



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR



**ENSAIOS ESTEREOLÓGICOS E MORFOLOGIA TRIDIMENSIONAL NA
FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Análise
quantitativa da imunomarcção seletiva de neurônios e micróglia em *Calidris
pusilla* e *Actitis macularia*.**

CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ

Belém
2013



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR



CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ

ENSAIOS ESTEREOLÓGICOS E MORFOLOGIA TRIDIMENSIONAL NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Análise quantitativa da imunomarcção seletiva de neurônios e micróglia em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*.

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

Co-Orientador: Prof. Dr. David Francis Sherry

Belém
2013



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR



“ENSAIOS ESTEREOLÓGICOS E MORFOLOGIA TRIDIMENSIONAL NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Análise quantitativa da imunomarcagem seletiva de neurônios e micróglia em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*.”

Cristovam Guerreiro Diniz. Belém, Pará, UFPA/ICB, 2013.

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

Presidente:

Professor Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz - Orientador

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Membros:

Professor Dr. Ruben Carlos Araújo Guedes

Departamento de Nutrição UFPE

Professora Dra. Lucidia Fonseca Santiago

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Professora Dra. Luciana Negrão Frota de Almeida

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA



RESUMO

É objetivo do presente trabalho implantar como modelos para estudo da formação hipocampal das aves migratórias as espécies de maçarico *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* que abandonam as regiões geladas do Canadá, fugindo do inverno, em direção à costa da América do Sul e do Caribe onde permanecem até a primavera quando então retornam ao hemisfério norte. Mais especificamente pretende-se descrever a organização morfológica qualitativa e quantitativa da formação hipocampal, empregando citoarquitetonia com cresil violeta e imunomarcção para neurônios e células da glia, sucedidas por estimativas estereológicas do número total de células identificadas com marcadores seletivos para aquelas células, assim como comparar a morfologia tridimensional da micróglia das aves com a dos mamíferos. As coletas de campo para a caracterização da formação hipocampal do *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* em seus aspectos morfológicos foram feitas no Brasil na Ilha Canelas (0°47'21.95"S e 46°43'7.34"W) na Costa da Região Nordeste do Pará no município de Bragança, e no Canadá, na Baía de Fundy perto de Johnson's Mills na cidade de New Brunswick (45°50'19.3" N 64°31'5.39" W).

A definição dos limites da formação hipocampal foi feita empregando-se as técnicas de Nissl e de imunomarcção para NeuN. Para a definição dos objetos de interesse das estimativas estereológicas e das reconstruções tridimensionais empregou-se imunomarcção com anticorpo anti-NeuN para neurônios e anti-IBA-1 para micróglia. As estimativas estereológicas revelaram em média número similar de neurônios nas duas espécies enquanto que no hipocampo de *Actitis macularia* observou-se número de micróglia 37% maior do que no de *Calidris pusilla*. Além disso, encontrou-se que em média o volume da formação hipocampal do *Actitis macularia* é 38% maior do que o encontrado em *Calidris pusilla*.

Os estudos comparativos da morfologia microglial das duas espécies de aves com a dos mamíferos *Rattus norvegicus* e *Cebus apella* revelaram diferenças morfológicas significantes que indicam que as micróglia das aves mostram em média, menor complexidade (dimensão fractal), tem diâmetros e perímetros de soma menores e possuem ramos mais finos do que aquelas do rato e do macaco.

Palavras Chave: morfometria, estereologia, hipocampo e aves.



ABSTRACT

The aim of this report is to describe the hippocampal formation of two migratory birds, *Calidris pusilla* and *Actitis macularia*, that leave the cold regions of the Canadian Tundra, escaping the winter, towards the coast of South America and the Caribbean Islands where they remain until winter ends returning to the Northern hemisphere. We intend to describe the qualitative and quantitative morphological organization of the hippocampal formation, using cytoarchitectonics with cresyl violet and immunostaining for neurons and microglia, followed by stereological estimates of the total number of cells identified with selective markers. We intend as well to compare the three-dimensional morphology of hippocampal microglia of these species with those of the dentate gyrus of Wistar rats and Capuchin monkey. The shorebirds used in the characterization were captured in Canela Island, Bragança City, State of Pará, Brazil (0°47'21.95"S and 46°43'7.34"W), as well as in Canada, in the Bay of Fundy, near Johnson's Mills, New Brunswick (45° 50' 19.3" N 64° 31' 5.39" W).

