 10. (A) Estimativa estereológica do número de neurônios NeuN positivos durante a migração na formação hipocampal de *Calidris pusilla*. FHD: formação hipocampal direita. FHE formação hipocampal esquerda (B). Mostra uma representação dentro do número médio de células totais (Nissl) da formação hipocampal o número médio de neurônios totais (DCX+NeuN) e de Glíais da FHE e FHD durante a migração e da FHE durante a pós-migração. Estimativas de neurônios NeuN positivos retirados de Guerreiro-Diniz et al.,2016. (C) Mostra a representação da porcentagem do número de neurônios maduros, glíais e neurônios novos durante e após a migração.....

42

Figura 11. Fotomicrografia de secção coronal da formação hipocampal de *Calidris pusilla*, mostrando astrócitos GFAP positivos, pós-migração. (A) objetiva de 4x, escala 500µm (B)objetiva 100xµm, escala 25 µm.

43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDL	corticoidea dorsolateralis
Ei	entopallium internum
Ep	entopallial belt
HA	hyperpallium apicale
HD	hyperpallium densocellulare
HI	hyperpallium intercalatum
IHA	interstitial nucleus of the HA
MD	mesopallium dorsale
NB	nucleus basalis
NFL	nidopalliu frontolaterale
OB	olfactory bulb
IEG	immediate early genes
Arc	activity regulated cytoskeleton-associated protein
Zif268	zinc finger protein 225
GFAP	glial fibrilar acid protein
Sox2	sex determining region Y)-box 2
Ki67	protein
Dcx	doublecourtin
PSA-NCAM	Polysialylated-neural cell adhesion molecule
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor)
NPC	Neural progenitor cell
TrKB	Tropomyosin receptor kinase B
FGF	Fibroblast growth factors
Wnt	Moléculas de via de sinalização

INTRODUÇÃO

1.1. Aves Migram Longas Distâncias Sazonalmente para Encontrar Hábitats Adequados à Sobrevivência

Com a proximidade do outono boreal, milhões de aves deixam todos os anos, suas áreas de reprodução em direção à América do Sul (Barnea, Anat e Pravosudov, Vladimir, 2011). Fugindo do inverno, partem em busca de locais com disponibilidade de alimento e temperaturas mais amenas, as áreas de invernada. Nesse voo em direção ao hemisfério Sul, seguem um trajeto ao longo da costa leste ou oeste marítima do continente onde se distribuem e passam a maior parte do seu ciclo de vida (Antas, 1983). Durante a primavera e o verão retornam às áreas de reprodução, (Harrington *et al.*, 1986). Muitas delas com migrações sazonais regulares retornam aos mesmos locais de invernada, reprodução, e sítios de parada, em anos sucessivos, mantendo-se fieis a esses hábitats (Hansson *et al.*, 2002).

O Brasil está na rota de muitas espécies de aves migratórias, tanto de visitantes meridionais, aves Neotropicais, que se reproduzem em áreas do hemisfério sul; como setentrionais, aves Neárticas, que se reproduzem no hemisfério norte (Azevedo Júnior e Larrazábal, 1994). Dentre os deslocamentos de aves no Brasil, destacam-se as migrações no inverno do hemisfério Norte (inverno boreal) e no inverno do hemisfério Sul (inverno austral) (Sick, 1983). As migrações em direção ao Hemisfério Sul começam até meados de agosto, logo após a reprodução, continuando até meados de novembro e o regresso ao Hemisfério Norte abrange o período de fevereiro até meados de maio (Rodrigues, 2006).

A Região norte do Brasil é a porta de entrada dos migrantes setentrionais no país (Azevedo Júnior e Larrazábal, 1994); são milhares de indivíduos que chegam e utilizam essas áreas para pouso e alimentação, logo após o período reprodutivo (Sick, 1983). Dessa forma, a Amazônia e zona costeira da Região Norte e Nordeste são locais com muitos registros de espécies migratórias do Hemisfério Norte. Foram registradas cerca de 40 espécies pertencentes às famílias Jacanidae, Rostratulidae, Haematopodidae, Charadriidae, Scolopacidae, Recurvirostridae, Burhinidae e Laridae, que vêm à procura de locais de invernada onde encontram alimentação farta, propiciando a garantia de engorda, adquirindo, dessa forma, energia suficiente para efetuar as mudas e retornar ao seu sítio de reprodução (De Azevedo Júnior *et al.*, 2001).

Os habitats selecionados pelas aves migratórias ao longo de suas rotas são diversos e estão relacionados aos hábitos alimentares, disponibilidade de recursos e táticas de forrageamento. Devido à distribuição não-contínua desses recursos, as espécies migrantes geralmente se concentram em áreas específicas. Esses locais têm importância fundamental para conservação dessas espécies, uma vez

que, ao realizarem grandes migrações, elas necessitam de áreas adequadas para trocarem as penas, se alimentarem e adquirir as reservas energéticas necessárias à continuação das longas viagens (Myers *et al.*, 1985; Morrison e Ross, 1989). São bons exemplos de regiões com essas características, o salgado no nordeste paraense, a costa do Amapá e reentrâncias maranhenses na Região Norte; no Nordeste – a costa do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe e Bahia; e ao Sul – a região do Parque Nacional da Lagoa do Peixe–RS.

Nesses locais, as famílias Charadriidae e Scolopacidae correspondem ao grupo de aves com a maior representatividade de espécies migrantes setentrionais, que se caracterizam pela reunião em grandes agrupamentos e realização de longas jornadas continentais, algumas vezes deslocando-se para pontos extremos do continente americano. Em sua maioria, deslocam-se acompanhando regiões costeiras, onde são encontrados sítios com grandes concentrações de indivíduos. (Antas, 1983; Sick, 1983; Azevedo Júnior e Larrazábal, 1994; Rodrigues, 2000; De Azevedo Júnior *et al.*, 2001; Telino-Júnior *et al.*, 2003; Lyra-Neves *et al.*, 2004; Rodrigues, 2006).

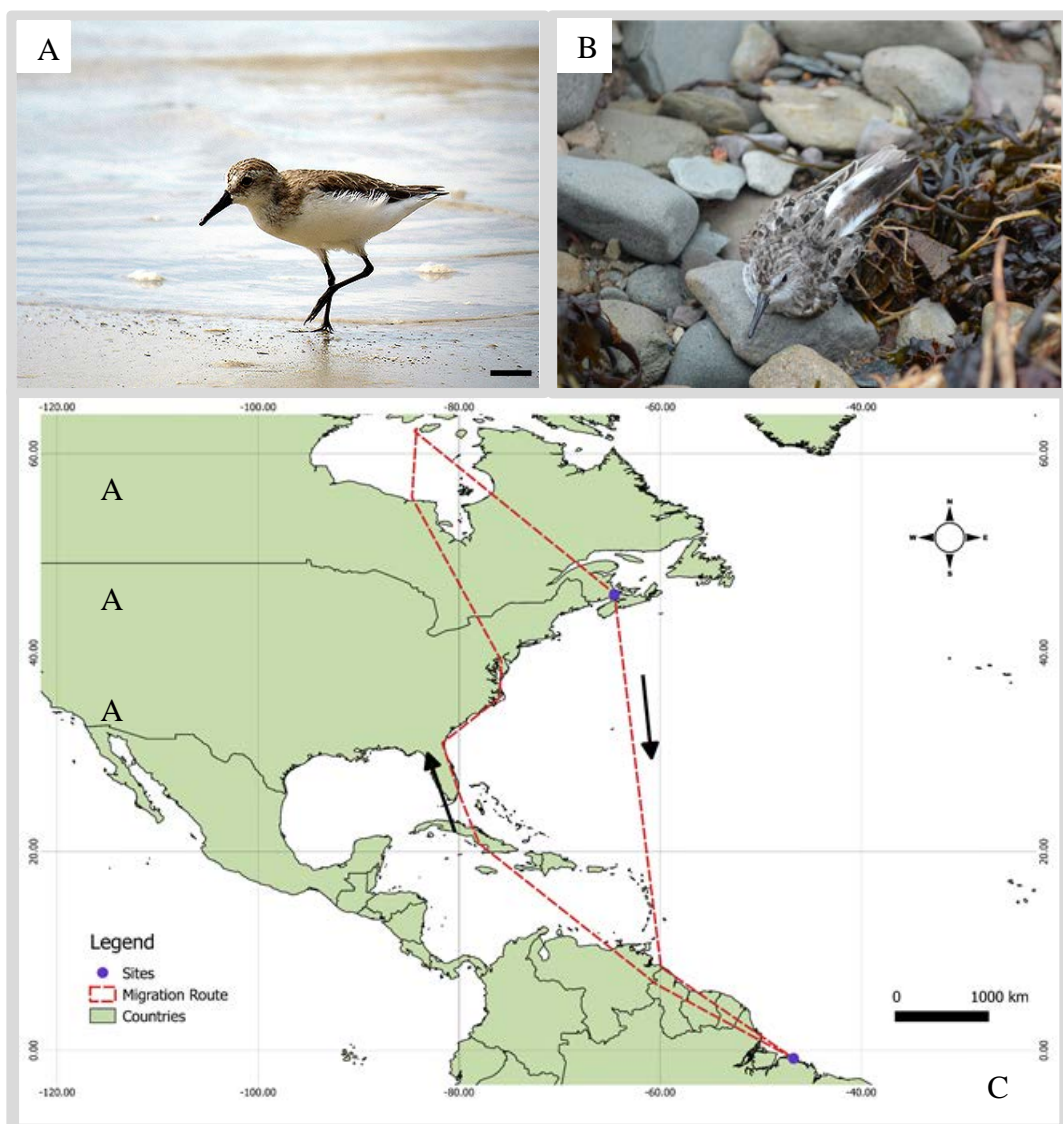
Anualmente várias espécies de pássaros migrantes setentrionais ocupam a península Bragantina ao nordeste do estado Pará, onde são encontradas principalmente em áreas de manguezal, dentre as quais o *Calidris pusilla* (Figura 1), um maçarico migrante de longa distância que se reproduz no Ártico e realiza intensa migração anual outonal para a América do Sul.

Através de rastreamento por geolocalização de um indivíduo nascido em *Coats Island* no Ártico canadense foi observado um voo sem escalas, de seis dias, de um sítio de parada na Baía James até o delta do Orinoco, na fronteira da Venezuela com a Guiana, seguido de 11 dias de voos com escalas para o Norte do Brasil onde passou o inverno (Brown, Stephen, 2014). Esse registro demonstrou que seu trajeto migratório incluiu um voo de 5.300 quilômetros sobre o Oceano Atlântico em direção a América do Sul (Brown, Stephen, 2014). Aproximadamente 75% da população mundial de *C. pusilla* fazem uma parada durante a migração de outono em outro sítio de parada, a Baía de Fundy, no Canadá, ao em vez da Baía James. É na Baía de Fundy que os pássaros se alimentam em grande escala para aumentar suas reservas de gordura, chegando a dobrar seu peso corpóreo em duas semanas, a fim de fornecer a energia necessária ao exercício contínuo e intenso durante o voo transatlântico sem escalas (Weber, 2009)

Para migrar longas distâncias é necessário que as aves obtenham, processem e integrem informações sensoriais a partir de um grande número de pistas no ambiente (Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016). Essas informações são providas pelo uso da bússola magnética e celestial, marcos visuais e geometria espacial assim como das informações de origem olfatória e magnética. A migração de longa distância é altamente exigente em muitos aspectos do ciclo de vida de um pássaro. Além do imenso esforço fisiológico necessário para viajar em grandes distâncias geográficas, as aves também

devem evitar a predação, minimizar competição por recursos, superar condições climáticas adversas e navegar e orientar com precisão (Arlestam e Arkesson, 2003). Na verdade, vários estudos exploraram a importância da aprendizagem e experiência de navegação precisa em aves migratórias (Thorup *et al.*, 2007).

Figura 1. A espécie estudada, no sítio de parada Baía de Fundy – CA (A) e no sítio de invernada Ilha de Canela – BR, escala 2cm, (B). Foto David Sherry. (C) Mapa com rota migratória (linha tracejada) e os pontos de captura (círculos preenchidos)

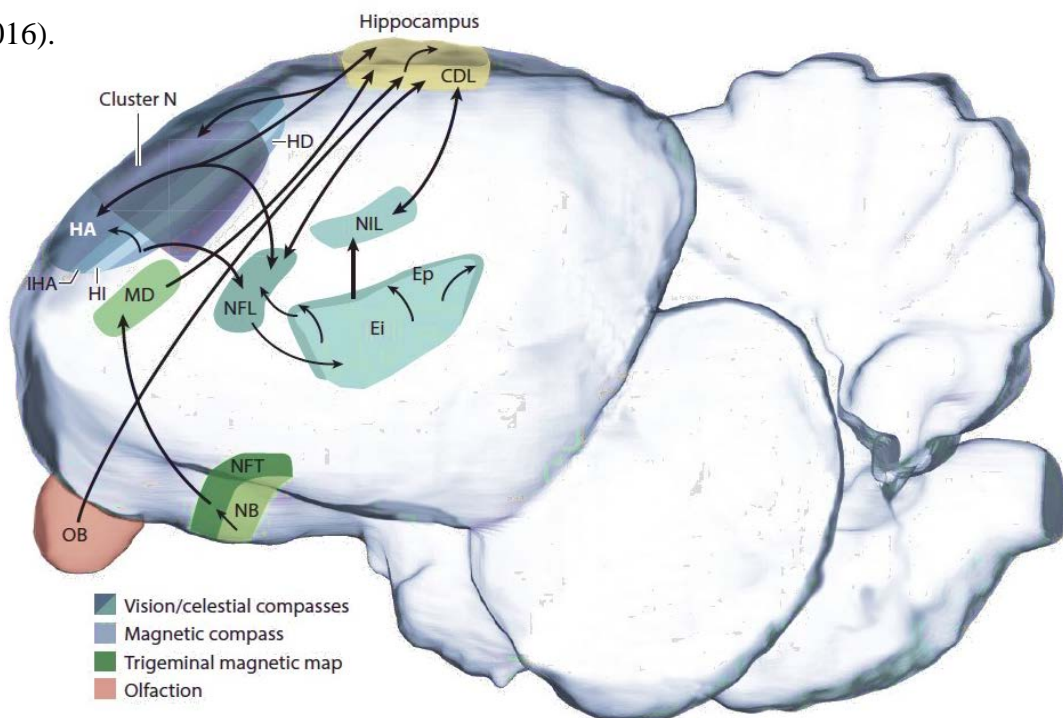


Elaborado por Cesar Diniz a partir da rota de (Brown, S, 2014)

1.2 Navegação de Longa Distância em Aves Migratórias Requer Habilidades Cerebrais Integradas na Formação Hipocampal

Acredita-se que as informações multissensoriais necessárias à navegação são integradas no hipocampo (Figura 2) em função de suas conexões com as estruturas que representam os mapas e as bússolas necessárias ao controle da direção durante o voo (Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016). Durante a migração o hipocampo das aves também é utilizado para aprender e lembrar a rota de migração e os locais de paragem necessários ao reabastecimento das reservas de energia (Healy, S. D. *et al.*, 1996; Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003). O hipocampo parece igualmente essencial à recuperação dos detalhes dos habitats de reprodução e invernada, já que ambos parecem ser reutilizados anualmente envolvendo portanto aprendizagem e memória (Chilton, 1995). E nesses habitats o hipocampo também é necessário para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais, de onde encontraram parceiros, alimento, água, esconderijo, ou locais de repouso bem como lembrar os locais forrageados, onde houve riscos, predação (Best *et al.*, 2001).

Figura 2. Vias para o hipocampo que pode armazenar, integrar e recuperar informações sobre diferentes fluxos sensoriais (visão, olfação, magnético) bem como mapas (magnético) e bússolas (celestes-sol/estrelas e magnética). Abreviações: CDL, corticoidea dorsolateralis; Ei, entopallium internum; Ep, entopallial belt; HA, hyperpallium apicale; HD, hyperpallium densocellulare; HI, hyperpallium intercalatum; IHA, interstitial nucleus of the HA; MD, mesopallium dorsale; NB, nucleus basalis; NFL, nidopalliu frontolaterale; NFT, trigeminal part of the nidopallium frontale; NIL, nidopallium intermedium laterale; OB, olfactory bulb. Elaborado por Mouritsen, Henrik *et al.* (2016).



Elaborado por Mouritsen, Henrik *et al.* (2016).

Adultos de algumas espécies de aves utilizam representação espacial aprendida do seu ambiente, para se orientar durante a navegação, e este aprendizado é dependente do hipocampo (Bingman e Able, 2002). Há evidências também do envolvimento do hipocampo nos componentes espaciais e de navegação da migração de média distância referida em inglês como *homing*. *Homing* é uma expressão inglesa usada para caracterizar a habilidade de determinadas espécies de encontrar o caminho de volta para casa depois de se afastar dela por distâncias variáveis (Healy *et al.*, 1996; Bingman e Able, 2002; Pravosudov, V. V. *et al.*, 2006). O hipocampo parece ser importante para aperfeiçoar a volta para casa (*homing*) (Strasser *et al.*, 1998). De um modo geral portanto, as aves migratórias parecem usar um complexo sistema de navegação em que a aprendizagem e a memória hipocampo-dependentes parecem essenciais (Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003).

Alguns estudos sugerem que as aves adultas migratórias de longa distância, usam uma representação espacial aprendida do seu ambiente em vez de um mecanismo puramente inato para navegar durante a migração (Thorup *et al.*, 2007). Mesmo que aves ainda jovens utilizam um sistema de navegação "simples", conhecido como estratégia de navegação por vetor, que requer apenas uma direção migratória herdada, um relógio circanual e pelo menos uma bússola (Mouritsen, 2003). Em contrapartida os pássaros mais velhos usam um sistema de orientação mais complexo baseado na memória e aprendizado de múltiplos sistemas que operam de forma integrada e dependem do hipocampo para formação e recuperação de memórias de longo prazo associadas à migração (Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003). O comportamento migratório em adultos está associado a neurogênese mantida ou aumentada e a produção diferencial de novos neurônios pode ser o mecanismo que sustenta mudanças na arquitetura do hipocampo entre aves migratórias e não migratórias adultas (Ladage *et al.*, 2011). E mesmo que a neurogênese diminui com a idade, uma vez que os juvenis, independentemente do estado migratório, apresentam níveis de neurogênese semelhantes e superiores aos adultos não migratórios, às aves migrantes adultas podem aumentar ou manter estacionalmente níveis de neurogênese comparáveis aos encontrados em juvenis (Ladage *et al.*, 2011).

A experiência migratória provoca aumento relativo no volume do hipocampo e no número total de neurônios de *Sylvia borin*, mas permanece desconhecido se a memória é afetada pela experiência migratória e se as espécies migratórias tem ou não uma memória melhor e um hipocampo maior do que as espécies não migratórias (Healy, S. D. *et al.*, 1996). Foram encontradas diferenças na memória e na densidade de neurônios do hipocampo, mas não no volume do hipocampo entre espécies migratórias e não migratórias de *Junco hyemalis* ou seja melhor memória espacial (Cristol, D. A. *et al.*, 2003). Mettke-Hofmann e Gwinner (2003) encontraram diferenças na memória de longo prazo entre as espécie *Sylvia borin* (migratória) e *Sylvia melanocephala* (não migratória), mas não

ficou claro se essas diferenças foram relacionadas às diferenças no hipocampo e que tipo de memória foi afetada pelo comportamento migratório.

De acordo com Pravosudov, Kitaysky, *et al.*(2006) a espécie migratória *Zonotrichia leucophrys gambelii* possui memória espacial melhor e mais neurônios no hipocampo em relação a seus coespecíficos que não realizam migração, o que sugere que a migração pode envolver memória espacial. Além disso esses autores sugerem que especificamente o hipocampo direito, parece codificar pistas espaciais globais, que podem estar envolvidos no comportamento migratório. No entanto, existem outros fatores não relacionados ao comportamento migratório, que parecem associados à diferenças registradas na memória e no hipocampo entre subespécies migratórias e não migratórias de pardal. Esse último resultado é interessante porque o hipocampo direito foi especificamente implicado no processamento de informações espaciais globais, enquanto que o hipocampo esquerdo parece estar envolvido na codificação de informações espaciais sobre o local, pistas visuais, e reconhecimento de objetos específicos (Kahn e Bingman, 2004). Isso sugere que ambos os hipocampus direito e esquerdo estão envolvidos, no processamento da memória espacial mas sua importância relativa para a função de memória não está totalmente clara (Kahn e Bingman, 2004).

1.3 Padrões de Ativação de Genes de Expressão Rápida na Formação Hipocampal em Resposta à Experiência Comportamental

Apesar de evolutivamente homólogos, partilhando muitas das mesmas funções espaciais e mnemônicas, o hipocampo dos pássaros e dos mamíferos são anatomicamente muito diferentes, com 320 milhões de anos de divergência evolutiva (Sherry *et al.*, 2017). Ao longo de toda a vida, a experiência sensorial gera atividade neuronal que desempenha papel essencial no desenvolvimento adequado das funções dos circuitos neurais.

,Os IEGs (immediate early genes) também foram utilizados para reportar atividade neuronal, fazendo uso de sua rápida indução por experiências comportamentais (Vann *et al.*, 2000).

A diferença do número de neurônios c-Fos positivos entre sub-regiões hipocampais dá suporte a ideia de que subcampos do hipocampo ao longo do circuito tri sináptico hipocampal dos mamíferos podem contribuir com funções distintas e complementares. De fato, outros estudos mostraram dissociação funcional ao longo do eixo septo temporal, em resposta ao rearranjo espacial de estímulos visuais (Jenkins *et al.*, 2004). Ou em resposta a uma nova configuração de estímulos visuais familiares (Amin *et al.*, 2006) em que o número de neurônios c-Fos-positivos aumentaram na região dorsal, mas não na região ventral. Da mesma forma, o treinamento de tarefa de memória espacial em um labirinto de braço radial induziu maior ativação de c-Fos no hipocampo dorsal (Vann *et al.*, 2000). Além disso, registrou-se após exploração de um novo ambiente, a expressão de Arc (activity-

regulated cytoskeleton-associated protein) (Guzowski *et al.*, 1999) no hipocampo dorsal e após treinamento em um labirinto aquático de Morris o aumento da expressão de c-Fos e zif268 (zinc finger protein 225) (Guzowski *et al.*, 2001) no hipocampo dorsal.

Em síntese a regulação da expressão IEGs no hipocampo ocorre por interações entre o comportamento e os sistemas cerebrais associados de forma específica. Os IEGs são induzidos no hipocampo após a experiência comportamental num novo ambiente (Arc) (Guzowski *et al.*, 1999; Vazdarjanova *et al.*, 2002); em um labirinto aquático (Arc, zif268 e c-Fos) (Guzowski *et al.*, 2001); em um labirinto de braço radial (c-Fos) (Vann *et al.*, 2000); recuperação de memória de medo (zif268) (Hall *et al.*, 2001). Assim o hipocampo dorsal se mostra essencial para navegação espacial, enquanto que o hipocampo ventral se relaciona principalmente com os aspectos não-espaciais do comportamento (Kubik *et al.*, 2007). Essa ideia é consistente com os trabalhos que sugerem que o hipocampo desempenha múltiplas funções (Riedel *et al.*, 1999; Micheau *et al.*, 2004; Kubík e Fenton, 2005).

A formação hipocampal é uma das regiões cerebrais conhecidas por participar da navegação e tarefas de orientação espacial (Herold *et al.*, 20015; Bingman *et al.*, 1998). Em aves os genes de ativação imediata foram utilizados para mapear a ativação do hipocampo durante a orientação espacial. E dentre os genes de expressão imediata, o c-Fos pode ser considerado um dos marcadores mais populares para o mapeamento de circuitos neurais funcionais envolvidos no processamento de informações sensoriais devido à sua rápida expressão, bem como a sua capacidade de resposta a uma ampla gama de estímulos. Sabendo que essa proteína é amplamente expressada quando a bússola magnética é usada para orientar a migração (Mouritsen *et al.*, 2004) tanto quanto sabemos que essas células são igualmente mais responsivas quando o contexto espacial é repetido (Sherry *et al.*, 2017). Finalmente é bom lembrar que os neurônios da formação hipocampal alteram taxas de disparo (Vargas *et al.*, 2006), e aumentam a atividade neuronal (Wu e Dickman, 2011; Keary e Bischof, 2012) em resposta às mudanças no campo magnético. E se há mudanças na intensidade do campo ocorre aumento correspondente na intensidade da atividade neuronal na formação hipocampal (Németh *et al.*, 2016). Portanto, experiências com IEGs mostrando mudanças significativas nos padrões de ativação hipocampal confirmam o papel do hipocampo na navegação espacial (Smulders e Devoogd, 2000; Mayer e Bischof, 2012). Independente se a resposta está relacionada ao armazenamento de memória ou aumento da atividade neuronal em resposta a mudanças no campo magnético (Keary e Bischof, 2012; Mayer e Bischof, 2012).

Os animais que têm maior dependência de aprendizado espacial e de memória tendem a ter um hipocampo maior, com mais neurônios nessa área, bem como, maior neurogênese (Krebs *et al.*, 1989; Ladage *et al.*, 2010) e maior número de micróglia (Diniz *et al.*, 2016). No entanto, o mecanismo subjacente à manutenção do volume aumentado do hipocampo e número de neurônios

em aves migratórias não está resolvido. Uma possibilidade seria a de que o aumento no volume do hipocampo pode ser resultado da adição de novos neurônios (Ladage, Lara D *et al.*, 2011).

1.4 Processo de Neurogênese da Formação Hipocampal

A adição de novos neurônios na formação hipocampal ocorre através do processo de neurogênese. Em mamíferos as células tronco neurais, num dos nichos neurogênicos da zona subgranular do giro dentado dão origem as células progenitoras neurais, expressam a nestina e a proteína glial ácida fribilar e possuem proliferação limitada diferenciando-se em neurônios ou células gliais (Aimone *et al.*, 2014) que se inserem-se aos circuitos existentes migrando curtas distâncias (Encinas e Sierra, 2012). Para que a maturidade morfológica de neurônios recém-nascidos seja alcançada decorrem em geral 2 meses, sendo que ao longo desse tempo algumas proteínas deixam de ser expressas e outras começam a ser expressadas, e.g. GFAP, Sox2, Ki67, Nestina, Dcx, PSA-NCAM, Calretina, Calbidina e NeuN (Seri *et al.*, 2001; Kempermann *et al.*, 2004; Kempermann, 2006; Duan *et al.*, 2008). O processo de maturação em adultos é mais demorado provavelmente devido a diferenças entre o nicho local de neurogênese adulta e neonatal, contribuindo para uma velocidade de maturação diferente (Zhao, C. *et al.*, 2006).

Comparados a células granulares maduras, os novos neurônios exibem alta plasticidade sináptica durante estágios específicos do desenvolvimento (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Ge, Yang, *et al.*, 2007). Sete semanas após a divisão, os novos neurônios exibem propriedades eletrofisiológicas de neurônios maduros, como disparo de potenciais de ação (Mongiat e Schinder, 2011), podendo ser finalmente integrados à circuitaria hipocampal. As células não recrutadas para maturação são eliminadas por apoptose (Dayer *et al.*, 2003; Zhao, S. *et al.*, 2006). Quando integrados ao circuito, a excitabilidade dos neurônios imaturos pode contribuir para a remodelação dos circuitos do hipocampo (Doetsch e Hen, 2005) e essa é apenas uma das muitas funções propostas para a neurogênese do hipocampo adulto.

Neurônios recém-nascidos se mostram distintos dos maduros pois exibem uma elevada resistência de entrada (Esposito *et al.*, 2005), recebem menos inibição (Li *et al.*, 2002), e consideravelmente maior plasticidade sináptica de suas aferências glutamatérgicas (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Ge, Pradhan, *et al.*, 2007). Devido a estas propriedades, neurônios novos tem limiares de excitação menores do que neurônios maduros (Esposito *et al.*, 2005; Mongiat *et al.*, 2009; Mongiat e Schinder, 2011), e, assim, em resposta a *inputs* pré-sinápticos, as sinapses formadas por neurônios recém-nascidos nos terminais multisinápticos podem ser mais dinâmicas do que as sinapses existentes. Se isso ocorrer durante o período crítico de maturação, pode permitir que os novos neurônios recentemente integrados contribuam para o processamento de informações. Por possuir maior dinâmica, as sinapses jovens podem permitir novas projeções e posteriormente, com a

maturidade alcançada promover retração das espinhas que não formaram novas sinapses em neurônios maduros (Toni e Sultan, 2011).

Os novos neurônios são responsáveis por determinadas propriedades especiais do circuito local (Snyder *et al.*, 2001; Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Ge, Yang, *et al.*, 2007). Se houver um bloqueio da neurogênese ocorre menor amplitude da resposta evocada pela via perfurante (Lacefield *et al.*, 2012). A partir de modelos computacionais é possível inferir que a adição de novos neurônios pode alterar propriedades de redes neurais tendo sido sugerido diferentes funções para os novos neurônios em diferentes estágios de maturação neuronal (Aimone *et al.*, 2014).

A substituição neuronal têm sido interpretada como responsável por mudanças comportamentais dependentes de aprendizado e memória, tanto quando de funções emocionais (Gould *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1993). Da mesma forma tem sido usado para estipular os limites prováveis da capacidade que um cérebro tem de codificar novas memórias (Nottebohm, 2002b).

O grande número de sinapses formadas em cada neurônio e cada um fornece a flexibilidade para uma atualização constante e praticamente ilimitada da informação (Bailey e Kandel, 1993). No entanto, uma teoria de aprendizagem baseada em plasticidade sináptica não previu a necessidade de substituir os neurônios adultos saudáveis por outros neurônios do mesmo tipo, e assim algum elo dessa cadeia deve ter passado despercebida (Nottebohm, 2002a). As sinapses são instrumentos fundamentais para consolidação de aprendizado e memória de longo prazo (Bailey e Kandel, 1993). A aprendizagem e memorização sazonal de canções ou o armazenamento de alimentos e sua recuperação por pássaros que os estocam em esconderijos distribuídos na floresta poder ser facilitada pela chegada de novos neurônios possibilitando a consolidação dos novos aprendizados e memória relacionadas (Nottebohm, 2002b).

Mudanças permanentes na expressão gênica podem ser mais adequadas para determinar a forma, número e propriedades das sinapses de um neurônio e, portanto, a maneira em que esse neurônio interage com os outros e com o ambiente (Begum e Sng, 2017; Yoo *et al.*, 2017).

Considerando que mudanças permanentes na expressão dos genes codificam memórias de longo prazo, e que a aquisição destas memórias são em última instância uma etapa final e irreversível da diferenciação celular, então o neurônio inteiro, não apenas a sinapse, pode ser considerado uma unidade de aprendizagem e o número de neurônios disponíveis para o armazenamento de novas memórias de longo prazo seria inversamente relacionado com o número de memórias previamente adquiridas (Barnea, 2009). Esse mecanismo remete a uma função importante da neurogênese sobre o aumento da capacidade de aprendizado e armazenamento de novas informações. Além disso, o uso da memória espacial e aprendizagem tem sido mostrado por afetar a neurogênese do hipocampo em mamíferos e aves (Greenough *et al.*, 1999; Leuner *et al.*, 2006; Ladage, L. D. *et al.*, 2011).