The hippocampal formation limits definition was performed employing Nissl staining and immunostaining for NeuN. For the objects of interest definition of stereological estimates and three-dimensional reconstructions we used immunostaining with anti NeuN for neurons and anti-IBA-1 for microglia respectively. The stereological results revealed similar number of neurons in both species whereas the number of microglia in *Actitis macularia* was 37% higher than in *Calidris pusilla*. Furthermore, it was found that the hippocampal formation average volume in *Actitis macularia* was 38% higher than that found in *Calidris pusilla*. Comparative studies of the microglial morphology with mammals (*Rattus norvegicus* and *Cebus apella*) revealed significant morphological differences that indicate microglia in birds shows on average lower complexity (smaller fractal dimension), smaller tree volumes and areas and thinner branches than rat and monkey microglia.



SUMÁRIO

Sumário	1
1- INTRODUÇÃO	8
1.1- Os Modelos Experimentais	8
1.2- Memória e Formação Hipocampal	14
1.3- Anatomia e Fisiologia Comparadas da Formação Hipocampal em Mamíferos e Aves	19
1.4- O Hipocampo das Aves, Plasticidade e Memória	23
1.5 - Aves Migratórias e o Sistema Neural de Navegação	26
1.6- Estereologia Baseada em Design para Contagem de Células: O Fracionador Óptico	29
1.7- Morfologias das Células Gliais em Aves e Mamíferos	31
2- OBJETIVOS	39
2.1- Geral	39
2.2- Específicos	39
3- Material e Métodos	40
3.1- Captura com Redes de Neblina	40
3.2- Perfusão, Corte, Coloração e Imunohistoquímica	40
3.2.1- Coloração de Nissl	41
3.2.2- Imunomarcção para GFAP, Neu-N, IBA1, ZENK e C-Fos	41
3.3- Estereologia	43
3.4- Análise Estatística	49
3.5 Morfometria Baseada em Reconstrução Tridimensional	50
4- RESULTADOS	57
4.1- Descrição da Formação Hipocampal em <i>Calidris pusilla</i> e <i>Actitis macularia</i>	58
4.2 – Ensaio Estereológicos	61
4.4- Análise Comparativa da Morfologia da Micróglia da Camada Molecular do Giro Denteado de Mamíferos e do Hipocampo Dorsal e Ventral de Aves Marinhas	68
5- DISCUSSÃO	83
5.1- Limites Arquitetônicos	84
5.2- Ensaio Estereológicos na Formação Hipocampal de Aves: Efeitos do ambiente sobre a plasticidade neuronal e glial.	86



5.3- Morfologia Tridimensional da Micróglia no Hipocampo Dorsal e Ventral de Maçaricos e na Camada Molecular do Giro Denteado de Mamíferos.	91
5.4- Limitações Técnicas	93
5.4.1 Ambiguidades não Estereológicas nas Estimativas.....	93
5.4.2 Limitações nas Reconstruções Tridimensionais	94
6- CONCLUSÕES	96
7- REFERÊNCIAS.....	97



1- INTRODUÇÃO

1.1- Os Modelos Experimentais

Englobando os maçaricos, batuíras, quero-quero, narcejas, pirupirus e outras, a expressão "aves limícolas" define um grupo de aves que mantêm estreitas relações com ambientes úmidos, seja para buscar alimento, reprodução ou descanso (Rodrigues, 1993).

Com a proximidade do outono boreal, milhões de aves deixam suas áreas de reprodução todos os anos, em busca de locais com temperaturas mais amenas e com disponibilidade de alimento, área essa escolhida para passar o período do inverno (daí serem referidas como áreas de invernada). Dentre as áreas de invernada estão aquelas da América do Sul onde alguns dos exemplares utilizados neste trabalho foram coletados. Assim a migração segue a direção Sul sendo a América do Sul alvo sistemático dessas aves (Azevedo Júnior *et al.*, 2001), principalmente ao longo da costa marítima do continente onde passam a maior parte do seu ciclo de vida (Antas, 1983). Durante a primavera e o verão retornam às áreas de origem, (Harrington *et al.*, 1986) havendo muitas delas com migrações sazonais regulares que retornam aos mesmos locais de invernada, reprodução e sítios de parada durante a migração, em anos sucessivos, mantendo fidelidade a esses habitats (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, 1998). 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, 1997). As migrações em direção ao Hemisfério Sul começam em meados de agosto, logo após a reprodução, continuando até meados de novembro com o regresso ao Hemisfério Norte abrangendo 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, 1998); são centenas e até milhares de indivíduos que chegam e utilizam essas áreas para pouso e alimentação, logo após o período reprodutivo (Sick, 1997). Dessa forma, a Amazônia e as zonas costeiras 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 *Jacaniidae*, *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 no hemisfério norte (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 descontínua 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 chave 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).

No Brasil destacam-se: ao Norte - o salgado paraense, a costa do Amapá e reentrâncias maranhenses; 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.

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. (Sick, 1983; Antas, 1989; Sick, 1997; Azevedo-Júnior, 1998; Rodrigues, 2000;



Larrazábal *et al.*, 2002; Telino-Júnior *et al.*, 2003; Lyra-Neves *et al.*, 2004; Rodrigues, A. a. F., 2006). Estudos anteriores indicaram que as populações de maçaricos que chegam a costa Norte tendem a se distribuir em uma faixa litorânea que se estende desde a Venezuela até o Brasil (Mcneil, 1970; Spaans, 1978; Rodrigues, 1996).

Anualmente várias espécies de pássaros migrantes setentrionais ocupam a península Bragantina ao Nordeste do Pará, onde são encontradas principalmente em áreas de manguezal, dentre as quais o maçarico do peito pintado *Actitis macularia*. Essa espécie pertencente à família Scolopacidae é uma ave limícola de pequeno porte, 18-20 cm de comprimento e pesando de 19-64 g, que juntamente com a sua espécie-irmã, a *Actitis hypoleucos* compõem o gênero *Actitis* (Figura 01). Seu habitat de reprodução é perto de água doce na maior parte do Canadá e dos Estados Unidos. Eles migram para o sul dos Estados Unidos e América do Sul, e raramente para a Europa Ocidental. Esta última espécie não é gregária e raramente é vista em bandos.

Os adultos da espécie *Actitis macularia* possuem pernas curtas e amareladas e um bico laranja com a ponta escura. Apresenta duas plumagens, de descanso



Figura 01: Maçarico pintado (*Actitis macularia*) Parque Bluffer em Toronto, Canada, 2005. A esquerda plumagem não reprodutiva e a direita plumagem reprodutiva (Wikipedia, 2005).

reprodutivo ou eclipse: manto castanho-acinzentado e ventre branco; e reprodutiva: castanho no dorso salpicado de preto no ventre. Seu ninho é encontrado no chão.



As fêmeas podem copular com mais de um macho, deixando a incubação para eles e aumentando, assim, o número de ovos a eclodir em uma única temporada reprodutiva.

Essas aves forrageiam no solo ou água atrás de crustáceos e outros invertebrados, mas também podem apanhar insetos em pleno voo. Ao alimentarem-se, elas podem ser reconhecidas pelo balanço corporal e por movimento de elevação da cauda enquanto anda a procura de suas presas na praia (Del Hoyo *et al.*, 1992). Para encontrar alimento, refúgio, parceiros sexuais ou locais de nidificação os pássaros convivem com diversas mudanças ambientais e de sazonalidade.