Podemos dizer então que a necessidade elevada de adquirir novas informações em regiões cerebrais relevantes promove o recrutamento de novos neurônios (Nottebohm, 2002). Com propósito de facilitar a plasticidade cerebral, esse recrutamento, pode desempenhar um papel importante na aquisição de novas memórias em invertebrados (Bridges e Grattan; Lomassese et al., 2000) e vertebrados (Branea e Pradosudov, 2011). Em animais adultos, a exposição a novas informações tem sido correlacionada positivamente com o aumento do recrutamento de novos neurônios em seus cérebros (Barnea e Pradosudov, 2011; Zhao e Gage). Embora esta exposição que está ligada ao recrutamento de novos neurônios, possa se manifestar em muitas maneiras ao longo e em função da história de vida de um animal bem como dos desafios que enfrenta (Chancellor et al., 2011; Patel e Krebs, 1997).

Em aves aprender poderia ser a chave para melhorar a capacidade de navegação; a identificação de locais de parada adequados em rota; evitando condições meteorológicas adversas ou potenciais predadores; e para competir por alimento com outras aves migrantes e as aves locais. Essas necessidades de maior capacidade de aprendizagem durante a migração podem ser respondidas por um maior recrutamento neuronal nas regiões cerebrais relevantes de aves migratórias. Alguns estudos investigaram diretamente a possível relação entre recrutamento neuronal e comportamento migratório em aves (Ladage e Pradosudov, 2011; Barkan e Barnea, 2014). Esses estudos revelaram que pássaros de espécies ou subespécies migratórias possuíam mais neurônios novos do que as espécies residentes, para regiões do cérebro que desempenham um papel no processamento da informação espacial.

Assim, é razoável supor que maior produção de novos neurônios no hipocampo, devido ao aumento das demandas de aprendizagem e memória durante a migração, pode estar subjacente às diferenças encontradas no hipocampo entre aves migratórias e não migratórias (Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003). Uma vez que a neurogênese mostrou ser muito elevada durante a ontogenia e declina com a idade (Lipkind *et al.*, 2002), juvenis de subespécies migratória e não migratória teriam maiores níveis de neurogênese do que seus respectivos homólogos adultos. No entanto, os adultos migratórios contrariaram a tese da regulação negativa da neurogênese que ocorre durante o envelhecimento, uma vez que também durante o envelhecimento a regulação é positiva, onde número de novos neurônios é semelhante entre migrantes adultos e juvenis sendo maior do que os não-migrantes adultos (Ladage *et al.*, 2011).

Ao se integrarem estruturalmente à rede neural do hipocampo estes novos neurônios possuem características de neurônios funcionais que parecem ser importantes por exemplo para a discriminação espacial (Markakis e Gage, 1999; Clelland *et al.*, 2009). Ao longo dos últimos anos evidências obtidas por análises envolvendo vários níveis, incluindo o celular, o de circuitos, o sistêmico e o comportamental (Deng *et al.*, 2010; Aimone e Gage, 2011; Lazarini e Lledo, 2011;

Sahay, Scobie, *et al.*, 2011) sugerem que os novos neurônios contribuem para as funções hipocampo-dependentes.

A neurogênese no hipocampo pode regular a capacidade de formar novas memórias, desempenhando um papel funcional importante na separação de padrões, ou seja, na distinção entre eventos semelhantes. Sua contribuição seria a de melhorar o processo de separação de padrões (Sahay, Scobie, *et al.*, 2011) codificando-os em memórias episódicas distintas, para que o cérebro possa distinguir entre os diferentes locais em que esses eventos ocorreram (Ergorul e Eichenbaum, 2004; Yassa e Stark, 2011).

Tem sido sugerido que a neurogênese hipocampal em adultos aumenta a formação de memória modulando a eficiência da separação de padrões. Através de mapeamento genético dependente da atividade mostrou-se que a redução da neurogênese adulta degradou a capacidade de CA3 em separar padrões através da codificação em população de neurônios, havendo uma grande sobreposição de populações de neurônios ativas em contextos semelhantes (Niibori *et al.*, 2012). Em nível comportamental a redução de neurogênese adulta produz déficits visuais de discriminação contextual e espacial (Niibori *et al.*, 2012; Winocur *et al.*, 2012). Por outro lado, o aumento e sobrevivência dos novos neurônios facilita a discriminação e talvez melhore o padrão de discriminação (Sahay, Scobie, *et al.*, 2011; Sahay, Wilson, *et al.*, 2011). Há hoje um consenso de que a neurogênese modula a capacidade do hipocampo em formar diferentes memórias a partir de diferentes episódios, facilitando sua discriminação (Sahay, Wilson, *et al.*, 2011) ou ainda pode simplesmente estabelecer uma reserva de novos neurônios que podem ser desenhados para suprir funções distintas quando necessárias (Kempermann, 2008).

Em resumo, coletivamente, esses estudos têm sugerido significativa contribuição da neurogênese adulta para o aprendizado e a retenção da memória espacial de longo prazo, para a discriminação de padrões espaciais e medo condicionado ao contexto (Deng *et al.*, 2010; Aimone e Gage, 2011; Marín-Burgin e Schinder, 2012). Modelos computacionais (Aimone *et al.*, 2009) e experimentais (Clelland *et al.*, 2009) sugerem que neurônios imaturos podem ser críticos para criar associações entre memórias aprendidas vizinhas no domínio do tempo (Aimone *et al.*, 2009) e podem ajudar a distinguir memórias relacionadas no domínio do espaço (Clelland *et al.*, 2009).

A substituição neuronal numérica não possibilita saber sobre a funcionalidade e capacidade do novo neurônio (Barnea, Anat e Pravosudov, Vladimir, 2011). Sendo que a morte seletiva provoca aumento na incorporação de novos neurônios do mesmo tipo (Scharff *et al.*, 2000). Onde, o número de neurônios presentes, podem regular ou restringir o número de células adicionadas, a morte celular gera posteriormente uma onda de nova adição neuronal, até que o espaço do circuito disponível é ocupado novamente (Scharff *et al.*, 2000). Sabe-se que os novos neurônios são funcionais, mas se

esses novos neurônios funcionam da mesma maneira que os neurônios antigos ainda não está claro. E o aprendizado nem sempre é afetado quando os níveis de neurogênese são reduzidos, seja experimentalmente ou naturalmente (Leuner *et al.*, 2006).

1.6 Aspectos Gerais da Regulação da Neurogênese

A neurogênese pode ser regulada a cada estágio de seu processo por diferentes estímulos intrínsecos e extrínsecos, que por sua vez podem afetar múltiplos estágios seja durante a proliferação (expansão), diferenciação (neuronal ou glial) e sobrevivência. Assim, o efeito na neurogênese resulta de diferentes combinações de fatores nos estágios individuais do desenvolvimento neuronal e da interação entre eles (Aimone *et al.*, 2014).

Os progenitores neurais amplificadores do hipocampo são influenciados positivamente pela atividade física, um efeito pró-proliferativo (Kronenberg *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 2008) que se estende aos estágios subsequentes do desenvolvimento neuronal. Mesmo quando o efeito da proliferação retorna a níveis basais, as populações de células positivas para Dcx continuam a aumentar (Kronenberg *et al.*, 2003), sendo o exercício um indutor robusto do aumento da neurogênese no giro denteado tanto em animais jovens quanto adultos e idosos (Aimone *et al.*, 2014).

A atividade física exerce efeitos positivos sobre a função cognitiva e plasticidade cerebral podendo ser mediado pela angiogênese (incremento na vasculatura) encefálica e portanto, aumento de fluxo sanguíneo no tecido nervoso (Van Der Borght *et al.*, 2009), resultando numa melhor distribuição de oxigênio, neurotrofinas e nutrientes. As neurotrofinas, por sua vez, estão envolvidas na regulação da sobrevivência neuronal e isso inclui o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Palmer *et al.*, 1997; Cotman e Berchtold, 2002; Li *et al.*, 2008; Berchtold *et al.*, 2010) que pode estar diretamente envolvido nos efeitos benéficos proporcionados pelo exercício físico (Gómez-Pinilla, 2008; Lista e Sorrentino, 2010), pois as NPCs (Células progenitoras neurais) expressam TrkB, receptor de alta afinidade para BDNF (Li *et al.*, 2008). O hipocampo e o hipotálamo de adultos têm os níveis mais elevados de BDNF (Kato-Semba *et al.*, 1997). Especificamente no hipocampo a produção de BDNF é minimamente produzida por astrócitos (Rudge *et al.*, 1995), sendo altamente localizado nos núcleos da camada granular do giro denteado (Kato-Semba *et al.*, 1997). Embora os níveis da proteína BDNF no hipocampo não diminuam com a idade (Lapchak *et al.*, 1993; Kato-Semba *et al.*, 1997; Bimonte *et al.*, 2003) o seu receptor TrkB diminui (Croll *et al.*, 1998; Silhol *et al.*, 2005). Em seres humanos os níveis séricos de BDNF estão correlacionados com volume hipocampal e memória, onde níveis baixos são observados em pessoas idosas com hipocampus menores e comprometimento de memória (Erickson *et al.*, 2010). Coerente com essa ideia é o fato de que sua administração exógena tem sido utilizada para reverter déficits no processo de aprendizagem e memória (Cotman e Berchtold, 2002).

A densidade dos astrócitos do hipocampo, imunopositivos para GFAP, permanecem os mesmos durante a vida adulta em mamíferos, mas a densidade de astrócitos que expressam FGF-2 diminui no hipocampo com o aumento da idade, sugerindo que o ambiente dessa região para a NPCs, torna-se progressivamente menos favorável a neurogênese com a idade (Shetty *et al.*, 2005). Somado a isso os próprios fatores de crescimento (IGF-I, VEGF) que promovem a neurogênese também têm seus níveis significativamente reduzidos em ratos idosos comparados a ratos jovens (Shetty *et al.*, 2005; Bernal e Peterson, 2011). Assim, tanto os níveis de FGF-2 quanto de seus receptores diminuem no hipocampo com a idade, tendo sua via afetada negativamente com o envelhecimento (Shetty *et al.*, 2005; Bernal e Peterson, 2011). Então, a alteração do perfil de astrócitos no hipocampo com a idade, sugere esse tipo celular como um dos principais contribuintes ao nicho neurogênico, e o declínio dos fatores pró-neurogênicos secretados, correlaciona-se à diminuição da neurogênese hipocampal com o aumento da idade. Já outros fatores não diminuem com a idade.

Astrócitos presentes nos nichos neurogênicos interagem, dependendo do número de fatores (incluindo a expressão dos genes dos astrócitos) com NPCs. Em cultura de células com astrócitos, tanto direta como sem contato, eles induzem a diferenciação neuronal de NPCs (Barkho *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2010). Coculturas de astrócitos e neuroesferas revelaram a importância de GFAP e expressão de vimentina na mediação do contato célula-célula, demonstrando que essas proteínas de filamento intermediário regulam negativamente a neurogênese *in vitro* (Wilhelmsson *et al.*, 2012), bem como outras proteínas como efrina-B2, também expressa por astrócitos (Ashton *et al.*, 2012). A região de origem de astrócitos desempenham um papel significativo na sua capacidade para promover a neurogênese de NPCs. Astrócitos isolados a partir do hipocampo adulto, mas não de medula espinal, promovem a diferenciação neuronal de NPCs em cocultura através de ambos os fatores solúveis e do contato célula-célula (Song *et al.*, 2002). Embora os astrócitos derivados do hipocampo e as do córtex sejam capazes de induzir a diferenciação neuronal, as isoladas do hipocampo são mais eficazes, sugerindo que os astrócitos do hipocampo liberam fatores neurogênicos mais potentes (Oh *et al.*, 2010).

O Wnt3 continuamente expresso no hipocampo durante toda a vida adulta também produzido pelos astrócitos, juntamente com B-catenina sinaliza a estimulação em NPCs, sendo essa a possível via pela qual o astrócito regula diretamente a atividade das NPCs (Lie *et al.*, 2005). Wnt regula de várias formas a neurogênese hipocampal adulta (Kuwabara *et al.*, 2009) tanto na proliferação de NPC quanto na diferenciação, tendo sido demonstrado em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Lie *et al.*, 2005; Kuwabara *et al.*, 2009; Wexler *et al.*, 2009) que isso ocorre através de regulação para cima da expressão de NeuroD1, elemento essencial do fator de transcrição na geração de GCs e diferenciação

neuronal de NPCs. Em resposta ao Wnt, as NPCs aumentam a expressão da linha-1, que é importante na sobrevivência dessas células (NPCs).

Os astrócitos além de secretar fatores neurotróficos que atuam nas NPCs, estão intimamente ligados a células endoteliais, em torno dos vasos sanguíneos, estas que representam uma fonte de fatores extrínsecos que podem modular a neurogênese adulta. A presença de NPCs próximas a vasos sanguíneos (Palmer *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2008) pode sugerir a produção de fatores a partir dos vasos que estimulam a proliferação, diferenciação neuronal e sobrevivência (Palmer *et al.*, 2000). Células endoteliais secretam fatores solúveis que aumentam a proliferação das NPCs (Shen *et al.*, 2004), maturação, migração através da secreção de BDNF (Leventhal *et al.*, 1999). Essa relação entre as NPCs e os vasos é bem evidente em animais que realizam exercício voluntário nas rodinhas de correr, um potente estimulador de neurogênese hipocampal adulta que também induz um aumento no fluxo sanguíneo no giro denteado (Pereira *et al.*, 2007) a partir da expansão da área coberta por vasos sanguíneos no giro denteado (Van Praag *et al.*, 2005). Analisando a expressão de gene a partir de astrócitos, isolados a partir de diferentes regiões do sistema nervoso central, temos identificado os fatores-chave. Dois desses fatores liberados pelos astrócitos são promotores de neurogênese, a IL-1 β e IL-6, que são citocinas pró-inflamatórias que, em combinação com outros fatores tais como a molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1) e da proteína induzida por interferon 10 (IP-10), aumentam a diferenciação neuronal de NPCs (Barkan *et al.*, 2016a). Embora as citocinas pró-inflamatória inibam geralmente a neurogênese, esta inibição depende em grande parte da concentração de citocinas. Em contrapartida, os astrócitos isolados a partir da medula espinal expressam mais insulina de ligação, ao factor de crescimento da proteína-6 (IGFBP-6), decorina, e encefalina, que regulam negativamente a neurogênese (Barkan *et al.*, 2016a). Mais importante ainda, é a combinação dos fatores secretados por astrócitos no microambiente local que produz o nicho neurogênico (Barkan *et al.*, 2016a).

Em aves, o processo de neurogênese do hipocampo adulto é regulado por fatores incluindo a atividade cognitiva, o enriquecimento ambiental, o exercício, a dieta, o estresse, os hormônios gonadais e o envelhecimento. É importante ressaltar que a correlação positiva entre o número de neurônios e o desempenho de aprendizado não implica necessariamente numa relação causal. (Galea *et al.*, 2013; Ladage, 2015).

Portanto o olhar atento à neurogênese adulta e a substituição neuronal em uma diversidade de animais livres que levam uma vida normal, pode fornecer dados com os melhores exemplos de como o ambiente realmente afeta a neurogênese e às funções a ela relacionadas. A substituição neuronal espontânea é um recurso cerebral que deve ser investigado inicialmente a luz das mudanças reais em animais selvagens para então descobrir como a natureza a utiliza (Nottebohm, 2002b).

Levando isso em conta nosso estudo testou a hipótese de que a migração outonal afeta o volume e o número de células na formação hipocampal em aves marinhas migratórias de longa distância. Em nosso estudo as análises estereológicas foram realizadas em estruturas do sistema nervoso central de aves em migração e em invernada da espécie *Calidris pusilla*, tendo como área de interesse geral o telencéfalo e em particular a formação hipocampal. Essa ave marinha migra na direção norte sul (migração outonal) deixando para trás a tundra canadense em busca da costa da América do Sul onde permanecerá até a primavera. Nossa intenção é quantificar além dos neurônios novos DCx-positivos, as células c-fos positivas e os astrócitos GFAP positivos nos animais capturados na Baía de Fundy (Canadá) comparando-os aos dos animais capturados na Ilha Canela na costa do município de Bragança no Estado do Pará (Brasil). Para o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo a documentar se as taxas de neurogênese se mantêm estáveis nas áreas de invernada.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do comportamento migratório outonal de longa distância sobre a formação hipocampal das aves.

1.7.2 Objetivos Específicos

Estimar durante a migração e após a migração outonal:

- 1- O número total de células e o padrão de ativação de genes de expressão rápida na formação hipocampal.
- 2- O volume telencefálico e da formação hipocampal.
- 3- O número de neurônios Dcx-positivos do telencéfalo e da formação hipocampal.
- 4- O número de neurônios maduros da formação hipocampal.
- 5- O número de astrócitos da formação hipocampal adulta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo consideramos o processo migratório de longa distância outonal, levando em conta os diversos estímulos multissensoriais (exercício de voo, aprendizagem e memória espacial, orientação celeste, magnética) que envolvem as tarefas de navegação da jornada de 5.300 km traçada pelas aves migratórias do sítio reprodutivo no Canadá, incluindo escalas em sítios de parada, em direção ao sítio de invernada no Brasil (Weber, 2009).

Foram realizadas duas janelas de amostragem. A primeira para representar indivíduos em plena atividade migratória, e contendo doze espécimes de *Calidris pusilla* foram coletados em agosto de 2012 na Baía de Fundy, Canadá (45 ° 50'19.3 "N e 64 ° 31'5.39" W) (Figura 1). Ressalta-se que esse sítio de parada é utilizado por aproximadamente 75% da população mundial da espécie (Weber, 2009) e encontra-se a mais de 2.000 km de distância do sítio reprodutivo, na primeira fase da tarefa migratória (Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016), ou seja, à muitos quilômetros da meta final.

A segunda janela amostral reuniu indivíduos que concluíram a migração sul, tendo sido capturados nove indivíduos entre novembro e março na Ilha de Canela - zona costeira tropical do norte do Brasil (00°47'09.07 "S e 46°43'11.29" W). O período de coleta pós-migração, evitou o período imediato após a chegada ou seja, os meses de agosto e setembro (Weber, 2009) quando possivelmente os efeitos do exercício extenuante, falta de sono (níveis de glicocorticoides, citocinas pró-inflamatórias) podem regular a neurogênese, e com isso mascarar os efeitos da migração.

Os pássaros foram capturados sob licença Nº 44551-2 do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e a licença científica ST2783 do Serviço de Vida Selvagem do Canadá. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Instituto Nacional de Saúde (EUA) e com os regulamentos brasileiros para procedimentos científicos em animais, além da aprovação do Subcomitê de Usuários de Animais da Universidade de Western Ontario.

Foram escolhidos três pontos aleatórios, no Canadá na zona entre marés e no Brasil na faixa de areia acima da zona entre marés, ou seja, nos locais utilizados pelas aves para pouso a noite durante a maré cheia. Em cada ponto foi aberta uma rede de neblina 12m X 2,5m, ao entardecer. As redes foram vistoriadas a cada dez minutos para a retirada das aves emalhadas. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados, o estresse e o desconforto dos mesmos.

2.1 Perfusão e Histologia

Sob anestesia profunda com isoflurano, as aves foram perfundidas transcárdialmente com solução salina tamponada com fosfato a 0,1 M seguido de fixadores aldeídicos (paraformaldeído a 4%, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2-7,4). Após a craniotomia os encéfalos foram armazenados em

solução salina tamponada com fosfato 0,1 M, em seguida cortados por Vibratomo (Leica VT1000S) no plano coronal em secções de 80 µm de espessura (animais do Brasil) e 60 µm (animais do Canadá), para obter séries anatômicas com intervalos de 1:6. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, secas ao ar à temperatura ambiente, coradas pelas técnicas de Nissl (Tabela 1), ou imunomarcadas, desidratadas e diafanizadas em séries de álcool e xileno.

2.2 Imuno-histoquímica

As secções destinadas à imuno-histoquímica foram submetidas à recuperação antigênica com ácido bórico 0,2 M (pH 9) a 70 ° C durante 60 min flutuando livremente na solução; após o resfriamento em temperatura ambiente, foram lavadas por 2 min, com tampão fosfato salina e triton a 1% (PBST) e três vezes em PBS. As secções foram então imersas durante 12 horas em soro de cavalo normal a 10% (S-2000 Vector Laboratories, diluído em PBS/T 0,3% para Dcx e GFAP) e soro de cabra normal a 10% (S-1000 Vector Laboratories diluído em PBS/T 0,3% para c-Fos) e transferido para o anticorpo primário (Doublecortin C-18, sc-8066 Santa Cruz Biotechnology ou GFAP sc-6170 Santa Cruz Biotechnology ou c-Fos Sc-253 Santa Cruz Biotechnology), diluído em PBST 0,3% (1: 500) e incubadas durante 12 h a 4 ° C com agitação suave e contínua. As secções lavadas (PBS) foram então incubadas durante a noite no anticorpo secundário (para Dcx e para GFAP, Vector Laboratories, Inc. cavalo anti-cabra BA 9500, 1: 400 em PBST 0,3%, para c-Fos Vector laboratories, Cabra anti-coelho BA-1000, 1:400 em PBST 0,3%) seguido de peróxido de hidrogénio a 0,3% durante 15 minutos, lavadas três vezes em PBS por 2 min a cada vez, e em seguida imersas em solução de complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA; 37,5 µl A, 37,5 µl B em 13,12 ml de 0,3% PBST) durante 60 minutos. Após uma lavagem de 2 min em PBS, as secções foram submetidas à reação histoquímica para revelação da peroxidase para visualização dos neurónios imunomarcados por Dcx, utilizando o método de glicose-oxidase-DAB-níquel (Shu *et al.*, 1988). Para imunomarcção de neurónios maduros NeuN ver <https://www.protocols.io/view/neun-immunohistochemistry-protocol-h56b89e> E para detalhes da imunomarcção de neurónios novos Dcx positivos, ver: <https://www.protocols.io/view/dcx-immunohistochemistry-protocol-h57b89n>

Como o Doublecortin C-18, sc-8066 Santa Cruz Biotechnology, é bem caracterizado e seu padrão de marcação conhecido em aves utilizamos como controle da marcação inespecífica, o mesmo procedimento imuno-histoquímico omitindo o anticorpo primário comprovou que o anticorpo secundário utilizado de forma isolada não revela células imunomarcadas (Saper e Sawchenko, 2003).

Tabela 1. Coloração de Nissl

SOLUÇÃO	TEMPO DE IMERSÃO (minutos)
Álcool 100%	05
Álcool 100% + Clorofórmio (1:1)	10
Álcool 95%	03
Álcool 75%	03
H ₂ O destilada	0 - 01
Cresil violeta	01 - 04
H ₂ O destilada	0 - 01
Álcool 80%	03
Álcool 90%	10
Álcool 100% + Clorofórmio (1:1)	03
Álcool 95% + ácido acético (15 gotas/100 ml)	03
Álcool 95%	06
Álcool 100% + ácido butílico (1:1)	03
Xileno I	05
Xileno II	05

2.3 Volumes Hipocampal e Telencefálico

Definimos a formação hipocampal de *C. pusilla* como compreendendo o hipocampo propriamente dito e a área para-hipocampal (Diniz *et al.*, 2016). Para medir os volumes do hipocampo e a razão entre eles, seguimos o método do volume total de telencéfalo previamente recomendado (Ladage *et al.*, 2009). Para tal, utilizamos o fracionador óptico, um método estereológico padrão que estima volumes baseados no princípio de Cavalieri (Gundersen e Jensen, 1987). Os valores para as análises estatísticas foram extraídos de uma série de cortes anatômicos marcados com duplacortina. O volume de telencéfalo (telencéfalo + hipocampo) foi estimado entre a primeira e a última secção de tecido do telencéfalo, como sugerido anteriormente (Roth e Pravosudov, 2009).

2.4 Números total de células, de Neurônios DCX-positivos, Células c-Fos positivas, NeuN positivas e GFAP positivas

Para visualizar todas as células existentes na região de interesse optamos por utilizar a técnica de coloração Nissl, que após a montagem das seções em lâminas devidamente gelatinizadas, decorre de uma série de imersões descritas na Tabela 1. Após a marcação seletiva de duplacortina, determinou-se o número de neurônios positivos para Dcx, um marcador endógeno de neurônios imaturos no cérebro

aviário (Balthazart *et al.*, 2008). Esse marcador é expressado em neurônios imaturos durante a migração e sua integração em novos circuitos neurais diminui após sua maturação. A principal vantagem da quantificação da neurogênese usando Dcx em relação às medidas tradicionais (bromodeoxyuridine e timidina tritiada) é justamente sua produção endógena enquanto que outros marcadores tradicionais devem ser injetados nos animais, identificando subseqüentes divisões celulares, que ocorrem de forma não específica (neurônios e glia) fornecendo a informação instantânea do destino dos neurônios que refletem o momento da injeção, (Couillard-Despres *et al.*, 2005).

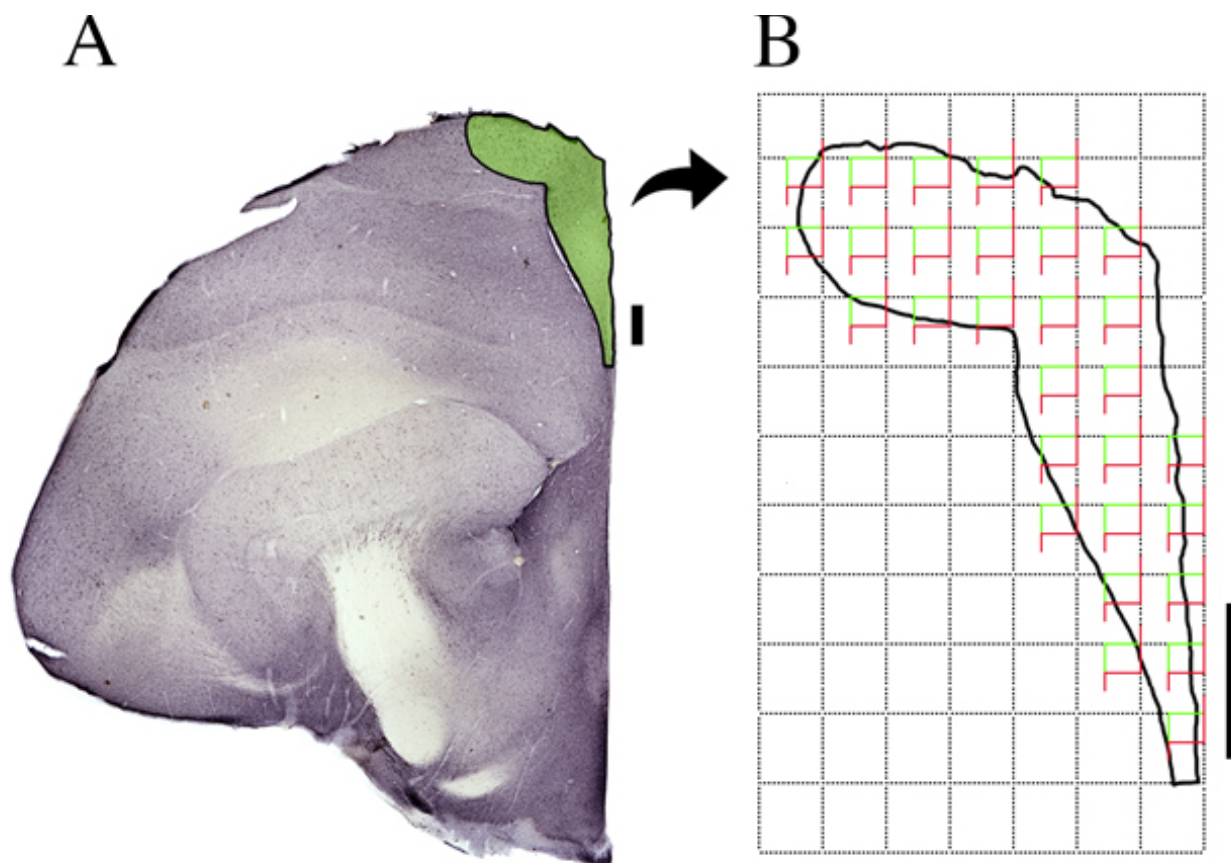
Por outro lado, sabe-se especificamente quanto tempo o Dcx é expresso em novos neurônios (Balthazart *et al.*, 2008) sugerem menos de 30 dias após a proliferação. Usamos Dcx porque este marcador ser comumente utilizado para identificar a regulação para cima do recrutamento neuronal em roedores e com menor frequência em aves (Garrett *et al.*, 2012)). Dentre os genes de expressão imediata, escolhemos o c-Fos por ser considerado um dos marcadores mais populares para o mapeamento de circuitos neurais funcionais envolvidos no processamento de informações sensoriais devido à sua rápida expressão, bem como a sua capacidade de resposta a uma ampla gama de estímulos. Após a marcação seletiva para NeuN, determinou-se o número de neurônios maduros. Escolhemos identificar a população de astrócitos que expressam a mesma proteína das células progenitoras neurais quiescentes, característico por marcar o citoesqueleto dos astrócitos expressam proteína ácida fibrilar- GFAP. Optamos, por não extrair dados de densidade celular por não ter como estimar a retração do telencéfalo pós-fixado.

O procedimento de contagem foi iniciado com a geração automática de caixas de contagem pelo programa, localizadas em cada ponto de intersecção entre o plano em que está situada a fatia e a sonda estereológica (Figura 3). Foram marcados os objetos de interesse (elementos celulares) dentro de cada caixa de contagem, sendo que estes geram informações para o programa *Stereo investigator*, revelando o número e a posição das células contidas na mesma. Essas informações são coletadas sistematicamente na fração de seções escolhidas e a partir delas são estimados pelo programa o número esperado de objetos de interesse para toda a estrutura cujo contorno foi digitalizado.

A unidade de contagem utilizada em nosso protocolo foi o corpo celular e o foco escolhido para posicionar o marcador no eixo z foi, quando realizado para a glia, a cromatina nuclear e para o neurônio, o seu núcleo. Para evitar que o mesmo objeto seja contado repetidas vezes, o procedimento de focalização deve ser efetuado repetidamente nos diferentes planos ao longo do eixo Z em cada caixa,

especialmente quando coexistem muitas células na mesma caixa. (Tabelas de 1 a 9 referentes aos parâmetros estereológicos estão no anexo I).

Figura 3. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do Telencéfalo de *Calidris pusilla* (80 μm), com destaque em verde para contorno da formação hipocampal esquerda, escala 25 μm . (B) Contorno da formação hipocampal esquerda, mostrando a disposição das caixas de contagens de 50x50 μm dispostas num grid de 250x250, escala 500 μm .