Aparentemente o padrão de migração dessa espécie em direção Norte para o período de reprodução é diferente do da direção Sul para o período de invernada. De fato as rotas transoceânica (da Nova Inglaterra para América do Sul) e continental através dos EUA são adotadas alternativamente para o período de invernada enquanto que a migração em direção Norte para o período de reprodução



Figura 02. Maçariquinho rasteiro (*Calidris pusila*) em Cobourg, Ontario, Canada, Agosto de 2006 (Wikipedia, 2006).

evita a rota transoceânica sendo realizada integralmente através do Continente Americano (Del Hoyo *et al.*, 1992).

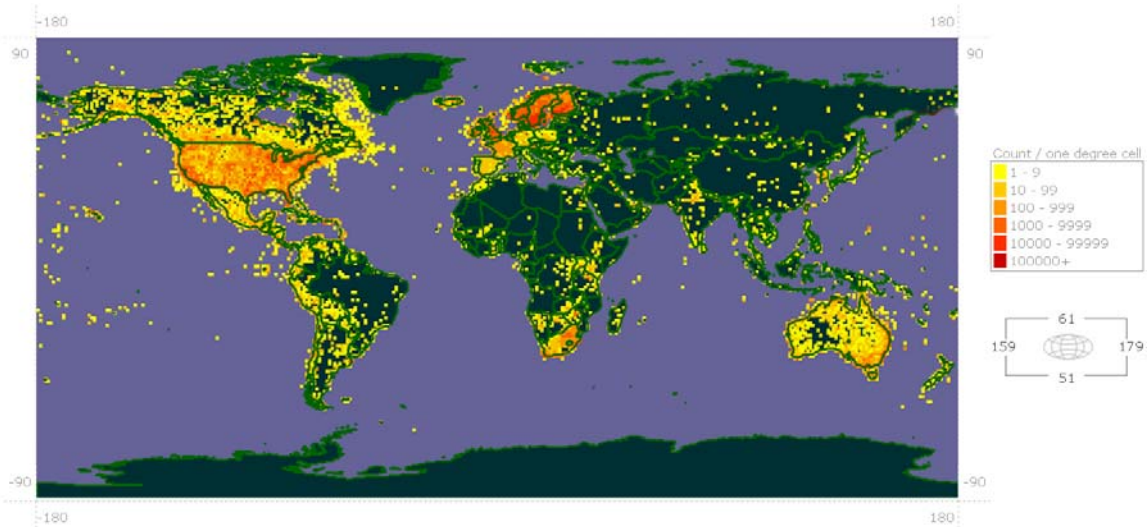


Figura 03. Legenda Distribuição pontos amarelos ocorrência Scolopacidae (G.B.I.F., 2008).

O maçarico-rasteirinho (*Calidris pusilla*) é uma espécie de ave pequena, porém robusta, de bico grosso, negro e de ponta alargada (Figura 02), à semelhança de vários congêneres, excetuando-se a espécie *Calidris canutus* (Sick, 1997). Pertencem à família Scolopacidae que possui um total de 89 espécies, encontradas em áreas costeiras e alagadas, espalhadas por todo o globo (Figura 03). A família Scolopacidae parece ter um ancestral bioquímico comum de onde derivou-se de evolução explosiva durante o período terciário, após uma grande onda de extinção acontecida no final do período Cretáceo (Piersma, 1996).

Maçaricos reproduzem apenas na Tundra Ártica superior, mas se deslocam ao sul de sua área de reprodução na disjunção circumpolar para áreas não reprodutivas (de invernada) em todos os continentes (menos o Antártico), entre as latitudes 58° N e 53° S (Figura 03). Maçaricos geralmente se alimentam em áreas costeiras que sofrem influências de marés (do inglês “intertidal areas”), de substrato mole. Como consequência as áreas de alimentação são pouco numerosas e muito distantes umas das outras, obrigando-os a realizar voos de muitos milhares de quilômetros rotineiramente. As maiores taxas de forrageamento ocorrem nos locais mais ao norte antes do voo definitivo para a reprodução na tundra (Piersma *et al.*, 2005).



Fortemente territorialistas, os machos defendem ativamente seus territórios por exibição em voos, nos quais planam vocalizando em alturas variáveis frequentemente por vários minutos (Pitelka *et al.*, 1974).

Com relação ao sistema de pareamento, durante o período reprodutivo, machos e fêmeas formam pares monogâmicos que se mantêm durante todo o período de incubação dos ovos e que é realizada por ambos os sexos (Ashkenazie e Safriel, 1979).

Observa-se somente um leve dimorfismo sexual nesta espécie, sendo as fêmeas maiores do que os machos, sem diferença de coloração significativa e sem a presença de caracteres sexuais secundários conspícuos (Prater, 1977).

Diferente do *Actitis macularia*, o *Calidris pusilla* é um pássaro migratório de longa distância percorrendo às vezes, em voos ininterruptos cerca de 4000 km, em busca de seus sítios preferenciais de invernada (Morrison, 1984).

Orientação espacial e memória são, portanto, habilidades essenciais para lidar com essas demandas dos pássaros migratórios e estudos anteriores indicam um papel crucial do hipocampo na consolidação da memória espacial de aves e mamíferos e.g. (O'keefe e Dostrovsky, 1971; Sherry, 2011). Presume-se que o hipocampo das aves possa conter como nos mamíferos, um 'mapa cognitivo', que fornece uma representação do animal em relação ao ambiente (Sallaz *et al.*, 2000).

Muito poucas espécies migratórias foram objeto de investigação neurobiológica detalhada e muitos aspectos dos mecanismos envolvidos com o processo migratório permanecem obscuros. Essa jornada anual que essas espécies empreendem depende de orientação precisa, reconhecimento de pistas visuo-espaciais e avaliação de distâncias ao longo da viagem intercontinental que estão longe de serem compreendidas em suas bases neurobiológicas.

De fato, quando se constata que sequer foram descritas em detalhe as estruturas relacionadas à formação e recuperação de memórias em muitas das espécies migratórias, torna-se importante empreender esforços para o preenchimento dessa lacuna. No que concerne à formação hipocampal, uma das áreas de cuja integridade depende a consolidação de memórias relacionadas à



navegação em grande e pequena escala, tanto em aves (Bingman *et al.*, 2006; Sherry, 2011), quanto em mamíferos (Leuner *et al.*, 2010; Buzsáki e Moser, 2013), nada foi anteriormente descrito em maçaricos migradores, motivo pelo qual se empreendeu o presente projeto.

1.2- Memória e Formação Hipocampal

A memória é entendida como a capacidade de adquirir, armazenar e recuperar informações que permitem responder a pelo menos três das perguntas essenciais para sobrevivência adaptada ao meio ambiente que partilham. Assim, as tarefas relacionadas à reprodução, à busca de alimento e o reconhecimento de predadores depende da habilidade de se identificar o que é? Onde está? E quando? Para que isso seja possível, a formação hipocampal e o cerebelo precisam ser preservados íntegros garantindo a formação das memórias declarativa e procedural respectivamente (Okano *et al.*, 2000).

Quando nos referimos à memória declarativa episódica humana falamos da capacidade de lembrarmos conscientemente, empregando a linguagem como instrumento, e falamos de memória semelhante à episódica quando se tratam de outras espécies que não desenvolveram a linguagem, sendo a consolidação desta lembrança tarefa que envolve o lobo temporal medial (aí incluídos o hipocampo, o giro denteado, o complexo subicular e os córtices perirrinal e parahipocampal) (Squire *et al.*, 2007).

Recentemente, a região análoga ao hipocampo de mamíferos, (Nadel, 1978; Amaral, 1993) vem recebendo muita atenção em aves, havendo um volume crescente de evidências de que a parte medial do córtex dorsal das aves é homóloga ao hipocampo de mamíferos tendo em conta seu desenvolvimento, sua topografia e seu papel funcional (Ariens-Kappers *et al.*, 1936; Kallen, 1962; Campbell e Hodos, 1970; Benowitz e Karten, 1976). Essa área está implicada em diversos processos de memória incluindo aqueles necessários à navegação



(Bingman e Yates, 1992; Bingman *et al.*, 1988) e ao armazenamento de alimento (Krebs *et al.*, 1989; Sherry e Vaccarino, 1989).