O número total de neurônios ou células da glia são estimados dentro da região de interesse através do método do fracionador óptico, com a multiplicação do número de neurônios contados dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Os valores obtidos podem variar de acordo com o número de secções investigadas em comparação ao número total de secções que contem a região de interesse “section sampling fraction” (ssf); da área da caixa de contagem comparada com a área da matriz de contagem “area sampling fraction”(asf); e da altura da caixa de contagem comparada com a espessura da secção após os procedimentos histológicos “thickness sampling fraction”(tsf) (Howard e Reed, 2005). Como a espessura total da secção em cada sitio de contagem é variável ao longo da secção, a fração amostral da espessura da secção é estimada em cada ponto da secção a partir das informações que o experimentador define focalizando os pontos mais superficial e mais profundo da secção em cada sitio da contagem da matriz amostral.

$$\text{Número total de neurônios (N)} = \text{números de neurônios contados } (\Sigma Q) * 1/\text{ssf} * 1/\text{asf} * 1/\text{tsf}$$

Onde,

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

asf – “area sampling fraction” = área da caixa de contagem/área da matriz (x,y)

tsf – “tissue sampling fraction” = altura da caixa de contagem/espessura da secção

2.5 Análise Estatística

Em nosso estudo utilizaremos o método estereológico do fracionador óptico. Essa escolha é baseada no fato de que já foi demonstrado que as 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). Em cada análise foi utilizado n de 5 indivíduos em cada janela, com exceção das contagens de células c-Fos positivas que o erro adequado foi encontrado com apenas 4 indivíduos. Para medir possíveis erros metodológicos na contagem utilizamos o coeficiente de Scheaffer, cujo valor deve ser menor do que 0,05. 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, motivo de sua adoção neste trabalho (Glaser e Wilson, 1998). Para detectar se a distribuição dos dados é normal foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Como nossas análises envolveram apenas duas janelas amostrais e dados independentes, utilizamos o teste t de Student não pareado para detectar as diferenças entre as variáveis comparadas.

2.6 Fotomicrografia

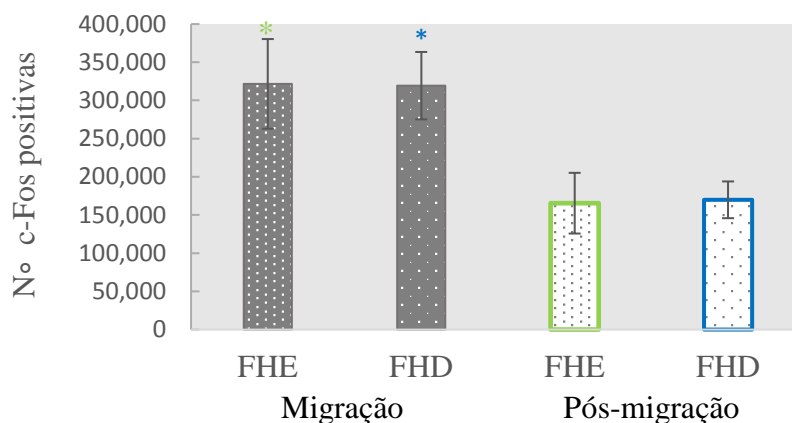
Usamos uma câmera digital (Microfire, Optronics, CA, EUA) acoplada a um microscópio NIKON Eclipse Ci para capturar imagens digitais. Para corrigir essas imagens em níveis de brilho e contraste, empregou-se o *software* Adobe Photoshop (CS6) e os ajustes foram aplicados a toda a imagem.

3. RESULTADOS

3.1. Estimativa do número total de células e ativação hipocampal

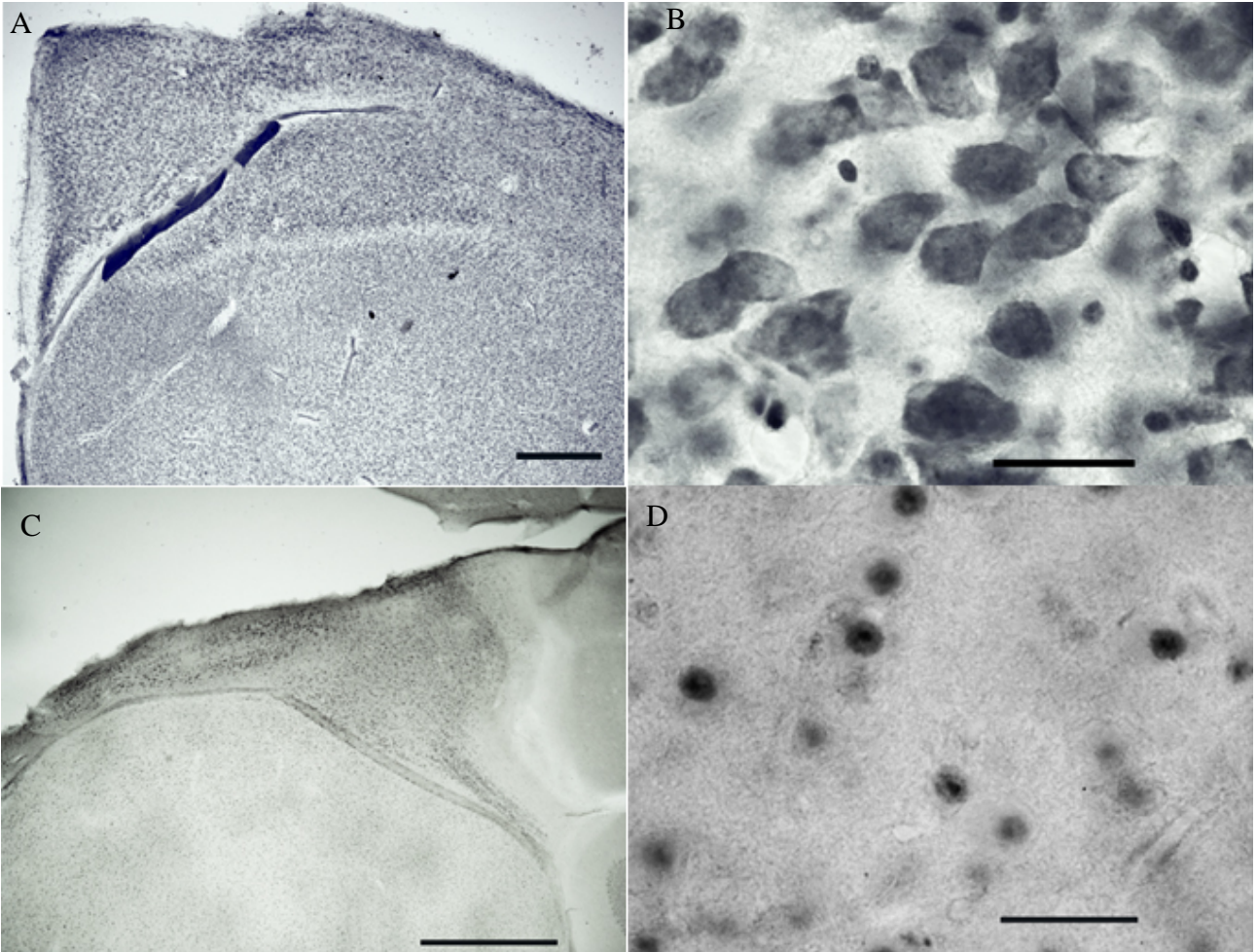
O número total de células neurais coradas com Nissl (Tabela 10 - Anexo I), durante a migração foram em média de $1.439.125 \pm 95.617$ DP (FHE) e $1.553.229,43 \pm 289.619$ DP (FHD). Esses números não diferem significativamente do número encontrado durante o período de pós-migração equivalentes a $1.286.786 \pm 259096$ (FHE) $1.229.902 \pm 280.326$ (FHD). A razão entre o número de células c-Fos positivas e o número total de células coradas com Nissl diminui do período migratório para o da pós-migração (FHE: migração $0,2223507238$ pós-migração $0,128588036$ FHD: migração $0,205590856$, pós-migração $0,138122506$). As células c-Fos positivas na formação hipocampal adulta dos maçaricos

Figura 4. Estimativa estereológica do número total de células c-Fos positivas na formação hipocampal direita (FHD) e esquerda (FHE), durante a migração e após a migração, em *Calidris pusilla*. (*) indica diferença significativa ($p < 0,02$) entre o período migratório e pós-migratório.



durante a migração representam aproximadamente 22% (FHE) e 20% (FHD) de todas as células dessa região. Essa proporção diminui para 12% (FHE) e 13% (FHD) no segundo momento analisado durante a pós-migração. Encontramos entre esses momentos uma diferença significativa, onde o número de células c-Fos positivas na formação hipocampal em média é maior durante a migração (FHE Migração 321.655 ± 83.046 DP; pós-migração 165.465 ± 56.186 DP; teste t de duas caudas, $t = 2,01$ $p = 0,02$; FHD migração 319.329 ± 88.248 DP; pós-migração 169.877 ± 48.120 DP; teste t de duas caudas, $t = 2,01$ $p = 0,03$) (Figura 4 –Tabela 11 –Anexo I).

Figura 5. Fotomicrografias de secção coronal da formação hipocampal do maçarico *Calidris pusilla*. (A) Baixo aumento, coloração de Nissl hemisfério direito, escala 500 μm (B) Grande aumento—objetiva 100x coloração de Nissl, escala 25 μm . (C) Baixo aumento, imunohistoquímica c-Fos hemisfério esquerdo, escala 500 μm . (D) Baixo aumento, imunohistoquímica c-Fos hemisfério esquerdo, escala 25 μm .

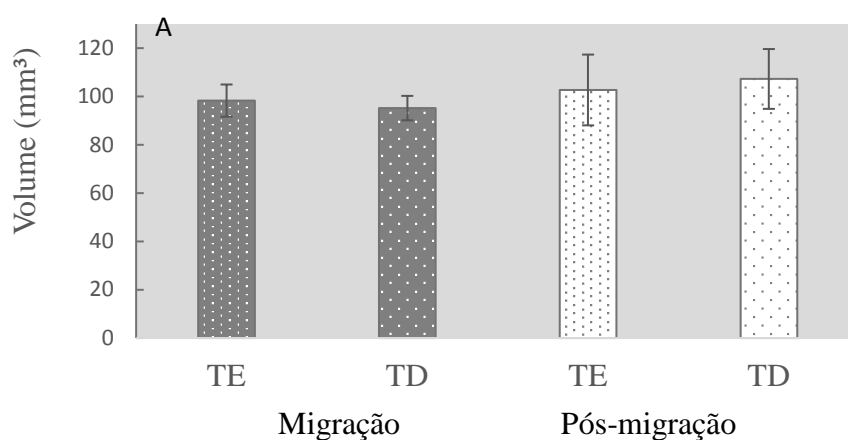


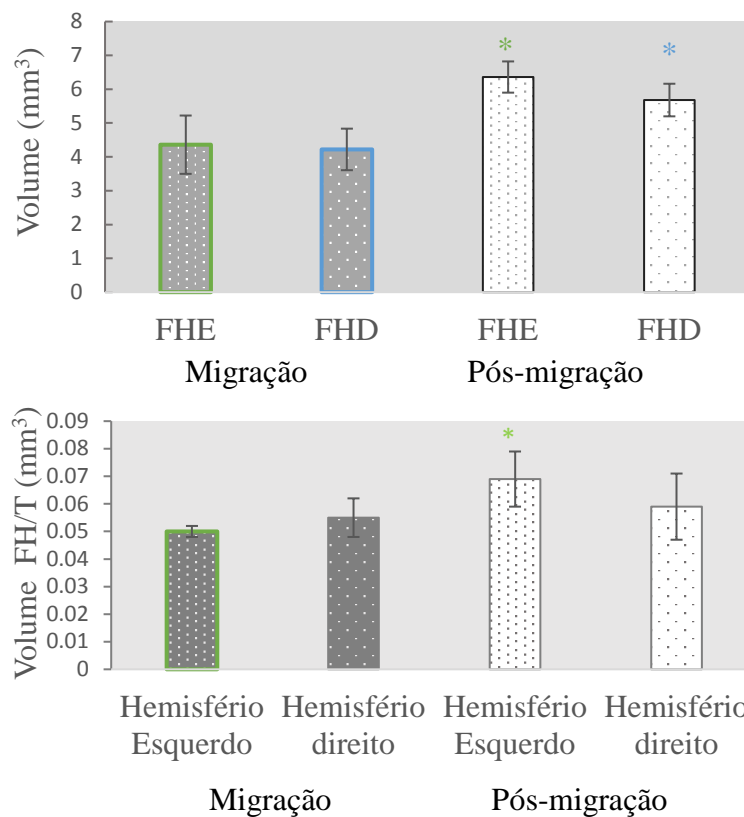
3.2. Volume Telencefálico e Hipocampal

Em geral, o efeito do processo migratório outonal de longa distância é mínimo sobre o volume do telencefalo. De fato, a diferença de volume entre períodos migratório (TE $98,28 \text{ mm}^3 \pm 6,66 \text{ DP}$, TD $95,18 \text{ mm}^3 \pm 5,05 \text{ DP}$) e pós-migratório (TE $102,68 \text{ mm}^3 \pm 14,65 \text{ DP}$, TD $107,24 \text{ mm}^3 \pm 12,38 \text{ DP}$) não foi significativa, bem como não encontramos diferenças no volume telencefálico entre os hemisférios (Figura 6, Tabela 15 - Anexo I).

Entretanto, o processo migratório exerce um efeito significativo sobre o tamanho do hipocampo, pois os volumes das formações hipocampais foram significativamente diferentes entre os maçaricos migrantes e os maçaricos que já completaram o processo (Formação hipocampal esquerda - FHE, migração de $4,46 \text{ mm}^3 \pm 0,7 \text{ DP}$; pós-migração $6,28 \text{ mm}^3 \pm 0,3 \text{ DP}$ teste-t, $t = 2,01$, $p = 0,003$ e Formação hipocampal direita - FHD migração $4,22 \text{ mm}^3 \pm 0,61 \text{ DP}$; pós-migração $5,68 \text{ mm}^3 \pm 0,48 \text{ DP}$ teste-t, $t = 2,3$, $p = 0,0030$). Durante a migração, a razão entre os volumes da formação hipocampal pelo telencefalo foram em média de $0,051 \pm 0,007$ (HE) e $0,055 \pm 0,007$ (HD) e no período de pós-migração $0,069 \pm 0,012$ (HE) e $0,057 \pm 0,012$ (FHD). Sendo que a diferença só foi significativa no hemisfério esquerdo, $t=1,94$ $p=0,02$ (Figura 6. Tabela 15 Anexo I).

Figura 6. **A.** Estimativa do volume médio do telencefalo de *Calidris pusilla* adulto. Mostrando que não há diferenças significativas entre as diferentes fases do processo migratório (durante a migração sul, barras escuras e durante a pós-migração, barras claras), entre os hemisférios TE: Telencefalo esquerdo, TD: Telencefalo direito. **B.** Volume médio da Formação hipocampal de *Calidris pusilla* adulto. Mostrando as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes fases do processo migratório (durante a migração sul, barras escuras e durante a invernada, barras claras). Mas não entre os hemisférios de uma mesma janela FHE: Formação hipocampal esquerda FHD: Formação hipocampal direita **C.** Razão entre os volumes do telencefalo e da formação hipocampal. T: telencefalo. * Mostrando que há diferença significativa ($p < 0,02$) entre o período migratório e pós-migração apenas entre os hemisférios esquerdos.





O volume da FHE representa durante a migração $5,05\% \pm 0,65$ DP do telencéfalo esquerdo (TE) e o FHD corresponde a $5,4\%; \pm 0,71$ DP do telencéfalo direito (TD). E no período, pós-migração a FHE corresponde a $6,8\% \pm 0,3$ DP do TE e a FHD $5,8\% \pm 1,19$ DP de TD.

3.3 Quantificação da Neurogênese

A duplacortina foi amplamente expressa no telencéfalo adulto de *Calidris pusilla* em ambas as condições estudadas, não havendo diferença significativa entre as médias do número total de células DCX-positivas estimados no período de migração (TE: $1.941.675 \pm 541.687$ DP, TD: $1.855.751 \pm 503.774$ DP) e no de pós-migração (TE: $2.268.062 \pm 544.394$ DP, TD: $2.378.258 \pm 687.701$ DP), nem entre os hemisférios de um mesmo período (Tabela 16 -Anexo I).

Encontramos diferença significativa no número de neurônios DCX-positivos no hipocampo, entre as aves em migração (Figura 7. E; F; G; H) e as aves em pós-migração (Figura 7. A; B; C; D), (Figura 7, 8 Tabela 12 –Anexo I). As aves no período de pós-migração tiveram mais neurônios novos, 2,4 vezes na FHE e 2,2 vezes na FHD, do que as migratórias (FHE: pós-migração $133.143,80 \pm 15.551,80$, migração $55.057,95 \pm 12.171,50$, teste t de duas caudas, $t = 2,36$ $p = 0,00007$ e FHD: pós-migração $122.750,62 \pm 22.099,45$, migração $54.032,69 \pm 13.633,76$, teste t de duas caudas, $t = 2,36$ $p = 0,00058$).

Figura 7. Neurônios imunomarcados com duplacortina na formação hipocampal. (A) Fotomicrografias da formação de hipocampal no período de pós-migração, objetiva de 4x (B) objetiva de 10x, (C) de objetiva 20x e (D) objetiva de 100x. (E) Fotomicrografias da formação hipocampal no período migratório (F) Objetiva de 4x, (F) Objetiva de 10x (G) Objetiva de 20x (H) Objetiva de 100x. Barras de escala: A e E - 500 μ m; B e F - 250 μ m; C e G - 125 μ m; D e H - 25 μ m..(I).

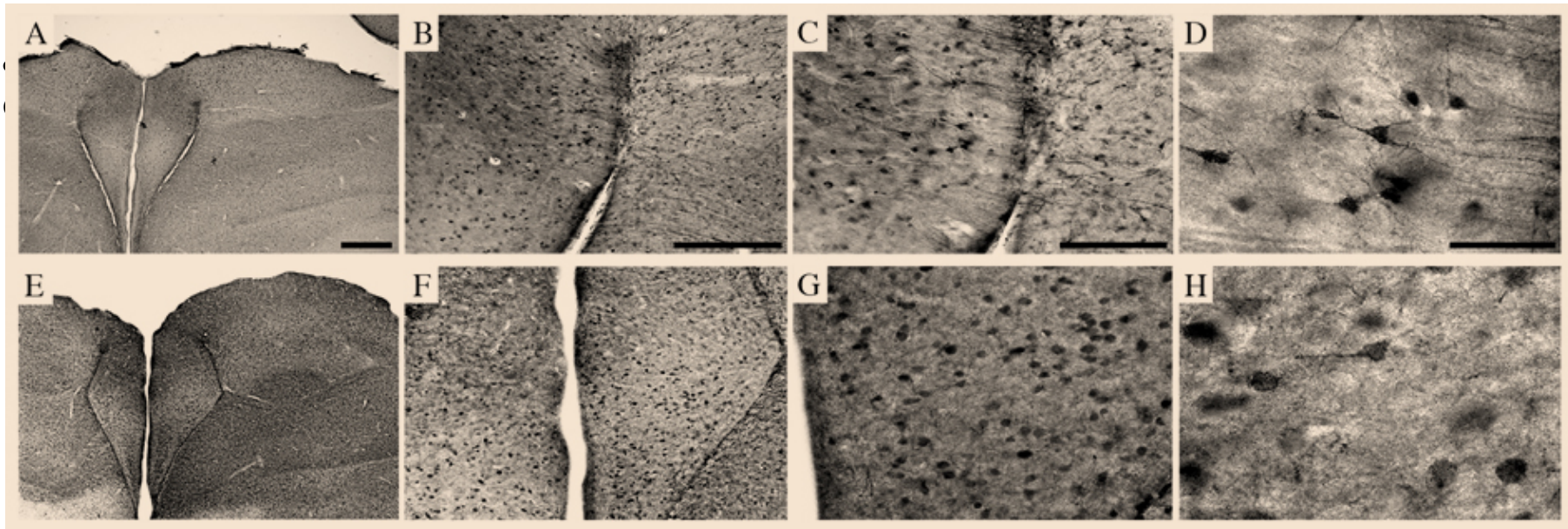
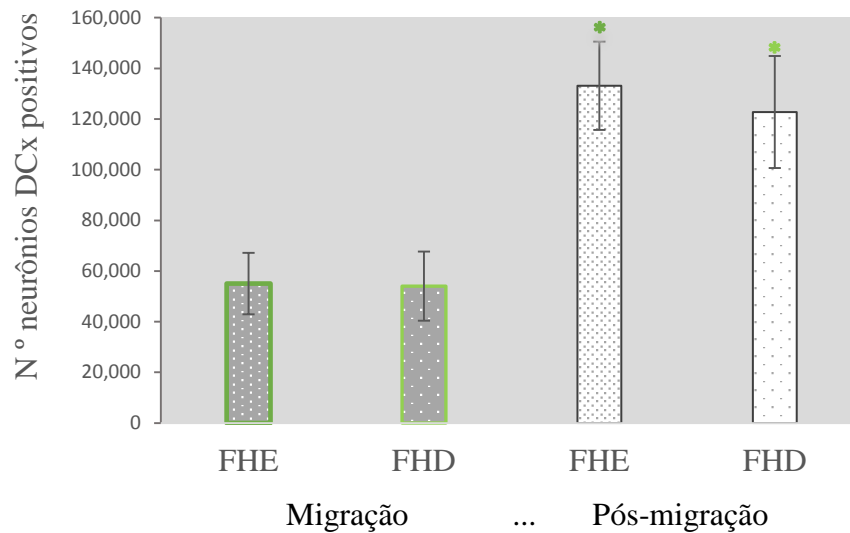


Figura 8. Estimativa do valor médio do número de neurônios expressando duplacortina amostrados na FH de *Calidris pusilla* adulto. Mostrando as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes fases do processo migratório (durante a migração sul, barras escuras e durante invernada, barras claras). Mas não entre os hemisférios de uma mesma janela, FHE: Formação hipocampal esquerda, FHD: Formação hipocampal direita.



Durante a migração o *Calidris pusilla* possui em média na formação hipocampal esquerda (FHE) $946.247 \pm 139,352$ DP neurônios NeuN positivos e $980.469 \pm 127,132$ na formação hipocampal direita (FHD) e um total de $1.001.324,92$ neurônios na FHE e $1.034.501,74$ na FHD (Figuras 9 e 10. A Tabela 13- Anexo I). Durante a migração os neurônios novos (Dcx positivos) representam média 5% da população total de neurônios amostrados que são os neurônios Dcx positivos somados aos NeuN positivos.

Figura 9. Fotomicrografias de secção coronal da formação hipocampal do *Calidris pusilla* coletados durante a migração, mostrando neurônios maduros NeuN positivos. (A) Em baixo aumento, Objetiva 4x, escala $500 \mu\text{m}$. (B) Em grande aumento, Objetiva 100 x, escala $25 \mu\text{m}$.

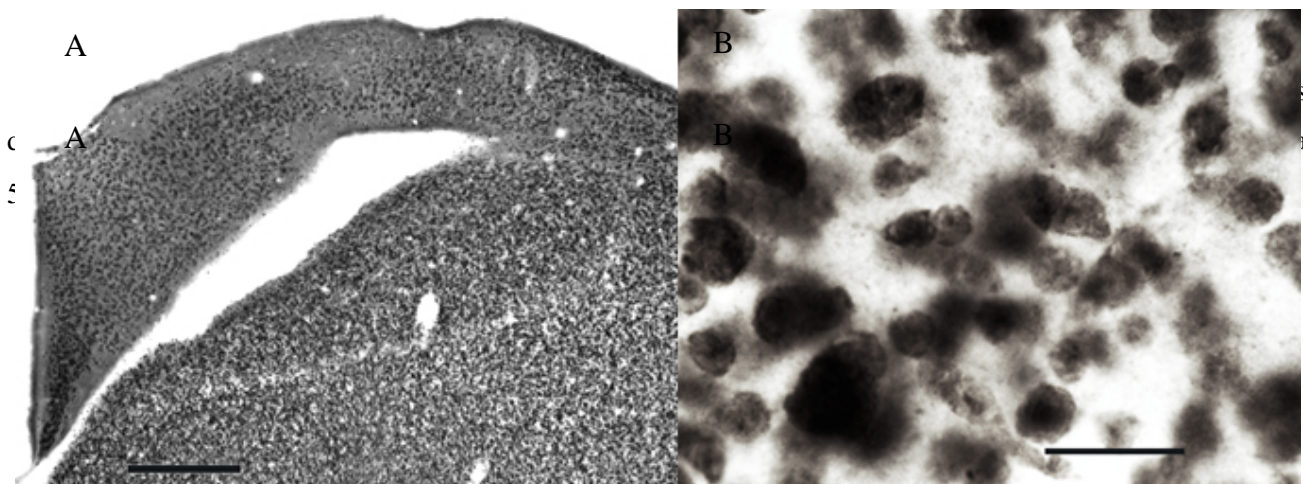
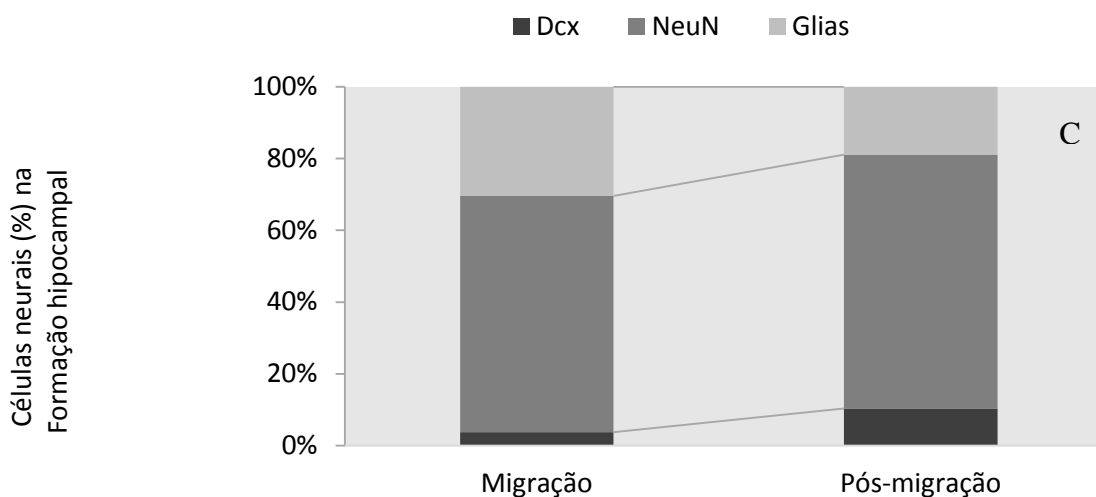
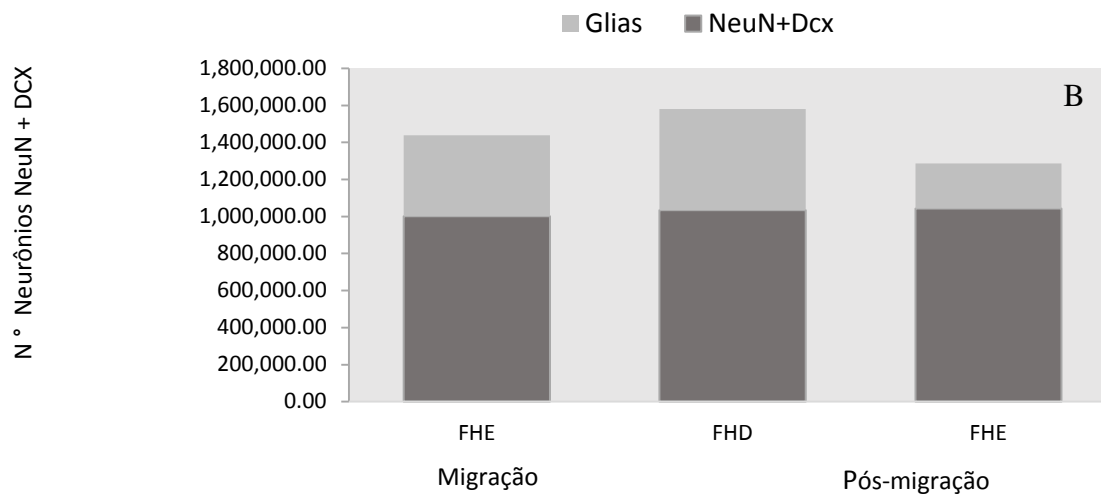
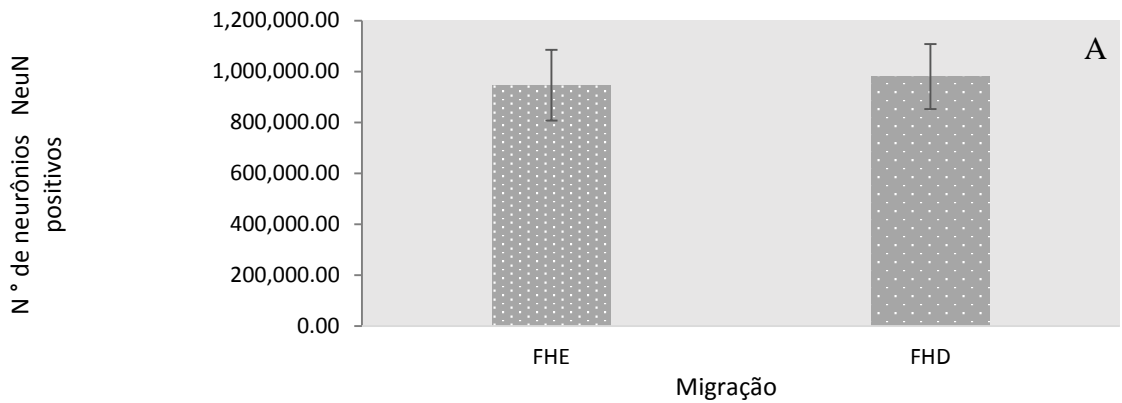


Figura 10. (A) Estimativa estereológica do número de neurônios NeuN positivos durante a migração na formação hipocampal de *Calidris pusilla*. FHD: formação hipocampal direita. FHE formação hipocampal esquerda (B). Mostra uma representação dentro do número médio de células totais (Nissl) da formação hipocampal o número médio de neurônios totais (DCX+NeuN) e de Glia da FHE e FHD durante a migração e da FHE durante a pós-migração. Estimativas de neurônios NeuN positivos retirados de Guerreiro-Diniz et al.,2016. (C) Mostra a representação da porcentagem do número de neurônios maduros, glia e neurônios novos durante e após a migração.