Vários outros autores tem tentado comparar o hipocampo das aves com o dos mamíferos usando critérios citoarquitetônicos e neuroquímicos, mas pouca concordância tem sido alcançada com o emprego desses critérios (Craigie, 1930; Ariens-Kappers *et al.*, 1936; Benowitz e Karten, 1976; Casini *et al.*, 1986). A parte dorsomedial do cérebro de pássaros é tradicionalmente dividida em duas grandes áreas, a ventral chamada de hipocampo próprio (Hp) e a posicionada dorsolateralmente, denominada de área parahipocampal (APH), com dois padrões de projeções distintos (Figura 04) . A formação hipocampal (FH) das aves (Hp + APH) faz parte do sistema límbico, uma rede de múltiplas conexões dos centros telencefálicos e subtencefálicos, que é responsável pelo aprendizado associado às emoções e motivação em geral.

O hipocampo não é um centro cerebral voltado apenas ao processamento de informação espacial, ele também parece estar envolvido em outros tipos de formação de memória e aprendizado, pelo menos em galináceos jovens (Sandi *et al.*, 1992). As estruturas do prosencéfalo implicadas nesse tipo de formação de memória são conectadas umas com as outras sugerindo a presença de um circuito prosencefálico de memória que é influenciado pelos centros monoaminérgicos do mesencéfalo (Szekely, 1999).