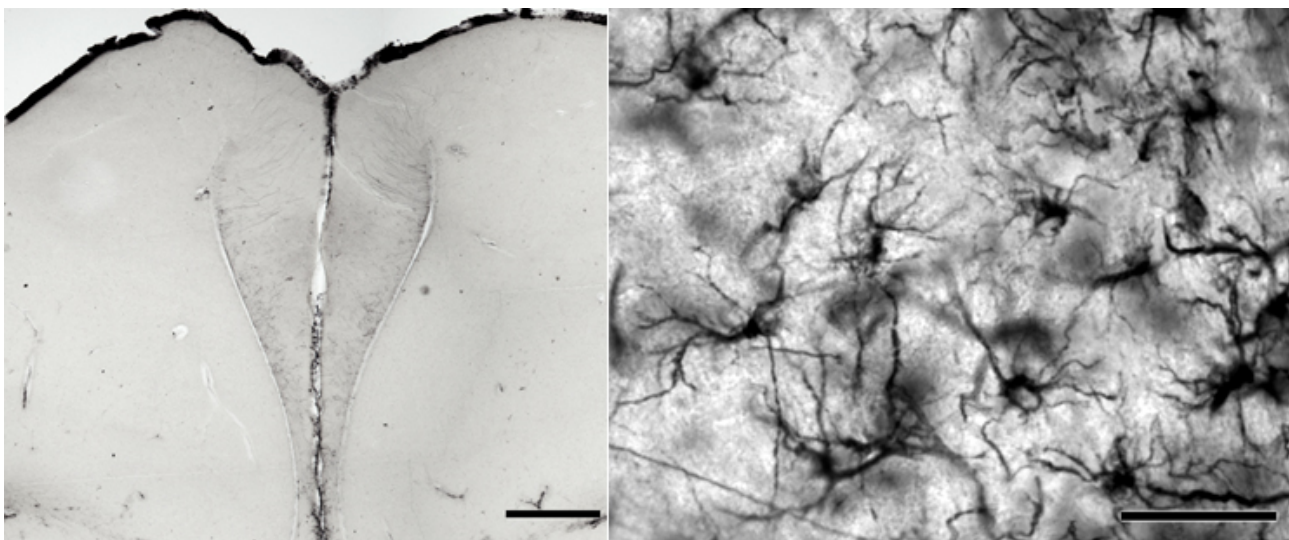
Encontramos uma porcentagem de neurônios 70,68% após a migração se completar em comparação a 65,75% durante a migração. Sendo que a proporção de glias diminui para 18,97% no período pós-migração em comparação ao 30,42% encontrados em plena atividade migratória .

A razão entre o número médio de neurônios Dcx-positivos e o número médio total de células (Nissl) existentes na formação hipocampal no período migratório (FHE: $0,038075146 \pm 0,006051666$; FHD: $0,036555445 \pm 0,013608899$) para o pós-migratório (FHE: $0,108574605 \pm 0,026240065$; FHD: $0,101327613816783 \pm 0,012935158$).

As células Dcx-positivas produzidas na formação hipocampal adulta dos maçaricos enquanto estão migrando representam aproximadamente 3,03% (FHE) 3,05% (FHD) do total de células novas produzidas no telencéfalo, 5,9%(FHE) do total de neurônios maduros da formação hipocampal e 3,8% (FHE) 3,6% (FHD) do total de células na formação hipocampal. Durante o período pós-migratório essa proporção aumenta, alcançando 6% (FHE) 5,3% (FHD) do total de células Dcx-positivas produzidas no telencéfalo, 27% (FHE) dos neurônios maduros e 10,8%(FHE) 10,1%(FHD) de todas as células da formação hipocampal.

O número total de astrócitos GFAP positivos da formação hipocampal reduz significativamente (teste de duas caudas t, $p < 0,003$, $t = 4,75$) realizado em *C. pusilla* após a migração (FHD 70.636 ± 17576 , média \pm DP) em comparação com os indivíduos em migração (FHD 154.656 ± 35422) (Figura 11. Tabela 14-Anexo I).

Figura 11. Fotomicrografia de secção coronal da formação hipocampal de *Calidris pusilla*, mostrando astrócitos GFAP positivos, pós-migração. (A) objetiva de 4x, escala 500 μ m (B) objetiva 100x μ m, escala 25 μ m.



4 DISCUSSÃO

Após a Baía de Fundy ter sido deixada para trás, o voo transatlântico inicia e se completa após cerca de seis dias de voo ininterrupto em direção à costa da América do Sul (Brown, S, 2014). Essa experiência migratória de longa distância, com voos sem escala, por si só, pode provocar as mudanças hipocampais que encontramos, resultando em uma formação hipocampal com menos células ativas e astrócitos, contrastando com volume maior e maior número de neurônios novos após a migração. Aparentemente esse processo não influenciou o número total de neurônios maduros sugerindo que a neurogênese contribuiu para a manutenção inalterada do número total de neurônios.

Assim, embora o número de células totais não sofra alteração, ocorre uma mudança no padrão de ativação revelado por genes de expressão rápida (c-Fos) no hipocampo quando comparamos indivíduos capturados durante o período migratório em sítio de parada no Canadá com os capturados no Brasil, demonstrando que a formação hipocampal está ativa durante a migração. Uma hipótese para interpretar esses achados seria a de que isso ocorre em resposta aos diferentes contextos visuo-espaciais encontrados, em cada um dos sítios.

A formação hipocampal é uma das regiões cerebrais conhecidas por participar da navegação e tarefas de orientação espacial (Herold *et al.*, 20015; Bingman *et al.*,1998). Numerosos estudos consolidam a hipótese de que o hipocampo oferece contribuição fundamental para a cognição espacial e está envolvido no controle dos aspectos sofisticados da navegação, como integração multimodal de informações sensoriais e mapa de reorientação corretiva sucedendo algum deslocamento natural ou erro de navegação (Herold *et al.*, 2; Mouritsen, H. *et al.*, 2016). Embora em nosso estudo não possamos saber a quais estímulos especificamente essas células estão respondendo ao expressar o c-Fos como marcador de atividade. As experiências com IEGs mostrando mudanças significativas nos padrões de ativação hipocampal, assim como as que encontramos aqui confirmam o papel do hipocampo na navegação espacial (Smulders e Devoogd, 2000; Mayer e Bischof, 2012). Independente se a resposta está relacionada ao armazenamento de memória ou aumento da atividade neuronal em resposta a mudanças no campo magnético (Keary e Bischof, 2012; Mayer e Bischof, 2012).

Hoje é bem descrito que as espécies migratórias têm memória espacial melhor e hipocampo maior do que as espécies não migratórias. Coerente com esse ponto de vista está a evidência em *Sylvia borin* (uma espécie migratória) de que à experiência migratória promove aumento relativo no volume do hipocampo (Healy, S. D. *et al.*, 1996). Mettke-Hofmann e Gwinner (2003), encontraram diferenças na memória de longo prazo entre as espécies *Sylvia borin* (migratória) e *Sylvia melanocephala* (não migratória), mas não ficou claro se essas diferenças foram relacionadas às diferenças no hipocampo e que tipo de memória foi afetada pelo comportamento migratório. Embora alguns estudos não tenham encontrado diferenças no volume do hipocampo entre espécies migratórias e não migratórias de *Junco*

hyemalis, os dados descrevem que a espécie migrante têm melhor memória espacial (Cristol, D. A. *et al.*, 2003). De fato, estudos anteriores tendo o hipocampo como região de interesse realizados em duas subespécies de aves do gênero *Zonotrichia*, uma migratória e outra não migratória, revelaram que as migrantes possuem hipocampo maior em relação ao telencéfalo (Ladage, Lara D *et al.*, 2011). Posteriormente outros trabalhos com a mesma espécie revelaram volumes hipocampais absolutos comparáveis (Roth *et al.*, 2012). De qualquer forma, tanto aves que estocam alimentos e precisam recuperá-los voltando aos sítios onde os armazenaram (Barnea, A. e Pravosudov, V., 2011) quanto as aves migratórias que precisam recuperar a rota de migração (Pravosudov, V. V. *et al.*, 2006) requerem aprendizado e memória espacial.

De forma coerente, portanto, foi sugerido que as diferenças entre uma subespécie migratória e a não migratória detectadas através dessas análises refletem diferenças na memória espacial associada ao comportamento migratório. Essas tarefas hipocampo-dependentes podem gerar alteração no número de elementos celulares (neurônios ou gliais) hipocampais, que em maior ou menor proporção são relevantes para consolidação do aprendizado e memória. Entretanto, continua sob investigação em que extensão a memória é afetada pela experiência migratória (Healy, S. D. *et al.*, 1996).

Não foi possível distinguirmos entre fenótipos de morfologia alongada (migratórios) e recrutados (esféricos) (Balthazart *et al.*, 2008; Hall e Macdougall-Shackleton, 2012) quando da quantificação de células imunomarcadas para duplacortina, mas em geral as taxas de neurogênese da formação hipocampal de aves migrantes de longa distância, são maiores após o processo migratório sul se completar, do que durante a migração. Essa diferença pode não ser global (telencéfalo), uma vez que o número das células Dcx-positivas no telencéfalo não diferiram nos maçaricos em migração daqueles no período de pós-migração. Não está excluída, entretanto, a possibilidade de diferentes taxas de neurogênese em diferentes regiões e isso pode ter implicações funcionais distintas. Na parte rostral do telencéfalo, encontram-se as regiões que processam informações visuais/celestiais e magnéticas pois a navegação de longa distância transoceânica e transcontinental faz uso dessas informações (Mouritsen, *et al.*, 2017). Igualmente importantes são as regiões que estão na parte caudal onde ficam o hipocampo e o nidopallium caudo-lateral responsáveis pela integração das informações sensoriais e planejamento do voo e suas modificações com base em novas informações adquiridas durante o trajeto (Frost e Mouritsen, 2006; Thorup e Holland, 2009). É importante lembrar que os mapas de gradientes aprendidos e pistas referenciais locais usando várias modalidades sensoriais estão associados ao comportamento migratório terrestre de curta distância (Biro *et al.*, 2004; Frost e Mouritsen, 2006). Assim, estas últimas talvez sejam mais utilizadas próximo a chegada dos sítios de parada. O ambiente através do qual as aves voam muda drasticamente durante este voo e as aves provavelmente integram em outras áreas além da formação

hipocampal pistas adicionais importantes para completar a migração com êxito (Bingman e Cheng, 2005; Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016).

Para investigar sobre relação das células Dcx-positivas geradas durante a migração e o número de neurônios maduros nos dois momentos da migração, ou seja, durante e após o processo se completar (Figura 8.B), comparando com os dados de Guerreiro-Diniz *et al.*, 2016. Empregando imunomarcagem para NeuN não encontramos diferença significativa entre os indivíduos capturados em momentos diferentes do trajeto migratório, indicando que, o número total de neurônios não aumenta após cada migração e os neurônios recém-gerados parecem compensar a perda que pode ocorrer durante o voo transatlântico. E a neurogênese hipocampal em *C. pusilla* assim como, em *Poecile atricapillus* é parte de um processo de substituição neuronal, em vez de um aumento progressivo do número de neurônios no hipocampo (Barnea e Nottebohm, 1994). Assim a diferença no volume do hipocampo pode estar relacionada a outras modificações que não resultam de alterações de números neuronais. Sugerimos que outras alterações numéricas e/ou morfológicas e/ou expansão da matriz extracelular possam contribuir para as diferenças de volume do hipocampo.

As aves possuem uma relação entre neurônio e peso cerebral bem maior que a exibida nos mamíferos, contendo muito mais neurônios no pálio aviário que os mamíferos de tamanho equivalente. Sendo que, a densidade de células não neuronais (gliais e endoteliais) no telencéfalo parece ser distintamente inferior nas aves do que nos mamíferos (Olkowicz *et al.*, 2016). Nossos achados caminham na mesma direção (Figura 10.B), entretanto, investigamos apenas os números celulares da formação hipocampal inviabilizando uma comparação direta.

Sabe-se que as aves adultas migratórias, tem relativamente uma maior densidade de neurônios novos hipocampais do que adultos não migratórios (Ladage, Lara D *et al.*, 2011). Esses achados corroboram dados anteriores de Pradosudov, *et al.*, 2012 que mostraram na mesma espécie que os indivíduos da subespécie migrante tinham mais neurônios hipocampais totais do que a subespécie não migratória, em concordância com os achados de Cristol *et al.*, 2003. Em linha com esses dados estão aqueles obtidos a partir da comparação entre a subespécie migratória (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) com a não migrante *Z. l. nuttalli*, demonstrando maior número de neurônios duplacortina-positivos no hipocampo da espécie migrante (Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016). Esses novos neurônios em espécies migrantes, podem ser importantes para consolidar e recuperar informações para construção de mapas que serão usados em migrações futuras.

Sugerimos que os efeitos específicos do período pós-migração que resultam em neurogênese elevada possam também estar relacionados à preparação para a migração que ocorre na primavera em direção ao norte. Esse trecho da viagem que inclui vários sítios de parada ao longo do continente, teria que contar inclusive com a utilização de mapas baseados em memória de longo prazo, construídos ao

longo de migrações anteriores (Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016). Tem sido sugerido igualmente que em indivíduos que precisam ainda aprender o caminho, esses novos neurônios podem ser usados para suprir funções distintas em redes neurais diversificadas (Kempermann, 2008). Tomando-se os dados em conjunto é razoável sugerir que o aumento do número de novos neurônios no hipocampo pode estar associado ao aumento do processamento espacial dependente de experiência (Döbrössy *et al.*, 2003; Hairston *et al.*, 2005; Ladage *et al.*, 2010). Esses novos neurônios migram e entram nas redes neurais se tornando importantes, tanto para a localização espacial (Markakis e Gage, 1999; Clelland *et al.*, 2009) quanto para memória e aprendizagem de longo prazo (Ladage *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2014).

Um outro aspecto importante que tem sido enfatizado é o da especialização hemisférica. De fato foi sugerido que o hipocampo direito parece codificar pistas espaciais globais e podem estar envolvidos em comportamento migratório (Pravosudov, V. V. *et al.*, 2006). Adicionado a isso, trabalhos com pombos mostraram que lesões no hipocampo direito interferem na aprendizagem da bússola solar (Gagliardo *et al.*, 2005). No presente trabalho, entretanto, não encontramos diferenças no número de neurônios maduros, entre os hemisférios direito e esquerdo, tanto em indivíduos em migração quanto em indivíduos em invernada (Guerreiro-Diniz *et al.*, 2010). No pardal, Ladage, Lara D *et al.* (2011) sugerem que a produção de novos neurônios hipocampais poderia explicar a diferença encontrada entre pardais migradores e não migradores. Eles arguem que a neurogênese é regulada pelo processamento espacial e sugerem que maiores demandas de reconhecimento espacial estão associadas ao aparecimento de novos neurônios no hipocampo (Hastings e Gould, 1999; Döbrössy *et al.*, 2003; Hairston *et al.*, 2005; Ladage *et al.*, 2010).

Assim, as espécies migrantes de um modo geral apresentam comportamentos consistentes com aumento de demanda de aprendizagem e memória espacial, e isso parece evidente quando os pássaros migrantes precisam consolidar informação espacial para retornar aos mesmos sítios de parada em direção aos sítios de invernada (Winker *et al.*, 1992; Estelle *et al.*, 1996), como o *Calidris pusilla* (Weber, 2009), sendo essa orientação uma tarefa aprendida. Além disso, as aves migratórias executam com melhor desempenho tarefas de memória espacial (Cristol *et al.*, 2003; Pravosudov, Vladimir V *et al.*, 2006) e têm melhor memória de longo prazo (Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003). Em concordância, adultos e aves juvenis migratórias apresentam número e densidades similares de novos neurônios no hipocampo e que o efeito da idade na neurogênese parece não ser o mesmo em diferentes regiões cerebrais (Ladage *et al.*, 2010).

O trajeto migratório é visuo-espacialmente enriquecido, ocorrendo processos perceptuais que utilizam navegação celestial, olfativa e geomagnética, de acordo com a distância da meta final (Mouritsen, H. *et al.*, 2016). No geral, a migração de longa distância pode ser considerada um tipo de enriquecimento ambiental onde as aves migratórias de longa distância ativam maior recrutamento de

novos neurônios, possivelmente por serem expostos a maior diversidade de informações espaciais em comparação aos migrantes de curtas distâncias (Barkan *et al.*, 2016b). Coerente com esse ponto de vista, o efeito do enriquecimento ambiental também está associado à elevada neurogênese e recrutamento neuronal no giro denteado em mamíferos roedores (Bednarczyk *et al.*, 2011; Gregoire *et al.*, 2014).

Uma outra forma de interpretar os achados de menor neurogênese na formação hipocampal nos indivíduos capturados na Baía de Fundy seria a evidência de que os glicocorticoides (que regulam a taxa de neurogênese para baixo), estão elevados em aves migrantes de longas distâncias quando se preparam para a migração, acumulando reservas de gordura para a viagem e durante as escalas para reabastecimento (Piersma *et al.*, 2000; Eikenaar *et al.*, 2014)). Além disso é razoável antecipar que o exercício físico extenuante durante o voo transatlântico mantenha esses níveis de glicocorticoides elevados, postergando o aumento da neurogênese hipocampal para o período de invernada. (Barnea, Anat e Pravosudov, Vladimir, 2011; Aimone *et al.*, 2014; Cameron e Glover, 2015; Ladage, 2015). De fato pode ser que o efeito do voo transatlântico pró-proliferativo se estenda aos estágios subsequentes (Kronenberg *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 2008) com aumento de angiogênese, resultando numa melhor distribuição de oxigênio, neurotrofinas e nutrientes e que mesmo quando voltam aos níveis basais, a população Dcx positiva continua a aumentar (Kronenberg *et al.*, 2003). Coerentemente já está descrito que espécies migratórias quando se exercitam voando, apresentam níveis de neurogênese no hipocampo maiores do que quando não fazem exercício de voo (Hall *et al.*, 2014).

Diferente da neurogênese estão os números encontrados para astrócitos imunomarcados para GFAP que estão diminuídos nos animais capturados na costa de Bragança. Esse número de astrócitos menor, pode estar associado igualmente ao estresse imposto pelo voo sem escalas. O número maior de astrócitos durante a migração pode estar associado a uma série de eventos incluindo sua associação à fatores neurotróficos essenciais ao microambiente que sedia o nicho neurogênico e sua interação com células progenitoras neurais (Barkan *et al.*, 2016b).

Se o aumento da atividade cognitiva, enriquecimento ambiental e voo de longa distância são as causas do aumento de volume no hipocampo e da neurogênese em *Calidris pusilla*, os efeitos são observados após o trajeto de migração de longa distância se completar. De fato, os pássaros que foram capturados na Baía de Fundy no Canadá, percorreram menor distância e talvez tenham sido submetidos a uma variedade de estímulos multissensoriais semelhantes aos da sua área de reprodução no Canadá (Lank *et al.*, 2017), possivelmente diferentes daquelas experimentadas durante a viagem transatlântica e das encontradas nas áreas de invernada.

Além disso a dieta encontrada nos sítios de descanso no Canadá inclui grandes quantidades do anfípodo *Corophium volutator* nos quais 45% dos lipídios totais estão na forma de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) (Hampton, 1996b; Nagahuedi *et al.*, 2009; Weber, 2009) e isso pode ser

diferente da dieta encontrada no Brasil. A diferença na dieta, pode igualmente ser mais um fator que influencia na formação de novos neurônios, visto que uma dieta rica em PUFA leva a menor neurogênese hipocampal do que uma dieta baixa em PUFA (Hall *et al.*, 2014).

É difícil distinguir o peso relativo das contribuições de cada um dos fatores que afetam a neurogênese previamente descritos, e que estão atuantes durante o processo migratório sul. De fato, o enriquecimento ambiental, as mudanças na dieta, o estresse e a duração do ciclo de iluminação, que podem ser alterados ao longo da viagem migratória podem afetar o SNC em múltiplos domínios, incluindo as células da glia, os neurônios, a matriz extracelular e a neurogênese propriamente dita. Não temos, entretanto, como excluir a possibilidade da ocorrência de alterações numéricas em outras células além das Dcx-positivas, como por exemplo na população de células microgliais ou mesmo na matriz extracelular que possam estar contribuindo para explicar as diferenças no volume da formação hipocampal e do telencéfalo.

Assim, sugerimos que se a migração de longa distância atua para aumentar a neurogênese, seus efeitos serão aparentes após o processo de migração na direção sul se completar. De fato, o presente trabalho mostra de forma inequívoca que a neurogênese durante a migração entre o sítio reprodutivo e a primeira grande escala na Baía de Fundy é menor do que aquela observada após o voo transatlântico de longa distância. Nesse ponto de parada usado por 75% da população de *C. pusilla* (Weber, 2009), as aves ainda se encontram dentro da primeira fase da navegação de longa distância (Mouritsen, Henrik *et al.*, 2016) quando o hipocampo recebeu apenas parte da estimulação multissensorial associada aos ambientes encontrados durante a viagem. Essa interpretação é coerente com a evidência significativa de menor neurogênese nos indivíduos coletados na Baía de Fundy. Por outro lado, a dieta rica em PUFA (Weber, 2009) que esses indivíduos utilizam pode estar contribuindo para o aumento dos níveis de corticosteroides corroborando para redução da neurogênese hipocampal. Podemos supor ainda que essa diminuição pode estar associada ao elevado número de astrócitos expressando GFAP na formação hipocampal nessa janela migratória, já que, o metabolismo glial parece ser um modulador chave da neurogênese hipocampal adulta, onde a combinação dos fatores secretados pelos astrócitos no microambiente local são essenciais para o nicho neurogênico (Barkan *et al.*, 2016b).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados relacionados a esses objetivos, concluímos que o comportamento migratório outonal de longa distância gera alterações no número dos elementos celulares e do volume da formação hipocampal promovendo:

- Diminuição do número de células C-Fos positivas e de astrócitos GFAP positivos.
- Aumento da neurogênese e do volume hipocampal das aves, sem que o número total de neurônios maduros imunomarcados para NeuN seja alterado.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Quantificar a neurogênese antes da migração outonal no hemisfério norte e antes da migração primaveril no hemisfério sul, (utilizando além dos marcadores para células Dcx positivas, marcadores para angiogênese; proliferação celular; morte celular; e dupla marcação para neurônios novos e maduros).
- Descrever a dieta nos sítios reprodutivos antes da migração outonal e no sítio de descanso após a migração outonal.
- Sequenciamento do neurotranscriptoma de *Calidris pusilla* antes do voo transatlântico e análise do transcriptoma pós-migração.
- Monitorar os níveis de corticosterona durante o período de pós-migração outonal.

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez que as aves marinhas migratórias de longa distância oferecem janela de oportunidade única para investigar muitas questões relacionadas à neurobiologia celular da migração de uma forma geral, e em particular, sobre a plasticidade neural associada à função da neurogênese do hipocampo adulto das aves.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. Modeling new neuron function: a history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1160-1169, 2011. ISSN 1460-9568.
- AIMONE, J. B. et al. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 991-1026, 2014.
- AIMONE, J. B.; WILES, J.; GAGE, F. H. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. **Neuron**, v. 61, n. 2, p. 187-202, 2009. ISSN 0896-6273.
- AMIN, E. et al. Novel temporal configurations of stimuli produce discrete changes in immediate-early gene expression in the rat hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2611-21, Nov 2006. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17100849> >.
- ANTAS, P. T. Migration of Nearctic shorebirds (Charadriidae and Scolopacidae) in Brazil—flyways and their different seasonal use. **Wader Study Group Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 52-53, 1983.
- ASHTON, R. S. et al. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 1399-1406, 2012. ISSN 1097-6256.
- AZEVEDO JÚNIOR, S.; LARRAZÁBAL, M. Censo de aves limícolas na Coroa do Avião, Pernambuco, Brasil, informações de 1991 a 1992. **Revista Nordestina de Zoologia**, v. 1, n. 1, p. 263-277, 1994.
- BAILEY, C. H.; KANDEL, E. R. Structural changes accompanying memory storage. **Annu Rev Physiol**, v. 55, p. 397-426, 1993. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8466181> >.
- BALTHAZART, J. et al. Doublecortin as a marker of adult neuroplasticity in the canary song control nucleus HVC. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 801-817, 2008. ISSN 1460-9568.
- BARKAN, S. et al. Possible linkage between neuronal recruitment and flight distance in migratory birds. **Scientific reports**, v. 6, p. 21983, 2016a. ISSN 2045-2322.
- _____. Possible linkage between neuronal recruitment and flight distance in migratory birds. **Scientific reports**, v. 6, 2016b.
- BARKHO, B. Z. et al. Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. **Stem cells and development**, v. 15, n. 3, p. 407-421, 2006. ISSN 1547-3287.
- BARNEA, A. Interactions between environmental changes and brain plasticity in birds. **Gen Comp Endocrinol**, v. 163, n. 1-2, p. 128-34, Sep 01 2009. ISSN 1095-6840 (Electronic) 0016-6480 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19361509> >.

BARNEA, A.; NOTTEBOHM, F. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 23, p. 11217-11221, 1994. ISSN 0027-8424.

BARNEA, A.; PRAVOSUDOV, V. 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.

BARNEA, A.; PRAVOSUDOV, V. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. **Eur J Neurosci**, v. 34, n. 6, p. 884-907, Sep 2011. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21929623> >.

BEDNARCZYK, M. R. et al. Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment. **Hippocampus**, v. 21, n. 12, p. 1334-47, Dec 2011. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20623741> >.

BEGUM, M. R.; SNG, J. C. G. Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. **J Neurochem**, Jun 2017. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28628196> >.

BERCHTOLD, N. C.; CASTELLO, N.; COTMAN, C. W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, v. 167, n. 3, p. 588-597, 2010. ISSN 0306-4522.

BERNAL, G. M.; PETERSON, D. A. Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. **Aging cell**, v. 10, n. 3, p. 466-482, 2011. ISSN 1474-9726.

BEST, P. J.; WHITE, A. M.; MINAI, A. Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 459-486, 2001. ISSN 0147-006X.

BIMONTE, H. A.; NELSON, M. E.; GRANHOLM, A. C. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 1, p. 37-48, Jan-Feb 2003. ISSN 0197-4580 (Print) 0197-4580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493549> >.

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.; ABLE, K. P. Maps in birds: representational mechanisms and neural bases. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 6, p. 745-750, 2002. ISSN 0959-4388.

BIRO, D.; MEADE, J.; GUILFORD, T. Familiar route loyalty implies visual pilotage in the homing pigeon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 50, p. 17440-17443, 2004. ISSN 0027-8424.

BROWN, S. The Remarkable Odyssey of a Semipalmated Sandpiper. Canadá, 2014. Disponível em: < <http://shorebirdscience.org/coats-2014-06/> >. Acesso em: 08 de Outubro.

BROWN, S. **The Remarkable Odyssey of a Semipalmated Sandpiper.** <http://shorebirdscience.org/coats-2014-06/>: <http://shorebirdscience.org/> 2014.

CAMERON, H. et al. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 337-344, 1993. ISSN 0306-4522.

CAMERON, H. A.; GLOVER, L. R. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. **Annual Review of Psychology**, v. 66, p. 53-81, 2015.

CHILTON, H. Partners in practice: riding the waves of change. **Can J Occup Ther**, v. 62, n. 4, p. 183-7, Oct 1995. ISSN 0008-4174 (Print). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10151787>.

CLELLAND, C. et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 210-213, 2009. ISSN 0036-8075.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002. ISSN 0166-2236.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2005. ISSN 1460-9568.

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, p. 317-328, 2003.

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

CROLL, S. D. et al. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. **Brain research**, v. 812, n. 1, p. 200-208, 1998. ISSN 0006-8993.

DAYER, A. G. et al. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 460, n. 4, p. 563-572, 2003. ISSN 1096-9861.

DE AZEVEDO JÚNIOR, S. M. et al. Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. **Ararajuba**, v. 9, p. 33-42, 2001.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339-350, 2010. ISSN 1471-003X.

DINIZ, C. et al. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 1, 2016. ISSN 0100-879X.

DÖBRÖSSY, M. et al. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. **Molecular psychiatry**, v. 8, n. 12, p. 974-982, 2003. ISSN 1359-4184.

DOETSCH, F.; HEN, R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. **Curr Opin Neurobiol**, v. 15, n. 1, p. 121-8, Feb 2005. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721754> >.

DUAN, X. et al. Development of neural stem cell in the adult brain. **Current opinion in neurobiology**, v. 18, n. 1, p. 108-115, 2008. ISSN 0959-4388.

EIKENAAR, C.; KLINNER, T.; STÖWE, M. Corticosterone predicts nocturnal restlessness in a long-distance migrant. **Hormones and Behavior**, v. 66, p. 324-329, 2014.

ENCINAS, J. M.; SIERRA, A. Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. **Behavioural brain research**, v. 227, n. 2, p. 433-439, 2012. ISSN 0166-4328.

ERGORUL, C.; EICHENBAUM, H. The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". **Learn Mem**, v. 11, n. 4, p. 397-405, Jul-Aug 2004. ISSN 1072-0502 (Print) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254219 >.

ERICKSON, K. I. et al. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5368-5375, 2010. ISSN 0270-6474.

ESPOSITO, A. et al. Two-photon analysis of lead accumulation in rat cerebellar granule neurons. **Neurochem Res**, v. 30, n. 8, p. 949-54, Aug 2005. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258843> >.

ESTELLE, V. B.; MABEE, T. J.; FARMER, A. H. Effectiveness of Predator Exlosures for Pectoral Sandpiper Nests in Alaska (Protectores Efectivos Contra Depredadores Para Nidos de Calidris melanotos en Alaska). **Journal of Field Ornithology**, p. 447-452, 1996. ISSN 0273-8570.

FROST, B. J.; MOURITSEN, H. The neural mechanisms of long distance animal navigation. **Current opinion in neurobiology**, v. 16, n. 4, p. 481-488, 2006. ISSN 0959-4388.

GAGLIARDO, A. et al. Functional asymmetry of left and right avian piriform cortex in homing pigeons' navigation. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 189-94, Jul 2005. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16029208> >.

GALEA, L. A. M. et al. Sex, hormones and neurogenesis in the hippocampus: hormonal modulation of neurogenesis and potential functional implications. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 25, p. 1039-1061, 2013.

GARRETT, L. et al. Voluntary wheel running in mice increases the rate of neurogenesis without affecting anxiety-related behaviour in single tests. **BMC neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 61, 2012. ISSN 1471-2202.

GE, S. et al. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2007. ISSN 0166-2236.

GE, S. et al. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. **Neuron**, v. 54, n. 4, p. 559-566, 2007. ISSN 0896-6273.

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, p. 163-171, 1998.

GÓMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 568-578, 2008. ISSN 1471-003X.

GOULD, E. et al. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3642-3650, 1992. ISSN 0270-6474.

GREENOUGH, W. T.; COHEN, N. J.; JURASKA, J. M. New neurons in old brains: learning to survive? **Nature neuroscience**, v. 2, n. 3, 1999. ISSN 1097-6256.

GREGOIRE, C. A. et al. Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86237, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465980> >.

GUERREIRO-DINIZ, C. et al. Hippocampus and Dentate Gyrus of the Cebus Monkey: Architectonic and Stereological Study **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 2010.

GUNDERSEN, H.; JENSEN, E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J Microsc**, v. 147, p. 229–263, 1987.

GUZOWSKI, J. F. et al. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 12, p. 1120-1124, 1999.

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.

HAIRSTON, I. S. et al. Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. **Journal of neurophysiology**, v. 94, n. 6, p. 4224-4233, 2005. ISSN 0022-3077.

HALL, J.; THOMAS, K. L.; EVERITT, B. J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 2186-2193, 2001. ISSN 0270-6474.

HALL, Z. J. et al. Site-specific regulation of adult neurogenesis by dietary fatty acid content, vitamin E and flight exercise in European starlings. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 6, p. 875-882, 2014. ISSN 1460-9568.

HALL, Z. J.; MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A. Influence of testosterone metabolites on song-control system neuroplasticity during photostimulation in adult European starlings (*Sturnus vulgaris*). **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. e40060, 2012. ISSN 1932-6203.

HAMPTON, R. R. E. S., S.J. . Hippocampus and memory in a food-storing and in a nonstoring bird species. . **Behav. Neurosci**, v. 110, p. 946–64, 1996b.

HANSSON, B. et al. Restricted dispersal in a long-distance migrant bird with patchy distribution, the great reed warbler. **Oecologia**, v. 130, n. 4, p. 536-542, 2002. ISSN 0029-8549.

HARRINGTON, B. A.; ANTAS, P. D. T. Z.; SILVA, F. Observations of Common Terns in Southern Brazil, 29 April-3 May 1984. **Journal of Field Ornithology**, p. 222-224, 1986. ISSN 0273-8570.

HASTINGS, N. B.; GOULD, E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. **Journal of Comparative Neurology**, v. 413, p. 146-154, 1999. ISSN 0021-9967.

HEALY; 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 >.

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 >.

HEROLD, C.; COPPOLA, V. J.; BINGMAN, V. P. The maturation of research into the avian hippocampal formation: Recent discoveries from one of the nature's foremost navigators. **Hippocampus**, v. 25, n. 11, p. 1193-211, Nov 2015. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25850561> >.

HOWARD, C.; REED, M. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. 2005. ISSN 1859960898.

JENKINS, T. A. et al. Novel spatial arrangements of familiar visual stimuli promote activity in the rat hippocampal formation but not the parahippocampal cortices: a c-fos expression study. **Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 43-52, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960338> >.

KAHN, M. C.; BINGMAN, V. P. Lateralization of Spatial Learning in the Avian Hippocampal Formation. **Behavioral Neuroscience** v. 118, p. 33-344, 2004.

KATOH-SEMBA, R. et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. **J Neurochem**, v. 69, n. 1, p. 34-42, Jul 1997. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202291> >.

KATOH-SEMBA, R. et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 34-42, 1997. ISSN 1471-4159.

KEARY, N.; BISCHOF, H.-J. Activation changes in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) brain areas evoked by alterations of the earth magnetic field. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38697, 2012. ISSN 1932-6203.

KEMPERMANN, G. **Adult neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain.** Oxford University Press, USA, 2006. ISBN 0195179714.

KEMPERMANN, G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? **Trends in Neurosciences**, v. 31, p. 163-169, 2008.

KEMPERMANN, G. et al. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 447-452, 2004. ISSN 0166-2236.

KREBS, J. R. et al. Hippocampal specialization of food-storing birds. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 4, p. 1388-92, Feb 1989. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2919184> >.

KRONENBERG, G. et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 4, p. 455-463, 2003. ISSN 1096-9861.

KUBÍK, Š.; FENTON, A. A. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 40, p. 9205-9212, 2005. ISSN 0270-6474.

KUBIK, S.; MIYASHITA, T.; GUZOWSKI, J. F. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. **Learning & Memory**, v. 14, n. 11, p. 758-770, 2007. ISSN 1072-0502.

KUWABARA, T. et al. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 1097-1105, 2009. ISSN 1097-6256.

LACEFIELD, C. O. et al. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. **Hippocampus**, v. 22, n. 1, p. 106-116, 2012. ISSN 1098-1063.

LADAGE, L. A. Environmental change, the stress response, and neurogenesis. **Integrative and Comparative Biology**, 2015.

LADAGE, L. D. et al. Effects of captivity and memory-based experiences on the hippocampus in mountain chickadees. **Behavioral neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 284, 2009. ISSN 1939-0084.

LADAGE, L. D.; ROTH, T. C., 2ND; PRAVOSUDOV, V. V. Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behaviour in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* ssp.). **Proc Biol Sci**, v. 278, n. 1702, p. 138-43, Jan 07 2011. ISSN 1471-2954 (Electronic) 0962-8452 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20659933> >.

LADAGE, L. D. et al. Ecologically relevant spatial memory use modulates hippocampal neurogenesis. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1684, p. 1071-1079, 2010. ISSN 0962-8452.

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 of London B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1702, p. 138-143, 2011. ISSN 0962-8452.

LANK, D. B. et al. Long-term continental changes in wing length, but not bill length, of a long-distance migratory shorebird. **Ecol Evol**, v. 7, n. 9, p. 3243-3256, May 2017. ISSN 2045-7758 (Print) 2045-7758 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28480022> >.

LAPCHAK, P. A. et al. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampal formation of aging rats. **Neurobiology of aging**, v. 14, n. 2, p. 121-126, 1993. ISSN 0197-4580.

LAZARINI, F.; LLEDO, P.-M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 1, p. 20-30, 2011. ISSN 0166-2236.

LEUNER, B.; GOULD, E.; SHORS, T. J. Is there a link between adult neurogenesis and learning? **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 216-24, 2006. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421862> >.

LEVENTHAL, C. et al. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 450-464, 1999. ISSN 1044-7431.

LI, Y. et al. Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. **Neuron**, v. 36, n. 6, p. 1169-81, Dec 19 2002. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495630> >.

LI, Y. et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron**, v. 59, n. 3, p. 399-412, 2008. ISSN 0896-6273.

LIE, D.-C. et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1370-1375, 2005. ISSN 0028-0836.

LIPKIND, D. et al. Social change affects the survival of new neurons in the forebrain of adult songbirds. **Behav Brain Res**, v. 133, n. 1, p. 31-43, Jun 15 2002. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048172> >.

LISTA, I.; SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 30, n. 4, p. 493-503, 2010. ISSN 0272-4340.

LYRA-NEVES, R. D.; AZEVEDO JÚNIOR, S. D.; TELINO-JÚNIOR, W. Monitoramento do maçarico-branco, *Calidris alba* (Pallas)(Aves, Scolopacidae), através de recuperações de anilhas coloridas, na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2, p. 319-324, 2004.

MARÍN-BURGIN, A.; SCHINDER, A. F. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. **Behavioural brain research**, v. 227, n. 2, p. 391-399, 2012. ISSN 0166-4328.

MARKAKIS, E. A.; GAGE, F. H. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. **Journal of comparative neurology**, v. 406, n. 4, p. 449-460, 1999. ISSN 1096-9861.

MAYER, U.; BISCHOF, H.-J. Brain activation pattern depends on the strategy chosen by zebra finches to solve an orientation task. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 3, p. 426-434, 2012. ISSN 0022-0949.

METTKE-HOFMANN; GWINNER. 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: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12719527 >.

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> >.

MICHEAU, J. et al. Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 5, p. 1022, 2004. ISSN 1939-0084.

MONGIAT, L. A. et al. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5320, 2009. ISSN 1932-6203.

MONGIAT, L. A.; SCHINDER, A. F. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1055-1061, 2011. ISSN 1460-9568.

MORRISON, R.; ROSS, R. K. **Atlas of Nearctic shorebirds on the coast of South America**. Canadian Wildlife Service Ottawa (Canada), 1989. ISBN 0662168003.

MOURITSEN, H. Spatiotemporal orientation strategies of long-distance migrants. In: (Ed.). **Avian migration**: Springer, 2003. p.493-513.

MOURITSEN, H.; HEYERS, D.; GUNTURKUN, O. The Neural Basis of Long-Distance Navigation in Birds. **Annu Rev Physiol**, v. 78, p. 133-54, 2016. ISSN 1545-1585 (Electronic) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527184> >.

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.

MOURITSEN, H. et al. Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 39, p. 14294-9, Sep 28 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381765> >.

MYERS, J.; MARON, J. L.; SALLABERRY, M. Going to extremes: Why do Sanderlings migrate to the Neotropics? **Ornithological Monographs**, p. 520-535, 1985. ISSN 0078-6594.

NAGAHUEDI, S. et al. Mimicking the natural doping of migrant sandpipers in sedentary quails: effects of dietary n-3 fatty acids on muscle membranes and PPAR expression. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 8, p. 1106-1114, 2009. ISSN 0022-0949.

NÉMETH, Z. et al. Seasonal variation in CREB expression in the hippocampal formation of first-year migratory songbirds: Implications for the role of memory during migration. **The Auk**, v. 134, n. 1, p. 146-152, 2016. ISSN 0004-8038.

NIIBORI, Y. et al. Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal CA3 region. **Nat Commun**, v. 3, p. 1253, 2012. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212382> >.

NOTTEBOHM, F. Neuronal replacement in adult brain. **Brain Res Bull**, v. 57, n. 6, p. 737-49, Apr 2002a. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031270> >.

_____. Why are some neurons replaced in adult brain? **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 624-628, February 1 2002b.

OH, J. et al. Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. **Journal of neuroscience research**, v. 88, n. 13, p. 2798-2809, 2010. ISSN 1097-4547.

PALMER, T. D.; TAKAHASHI, J.; GAGE, F. H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 389-404, 1997. ISSN 1044-7431.

PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 425, n. 4, p. 479-494, 2000. ISSN 1096-9861.

PEREIRA, A. C. et al. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5638-5643, 2007. ISSN 0027-8424.

PIERSMA, T.; RENEERKENS, J.; RAMENOFSKY, M. Baseline corticosterone peaks in shorebirds with maximal energy stores for migration: a general preparatory mechanism for rapid behavioral and metabolic transition? **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 118-126, 2000.

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 of London B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1601, p. 2641-2649, 2006. ISSN 0962-8452.

PRAVOSUDOV, V. V.; KITAYSKY, A. S.; OMANSKA, A. The relationship between migratory behaviour, memory and the hippocampus: an intraspecific comparison. **Proc Biol Sci**, v. 273, n. 1601, p. 2641-9, Oct 22 2006. ISSN 0962-8452 (Print) 0962-8452 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17002950 >.

RIEDEL, G. et al. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 898-905, 1999.

RODRIGUES, A. A. F. Seasonal abundance of nearctic shorebirds in the Gulf of Maranhão, Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v. 71, n. 4, p. 665-675, 2000. ISSN 0273-8570.

_____. Aves da Reserva Biológica do Lago Piratuba e entorno, Amapá, Brasil. **Inventário biológico das Áreas do Sucuriçu e Região do lago, Amapá: Relatório Final PROBIO. Macapá: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá**, p. 188-195, 2006.

ROTH, T. C., 2ND et al. Variation in memory and the hippocampus across populations from different climates: a common garden approach. **Proc Biol Sci**, v. 279, n. 1727, p. 402-10, Jan 22 2012. ISSN 1471-2954 (Electronic)

0962-8452 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715407> >.

ROTH, T. C.; PRAVOSUDOV, V. V. Hippocampal volumes and neuron numbers increase along a gradient of environmental harshness: a large-scale comparison. **Proc Biol Sci**, v. 276, n. 1656, p. 401-5, Feb 07 2009. ISSN 0962-8452 (Print)

0962-8452 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945667> >.

RUDGE, J. S. et al. Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. **J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 6856-67, Oct 1995. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472443> >.

SAHAY, A. et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 466-470, 2011. ISSN 0028-0836.

SAHAY, A.; WILSON, D. A.; HEN, R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 582-588, 2011. ISSN 0896-6273.

SAPER, C. B.; SAWCHENKO, P. E. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. **Journal of Comparative Neurology**, v. 465, n. 2, p. 161-163, 2003. ISSN 1096-9861.

SCHARFF, C. et al. Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. **Neuron**, v. 25, n. 2, p. 481-92, Feb 2000. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719901> >.

SCHMIDT-HIEBER, C.; JONAS, P.; BISCHOFBERGER, J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 184-187, 2004. ISSN 0028-0836.

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.

Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11074347 >.

SERI, B. et al. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7153-7160, 2001. ISSN 0270-6474.

SHEN, Q. et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. **Science**, v. 304, n. 5675, p. 1338-1340, 2004. ISSN 0036-8075.

SHEN, Q. et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 289-300, 2008. ISSN 1934-5909.

SHERRY, D. F. et al. Are There Place Cells in the Avian Hippocampus? **Brain Behaviour and Evolution**, 2017.

SHETTY, A. K.; HATTIANGADY, B.; SHETTY, G. A. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: Role of astrocytes. **Glia**, v. 51, n. 3, p. 173-186, 2005. ISSN 1098-1136.

SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neuroscience letters**, v. 85, n. 2, p. 169-171, 1988. ISSN 0304-3940.

SICK, H. **Migrações de aves na América do Sul continental**. CEMAVE, 1983.

SILHOL, M. et al. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. **Neuroscience**, v. 132, n. 3, p. 613-624, 2005. ISSN 0306-4522.

SMULDERS, T. V.; DEVOOGD, T. J. Expression of immediate early genes in the hippocampal formation of the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*) during a food-hoarding task. **Behavioural brain research**, v. 114, n. 1, p. 39-49, 2000. ISSN 0166-4328.

SNYDER, J.; KEE, N.; WOJTOWICZ, J. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. **Journal of neurophysiology**, v. 85, n. 6, p. 2423-2431, 2001. ISSN 0022-3077.

SONG, H.; STEVENS, C. F.; GAGE, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 39-44, 2002. ISSN 0028-0836.

STEINER, B. et al. Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. **Neuroscience**, v. 154, n. 2, p. 521-529, 2008. ISSN 0306-4522.

STRASSER, R. et al. The homing pigeon hippocampus and the development of landmark navigation. **Developmental Psychobiology**, v. 33, p. 305-315, 1998.

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.

THORUP, K. et al. Evidence for a navigational map stretching across the continental US in a migratory songbird. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 46, p. 18115-18119, 2007. ISSN 0027-8424.

THORUP, K.; HOLLAND, R. A. The bird GPS-long-range navigation in migrants. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 22, p. 3597-3604, 2009. ISSN 0022-0949.

TONI, N.; SULTAN, S. Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. **European journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1062-1068, 2011. ISSN 1460-9568.

VAN DER BORGHT, K. et al. Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. **Hippocampus**, v. 19, n. 10, p. 928-936, 2009. ISSN 1098-1063.

VAN PRAAG, H. et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 38, p. 8680-8685, 2005. ISSN 0270-6474.

VANN, S. D. et al. Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 2711-2718, 2000. ISSN 0270-6474.

VARGAS, J. P.; SIEGEL, J. J.; BINGMAN, V. P. The effects of a changing ambient magnetic field on single-unit activity in the homing pigeon hippocampus. **Brain research bulletin**, v. 70, n. 2, p. 158-164, 2006. ISSN 0361-9230.

VAZDARJANOVA, A. et al. Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 23, p. 10067-10071, 2002. ISSN 0270-6474.

WEBER, J.-M. The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 5, p. 593-597, 2009. ISSN 0022-0949.

WEXLER, E. M. et al. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. **Stem cells**, v. 27, n. 5, p. 1130-1141, 2009. ISSN 1549-4918.

WILHELMSSON, U. et al. Astrocytes Negatively Regulate Neurogenesis Through the Jagged1-Mediated Notch Pathway. **Stem Cells**, v. 30, n. 10, p. 2320-2329, 2012. ISSN 1549-4918.

WINKER, K.; WARNER, D. W.; WEISBROD, A. Daily mass gains among woodland migrants at an inland stopover site. **The Auk**, p. 853-862, 1992. ISSN 0004-8038.

WINOCUR, G. et al. Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. **Behav Brain Res**, v. 227, n. 2, p. 464-9, Feb 14 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669236> >.

WU, L.; DICKMAN, J. D. Magnetoreception in an Avian Brain in Part Mediated by Inner Ear Lagena. **Current Biology** v. 21, n. 5, p. 418-423, 2011.

YASSA, M. A.; STARK, C. E. Pattern separation in the hippocampus. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 10, p. 515-25, Oct 2011. ISSN 1878-108X (Electronic) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788086> >.

YOO, M. et al. BAF53b, a Neuron-Specific Nucleosome Remodeling Factor, Is Induced after Learning and Facilitates Long-Term Memory Consolidation. **J Neurosci**, v. 37, n. 13, p. 3686-3697, Mar 2017. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28270570> >.

ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3-11, 2006. ISSN 0270-6474.

ZHAO, S. et al. Rescue of the reeler phenotype in the dentate gyrus by wild-type coculture is mediated by lipoprotein receptors for Reelin and Disabled 1. **J Comp Neurol**, v. 495, n. 1, p. 1-9, Mar 1 2006. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16432903 >.

ANEXO I.

Tabela 2. Parâmetros estereológicos para as estimativas de células coradas com Nissl na formação hipocampal do hemisfério direito (FHE) de *Calidris pusilla*, nos períodos de migração sul e na pós-migração. ΣQ^- = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissector óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction, FH= formação hipocampal.

Migração sul FHE	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	N° de Caixa de contagem	N° Secções FH	SSF	ASF	TSF	ΣQ^-
<i>C. pusilla</i> 14	50x50	250x250	342	19	0,167	0,040	0,600	6135
<i>C. pusilla</i> 15	50x50	250x250	304	15	0,167	0,040	0,691	6622
<i>C. pusilla</i> 17	50x50	250x250	313	14	0,167	0,040	0,633	6284
<i>C. pusilla</i> 18	50x50	250x250	324	19	0,167	0,040	0,534	5193
<i>C. pusilla</i> 05	50x50	250x250	321	17	0,167	0,040	0,620	5292
Pós-migração FHE								
<i>C. pusilla</i> 06	50x50	250x250	307	11	0,167	0,040	0,6224	6430
<i>C. pusilla</i> 19	50x50	250x250	168	12	0,167	0,040	0,5618	4365
<i>C. pusilla</i> 07	50x50	250x250	253	11	0,167	0,040	0,6494	4768
<i>C. pusilla</i> 09	50x50	250x250	281	11	0,167	0,040	0,6303	6662
<i>C. pusilla</i> 10	50x50	250x250	162	11	0,167	0,040	0,7042	4867

Tabela 3. Parâmetros estereológicos para as estimativas de células coradas com **Nissl** na formação hipocampal do hemisfério direito (**FHD**) de *Calidris pusilla*, nos períodos de migração sul e na pós-migração. ΣQ - = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissector óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction,. FH= formação hipocampal.

Migração sul FHD	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	Nº de Caixa de contagem	Nº Secções FH	SSF	ASF	TSF	ΣQ -
<i>C. pusilla</i> 14	50x50	250x250	411	20	0,167	0,040	0,593	7484
<i>C. pusilla</i> 15	50x50	250x250	336	15	0,167	0,040	0,670	7509
<i>C. pusilla</i> 17	50x50	250x250	309	15	0,167	0,040	0,670	6106
<i>C. pusilla</i> 18	50x50	250x250	371	19	0,167	0,040	0,554	6174
<i>C. pusilla</i> 05	50x50	250x250	295	17	0,167	0,040	0,658	5081
Pós-migração FHD								
<i>C. pusilla</i> 06	50x50	250x250	307	11	0,167	0,040	0,6173	6662
<i>C. pusilla</i> 19	50x50	250x250	182	13	0,167	0,040	0,5639	4284
<i>C. pusilla</i> 07	50x50	250x250	231	11	0,167	0,040	0,6438	4533
<i>C. pusilla</i> 09	50x50	250x250	267	11	0,167	0,040	0,6466	6056
<i>C. pusilla</i> 10	50x50	250x250	145	11	0,167	0,040	0,6849	4226

Tabela 4. Parâmetros estereológicos para as estimativas de células **c-Fos positivas** na formação hipocampal do hemisfério esquerdo (**FHE**) de *Calidris pusilla* durante a migração e na pós- migração outonal.. ΣQ - = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissector óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction,. FH= formação hipocampal.

Migração sul FHE	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	N° de Caixa de contagem	N° Secções FH	SSF	ASF	TSF	ΣQ -
<i>C. pusilla</i> 16	85X50	250X250	298	13	0,166	0,068	0,4878	1464
<i>C. pusilla</i> 12	85X50	250X250	261	16	0,166	0,047	0,6097	1798
<i>C. pusilla</i> 04	85X50	250X250	241	13	0,166	0,068	0,4830	1304
<i>C. pusilla</i> 17	85X50	300X300	200	13	0,166	0,047	0,7575	2438
Pós-migração FHE								
<i>C. pusilla</i> 19	140X106	250X250	300	9	0,166	0,237	0,4184	2534
<i>C. pusilla</i> 07	140X106	250X250	301	11	0,166	0,237	0,5813	5524
<i>C. pusilla</i> 08	140X106	250X250	351	9	0,166	0,237	0,5415	3510
<i>C. pusilla</i> 20	140X106	250X250	302	10	0,166	0,237	0,2036	843,1

Tabela 5. Parâmetros estereológicos para as estimativas de células **c-Fos positivas** na formação hipocampal do hemisfério direito (**FHD**) de *Calidris pusilla* durante a migração e na pós-migração outonal. ΣQ - = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o disector óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction, FH= formação hipocampal.

Migração sul FHD	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	N° de Caixa de contagem	N° Secções FH	SSF	ASF	TSF	ΣQ -
<i>C. pusilla</i> 16	85X50	250X250	251	12	0,142	0,068	0,476	1174
<i>C. pusilla</i> 12	85X50	300X300	279	18	0,166	0,047	0,598	1892
<i>C. pusilla</i> 04	85X50	250X250	233	13	0,166	0,068	0,471	1247
<i>C. pusilla</i> 17	85X50	300X300	200	14	0,166	0,047	0,740	2260
Pós-migração FHD								
<i>C. pusilla</i> 19	140X106	250X250	296	9	0,166	0,237	0,418	2994
<i>C. pusilla</i> 07	140X106	250X250	294	11	0,166	0,237	0,602	5537
<i>C. pusilla</i> 08	140X106	250X250	306	9	0,166	0,237	0,541	3065
<i>C. pusilla</i> 20	140X106	250X250	300	10	0,166	0,237	0,206	1006

Tabela 5: Parâmetros estereológicos para estimativas de células **DCX positivas** na formação hipocampal do hemisfério esquerdo (**FHE**) de *Calidris pusilla* durante a migração e na pós- migração outonal. ΣQ^- = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissecor óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction,. FH= formação hipocampal. T= telencéfalo.

Migração sul FHE	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	N° de Caixa de contagem	N° Secções FH	N° Secções T	SSF	ASF	TSF	ΣQ^-
<i>C. pusilla</i> 01	140 x 106	250 x 250	279	13	22	0.167	0.237	0.427	1143
<i>C. pusilla</i> 02	140 x 106	250 x 250	234	13	19	0.167	0.237	0.714	1242
<i>C. pusilla</i> 03	140 x 106	250 x 250	226	14	22	0.167	0.237	0.711	1275
<i>C. pusilla</i> 04	140 x 106	250 x 250	335	14	17	0.167	0.237	0.605	1191
<i>C. pusilla</i> 05	140 x 106	250 x 250	316	12	20	0.167	0.237	0.735	2003
Pós- migração FHE									
<i>C. pusilla</i> 06	140 x 106	250 x 250	272	10	12	0.167	0.237	0.503	3025
<i>C. pusilla</i> 07	140 x 106	250 x 250	315	11	15	0.167	0.237	0.620	2964
<i>C. pusilla</i> 08	140 x 106	250 x 250	308	12	14	0.167	0.237	0.562	3173
<i>C. pusilla</i> 09	140 x 106	250 x 250	301	11	15	0.167	0.237	0.570	3176
<i>C. pusilla</i> 10	140 x 106	250 x 250	279	11	13	0.167	0.237	0.570	2473

Tabela 6: Parâmetros estereológicos para estimativas de células **DCX positivas** na formação hipocampal do hemisfério direito de *Calidris pusilla* durante e na pós- migração outonal. ΣQ - = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissector óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction,. FH= formação hipocampal. T= telencéfalo.

Migração sul FHD	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	N° de Caixa de contagem	N° Secções FH	N° Secções T	SSF	ASF	TSF	ΣQ -
<i>C. pusilla</i> 01	140 x 106	250 x 250	284	13	22	0,167	0,237	0,427	1093
<i>C. pusilla</i> 02	140 x 106	250 x 250	233	13	19	0,167	0,237	0,735	1238
<i>C. pusilla</i> 03	140 x 106	250 x 250	250	14	22	0,167	0,237	0,714	1406
<i>C. pusilla</i> 04	140 x 106	250 x 250	263	11	17	0,167	0,237	0,633	1032
<i>C. pusilla</i> 05	140 x 106	250 x 250	321	12	20	0,167	0,237	0,758	2156
Pós- migração FHD									
<i>C. pusilla</i> 06	140 x 106	250 x 250	259	10	12	0,167	0,237	0,459	2709
<i>C. pusilla</i> 07	140 x 106	250 x 250	301	11	15	0,167	0,237	0,573	3108
<i>C. pusilla</i> 08	140 x 106	250 x 250	284	12	14	0,167	0,237	0,560	2309
<i>C. pusilla</i> 09	140 x 106	250 x 250	259	11	15	0,167	0,237	0,560	2698
<i>C. pusilla</i> 10	140 x 106	250 x 250	255	11	13	0,167	0,237	0,549	2184

Tabela 7: Parâmetros estereológicos utilizados para a estimativa de neurônios **NeuN positivos** na formação hipocampal do hemisfério esquerdo (**FHE**) de *Calidris pusilla* durante e após a migração. ΣQ = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissecador óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction,. FH= formação hipocampal. T= telencéfalo. Animais BCCP 01 to BCCP 04 retirados de Guerreiro-Diniz et al., 2016.

Migração sul FHE	Caixa de contagem (μm)	Grid (μm)	N° de Caixa de contagem	N° Secções FHE	N° Secções TE	SSF	ASF	TSF	ΣQ -
<i>C. pusilla</i> 01	50 x 50	250 x 250	230	15	22	0,167	0,028	0,505	2294
<i>C. pusilla</i> 11	50 x 50	250 x 250	193	14	19	0,167	0,028	0,332	1340
<i>C. pusilla</i> 12	50 x 50	250 x 250	235	17	23	0,167	0,028	0,292	1565
<i>C. pusilla</i> 03	50 x 50	250 x 250	211	19	21	0,167	0,028	0,546	2345
<i>C. pusilla</i> 13	50 x 50	250 x 250	166	13	22	0,167	0,028	0,317	1159
Pós-migração FHE									
BCCP 01	50 x 50	350 x 350	106	09	-	0,2	0,02	0,574	1664
BCCP 02	50 x 50	350 x 350	149	13	-	0,2	0,02	0,537	2135
BCCP 03	50 x 50	350 x 350	177	14	-	0,2	0,02	0,556	2168
BCCP 04	50 x 50	350 x 350	100	10	-	0,2	0,02	0,562	2012

Tabela 8: Parâmetros estereológicos para estimativa de neurônios **NeuN positivos** na formação hipocampal do hemisfério direito de *Calidris pusilla* durante a migração. ΣQ - = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissecor óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction. FH= formação hipocampal. T= telencéfalo.

Migração	Caixa de contagem (μm)	Gride (μm)	N° de Caixas de contagens	N° de Secções FH	N° de Secções T	SSF	ASF	TSF	ΣQ -
<i>C. pusilla</i> 01	50 x 50	250 x 250	241	15	22	0,167	0,028	0,485	2312
<i>C. pusilla</i> 11	50 x 50	250 x 250	218	14	19	0,167	0,028	0,322	1442
<i>C. pusilla</i> 12	50 x 50	250 x 250	237	17	23	0,167	0,028	0,304	1641
<i>C. pusilla</i> 03	50 x 50	250 x 250	222	19	21	0,167	0,028	0,549	2301
<i>C. pusilla</i> 13	50 x 50	250 x 250	173	13	22	0,167	0,028	0,313	1202

Tabela 9. Parâmetros estereológicos utilizados para a estimativa de **astrócitos GFAP positivos** na formação hipocampal do hemisfério direito (FHD) de *Calidris pusilla* durante e após a migração. ΣQ^- = Somatório do número total de objetos de interesse contados usando o dissecor óptico, SSF = Section Sampling Fraction, ASF = Area Sampling Fraction, TSF = Thickness Sampling Fraction. FH= formação hipocampal.

Migração sul	Caixa de contagem (μm)	Gride (μm)	N° de Caixas de contagens	N° de Secções FH	SSF	ASF	TSF	ΣQ^-
<i>C. pusilla</i> 01	110x80	200x200	804	19	0,167	0,220	0,746	5089
<i>C. pusilla</i> 11	110x80	200x200	772	17	0,167	0,220	0,709	4598
<i>C. pusilla</i> 12	110x80	200x200	686	19	0,167	0,220	0,741	3994
<i>C. pusilla</i> 03	110x80	200x200	537	17	0,167	0,220	0,676	3874
<i>C. pusilla</i> 04	110x80	200x200	676	13	0,167	0,220	0,651	3389
Pós-migração								
<i>C. pusilla</i> 06	110x80	200x200	288	10	0,167	0,220	0,586	834
<i>C. pusilla</i> 08	110x80	120x120	948	10	0,167	0,611	0,735	4039
<i>C. pusilla</i> 10	110x80	180x180	547	11	0,167	0,272	0,738	2205
<i>C. pusilla</i> 21	110x80	200x200	460	17	0,167	0,220	0,649	1841
<i>C. pusilla</i> 22	110x80	170x170	710	11	0,167	0,304	0,702	2590

Tabela 10. Estimativa numérica das células coradas com **Nissl** na formação hipocampal de *Calidris pusilla*, nos períodos de migração sul e na pós-migração. FHE: formação hipocampal esquerda, FHD: formação hipocampal direita. CES Coeficiente de erro Scheaffer, Desvio padrão D.P.

Migração sul	Data de captura	Nº total células Nissl FHE	CES FHE	Espessura (µm) FHE	Nº de células Nissl FHD	CES FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C. pusilla</i> 14	04/08/12	1.531.948	0,025	25,0	1.890.759,75	0,023	25,7
<i>C. pusilla</i> 15	04/08/12	1.435.049	0,026	22,0	1.679.200,88	0,024	22,6
<i>C. pusilla</i> 17	07/08/12	1.486.516,	0,030	24,0	1.156.355,75	0,026	22,6
<i>C. pusilla</i> 18	07/08/12	1.461.684,25	0,030	29,0	1.671.562,50	0,025	27,7
<i>C. pusilla</i> 05	07/08/12	1.280.432,25	0,020	21,0	1.368.268,25	0,033	22,6
Média		1.439.125,88	0,030	24,8	1.553.229,43	0,026	24,2
Desvio padrão		956.17,59	0,002	2,6	289.619,40	0,004	2,4
Pós-migração sul	Data de captura	Nº total células Nissl FHE	CES FHE	Espessura (µm) FHE	Nº de células Nissl FHD	CES FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C. pusilla</i> 06	14/01/14	1.547.002,5	0,026	24,0	925.459,50	0,039	21,9
<i>C. pusilla</i> 19	03/03/09	1.164.047,75	0,034	27,0	1.621.567,00	0,027	24,3
<i>C. pusilla</i> 07	14/01/14	1.101.916,25	0,030	23,0	1.140.639,38	0,036	27,2
<i>C. pusilla</i> 09	10/11/14	1.584.751,75	0,024	24,0	1.057.322,50	0,034	23,4
<i>C. pusilla</i> 10	10/11/14	1.036.214,88	0,037	22,0	1.404.525,25	0,027	23,4
Média		1.286.786,63	0,030	24,0	1.229.902,73	0,033	24,0
Desvio padrão		259.096,32	0,005	1,9	280.326,37	0,005	2,0

Tabela 11. Estimativa numérica das células **c-Fos positivas** na formação hipocampal de *Calidris pusilla* nos períodos de migração sul e na pós-migração. FHE: formação hipocampal esquerda, FHD: formação hipocampal direita. CES Coeficiente de erro Scheaffer, Desvio padrão D.P.