Não existe acordo no que diz respeito à extensão da APH: de fato ainda

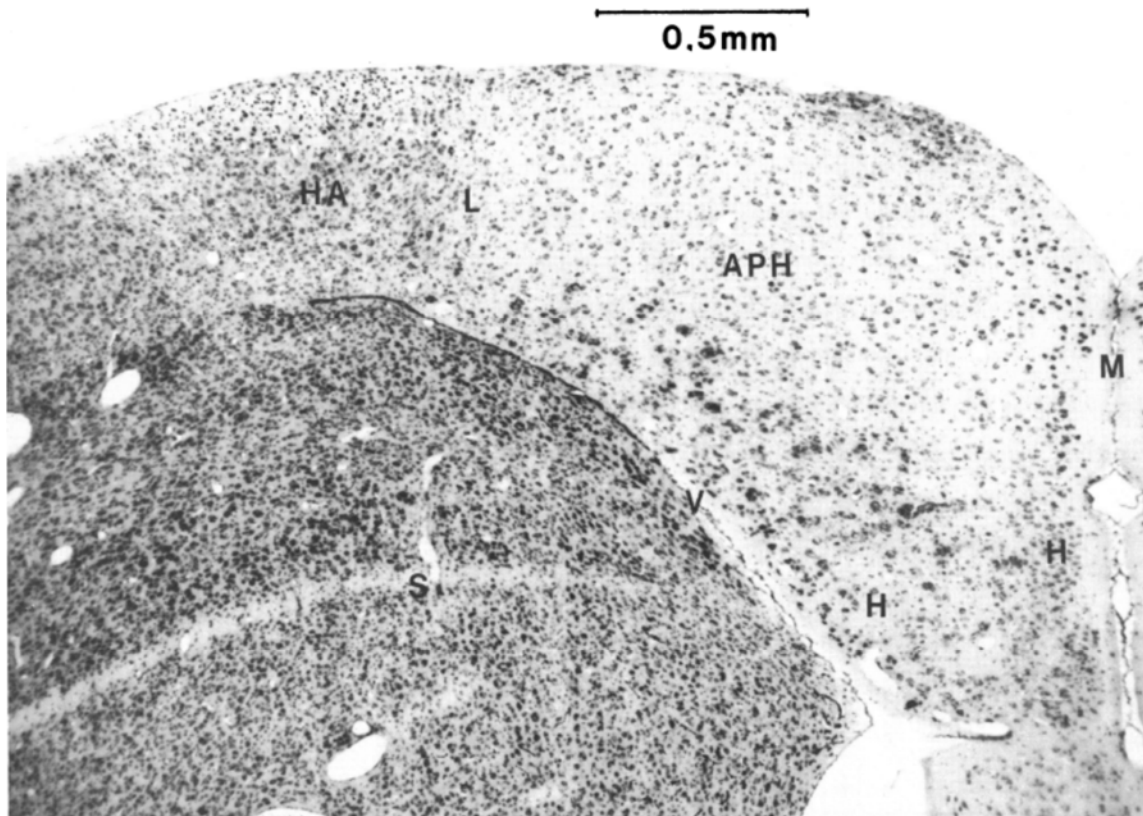


Figura 04: Uma secção coronal do complexo hipocampal e áreas adjacentes do telencefalo do pássaro *Parus palustris*. A secção faz parte da coordenada 0.3 da extensão rostro-caudal do hipocampo. Siglas: H, hipocampo (área de células densas em forma de V); APH, área parahippocampal; L, limite lateral (caracterizado por uma aguda mudança da densidade das células; V, ventrículo; M, linha média; HA, Hiperestriado acessório; e S, estriado. (Harsanyi e Friedlander, 1997)

permanece a controvérsia de se é apenas uma faixa de córtex que separa o Hp das estruturas do palio lateral e que repousa medialmente no ventrículo lateral, ou se também incorpora grupos de células homogêneas entre as duas placas celulares do hipocampo. A linha de separação entre as áreas dorsolaterais não está claramente definida; a APH parece ser contínua com o hiperestriado acessório (HA) e também contínua em sua porção caudal com o córtex dorsolateral (Szekely, 1999). Em secções coradas com Nissl, a APH e o Hp são homogêneos e representadas como continuações da área cortical adjacente e com uma laminação relativamente distinta em sua parte posterior ventral.



Assim, o maior desafio tem sido encontrar uma forma de se definir um limite entre o hipocampo e o palium lateral (LP). Em pombos, o neuropeptídeo designado substância P faz o delineamento de alguns campos circunscritos dentro desse complexo, independente de sua localização em relação ao Hp e a APH (Erichsen *et al.*, 1991).

O uso de técnicas imunohistoquímicas viabilizou a revisão do sistema de parcelamento do palium dorsomedial, uma vez que novas estruturas compostas por células de natureza química semelhante foram encontradas no palium dorsomedial de pombos (Figura 05) (Erichsen *et al.*, 1991). Um achado importante desse estudo foi o aparecimento do núcleo reativo para substância P (SPF) de disposição alongada rostrocaudalmente, provendo resposta direta para a definição do limite lateral. Nesse sistema de divisão o SPF localiza-se externamente ao Hp e é também claramente separado do hiperpalium acessório. De acordo com sua posição o SPF é um possível candidato ao correspondente do córtex entorrinal de mamíferos.

O resultado de diferentes técnicas e diferentes espécies empregadas em estudos das subdivisões do HP (Figura 05) não nos leva a uma conclusão final sobre o número ou a localização das subdivisões hipocampais. A conectividade do HP exige estudos adicionais para se avaliar melhor se a similaridade topográfica, a morfologia e a especificidade dos neurotransmissores envolvidos na imunomarcção são suficientes para definir o parcelamento da formação hipocampal (Szekely, 1999).