Migração sul	Data de captura	Nº de células c-Fos FHE	CE Scheaffer FHE	Espessura (µm) FHE	Nº de células c-Fos FHD	CE Scheaffer FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C. pusilla 15</i>	04/08/12	265.205	0,04	20,6	253.218,91	0,04	20,6
<i>C. pusilla 12</i>	07/08/12	374.639	0,05	16,5	401.844,81	0,05	16,8
<i>C. pusilla 04</i>	07/08/12	237.685	0,05	20,0	233.508,66	0,05	20,7
<i>C. pusilla 16</i>	07/08/12	409.092	0,05	13,4	388.746,69	0,04	13,6
Média		321.655,05	0,04	19,0	319.329,77	0,05	19,4
Desvio padrão		83.046,13	0,005	3,3	92.028,27	0,004	2,2
Pós-migração	Data de captura	Nº de células c-Fos FHE	CE Scheaffer FHE	Espessura (µm) FHE	Nº de células c-Fos FHD	CE Scheaffer FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C. pusilla 19</i>	03/03/09	153.058	0,06	23,3	180.874,77	0,06	23,9
<i>C. pusilla 07</i>	14/01/14	240.375	0,05	25,2	232.455,53	0,04	24,5
<i>C. pusilla 08</i>	10/11/14	163.812	0,05	26,9	143.167,56	0,05	27,2
<i>C. pusilla 20</i>	10/11/14	104.616	0,08	49,1	123.011,13	0,07	48,4
Média		165.465,37	0,057	33,7	169.877,25	0,056	31,0
Desvio padrão		56.186,43	0,015	13,3	48.120,78	0,014	11,7

Tabela 12. Resultados esterológicos com estimativa numérica dos neurônios **Dcx positivos** na formação hipocampal do hemisfério esquerdo (FHE) e do hemisfério direito (FHD) durante a migração e na pós-migração de *Calidris pusilla*. CES Coeficiente de erro Scheaffer, Desvio padrão D.P.

Migração sul	Data da captura	Nº de DCX FHE	CES FHE	Espessura (µm) FHE	Nº de DCX FHD	CES FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C.pusilla</i> 01	04/08/2012	67.541,45	0,034	23,4	64.694,47	0,033	23,3
<i>C.pusilla</i> 02	04/08/2012	43.855,88	0,045	20,4	42.555,52	0,043	20,3
<i>C.pusilla</i> 03	12/08/2012	45.299,09	0,047	22,0	49.850,47	0,046	20,6
<i>C.pusilla</i> 04	07/08/2012	49.807,38	0,041	24,4	41.232,15	0,047	23,3
<i>C.pusilla</i> 05	07/08/2012	68.785,96	0,048	20,5	71.830,84	0,044	19,5
Média		55.057,95	0,043	21,7	54.032,69	0,040	21,4
D.P.		12.171,50	0,006	2,0	13.633,76	0,006	1,78
Pós-migração sul	Data da captura	Nº of DCX FHE	CES FHE	Espessura (µm) FHE	Nº de DCX FHD	CES FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C.pusilla</i> 06	03/03/2009	151.874,95	0,048	25,7	149,374.03	0,046	31,0
<i>C.pusilla</i> 07	14/01/2014	142.769,19	0,040	28,9	140,220.59	0,039	26,3
<i>C.pusilla</i> 08	10/11/2014	120.850,48	0,038	26,6	101,864.27	0,044	25,3
<i>C.pusilla</i> 09	10/11/2014	140.695,00	0,036	26,1	121,964.11	0,044	26,4
<i>C.pusilla</i> 10	10/11/2014	109.529,36	0,037	26,6	100,330.13	0,047	26,2
Média		133.143,80	0,040	26,1	122,750.63	0,040	27,0
D.P.		15.551,80	0,005	1,9	22,099.45	0,003	2,26

Tabela 13. Resultados estereológicos com estimativa numérica de neurônios **NeuN positivos** na formação hipocampal de *Calidris pusilla*.

CES = coeficiente de erro Scheaffer, D. P. = Desvio padrão, FHE=formação hipocampal esquerdo, FHD =formação hipocampal direita. Animais. BCCP 01 a BCCP 04 são de Guerreiro-Diniz, *et al.*, 2016.

Migração sul	Data de captura	Nº NeuN FHE	CES FHE	Espessura (µm) FHE	Nº NeuN FHD	CES FHD	Espessura (µm) FHD
<i>C. pusilla</i> 01	04/08/2012	982.519,38	0,042	19,0	1.030.756,2	0,04	20,1
<i>C. pusilla</i> 11	04/08/2012	871.772,44	0,039	30,0	968.726,25	0,038	31,0
<i>C. pusilla</i> 12	07/08/2012	1.160.225,63	0,036	33,0	1.165.632,5	0,034	32,1
<i>C. pusilla</i> 03	07/08/2012	927.566,44	0,040	18,0	905.189,75	0,036	18,3
<i>C. pusilla</i> 13	06/08/2012	789.153,00	0,036	31,0	832.040,50	0,039	31,6
Média		946.247,37	0,040	26,2	980.469,05	0,040	26,6
D.P		139.3525	0,003	7,1	127.132,02	0,004	6,81
Pós-migração sul	Data de captura	Nº NeuN FHE	CES FHE	Espessura (µm) FHE	Nº NeuN FHD	CES FHD	Espessura (µm) FHD
BCCP 01	18/01/2012	723.297	0,04	17,7	-	-	-
BCCP 02	04/02/2012	1.040,384	0,04	19,3	-	-	-
BCCP 03	04/02/2012	982.961	0,04	18,3	-	-	-
BCCP 04	04/12/2012	891.518	0,04	18,4	-	-	-
Média		909.504	0,04	18,41	-	-	-
D.P.		138.470,27	0,0022	0,7	-	-	-

Tabela 14. Resultados estereológicos com estimativa numérica de **astrócitos GFAP positivos** na formação hipocampal do hemisfério direito de *Calidris pusilla* CES =coeficiente de erro Scheaffer. D. P. = Desvio padrão, FHD =formação hipocampal direito

Migração sul	Data de captura	Nº GFAP FHD	Nº GFAP Vaso FHD	Nº GFAP total FHD	Espessura (µm) FHD	CES FHD	CES Vaso FHD	CES Total FHD
<i>C. pusilla</i> 01	04/08/2012	155.377,66	9.588,06	164.965,72	19,0	0,036	0,112	0,035
<i>C. pusilla</i> 11	04/08/2012	169.879,59	7.201,88	177.081,47	28,0	0,034	0,138	0,033
<i>C. pusilla</i> 12	07/08/2012	139.319,14	7.537,72	146.856,88	26,9	0,043	0,123	0,042
<i>C. pusilla</i> 03	07/08/2012	141.782,09	12.635,63	154.417,72	29,2	0,039	0,105	0,035
<i>C. pusilla</i> 04	07/08/2012	120.118,48	3.770,72	123.889,2	30,2	0,046	0,264	0,045
Média		145.295,39	8.146,80	153.442,20	26,7	0,040	0,1484	0,038
D.P.		18.627,74	3.264,99	20.058,07	4,46	0,00	0,07	0,01
Pós-migração sul	Data de captura	Nº GFAP FHD	Nº GFAP Vaso FHD	Nº GFAP FHD	Espessura (µm) FHD	CES	CES Vaso	CES FHD
<i>C. pusilla</i> 06	03/03/2009	43.474,75	1.410,77	44.885,52	29,60	0,04	0,01	0,04
<i>C. pusilla</i> 08	10/11/2014	52.803,49	1.053,40	53.856,90	26,30	0,04	0,23	0,04
<i>C. pusilla</i> 10	10/11/2014	57.761,70	300,06	58.061,76	27,30	0,06	0,58	0,06
<i>C. pusilla</i> 21	10/11/2014	62.439,41	1.139	63.578,57	24,70	0,04	0,17	0,04
<i>C. pusilla</i> 22	10/11/2014	72.586,00	112,00	72.699,00	27,40	0,05	0,68	0,05
Média		57.813,07	803,08	58.616,35	27,06	0,05	0,33	0,05
D.P.		10.843,53	564,70	10.421,62	1,79	0,01	0,28	0,01




Tabela 15. Estimativa dos **volumes** da formação hipocampal, do telencéfalo e a razão entre eles durante e após a migração outonal de *Calidris pusilla*. CEG=Coefficiente de erro Gundersen, Vol.=Volume. FHE=formação hipocampal esquerda; FHD formação hipocampal direita; TE=telencéfalo esquerdo;TD=telencéfalo direito

Migração sul	Data de captura	Estimativa do Vol. (mm ³) FHE	CEG m=1 FHE	Estimativa do Vol. (mm ³) TE	CEG m=1 TE	Vol. FHE /Vol. TE	Estimativa doVol. (mm ³) FHD	CEG m=1 FHD	Estimativa Vol. (mm ³) TD	CEG m=1 TD	Vol. FHD /Vol. TD
<i>C.pusilla</i> 01	04/08/2012	5,180	0,022	84,60	0,008	0,061	5,31	0,022	89,1	0,006	0,060
<i>C.pusilla</i> 02	04/08/2012	3,580	0,030	80,40	0,009	0,044	3,56	0,030	77,3	0,008	0,046
<i>C.pusilla</i> 03	12/08/2012	3,870	0,026	82,70	0,007	0,046	3,78	0,027	71,4	0,008	0,053
<i>C.pusilla</i> 04	07/08/2012	4,610	0,022	88,90	0,007	0,051	5,15	0,021	79,6	0,006	0,065
<i>C.pusilla</i> 05	07/08/2012	5,100	0,020	105,0	0,005	0,048	5,10	0,019	97,9	0,004	0,052
Média		4,468	0,024	88,32	0,007	0,050	4,58	0,024	83,0	0,006	0,055
D.P.		0,7	0,004	9,83	0,001	0,002	0,84	0,005	10,4	0,006	0,007
Pós-migração sul	Data de captura	Estimativa do Vol. (mm ³) FHE	CEG m=1 FHE	Estimativa do (mm ³) TE	CEG m=1 TE	Vol. LHF /Vol. TE	Estimativa do (mm ³) FHD	CEG m=1 RHF	Estimativa Vol. (mm ³) TD	CEG=1 TD	Vol. RHF /Vol. TD
<i>C.pusilla</i> 06	03/03/2009	5,82	0,023	67,70	0,023	0,085	5,55	0,024	72,4	0,020	0,077
<i>C.pusilla</i> 07	14/01/2014	6,66	0,022	108,0	0,008	0,061	6,39	0,019	111,0	0,007	0,058
<i>C.pusilla</i> 08	10/11/2014	6,45	0,024	95,30	0,005	0,067	5,28	0,025	99,2	0,006	0,053
<i>C.pusilla</i> 09	10/11/2014	6,24	0,026	117,0	0,006	0,053	5,37	0,029	120,0	0,006	0,045
<i>C.pusilla</i> 10	10/11/2014	6,27	0,023	81,90	0,011	0,076	5,25	0,025	83,1	0,011	0,063
Média		6,288	0,024	93,98	0,011	0,069	5,57	0,024	97,1	0,010	0,059
D.P.		0,31	0,002	19,8	0,007	0,01	0,47	0,024	19,5	0,020	0,012

Tabela 16. Resultados esterológicos com estimativa numérica dos neurônios **Dcx positivos do telencéfalo** do hemisfério esquerdo (TE) e do hemisfério direito (TD) durante a migração e na pós-migração de *Calidris pusilla*.

Migração sul TE	Data de captura	Nº de células	CES	Espessura (µm)	Migração sul TD	Data de captura	Nº de células	CE Scheaffer	Espessura (µm)
<i>C. pusilla</i> 01	04/08/12	2.098.918	0,029	22	<i>C. pusilla</i> 01	04/08/12	2.056.702	0,028	22
<i>C. pusilla</i> 02	04/08/12	2.007.998	0,032	23	<i>C. pusilla</i> 02	04/08/12	2.085.012	0,031	23
<i>C. pusilla</i> 03	12/08/12	2.088.195	0,029	23	<i>C. pusilla</i> 03	12/08/12	1.975.232	0,028	22
<i>C. pusilla</i> 04	07/08/12	1.030.471	0,040	25	<i>C. pusilla</i> 04	07/08/12	965.740	0,045	24
<i>C. pusilla</i> 05	07/08/12	2.482.799	0,033	22	<i>C. pusilla</i> 05	07/08/12	2.196.072	0,034	22
Média		1.941.675			Média		1.855.751		22,62
Desvio padrão		541.687			Desvio padrão		503.774		
Pós-migração sul TE					Pós-migração TD				
<i>C. pusilla</i> 06	03/03/09	2.413.727	0,039	38	<i>C. pusilla</i> 06	03/03/09	2.732.833	0,033	35,0
<i>C. pusilla</i> 07	14/01/14	3.055.404	0,038	29	<i>C. pusilla</i> 07	14/01/14	3.320.946	0,036	28,0
<i>C. pusilla</i> 08	10/11/14	1.892.190	0,047	27	<i>C. pusilla</i> 08	10/11/14	1.853.989	0,047	30,0
<i>C. pusilla</i> 09	10/11/14	2.341.529	0,035	28	<i>C. pusilla</i> 09	10/11/14	2.381.463	0,032	28,0
<i>C. pusilla</i> 10	10/11/14	1.637.461	0,041	29	<i>C. pusilla</i> 10	10/11/14	1.602.062	0,041	28,0
Média		2.268.062			Média		2.378.258		29,8
Desvio padrão		544.394,34			Desvio padrão		687.701,33		

ANEXO II

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trcheo 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 9970 - CEP 70818-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 20/06/2016 3) Válido Até/Valid Until: 20/12/2016	
4) Licença nº/Permit n°: 16BR020816/DF		6) Selo nº/Stamp n°: *****		8) Controle/Check #: H4DWY9RWWXSYBHJ	
5) Licença de/Permit for Importação/Import		7) Selo/Stamp *****		9) Autoridade Adm. Emissão/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature	
10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URUTA 001 BRAGANCA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR			11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporte) David Francis Sherry 69 Lonedale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA		
12) País Importador/Country of Import Brasil - BR			13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Canada - CA		
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Científico/Scientific...					
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations.					
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/A Belém Data Provável/Probable Date: 15/08/2016 ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.					
17) Item		18) Produto/Product		19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit	
20) Espécie: nome científico nome vulgar Species: scientific name common name		21) Anexo/Origem Appendix/Source		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	
23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Data		24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Data			
20) 1. Catfish pusilla Magarico-rastriinho Serrapinnatus-sandpaper		21) NC W		18) CEREBRO/BRAIN 22) cerebro/brain 10,00 UN -	
				19) - - 10,00 UN - - 23) - - 24) - -	
Fim dos Itens/Items End					
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement					
Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.
ASSINATURAS/SIGNATURE					
Verificar/Verify: http://ibama.gov.br/ctes/verificar E-mail: ctes.sede@ibama.gov.br 1ª Via - Original - Importador Exportador - Brasil Importer Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador Importador - Estrangeiro Exporter Importer - Other Country					

Instruções e explicações

(Os números das instruções correspondem aos do formulário)

- 1- Número da página / número de páginas.
- 2- Data de Emissão.
- 3- Data de Validade. O prazo de validade de uma licença não deve exceder 6 meses. Passado o último dia do prazo de validade, o documento torna-se nulo e sem qualquer valor jurídico, e o original e todas as cópias devem ser devolvidas pelo titular, à Autoridade Administrativa emissora. Uma licença de importação/reexportação não é válida se o correspondente documento CITES do país de exportação/reexportação tiver sido utilizado para a (re)exportação após o último dia do respectivo prazo de validade.
- 4- Número único do documento atribuído pela Autoridade Administrativa emiteente.
- 5- Tipo de documento expedido (licença de importação, de exportação, de reexportação ou outro).
- 6- Número do Selo de Segurança.
- 7- Selo de segurança deve ser validado com a rubrica da Autoridade Administrativa emiteente. O número do selo deve estar claramente legível.
- 8- Código da Segurança. Este código juntamente com o número da licença permite verificar, via Internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>), a validade do documento.
- 9- Dados e assinatura da Autoridade Administrativa responsável pela emissão da licença.
- 10- Nome e endereço completos do importador, inclusive o país.
- 11- Nome e endereço completos do exportador/reexportador, inclusive o país.
- 12- Nome completo do país importador.
- 13- Nome completo do país exportador.
- 14- Finalidade da operação, utilizar um dos seguintes códigos para indicar:
B Criação em cativeiro ou reprodução artificial;
E Fins educacionais;
G Jardim botânico;
H Troféu de caça;
M Pesquisa biomédica;
N Reintrodução ou introdução no meio silvestre;
P Uso pessoal;
Q Circo ou exposição itinerante;
S Fins científicos;
T Fins comerciais;
Z Jardim zoológico.
- 15- As condições especiais podem referir-se à legislação brasileira ou condições especiais determinadas pela Autoridade Administrativa emiteente. Este campo pode ser utilizado para justificar a omissão/falta de informações.
- 16- Data e local prováveis de entrada/saída no Brasil. Esta licença é válida somente para uma operação.
- 17- Numeração sequencial dos itens que serão importados/exportados/reexportados.
- 18- Tipo de produto (por exemplo: luva, animal vivo, mobiliário, acessórios).
- 19- Quantidade do produto e Unidade de medida. Não sendo possível determinar a quantidade deve-se especificar a unidade de medida utilizada, por exemplo o peso.
- 20- Nome científico (gênero, espécie e eventualmente sub-espécie) do animal ou planta tal como consta nos Anexos da Convenção ou nas listas de referência aprovadas na Conferência das Partes / Nome comum da espécie utilizado no Brasil.
- 21- Anexo (I, II ou III) no qual está incluída a espécie e Origem da espécie, utilizar os seguintes códigos:
A - Planta reproduzida artificialmente (Art.VII, 5 e Res. Conf.11.11)
C - Animal reproduzido em cativeiro
D - Espécime do Anexo I reproduzido em cativeiro ou artificialmente com finalidade comercial (Art. VII, 4 e Res. Conf. 12.10).
F - Animal nascido em cativeiro (F1 ou gerações posteriores)
O - Espécime pré-convenção
R - Espécime de criadouro com manejo semi-extensivo (ranching)
U - Espécime com origem desconhecida
W - Espécime com origem silvestre (coletado no meio silvestre)
- 22- Descrição mais exata possível da parte dos espécimes objeto do comércio (animal vivo, peles, planta, carteiras, sapatos, etc.), quantidade, unidade de medida, e marcação individual dos espécimes (acres, anilhas, micro-chip), frisão da cota de exportação (por exemplo: 500/1000) e se possível o sexo e a idade dos animais vivos.
- 23- País de origem em que o espécime foi retirado na natureza, reproduzido em cativeiro ou artificialmente. Informar o país de origem e o número da licença de exportação ou certificado de origem (tipo, número e data).
- 24- País da última reexportação, é o país de onde vem o espécime antes de entrar no país de destino deste documento. Informar o país de reexportador e o número de licença de reexportação (tipo, número e data). Para espécimes de espécies incluídas no Anexo I criados em cativeiro ou reproduzidos artificialmente deverá ser informado o número da operação. Para os espécimes pré-convenção deverá ser informado o certificado pré-convenção
- 25- Este campo deverá ser preenchido pelo funcionário da alfândega que inspeciona a remessa no momento da exportação/reexportação/importação, que deve anotar as quantidades efetivamente exportados/reexportados e anular os campos não utilizados.

Instructions and Explanations

(The listing numbers are equivalent to the forms)

- 1- Page Number/Number of pages
- 2- Issuing Date
- 3- Expiring date. The expiring date of the document should not exceed 6 months. After the expiring date the document is no longer valid, therefore, without any legal force, and the original document and all its copies must be returned by the stular to the Management Authority that issued the document. An Import CITES Permit is not valid if the corresponding document of the exporting country had been used for re-exportation after the expiring date
- 4- Unique number issued by the Management Authority
- 5- Type of document issued (export permit, re-export certificate, import permit or other).
- 6- Number of the security stamp
- 7- Security stamp - must be validated with the signature of the Management Authority Officer issuing the document. The security stamp must be clearly legible.
- 8- Security code. This code and the number of permit allow to check it at internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>).
- 9- Management Authority information and signature.
- 10- Complete name and address of the importer, including the country.
- 11- Complete name and address of the exporter/re-exporter, including the country.
- 12- Complete name of the importer country.
- 13- Complete name of the exporter country.
- 14- Purpose of the transaction Codes:
B - Bred in captivity or artificial reproduction;
E - Education purposes;
G - Botanical Garden;
H - Hunting trophy;
M - Medical research;
N - Reintroduction in the wild;
P - Personal;
Q - Circus or itinerary exhibition;
S - Scientific purposes;
T - Commercial purposes;
Z - Zoo
- 15- The special conditions may refer to the Brazilian Legislation or to the conditions established by the issuing management authority. This space can be used to justify the omission/lack of information.
- 16- Probable date and local of transportation in Brazil.
- 17- Sequential numbers of the items that will be imported/exported/re-exported. This permit or certificate is only valid for one trade.
- 18- Product (for example: glove, live animal, furniture, garment)
- 19- Quantity of the product and Unit. If it is not possible to estimate the quantity it should be specified the unit of measurement used, for example, the weight.
- 20- Scientific name (genre, species, and casually subspecies) of the animal or plant just as in the Appendices of the Convention or in the lists used of reference approved by the Convention of the Parties / Species' common name used in Brazil.
- 21- Appendix (I, II or III) in which is included the species and origin the species, it is used the following codes:
A - Plant artificially reproduced (Art. VII, 5 and Res. Conf. 11.11)
C - Animal bred in captivity
D - Species of Appendix I, reproduced in captivity or artificially with commercial purposes (Art. VII 4 and Res. Conf. 12.10)
F - Animal bred in captivity (F1 or later offspring)
O - Species pre-Convention
R - Ranching species
U - Unknown origin
W - Wild origin (collected in wild)
- 22- Description of the part of the specimens that will be commercialised (live animal, furs, plants, wallets, shoes, etc.), quantity, unit, the individual mark of the specimens (sea, leg band, microchip, etc), the current annual quota (for example 500/1000), and if possible the sex and age of the alive animals.
- 23- Country of origin is the country in which the specimens were taken from the wild, bred in captivity or artificially propagated. Indicate the country of origin and the number of the permit or certificate of the exporting country and the date of issuance. This block must only be completed in case of re-exports.
- 24- Country of last re-export is the country from which the specimens were re-exported before entering the country in which the present document is issued. Indicate the country of last re-export and the number of the re-export certificate of the country of last re-export and its date of issuance. This block must only be completed in case of re-export of specimens previously re-exported
- 25- To be completed by the official who inspects the shipment at the time of import / export / re-export. Enter the quantities of specimens actually. Strike out the unused blocks.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
 E DOS RECURSOS NATURAIS
 RENOVÁVEIS - IBAMA
 SCEN Techo 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 29879 - CEP 70619-900 - Brasília-DF



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
 E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA

1) Pag. Nº 1/1
 2) Data Emissão/Issuing Date: 20/06/2016
 3) Válido Até/Valid Until: 20/12/2016

4) Licença n°/Permit n°: 16BR020816/DF	6) Selo n°/Stamp n°: ***** 7) Selo/Stamp *****	8) Controle/Check 1: H4DWY4RWWX5YHJ 9) Autoridade Adm. Emissora/Issuing Management Authority Assinatura/Signature
5) Licença de/Permit for Importação/Import		

10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URLUTÁ 001 BRAGANÇA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) David Francis Sherry 69 Lonsdale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA
12) País Importador/Country of Import Brasil - BR	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Canada - CA

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction
 S - Científico/Scientific

15) Condições Especiais/Special Conditions
 For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations.

16) Dados do Transporte/Transportation Data
 Local/Place: ALF/Al Belém
 Data Provável/Probable Date: 15/08/2016
 ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/
 THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
20) 1. <i>Calidris pusilla</i> Magaño-rasteirinho Semipalmado-sandáspex	21) NC W	18) CEREBRO/BRAIN 22) cerebro/brain 10,00 UN -	19) -- 10,00 UN -- 23) - - 24) - -

Fim dos Itens/Items End

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.	Item	Qty./Qty.
------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------

ASSINATURA/SIGNATURE

1 Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: cites.sede@ibama.gov.br
 1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil
 2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country
 3ª Via - Aduana / Customs
 4ª Via - IBAMA

Instruções e explicações

(Os números das instruções correspondem aos do formulário)

- 1- Número da página / número de páginas.
- 2- Data de Emissão.
- 3- Data de Validade. O prazo de validade de uma licença não deve exceder 6 meses. Passado o último dia do prazo de validade, o documento torna-se nulo e sem qualquer valor jurídico, e o original e todas as cópias devem ser devolvidos pelo titular, à Autoridade Administrativa emissora. Uma licença de importação não é válida se o correspondente documento CITES do país de exportação/reexportação tiver sido utilizado para a (re)exportação após o último dia do respectivo prazo de validade.
- 4- Número único do documento atribuído pela Autoridade Administrativa emitente.
- 5- Tipo de documento expedido (licença de importação, de exportação, de reexportação ou outro).
- 6- Número do Selo de Segurança.
- 7- Selo de segurança deve ser validado com a rubrica da Autoridade Administrativa emitente. O número do selo deve estar claramente legível.
- 8- Código da Segurança. Este código juntamente com o número da licença permite verificar, via Internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>), a validade do documento.
- 9- Dados e assinatura da Autoridade Administrativa responsável pela emissão da licença.
- 10- Nome e endereço completos do importador, inclusive o país.
- 11- Nome e endereço completos do exportador/reexportador, inclusive o país.
- 12- Nome completo do país importador.
- 13- Nome completo do país exportador.
- 14- Finalidade da operação, utilizar um dos seguintes códigos para indicar:
B - Crisção em cativeiro ou reprodução artificial;
E - Fins educativos;
G - Jardim botânico;
H - Tófeu de caça;
M - Pesquisa biomédica;
N - Reintrodução ou introdução no meio silvestre;
P - Uso pesqueiro;
Q - Circo ou exposição itinerante;
S - Fins científicos;
T - Fins comerciais;
Z - Jardim zoológico.
- 15- As condições especiais podem referir-se à legislação brasileira ou condições especiais determinadas pela Autoridade Administrativa emitente. Este campo pode ser utilizado para justificar a omissão/falta de informações.
- 16- Data e local provável de entrada/saída no Brasil. Esta licença é válida somente para uma operação.
- 17- Numeração sequencial dos itens que serão importados/exportados/reexportados.
- 18- Tipo de produto (por exemplo: lã, animal vivo, mobiliário, acessórios).
- 19- Quantidade do produto e Unidade de medida. Não sendo possível determinar a quantidade deve-se especificar a unidade de medida utilizada, por exemplo o peso.
- 20- Nome científico (gênero, espécie e eventualmente sub-espécie) do animal ou planta tal como consta nos Anexos da Convenção ou nas listas de referência aprovadas na Conferência das Partes / Nome comum da espécie utilizado no Brasil.
- 21- Anexo (I, II ou III) no qual está incluída a espécie e Origem da espécie, utilizar os seguintes códigos:
A - Planta reproduzida artificialmente (Art.VII, 5 e Res. Conf.11.11)
C - Animal reproduzido em cativeiro
D - Espécime do Anexo I reproduzido em cativeiro ou artificialmente com finalidade comercial (Art. VII, 4 e Res. Conf. 12.10).
F - Animal nascido em cativeiro (F1 ou gerações posteriores)
G - Espécime pré-convenção
R - Espécime de criadouro com manejo semi-extensivo (ranching)
U - Espécime com origem desconhecida
W - Espécime com origem silvestre (coletado no meio silvestre)
- 22- Descrição mais exata possível da parte dos espécimes objeto do comércio (animal vivo, peles, plantas, cartelas, sapatos, etc.), quantidade, unidade de medida, a marcação individual dos espécimes (lares, anilhas, micro-chip), fração da cota de exportação (por exemplo: 500/1000) e se possível o sexo e a idade dos animais vivos.
- 23- País de origem em que o espécime foi retirado na natureza, reproduzido em cativeiro ou artificialmente. Informar o país de origem e o número da licença de exportação ou certificado de origem (tipo, número e data).
- 24- País da última reexportação, é o país de onde vem o espécime antes de entrar no país de destino deste documento. Informar o país de reexportador e o número de licença de reexportação (tipo, número e data). Para espécimes de espécies incluídas no Anexo I criados em cativeiro ou reproduzidos artificialmente deverá ser informado o número da operação. Para os espécimes pré-convenção deverá ser informado o certificado pré-convenção
- 25- Este campo deverá ser preenchido pelo funcionário da alfândega que inspeciona a remessa no momento da exportação/reexportação/importação, que deve anotar as quantidades efetivamente exportadas/reexportadas e anular os campos não utilizados.

Instructions and Explanations

(The listing numbers are equivalent to the forms)

- 1- Page Number/Number of pages
- 2- Issuing Date
- 3- Expiring date. The expiring date of the document should not exceed 6 months. After the expiring date the document is no longer valid, therefore, without any legal force, and the original document and all its copies must be returned by the titular to the Management Authority that issued the document. An import CITES Permit is not valid if the corresponding document of the exporting country had been used for re-exportation after the expiring date.
- 4- Unique number issued by the Management Authority
- 5- Type of document issued (export permit, re-export certificate, import permit or other)
- 6- Number of the security stamp
- 7- Security stamp - must be validated with the signature of the Management Authority Officer issuing the document. The security stamp must be clearly legible.
- 8- Security code. This code and the number of permit allow to check it at internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>).
- 9- Management Authority information and signature
- 10- Complete name and address of the importer, including the country
- 11- Complete name and address of the exporter-exporter, including the country
- 12- Complete name of the importer country
- 13- Complete name of the exporter country
- 14- Purpose of the transaction Codes
B - Bred in captivity or artificial reproduction;
E - Education purposes;
G - Botanical garden;
H - Hunting trophy;
M - Medical research;
N - Reintroduction in the wild;
P - Personal;
Q - Circus or itinerary exhibition;
S - Scientific purposes;
T - Commercial purposes;
Z - Zoo
- 15- The special conditions may refer to the Brazilian Legislation or to the conditions established by the issuing management authority. This space can be used to justify the omission/lack of information.
- 16- Probable date and local of transportation in Brazil.
- 17- Sequential numbers of the items that will be imported/exported/re-exported. This permit or certificate is only valid for one trade.
- 18- Product (for example: glove, live animal, furniture, garment)
- 19- Quantity of the product and Unit, if it is not possible to estimate the quantity it should be specified the unit of measurement used, for example, the weight
- 20- Scientific name (genre, species, and casually subspecies) of the animal or plant just as in the Appendices of the Convention or in the lists used of references approved by the Convention of the Parties / Species' common name used in Brazil.
- 21- Appendix (I, II or III) in which is included the species and origin the species, it is used the following codes:
A - Plant artificially reproduced (Art. VII, 5 and Res. Conf. 11.11)
C - Animal bred in captivity
D - Species of Appendix I, reproduced in captivity or artificially with commercial purposes (Art. VII 4 and Res. Conf. 12.10)
F - Animal bred in captivity (F1 or later offspring)
G - Species pre-Convention
R - Ranching species
U - Unknown origin
W - Wild origin (collected in wild)
- 22- Description of the part of the specimens that will be commercialised (alive animal, furs, plants, wallets, shoes, etc.), quantity, unit, the individual mark of the specimens (scar, leg band, microchip, etc), the current annual quota (for example 500/1000), and if possible the sex and age of the alive animals.
- 23- Country of origin is the country in which the specimens were taken from the wild, bred in captivity or artificially propagated. Indicate the country of origin and the number of the permit or certificate of the exporting country and the date of issuance. This block must only be completed in case of re-exports;
- 24- Country of last re-export is the country from which the specimens were re-exported before entering the country in which the present document is issued. Indicate the country of last re-export and the number of the re-export certificate of the country of last re-export and its date of issuance. This block must only be completed in case of re-export of specimens previously re-exported
- 25- To be completed by the official who inspects the shipment at the time of import / export / re-export. Enter the quantities of specimens actually. Strike out the unused blocks.

Instruções e explicações

(Os números das instruções correspondem aos do formulário)

- 1- Número da página / número de páginas.
- 2- Data de Emissão.
- 3- Data de Validade. O prazo de validade de uma licença não deve exceder 6 meses. Passado o último dia do prazo de validade, o documento torna-se nulo e sem qualquer valor jurídico, e o original e todas as cópias devem ser devolvidos pelo titular à Autoridade Administrativa emissora. Uma licença de importação/reexportação não é válida se o correspondente documento CITES do país de exportação/reexportação tiver sido utilizado para a (re)exportação após o último dia do respectivo prazo de validade.
- 4- Número Único do documento atribuído pela Autoridade Administrativa emitente.
- 5- Tipo de documento expedido (licença de importação, de exportação, de reexportação ou outro).
- 6- Número do Selo de Segurança.
- 7- Selo de segurança deve ser validado com a rubrica da Autoridade Administrativa emitente. O número do selo deve estar claramente legível.
- 8- Código da Segurança. Este código juntamente com o número da licença permite verificar, via Internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>), a validade do documento.
- 9- Dados e assinatura da Autoridade Administrativa responsável pela emissão da licença.
- 10- Nome e endereço completos do importador, inclusive o país.
- 11- Nome e endereço completos do exportador/reexportador, inclusive o país.
- 12- Nome completo do país importador.
- 13- Nome completo do país exportador.
- 14- Finalidade da operação, utilizar um dos seguintes códigos para indicar:
B Criação em cativeiro ou reprodução artificial;
E Fins educativos;
G Jardim botânico;
H Troféu de caça;
M Pesquisa biomédica;
N Reintrodução ou introdução no meio silvestre;
P Uso pessoal;
Q Circo ou exposição itinerante;
S Fins científicos;
T Fins comerciais;
Z Jardim zoológico.
- 15- As condições especiais podem referir-se à legislação brasileira ou condições especiais determinadas pela Autoridade Administrativa emitente. Este campo pode ser utilizado para justificar a omissão/falta de informações.
- 16- Data e local provável de entrada/saída no Brasil. Esta licença é válida somente para uma operação.
- 17- Numeração sequencial dos itens que serão importados/exportados/reexportados.
- 18- Tipo de produto (por exemplo: luva, animal vivo, mobiliário, acessórios).
- 19- Quantidade do produto e Unidade de medida. Não sendo possível determinar a quantidade deve-se especificar a unidade de medida utilizada, por exemplo o peso.
- 20- Nome científico (gênero, espécie e eventualmente sub-espécie) do animal ou planta tal como consta nos Anexos da Convenção ou nas listas de referência aprovadas na Conferência das Partes / Nome comum da espécie utilizado no Brasil.
- 21- Anexo (I, II ou III) no qual está incluída a espécie e Origem da espécie, utilizar os seguintes códigos:
A - Planta reproduzida artificialmente (Art.VII, 5 e Res. Conf. 11.11)
C - Animal reproduzido em cativeiro
D - Espécime do Anexo I reproduzido em cativeiro ou artificialmente com finalidade comercial (Art. VII, 4 e Res. Conf. 12.10)
F - Animal nascido em cativeiro (F1 ou gerações posteriores)
G - Espécime pré-convenção
R - Espécime de criadouro com manejo semi-extensivo (ranching)
U - Espécime com origem desconhecida
W - Espécie com origem silvestre (coletado no meio silvestre)
- 22- Descrição mais exata possível da parte dos espécimes objeto do comércio (animal vivo, peles, plantas, cartelas, sapatos, etc.), quantidade, unidade de medida, a marcação individual dos espécimes (lacres, anilhas, micro-chip), fração da cota de exportação (por exemplo: 500/1000) e se possível o sexo e a idade dos animais vivos.
- 23- País de origem em que o espécime foi retirado na natureza, reproduzido em cativeiro ou artificialmente. Informar o país de origem e o número da licença de exportação ou certificado de origem (tipo, número e data).
- 24- País da última reexportação, é o país de onde vem o espécime antes de entrar no país de destino deste documento. Informar o país de reexportador e o número de licença de reexportação (tipo, número e data). Para espécimes de espécies incluídas no Anexo I criados em cativeiro ou reproduzidos artificialmente deverá ser informado o número da operação. Para os espécimes pré-convenção deverá ser informado o certificado pré-convenção.
- 25- Este campo deverá ser preenchido pelo funcionário da alfândega que inspeciona a remessa no momento da exportação/reexportação/importação, que deve anotar as quantidades efetivamente exportados/reexportados e anular os campos não utilizados.

Instructions and Explanations

(The listing numbers are equivalent to the forms)

- 1- Page Number/Number of pages
- 2- Issuing Date
- 3- Expiring date. The expiring date of the document should not exceed 6 months. After the expiring date the document is no longer valid, therefore, without any legal force, and the original document and all its copies must be returned by the holder to the Management Authority that issued the document. An Import CITES Permit is not valid if the corresponding document of the exporting country had been used for re-exportation after the expiring date.
- 4- Unique number issued by the Management Authority
- 5- Type of document issued (export permit, re-export certificate, import permit or other).
- 6- Number of the security stamp.
- 7- Security stamp - must be validated with the signature of the Management Authority Officer issuing the document. The security stamp must be clearly legible.
- 8- Security code. This code and the number of permit allow to check it at internet (<http://verificar.ibama.gov.br/cites>).
- 9- Management Authority information and signature.
- 10- Complete name and address of the importer, including the country.
- 11- Complete name and address of the exporter/re-exporter, including the country.
- 12- Complete name of the importer country.
- 13- Complete name of the exporter country.
- 14- Purpose of the transaction Codes:
B - Bred in captivity or artificial reproduction;
E - Education purposes;
G - Botanical Garden;
H - Hunting trophy;
M - Medical research;
N - Reintroduction in the wild;
P - Personal;
Q - Circus or itinerary exhibition;
S - Scientific purposes;
T - Commercial purposes;
Z - Zoo
- 15- The special conditions may refer to the Brazilian Legislation or to the conditions established by the issuing management authority. This space can be used to justify the omission/lack of information.
- 16- Probable date and local of transportation in Brazil.
- 17- Sequential numbers of the items that will be imported/exported/re-exported. This permit or certificate is only valid for one trade.
- 18- Product (for example: glove, live animal, furniture, garment)
- 19- Quantity of the product and Unity, if it is not possible to estimate the quantity it should be specified the unit of measurement used, for example, the weight.
- 20- Scientific name (genre, species, and casually subspecies) of the animal or plant just as in the Appendices of the Convention or in the lists used of reference approved by the Convention of the Parties / Species' common name used in Brazil.
- 21- Appendix (I, II or III) in which is included the species and origin the species, it is used the following codes:
A - Plant artificially reproduced (Art. VII, 5 and Res. Conf. 11.11)
C - Animal bred in captivity
D - Species of Appendix I, reproduced in captivity or artificially with commercial purposes (Art. VII 4 and Res. Conf. 12.10)
F - Animal bred in captivity (F1 or later offspring)
G - Species pre-Convention
R - Ranching species
U - Unknown origin
W - Wild origin (collected in wild)
- 22- Description of the part of the specimens that will be commercialised (live animal, furs, plants, wallets, shoes, etc.), quantity, unit, the individual mark of the specimens (seal, leg band, microchip, etc), the current annual quota (for example 500/1000), and if possible the sex and age of the live animals.
- 23- Country of origin is the country in which the specimens were taken from the wild, bred in captivity or artificially propagated. Indicate the country of origin and the number of the permit or certificate of the exporting country and the date of issuance. This block must only be completed in case of re-exports.
- 24- Country of last re-export is the country from which the specimens were re-exported before entering the country in which the present document is issued. Indicate the country of last re-export and the number of the re-export certificate of the country of last re-export and its date of issuance. This block must only be completed in case of re-export of specimens previously re-exported.
- 25- To be completed by the official who inspects the shipment at the time of import / export / re-export. Enter the quantities of specimens actually. Strike out the unused blocks.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
 E DOS RECURSOS NATURAIS
 RENOVÁVEIS - IBAMA
 SCEN Tracto 2 - ES. Sede - Caixa Postal nº 69879 - CEP 70616-900 - Brasília-DF



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
 E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA

1) Pag. Nº 1/1
 2) Data Emissão/Issuing Date: 20/06/2016
 3) Válido Até/Valid Until: 20/12/2016

4) Licença n°/Permit n°: 16BR020816/DF	6) Selo n°/Stamp n°: ***** 7) Selo/Stamp *****	8) Controle/Check 1: H40WYARWXX5YHJ 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority Assinatura/Signature <i>Maria Izabel Soares Gomes</i> CITES Management Authority IBAMA/IBAMA
5) Licença de/Permit for Importação/Import		

10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URUTÁ 001 BRAGANÇA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) David Francis Sherry 69 Loradale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA
---	--

12) País Importador/Country of Import Brasil - BR	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Canada - CA
--	--

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction
S - Científico/For scientific purposes...

15) Condições Especiais/Special Conditions
For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations

16) Dados do Transporte/Transportation Data
Local/Place: ALF/AI Belém
Data Provável/Probable Date: 15/06/2016
ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO!
THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name	21) Anexo/Origem Appendix/Source	22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark
		23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date
		24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) I	18) CEREBROBRAIN	19) -- 10,00 UN --
20) 1. Calidris pusilla Maçarico-rastrelirinho Scaup-billed sandpiper	21) NC W	22) cerebro/brain 10,00 UN -
		23) - -
		24) - -

Fim dos Itens/Items End

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty

ASSINATURA/SIGNATURE

1) Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: cites.sede@ibama.gov.br
 1* Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44551-1	Data da Emissão: 03/07/2014 08:55	Data para Revalidação*: 02/08/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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 IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 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 www.ibama.gov.br (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 e o material biológico coletado apreendido 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 www.mma.gov.br/gen .
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 (paulo.oliveira@icmbio.gov.br / (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: resexcaete@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 Caeté e Taperapu 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 n°154/2007. 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).

Código de autenticação: 17785834



Página 1/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44551-1	Data da Emissão: 03/07/2014 08:55	Data para Revalidação*: 02/08/2015
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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 Piñá 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	019.498.982-34	5525405 SEGUP-PA	Brasileira
3	Mauro André Damasceno de Melo	Pesquisador	634.232.192-20	3266610 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-TAPERAÇU	UC Federal
2		PA	RESERVA EXTRATIVISTA MARINHA DE GURUPI-PIPIÁ	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	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 nº154/2007. 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).

Código de autenticação: 17785834



Página 2/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44551-1	Data da Emissão: 03/07/2014 08:55	Data para Revalidação*: 02/08/2015
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, 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 nº154/2007, 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 nº154/2007. 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).

Código de autenticação: 17785834



Página 3/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44551-1	Data da Emissão: 03/07/2014 08:55	Data para Revalidação*: 02/08/2015
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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 nº154/2007. 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).

Código de autenticação: 17785834



Página 4/4

ANEXO III

Publicação associada a Tese

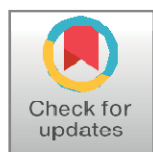
RESEARCH ARTICLE

Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*)

Nara Gyzely de Morais Magalhães^{1*}, Cristovam Guerreiro Diniz², Daniel Guerreiro Diniz¹, Ediely Pereira Henrique², Patrick Douglas Corrêa Pereira², Isis Ananda Matos Moraes², Mauro André Damasceno de Melo², David Francis Sherry³, Cristovam Wanderley Picanço Diniz¹

1 Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, Pará, Brasil, **2** Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Bragança, Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia, Bragança, Pará, Brasil, **3** University of Western Ontario, Department of Psychology Advanced Facility for Avian Research, London, Ontario, Canada

* cristovam.diniz@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: de Morais Magalhães NG, Guerreiro Diniz C, Guerreiro Diniz D, Pereira Henrique E, Corrêa Pereira PD, Matos Moraes IA, et al. (2017) Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*). PLoS ONE 12(6): e0179134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179134>

Editor: Verner Peter Bingman, Bowling Green State University, UNITED STATES

Received: March 18, 2017

Accepted: May 24, 2017

Published: June 7, 2017

Copyright: © 2017 de Morais Magalhães et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Programa Ciências do Mar II; The Canadian Bureau for International Education (CBIE); The Brazilian Research Council (CNPq) Edital Universal Grant number 440722/2014-4;

Abstract

Long distance migratory birds find their way by sensing and integrating information from a large number of cues in their environment. These cues are essential to navigate over thousands of kilometers and reach the same breeding, stopover, and wintering sites every year. The semipalmated sandpiper (*Calidris pusilla*) is a long-distance migrant that breeds in the arctic tundra of Canada and Alaska and winters on the northeast coast of South America. Its fall migration includes a 5,300-kilometer nonstop flight over the Atlantic Ocean. The avian hippocampus has been proposed to play a central role in the integration of multisensory spatial information for navigation. Hippocampal neurogenesis may contribute to hippocampal function and a variety of factors including cognitive activity, exercise, enrichment, diet and stress influence neurogenesis in the hippocampus. We quantified hippocampal neurogenesis and volume in adult migrating and wintering semipalmated sandpipers using stereological counts of doublecortin (DCX) immunolabeled immature neurons. We found that birds captured in the coastal region of Bragança, Brazil during the wintering period had more DCX positive neurons and larger volume in the hippocampus than individuals captured in the Bay of Fundy, Canada during fall migration. We also estimate the number of NeuN immunolabeled cells in migrating and wintering birds and found no significant differences between them. These findings suggest that, at this time window, neurogenesis just replaced neurons that might be lost during the transatlantic flight. Our findings also show that in active fall migrating birds, a lower level of adult hippocampal neurogenesis is associated with a smaller hippocampal formation. High levels of adult hippocampal neurogenesis and a larger hippocampal formation found in wintering birds may be late occurring effects of long distance migratory flight or the result of conditions the birds experienced while wintering.

Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA); Programa de Apoio a Núcleos Emergentes and (FINEP); Instituto Brasileiro de Neurociências (IBNnet); and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

INTRODUCTION

The semipalmated sandpiper is a long-distance migrant that breeds in the arctic and undertakes an annual fall migration to South America. Geolocation tracking of a semipalmated sandpiper that bred on Coats Island in the Canadian arctic showed a six-day, non-stop flight from a stopover site on James Bay to the Orinoco Delta on the border of Venezuela and Guyana, followed by 11 days of further movement to northeastern Brazil where it spent the winter [1]. Its fall migratory path included a 5,300-kilometer flight over the Atlantic Ocean to South America. Approximately 75% of the world population of semipalmated sandpipers make a stopover during fall migration in the Bay of Fundy in Canada. Birds feed at stopovers to increase their fat reserves in order to sustain intense continuous exercise during the following days of non-stop flight [2].

The avian hippocampus plays a central role in spatial ability and spatial memory in birds as shown by single cell recording [3, 4], the effects of hippocampal lesions [5–8] and comparative analyses [6, 9–17]. There is evidence for hippocampal involvement in the spatial and navigational components of migration and homing [11, 18–20]. Adult neurogenesis in the avian hippocampus is specifically associated with migratory behavior [15, 21] and migratory birds have been shown to have better long term memory [22] and better spatial memory [19, 20] than non-migrants. Migrants combine visuospatial learning and memory with other navigational systems [23, 24] including cryptochrome magnetoreception [25, 26] to maintain orientation during flight. Enhanced adult hippocampal neurogenesis is a strong candidate as one of the mechanisms underlying spatial ability and navigation in migrants [15] and there is recent evidence for glial cell involvement as well [16].

Experiments with immediate early genes (IEGs) have showed significant changes in hippocampal activation patterns confirming the hippocampus role in navigation [27–30]. Indeed, their activation seems to be directly related with memory storage and to an increase in the neuronal activity in response to changes in the magnetic field [30–36].

There are many proposed functions for adult hippocampal neurogenesis. It may provide new neurons to encode new memories [37] or promote both forgetting and the acquisition of new memory [38]. Neurogenesis in the hippocampus may play a role in pattern separation, that is, distinguishing among similar events [39] or it may establish a reserve of new neurons that can be drawn on as needed [40]. The excitability of immature neurons may contribute to the remodelling of hippocampal circuits [41]. There are, in addition, many factors that increase adult hippocampal neurogenesis including cognitive activity, environmental enrichment, exercise, diet, stress, gonadal hormones, and aging [42–47].

Because many of these multivariate influences are present in long distance migration we hypothesized that neurogenesis in the hippocampal formation of migrating birds would be higher than that of wintering birds. Indeed, we expect that the negative influence of the exhausting exercise associated with the long distance migratory flight would be less intense than the other positive influences and this would upregulate neurogenesis. To test this hypothesis, we compared the number of new and adult neurons in the hippocampus of semipalmated sandpipers captured during fall migration in August at stopover in the Bay of Fundy, Canada, with that of individuals captured while wintering in the northeastern coastal region of Brazil near Bragança, Pará.

MATERIAL AND METHODS

A total of thirteen individuals were used, eight migrating *C. pusilla* (01,02,03,04,05,11,12,13) were collected in August 2012 at the Bay of Fundy, Canada ($45^{\circ}50'19.3''$ N and $64^{\circ}31'5.39''$ W), we used *C. pusilla* 01, 02, 03, 04, 05 for DCX positive cell counts and volume estimation and *C. pusilla* 01, 11, 12, 03, 13 for NeuN cell counts. Other five wintering individuals (*C. pusilla* 06,07,08,09,10) were captured between November and March on Canela Island (four individuals in 2014 and one in 2009), in the tropical coastal zone of northern Brazil ($00^{\circ}47'09.07''$ S and $46^{\circ}43'11.29''$ W) and these were used only for DCX counts and volume.

Although the number of birds are different all statistical comparisons, were made between groups of 5 (five) individuals (except for NeuN counts extracted from previous report [16]) assuming unpaired samples and unequal variances. Semipalmated sandpipers reach the coastal zone of northern Brazil in August and September and begin migration to the arctic between May and July (Fig 1).

Birds were captured under license N° 44551–2 from the Chico Mendes Institute for conservation of Biodiversity (ICMBio) and Scientific Capture permit ST2783 from the Canadian Wildlife Service. All procedures were carried out in accordance with National Institutes of Health (USA) and Brazilian regulations for scientific procedures on animals and with approval of the Animal Users Subcommittee of the University of Western Ontario. All efforts were made to minimize the number of animals used and the stress and discomfort to animals.

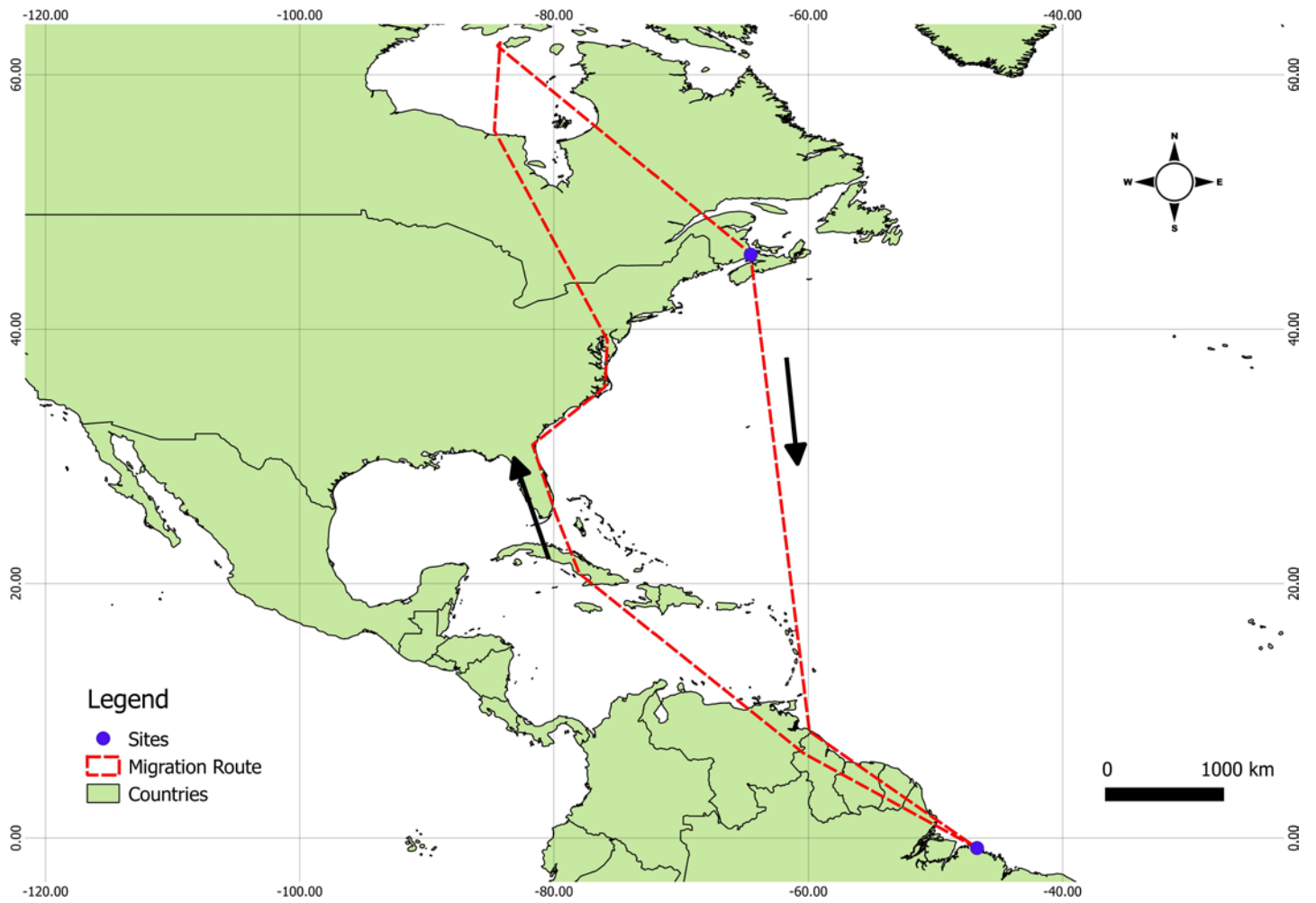


Fig 1. Migratory routes. Map with the migratory routes. Blue dots are the sampling sites. Red traced lines are the routes [48]. Scale bar: 1000 km.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179134.g001>

Perfusion and histology

Immediately after capture (still on the field) and under deep isoflurane anesthesia, birds were perfused transcardially with phosphate buffered saline 0.1M followed by aldehyde fixatives (4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2–7.4). Brains were dissected, stored in phosphate buffered saline 0.1M and cut by Vibratome (Leica VT1000S) or freezing microtome (Sliding Microtome, Reichert Jung) in the coronal plane. Six anatomical series of sections (6 parallel series), cut at 60 or 80 μ m in the freezing microtome or vibratome respectively, were immunolabeled for NeuN or DCX or stained by Nissl. Free-floating sections were immunolabeled with anti-doublecortin antibody (Santa Cruz SC-8066) or NeuN antibody (Milipore-Sigma, MAB377), and mounted on glass slides coated with an aqueous solution of gelatin (10%) and chromium potassium sulfate (0.5%). Sections were air-dried at room temperature, dehydrated, cleared in alcohol/xylene series and covered with 50% entellan (Entellan1 Novo 107961, Merck Milipore) diluted in xylene and cover slipped.

Immunohistochemistry

Free-floating sections were pre-treated with 0.2 M boric acid (pH 9) at 70°C for 60 min as an antigen retrieval method, washed in 1% phosphate buffer/saline/triton (PBST) and washed three times for 2 min each time in PBS. Sections were then immersed for 12 hours in 10% Normal Horse Serum Blocking Solution S-2000, Vector Laboratories (for DCX slides) and 10% Normal Goat Serum Blocking Solution S-1000 Vector Laboratories (for NeuN slides) transferred to the primary antibody (Doublecortin C-18, sc-8066 Santa Cruz Biotechnology and Anti-NeuN Mab 377 MilliporeSigma) diluted in PBST 0.3% (1:500) and incubated for 12h at 4°C with gentle and continuous agitation. Washed sections (PBST 1%) were then incubated overnight in the secondary antibody (Biotinylated Horse Anti-Goat IgG Antibody, BA-9500, Vector Laboratories (for DCX) and Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody, BA-9200, Vector Laboratories (for NeuN), 1:400 in PBST 0.3%) followed by 0.3% hydrogen peroxide for 15 minutes, washed three times in PBST for 2 min each time, then immersed in avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 37.5 μ l A, 37.5 μ l B in 13.12ml of 0.3% PBST) for 60 minutes. After a 2 min wash in PBS, sections were reacted to visualize DCX immunolabeled neurons using the glucose-oxidase-DAB-nickel method. As a control of the immunohistochemical labeling patterns we omitted the primary antibody and confirmed that the secondary antibody did not produce any unspecific labeling [49].

Hippocampal and telencephalon volumes

We defined the sandpiper hippocampal formation as comprising the hippocampus proper and the parahippocampal area [16]. To measure hippocampus volumes and the ratio between them we followed the total telencephalon method previously recommended [50]. To that end we used the optical fractionator, a standard stereological method that estimates volumes based on the Cavalieri principle [51]. Values for statistical analyses were extracted from doublecortin labelled anatomical series of sections. The telencephalon (telencephalon + hippocampus) volume was estimated between the first and the last tissue sections of the telencephalon as previously suggested [17].

After selective DCX and NeuN immunolabeling, we determined the number of neurons. We did not distinguish between migratory (elongate morphology) and recruited (spherical)

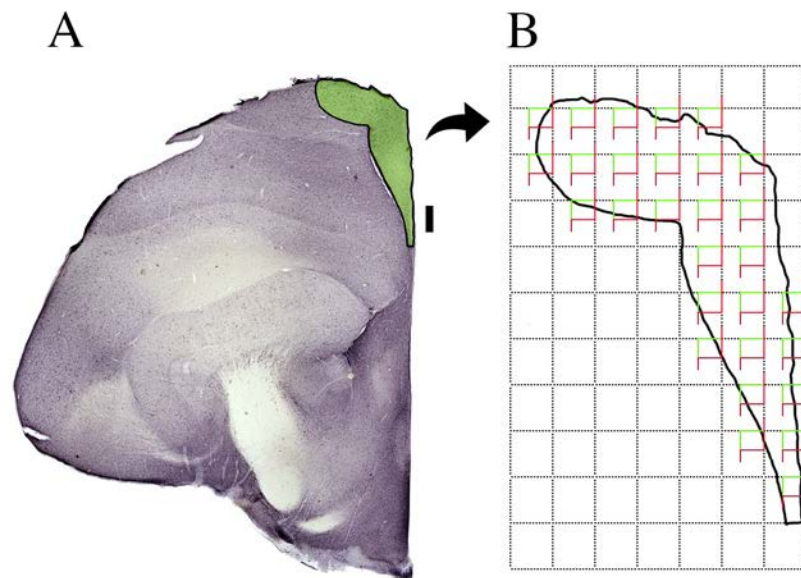


Fig 2. Hippocampal formation grid and counting frames. Example of a section of the left hippocampal formation highlighted in green color (A). Counting frames ($140 \times 106 \mu\text{m}$) were randomly and systematically placed in a $250 \times 250 \mu\text{m}$ grid (B). Scale bars: $500 \mu\text{m}$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179134.g002>

phenotypes [52, 53]. We used the optical fractionator to estimate total cell numbers [54–56]. The optical fractionator is unaffected by histological changes, shrinkage, or damage-induced expansion of tissue [57]. Each hippocampal contour from one hemisphere was digitized directly from each section using a 4.0X objective on a NIKON Eclipse CI (Nikon, Japan), equipped with a motorized stage (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). High power images were acquired under oil immersion, using a high-resolution 100x oil immersion plan apo objective (Nikon, NA 1.45, WD = $0.13 \mu\text{m}$), and Stereo Investigator software (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, USA). We began by screening the complete section from one hemisphere to delineate the hippocampal region. The borders of the hippocampal formation were defined according to the changes identified in the staining pattern. To unambiguously detect and count the objects of interest in the dissector probe, the low power objective was replaced by the high-resolution 100X oil immersion objective. At each counting site, the thickness of the section was carefully assessed using the high-power objective and the fine focus of the microscope to define the immediate defocus at the top and bottom of the section. Because both the thickness and neuron distribution in the sections were uneven, we estimated the total number of neurons based on the number-weighted section thickness. This value gives the estimated population count determined by the selected series of optical fractionator runs using the number-weighted section thickness [58]. All sampled neurons that came into focus inside the counting frame were counted and added to the total, provided cell bodies were entirely within the counting frame or intersected the acceptance line without touching the rejection line [51]. Counting frames ($140 \times 106 \mu\text{m}$) were randomly and systematically placed in a $250 \times 250 \mu\text{m}$ grid. Fig 2 shows an example of counting frames and grid placed over a section of the left hippocampal formation. The experimental parameters, volumes and counting results in the region of interest of left and right hemispheres are shown for each bird in the supplementary materials Tables A-G in S1 File. The grid size used was adapted to achieve an acceptable coefficient of error (CE). The calculation of the CE for the total neu-

ron count in each bird used in the present study adopted the one-stage systematic sampling procedure (Schaeffer CE) that has been previously validated [59]. The level of acceptable error in the stereological estimations was deFined by the ratio between the intrinsic error introduced by the methodology and the coefficient of variation. CE expresses the accuracy of the cell number estimates, and a CE under 0.05 was deemed appropriate for the present study because variance introduced by the estimation procedure contributes little to the observed group variance [59].

Photomicrography

We used a digital camera (Microfire, Optronics, CA, USA) coupled to a NIKON Eclipse Ci microscope to capture digital images which were processed with Adobe Photoshop software for illustrations shown in Figs 2 and 3. Scaling and adjustment of the brightness and contrast levels were applied to the whole image.

RESULTS AND DISCUSSION

Doublecortin was broadly expressed in the telencephalon of adult *Calidris pusilla*. Fig 3 shows doublecortin immunolabeled neurons on the hippocampal formation.

We found a major difference between migrating and wintering birds in the number of DCX-immunolabeled hippocampal cells and in hippocampal volume (Fig 4, Tables E-G in S1 File). *C. pusilla* wintering individuals showed on average, 2.4 times more DCX immunolabeled cells than *C. pusilla* migrating birds (Wintering $133,143.80 \pm 15,551.80$ vs Migrating $55,057.95 \pm 12,171.50$ (mean \pm SD); two-tailed t-test, $df = 7$ $t = 2.36$ $p < 0.00$). As expected the density values of DCX immunolabeled cells showed that wintering birds had 1.73 more DCX positive cells/mm³ than migrating ones (Wintering $21,256.95 \pm 3,384.1$; Migrating $12,257.19 \pm 1,065.42$ (mean \pm SD); two-tailed t-test, $df = 7$; $t = 2.01$; $p < 0.00$) (Fig 5). Total number of DCX labelled cells for each bird are shown in Table E in S1 File. The volumes of the hippocampal formation were significantly different in migrating and wintering semipalmated sandpipers (Wintering $6.28 \text{ mm}^3 \pm 0.3$ vs Migrating $4.46 \text{ mm}^3 \pm 0.7$ (mean \pm SD); two-tailed t-test, $df = 5$; $t = 2.01$, $p < 0.00$) shown in Table F in S1 File.

NeuN counts showed on average, no significant differences between migrating and wintering sandpipers. Indeed, NeuN total counts were $946,247 \pm 139,352$ neurons on migrating and

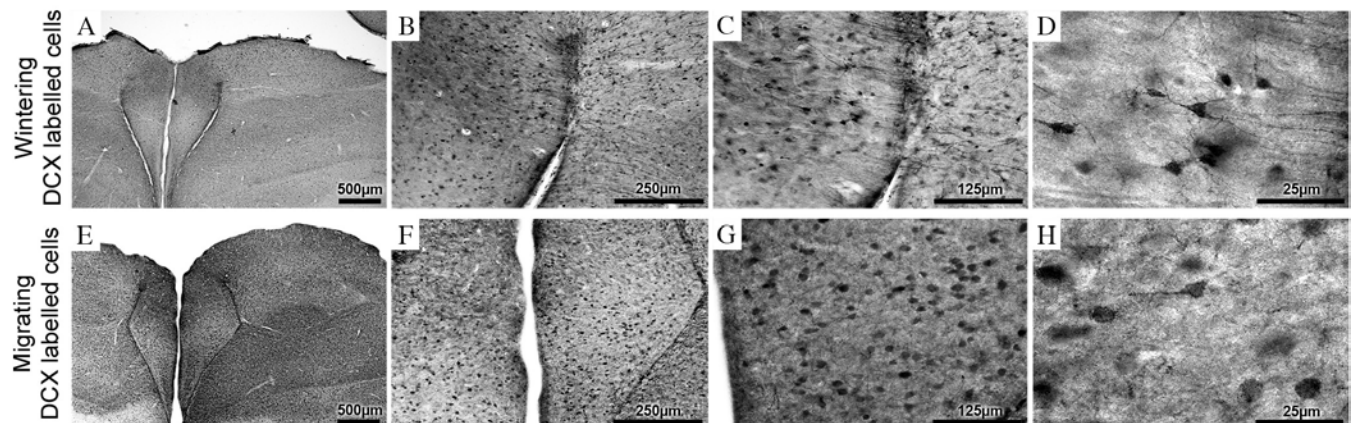


Fig 3. Doublecortin immunolabeled neurons in the hippocampal formation. (A) Wintering hippocampal formation image in 4x objective, (B) 10x objective, (C) 20x objective and (D) 100x objective. (E) Migrating hippocampal formation image in 4x objective, (F) 10x objective, (G) 20x objective and (H) 100x objective. Scale bars: A and E—500 μm ; B and F—250 μm ; C and G—125 μm ; D and H—25 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179134.g003>

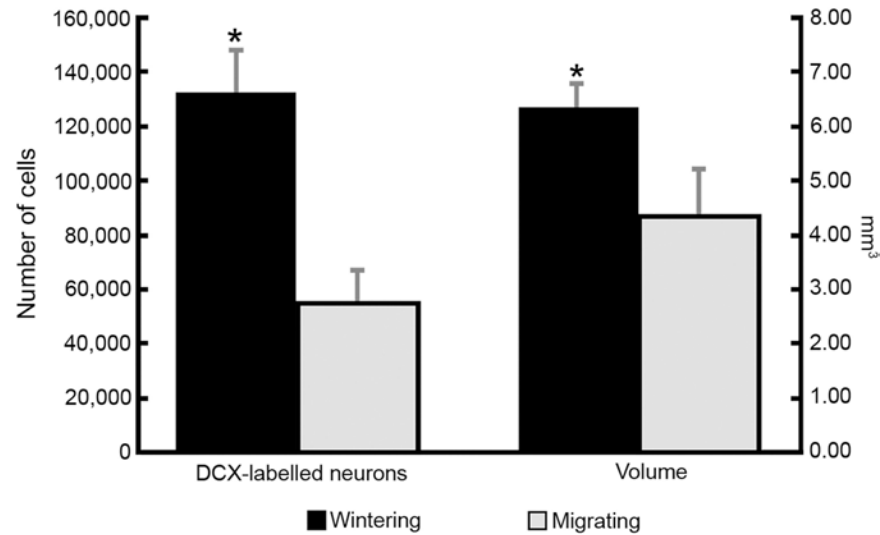


Fig 4. DCX Neurons and volume in migrating versus wintering. Difference between migrating and wintering birds in the number of DCX-immunolabeled hippocampal neurons and hippocampal volume. Asterisks mark significant statistical difference between wintering and migrating animals. Error bars represent standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179134.g004>

909,540 \pm 138,470 (mean \pm SD) on wintering sandpipers (data extracted from [16]) (two-tailed t-test, $df = 7$; $t = 0.39$, $p = 0.7$).

Detailed cell counts and volume data are shown in supplementary material for both hemispheres (Tables A-G in S1 File).

The fall migration of the semipalmated sandpiper includes continental stopover sites and a multi-day nonstop flight across the Atlantic Ocean from northeastern North America to

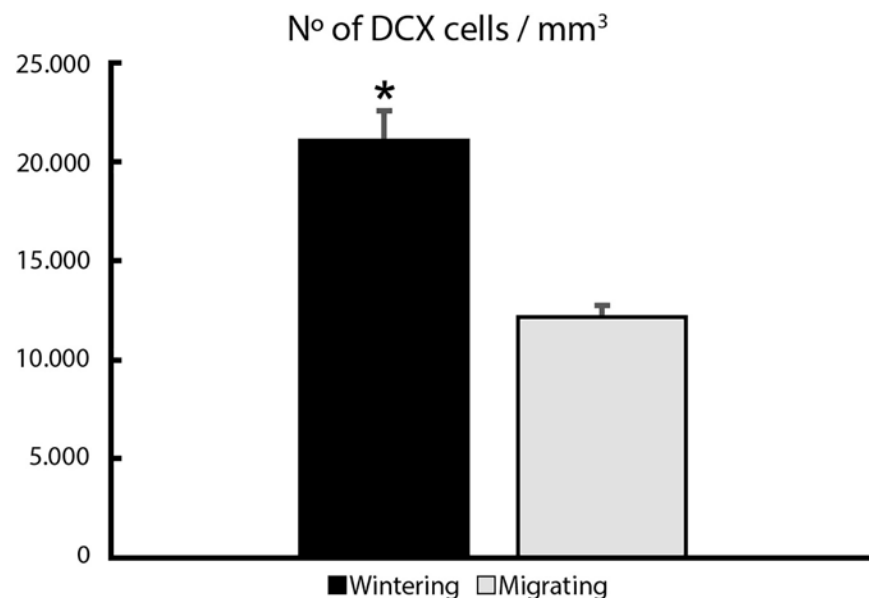


Fig 5. Doublecortin immunolabeled neurons per mm^3 . Difference between migrating and wintering birds in the number of DCX-immunolabeled hippocampal neurons per mm^3 . The asterisk marks significant statistical difference between wintering and migrating animals. Error bars represent standard deviation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179134.g005>

northeastern South America. The environment through which the birds fly changes dramatically during this flight and birds probably integrate global cues, learned local gradient maps, and local landmark information in order to successfully complete migration [24, 60]. Trans-oceanic and trans-continental long-distance navigation makes use of celestial and geomagnetic information [61, 62] whereas learned gradient maps and local landmarks in various sensory modalities are associated with short distance overland migratory behavior [61, 63]. We have shown for the first time in the present report that levels of neurogenesis and volume of the hippocampal formation of a long-distance migrant are lower during fall migration than while wintering.

It is not clear why hippocampal neurogenesis might differ between wintering and actively migrating birds. Cognitive activity, environmental enrichment, diet, and stress are known to affect levels of hippocampal neurogenesis. It is difficult to distinguish their relative contributions to neurogenesis. Indeed, it has been previously described that migration, as noted above, probably engages several cognitive processes. Increased spatial processing is associated with an increase in the number of new neurons in the hippocampus [14, 64–67] and birds' behavior during migration is consistent with elevated demands on spatial learning and memory [15]. Migratory birds, compared to non-migrants, show better performance in both spatial memory [19, 20] and long term memory tasks [22]. New neurons migrate, enter neural networks, and become important for spatial discrimination [68–71] and spatial memory and learning [14, 72–74]. In line with these results, previous research with migrating (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) and non-migrating (*Z. l. nuttalli*) white-crowned sparrows showed a greater number of doublecortin-positive neurons in the hippocampus of the migratory subspecies [15].

In addition, long distance migration might also be considered a kind of environmental enrichment. The journey may be visuo-spatially enriched and may engage perceptual processes involved in celestial, olfactory and geomagnetic navigation in ways that do not occur outside the period of migration. Long distance migrants may be exposed to more diverse spatial information, compared to short distance migrants, resulting in greater recruitment of new neurons [21]. From mammals, studies in rats and mice showed that environmental enrichment is associated with elevated neurogenesis and neuronal recruitment in the dentate gyrus [75–80].

If increased cognitive activity and environmental enrichment are indeed the causes of increased hippocampal volume and neurogenesis in semipalmated sandpipers, their effects however, are seen not during migration, but during the wintering period that follows.

Long distance flight also involves intense exercise, and exercise reliably increases hippocampal neurogenesis [78]. European starlings given flight exercise in a wind tunnel had greater levels of hippocampal neurogenesis than control birds without flight exercise [81]. Starlings flew in the wind tunnel for 15 consecutive days for durations that increased up to 180 min/day, followed by a final day of voluntary flight of up to 4 h. If long distance flight by semipalmated sandpipers causes an increase in hippocampal neurogenesis, however, its effects, like those of cognitive activity and environmental enrichment, are not seen during migration but during the subsequent wintering period.

The same study of starling wind tunnel flight also showed that a diet high in polyunsaturated fatty acids (PUFA) led to less hippocampal neurogenesis than a diet low in PUFAs [81]. Semipalmated sandpipers during their stopover in the Bay of Fundy consume a diet extremely high in PUFAs [2, 82, 83]. Their diet during this stopover includes large amounts of the amphipod *Corophium volutator* in which 45% of total lipids are in the form of PUFAs. This diet may therefore depress hippocampal neurogenesis during stopover.

Stress and elevated glucocorticoid levels reduce hippocampal neurogenesis [43, 44, 46, 47]. The glucocorticoid hormone corticosterone is elevated during long distance migrants in

preparation for migration, while accumulating fat reserves for migration, and during refueling stopovers [84–86]. Elevated glucocorticoid levels could therefore be responsible for lower levels of hippocampal neurogenesis found in semipalmated sandpipers collected during their Bay of Fundy stopover.

Finally, there is an alternative interpretation connected to a reduced use of the hippocampus during fall migration. In that case, long distance migration in the sandpipers may rely on compass direction whereas local navigation in the wintering home range may rely on constant use of the hippocampus stimulating neurogenesis in higher proportion. To support this hypothesis, previous findings demonstrated that pigeons with hippocampal ablation usually find their way back home [87]. If similarly fall migration is mainly dependent on compass and less in the HF we may have correspondently less hippocampal neurogenesis in migrating birds.

To find out if DCX-positive cells survived and were integrated into existing hippocampal circuits, or disappear, we checked how neuronal numbers compare in the two groups. The absence of significant difference between migrating and wintering sandpipers with NeuN labeling indicates that hippocampal neuronal number does not increase after each winter, and the newly generated neurons seem to compensate for the loss that might occur during the transatlantic flight. Thus, the difference in hippocampal volumes may be related to other modifications that do not come from neuronal number changes. We suggest that other cell numerical and/or morphological changes and/or expansion of extracellular matrix may contribute to the hippocampal volume differences.

Thus, if long distance migration does act to upregulate neurogenesis its effects are seen not during migration but during the wintering period that follows. Alternatively, there may be diet and glucocorticoid effects that reduce hippocampal neurogenesis during migration. In addition, there may be effects specific to the wintering period that result in elevated neurogenesis, perhaps in preparation for spring migration. Because all these effects and environmental inputs are associated with migration, and because all of them may have an influence on neurogenesis, it would be important in near future to compare more groups of birds at different stages of their annual cycle. Indeed, our study was limited to a group caught in Canada at the beginning of migration and a second group in Brazil during wintering. It would be very informative if there were two more groups of birds, one caught in Canada before migration, when the birds were settled in the region, and one in Brazil just as the return migration started. This design would allow to partially account for dietary, environmental, social (including reproduction) or other factors and stress.

CONCLUSIONS

We hypothesized that neurogenesis in the hippocampal formation of migrating birds would be higher than that of wintering birds. We found higher levels of adult hippocampal neurogenesis and a larger hippocampal formation in wintering birds, suggesting that these changes may be late occurring effects of long distance migratory flight or the result of conditions the birds experienced while wintering. We also detected no differences in NeuN immunolabeled cells in migrating and wintering birds suggesting at least for this time window that neurogenesis just replaced neurons that might be lost during the transatlantic flight. The clear differences we

SUPPORTING INFORMATION

S1 File. Supporting information. Tables A to G. (DOCX)

S2 File. ARRIVE guidelines. ARRIVE guidelines form. (PDF)

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Programa Ciências do Mar II; The Canadian Bureau for International Education (CBIE); The Brazilian Research Council (CNPq) Edital Universal Grant number 440722/2014-4; Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA); Programa de Apoio a Núcleos Emergentes and (FINEP); Instituto Brasileiro de Neurociências (IBNnet); and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). PROPESP/UFPA (Proreitoria de Pesquisa, Universidade Federal do Pará) and FADESP (Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD. **Data curation:** CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD. **Formal analysis:** CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD.

Funding acquisition: CGD NGMM DFS CWPD.

Investigation: CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD.

Methodology: CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD.

Project administration: CGD

NGMM DFS CWPD. **Resources:**

CGD NGMM DFS CWPD.

Supervision: CGD NGMM DFS

CWPD.

Validation: CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD.

Visualization: CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD.

Writing – review & editing: CGD NGMM DGD EPH PDCP IAMM MADM DFS CWPD.

REFERENCES

1. Brown S, Haley J. First Ever Geolocator Results For A Semipalmated Sandpiper Show Remarkable Year-Long Odyssey: manomet; 2014 [cited 2016 14 of Sptember]. Available from: <https://www.manomet.org/newsletter/first-ever-geolocator-results-semipalmated-sandpiper-show-remarkable-year-long-odyssey>.
2. Weber JM. The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J Exp Biol*. 2009;212(Pt5):593–7. <https://doi.org/10.1242/jeb.015024> PMID: [19218508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19218508/).
3. Siegel JJ, Nitz D, Bingman VP. Spatial-specificity of single-units in the hippocampal formation of freely moving homing pigeons. *Hippocampus*. 2005; 15:26–40. <https://doi.org/10.1002/hipo.20025> PMID: [15390167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15390167/)
4. Hough GE, Bingman VP. Rotation of visual landmark cues influences the spatial response profile of hippocampal neurons in freely-moving homing pigeons. *Behavioural Brain Research*. 2008; 187:473–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.09.031> PMID: [17997170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17997170/)
5. Krushinskaya NL. Some complex forms of feeding behaviour of nut-cracker *Nucifraga caryocatactes*, after removal of old cortex. *Zh Evol Biokhim Fiziol*. 1966; II:563–8
6. Sherry DF, Vaccarino AL. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behav Neurosci*. 1989;103:308–18.
7. Hampton RR, Shettleworth SJ. Hippocampal lesions impair memory for location but not color in passerine birds. *Behav Neurosci*. 1996; 110:831–5. PMID: [8864273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864273/)
8. Colombo M, Broadbent NJ, Taylor CSR, Frost N. The role of the avian hippocampus in orientation in space and time. *Brain Research* 2001; 919:292–301. PMID: [11701141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11701141/)
9. Krebs JR, Sherry DF, Healy SD, Perry VH, Vaccarino AL. Hippocampal specialization of food-storing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86(4):1388–92.
10. Jacobs LF, Gaulin S, Sherry DF, Hoffman GE. Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; 87 (16):6349–52.
11. Healy SD, Krebs JR. Food storing and the hippocampus in Paridae. *Brain, Behavior and Evolution*. 1996;47(4):195–9. PMID: [9156782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9156782/)
12. Garamszegi LZ, Eens M. The evolution of hippocampus volume and brain size in relation to food hoarding in birds. *Ecol Lett*. 2004; 7:1216–24.
13. Lucas JR, Brodin A, de Kort SR, Clayton NS. Does hippocampal size correlate with the degree of caching specialization? *Proc R Soc Lond, B*. 2004; 271:2423–9.
14. LaDage LD, Roth TC, Fox RA, Pravosudov VV. Ecologically relevant spatial memory use modulates hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2010; 277(1684):1071–9.
15. LaDage LD, Roth TC, Pravosudov VV. Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behaviour in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* ssp.). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2011; 278(1702):138–43.
16. Diniz C, Magalhães N, Sousa A, Santos Filho C, Diniz D, Lima C, et al. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016;49(1).
17. Roth TC, Pravosudov VV. 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*. 2009;276(1656):401–5.
18. Bingman VP, Able KP. Maps in birds: representational mechanisms and neural bases. *Current opinion in neurobiology*. 2002; 12(6):745–50. PMID: [12490268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490268/)

19. Cristol DA, Reynolds EB, Leclerc JE, Donner AH, Farabach GS, Ziegenfuss GW, et al. Hippocampal neurogenesis in *C. pusilla*. *Migratory dark-eyed juncos, Junco hyemalis, have better spatial memory and denser hippocampal neurons than nonmigratory conspecifics.* *Animal behaviour.* 2003; 66(2):317–28.
20. Pravosudov VV, Kitaysky AS, Omanska A. The relationship between migratory behaviour, memory and the hippocampus: an intraspecific comparison. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences.* 2006; 273(1601):2641–9.
21. Barkan S, Roll U, Yom-Tov Y, Wassenaar LI, Barnea A. Possible linkage between neuronal recruitment and flight distance in migratory birds. *Sci Rep.* 2016; 6:21983. <https://doi.org/10.1038/srep21983> PMID: 26905978; PubMed Central PMCID: PMC4764934.
22. Mettke-Hofmann C, Gwinner E. Long-term memory for a life on the move. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003; 100(10):5863–6.
23. Wiltshcko R, Dehe L, Gehring D, Thalau P, Wiltshcko W. Interactions between the visual and the magnetoreception system: different effects of bichromatic light regimes on the directional behavior of migratory birds. *J Physiol Paris.* 2013; 107(1–2):137–46. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2012.03.003> PMID: 22504660.
24. Mouritsen H, Heyers D, Güntürkün O. The Neural Basis of Long-Distance Navigation in Birds. *Annu Rev Physiol.* 2016; 78:133–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105054> PMID: 26527184.
25. Fusani L, Bertolucci C, Frigato E, Foà A. Cryptochrome expression in the eye of migratory birds depends on their migratory status. *J Exp Biol.* 2014; 217(Pt 6):918–23. <https://doi.org/10.1242/jeb.096479> PMID: 24622895.
26. Lau JC, Rodgers CT, Hore PJ. Compass magnetoreception in birds arising from photo-induced radical pairs in rotationally disordered cryptochromes. *J R Soc Interface.* 2012; 9(77):3329–37. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0374> PMID: 22977104; PubMed Central PMCID: PMC3481564.
27. Smulders TV, De Voogd TJ. Expression of immediate early genes in the hippocampal formation of the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*) during a food-hoarding task. *Behavioural brain research.* 2000; 114(1):39–49
28. Bischof H, Lieshoff C, Watanabe S. Spatial memory and hippocampal function in a nonfoodstoring songbird, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Reviews in the Neurosciences.* 2006; 17(1/2):43.
29. Mayer U, Watanabe S, Bischof H-J. Hippocampal activation of immediate early genes *ZenK* and *c-Fos* in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) during learning and recall of a spatial memory task. *Neurobiology of learning and memory.* 2010; 93(3):322–9. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.11.006> PMID: 19944176
30. Mayer U, Bischof H-J. Brain activation pattern depends on the strategy chosen by zebra finches to solve an orientation task. *Journal of Experimental Biology.* 2012; 215(3):426–34.
31. Jones M, Errington M, French P, Fine A, Bliss T, Garel S, et al. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature neuroscience.* 2001; 4 (3):289–96. <https://doi.org/10.1038/85138> PMID: 11224546
32. Guzowski JF. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus.* 2002; 12(1):86–104. <https://doi.org/10.1002/hipo.10010> PMID: 11918292
33. Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning & Memory.* 2007; 14(11):758–70.
34. Barry DN, Commins S. Imaging spatial learning in the brain using immediate early genes: insights, opportunities and limitations. *Reviews in the Neurosciences.* 2011; 22(2):131–42. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.019> PMID: 21476937
35. Wu L-Q, Dickman JD. Magnetoreception in an avian brain in part mediated by inner ear lagena. *Current Biology.* 2011; 21(5):418–23. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.058> PMID: 21353559
36. Keary N, Bischof H-J. Activation changes in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) brain areas evoked by alterations of the earth magnetic field. *PLoS One.* 2012; 7(6):e38697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038697> PMID: 22679515
37. Nottebohm F. Why are some neurons replaced in adult brain? *The Journal of Neuroscience.* 2002; 22 (3):624–8. PMID: 11826090

38. Frankland PW, Köhler S, Josselyn SA. Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends in Neurosciences*. 2013;36:497–503. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.002> PMID: 23768770
39. Sahay A, Wilson DA, Hen R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*. 2011; 70:582–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.012> PMID: 21609817
40. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends in Neurosciences*. 2008; 31:163–9. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.01.002> PMID: 18329110
41. Doetsch F, Hen R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*. 2005; 15:121–8. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.018> PMID: 15721754
42. Galea LAM, Wainwright SR, Roes MM, Duarte-Guterman P, Chow C, Hamson DK. Sex, hormones and neurogenesis in the hippocampus: hormonal modulation of neurogenesis and potential functional implications. *Journal of Neuroendocrinology*. 2013;25:1039–61. <https://doi.org/10.1111/jne.12070> PMID: 23822747
43. Barnea A, Pravosudov VV. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative, and neuroethological approaches. *European Journal of Neuroscience*. 2011; 34:884–907. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07851.x> PMID: 21929623
44. Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological Reviews*. 2014;94(991–1026). <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014> PMID: 25287858
45. Oomen CA, Bekinschtein P, Kent BA, Saksida LM, Bussey TJ. Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition. *WIREs Cognitive Science*. 2014; 5:573–87. <https://doi.org/10.1002/wcs.1304> PMID: 26308746
46. Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annual Review of Psychology*. 2015; 66:53–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015006> PMID: 25251485
47. LaDage LA. Environmental change, the stress response, and neurogenesis. *Integrative and Comparative Biology*. 2015. <https://doi.org/10.1093/icb/icc040> PMID: 25980567
48. The Remarkable Odyssey of a Semipalmated Sandpiper [Internet]. <http://shorebirdscience.org/>. 2014.
49. Saper CB, Sawchenko PE. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *Journal of Comparative Neurology*. 2003; 465(2):161–3. <https://doi.org/10.1002/cne.10858> PMID: 12949777
50. LaDage LD, Roth TC, Pravosudov VV. Biases in measuring the brain: the trouble with the telencephalon. *Brain Behav Evol*. 2009; 73(4):253–8. <https://doi.org/10.1159/000225623> PMID: 19546533; PubMedCentral PMCID: PMC2813798.
51. Gundersen H, Jensen E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987; 147:229–63. PMID: 3430576
52. Balthazart J, Boseret G, Konkle A, Hurley LL, Ball GF. Doublecortin as a marker of adult neuroplasticity in the canary song control nucleus HVC. *European Journal of Neuroscience*. 2008; 27(4):801–17. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06059.x> PMID: 18333960
53. Hall ZJ, Macdougall-Shackleton SA. Influence of testosterone metabolites on song-control system neuroplasticity during photostimulation in adult European starlings (*Sturnus vulgaris*). *PLoS One*. 2012; 7 (7):e40060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040060> PMID: 22792214; PubMedCentral PMCID: PMC3391231.
54. West MJ. Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res*. 2002; 135:43–51. PMID: 12143362. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)35006-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)35006-4)
55. West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci*. 1999;22(2):51–61. PMID: 10092043.
56. Bonthius DJ, McKim R, Koele L, Harb H, Karacay B, Mahoney J, et al. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2004; 14(1):45–57. PMID: 15519951. <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.09.003>
57. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical

58. MBF Bioscience W, VT USA. Stereo Investigator 11.03. 2014.
59. Glaser EM, Wilson PD. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. Journal of Microscopy. 1998; 192:163–71. PMID: [9853373](#)
60. Bingman VP, Cheng K. Mechanisms of animal global navigation: comparative perspectives and enduring challenges. Ethology Ecology & Evolution. 2005; 17:295–318.
61. Frost BJ, Mouritsen H. The neural mechanisms of long distance animal navigation. Curr Opin Neurobiol. 2006; 16(4):481–8. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.06.005> PMID: [16839758](#).
62. Thorup K, Holland RA. The bird GPS—long-range navigation in migrants. J Exp Biol. 2009; 212(Pt 22):3597–604. <https://doi.org/10.1242/jeb.021238> PMID: [19880719](#).
63. Biro D, Meade J, Guilford T. Familiar route loyalty implies visual pilotage in the homing pigeon. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(50):17440–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406984101> PMID: [15572457](#); PubMed Central PMCID: PMC536010.
64. Hairston IS, Little MT, Scanlon MD, Barakat MT, Palmer TD, Sapolsky RM, et al. Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. Journal of neurophysiology. 2005; 94(6):4224–33. <https://doi.org/10.1152/jn.00218.2005> PMID: [16014798](#)
65. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nature neuroscience. 1999; 2(3):260–5. <https://doi.org/10.1038/6365> PMID: [10195219](#)
66. Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, et al. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. Neuroscience letters. 2000; 286(1):21–4. PMID: [10822143](#)
67. Döbrössy M, Drapeau E, Arousseau C, Le Moal M, Piazza P, Abrous D. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. Molecular psychiatry. 2003; 8(12):974–82. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001419> PMID: [14647395](#)
68. Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. Journal of comparative neurology. 1999; 406(4):449–60. PMID: [10205022](#)
69. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature. 2002; 415(6875):1030–4. <https://doi.org/10.1038/4151030a> PMID: [11875571](#)
70. Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. Current opinion in neurobiology. 2004; 14(2):186–91. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.001> PMID: [15082323](#)
71. Clelland C, Choi M, Romberg C, Clemenson G, Fragniere A, Tyers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. Science. 2009; 325(5937):210–3. <https://doi.org/10.1126/science.1173215> PMID: [19590004](#)
72. Greenough WT, Cohen NJ, Juraska JM. New neurons in old brains: learning to survive? Nature neuroscience. 1999; 2(3).
73. Leuner B, Gould E, Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? Hippocampus. 2006; 16(3):216–24. <https://doi.org/10.1002/hipo.20153> PMID: [16421862](#)
74. Hall ZJ, Delaney S, Sherry DF. Inhibition of cell proliferation in black-capped chickadees suggests a role for neurogenesis in spatial learning. Dev Neurobiol. 2014; 74(10):1002–10. <https://doi.org/10.1002/dneu.22180> PMID: [24723376](#).
75. Grégoire CA, Bonenfant D, Le Nguyen A, Aumont A, Fernandes KJ. Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. PLoS One. 2014; 9(1):e86237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086237> PMID: [24465980](#); PubMed Central PMCID: PMC3900491.
76. Birch AM, McGarry NB, Kelly AM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner.

77. Bechara RG, Kelly Á. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behav Brain Res.* 2013; 245:96–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.018> PMID: 23439217.
78. Mustroph ML, Chen S, Desai SC, Cay EB, DeYoung EK, Rhodes JS. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice. *Neuroscience.* 2012; 219:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.007> PMID: 22698691; PubMed Central PMCID: PMC3402695.
79. Kempermann G, Fabel K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, et al. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci.* 2010; 4:189. <https://doi.org/10.3389/fnins.2010.00189> PMID: 21151782; PubMed Central PMCID: PMC3000002.
80. Bednarczyk MR, Hacker LC, Fortin-Nunez S, Aumont A, Bergeron R, Fernandes KJ. Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment. *Hippocampus.* 2011; 21(12):1334–47. <https://doi.org/10.1002/hipo.20831> PMID: 20623741.
81. Hall ZJ, Bauchinger U, Gerson AR, Price ER, Langlois LA, Boyles M, et al. Site-specific regulation of adult neurogenesis by dietary fatty acid content, vitamin E and flight exercise in European starlings. *Eur J Neurosci.* 2014; 39(6):875–82. <https://doi.org/10.1111/ejn.12456> PMID: 24372878.
82. Maillet D, Weber JM. Relationship between n-3 PUFA content and energy metabolism in the flight muscles of a migrating shorebird: evidence for natural doping. *J Exp Biol.* 2007; 210(Pt 3):413–20. <https://doi.org/10.1242/jeb.02660> PMID: 17234610.
83. Nagahuedi S, Popesku JT, Trudeau VL, Weber JM. Mimicking the natural doping of migrant sandpipers in sedentary quails: effects of dietary n-3 fatty acids on muscle membranes and PPAR expression. *J Exp Biol.* 2009; 212(Pt 8):1106–14. <https://doi.org/10.1242/jeb.027888> PMID: 19329744.
84. Piersma T, Reneerkens J, Ramenofsky M. Baseline corticosterone peaks in shorebirds with maximal energy stores for migration: a general preparatory mechanism for rapid behavioral and metabolic transitions? *General and comparative endocrinology.* 2000; 120(1):118–26. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7543> PMID: 11042017
85. O'Reilly KM, Wingfield JC. Seasonal, age, and sex differences in weight, fat reserves, and plasma corticosterone in Western sandpipers. *Condor.* 2003; 105:13–26.
86. Eikenaar C, Klinner T, Stöwe M. Corticosterone predicts nocturnal restlessness in a long-distance migrant. *Hormones and Behavior.* 2014; 66:324–9. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.06.013> PMID: 24956025
87. Bingman V, Bagnoli P, Ialalè P, Casini G. Homing behavior of pigeons after telencephalic ablations. *Brain, Behavior and Evolution.* 1984; 24(2–3):94–108. PMID: 6466966