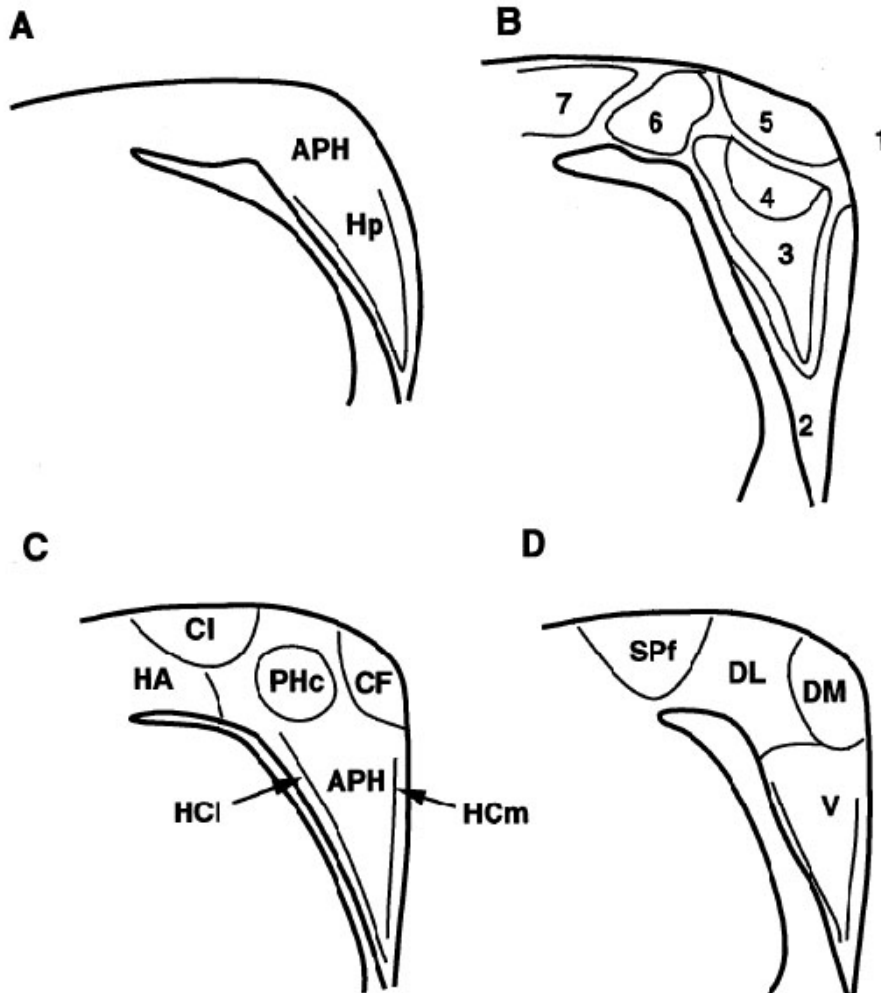


Figura 05: Desenhos esquemáticos das subdivisões hipocâmpais como descrito anteriormente (esquerda) e como revistas em Szekely 1999 (direita). (A) As subdivisões do HP, redesenhadas como no Atlas de Karten e Hodós (Karten HJ, 1967). Coordenada anteroposterior: 6,00. Estes autores não definiram uma fronteira lateral do complexo em relação a HA nem a separação exata entre HP e APH. (B) As subdivisões do HP do pombo foram estabelecidas com base na distribuição de neurotransmissores e neuropeptídeos (Erichsen *et al.*, 1991). Coordenada Antero posterior 7,05. (C) As subdivisões do HP de um *Zebra Finch* (Montagnese *et al.*, 1996). O desenho representa uma secção coronal da parte central do hipocampo. (D) As três subdivisões do hipocampo do *Zebra Finch* (Szekely e Krebs, 1996) seguidos de iontoforese de PHAL. O desenho representa a parte central do HP 1 mm anterior ao lambda (Szekely, 1999).



1.3- Anatomia e Fisiologia Comparadas da Formação Hipocampal em Mamíferos e Aves

Nos mamíferos a distribuição topográfica das estruturas que compõem a formação hipocampal segue a ordem: giro denteado, Corno de Amon, subículo e córtex entorrinal. A mesma distribuição espacial é encontrada em répteis squamata e tartarugas (Peichl, 1991). Em aves, a organização inverte-se aparecendo em primeiro lugar a área em forma de V que corresponderia ao Corno de Amon, seguida da junção da área medial e área dorsomedial correspondendo ao giro denteado, em seguida a área lateral correspondendo ao subículo e por fim, a área SPf correspondendo ao córtex entorrinal .

Propostas de parcelamento comparativas entre hipocampos de aves e mamíferos foram obtidas através de imunomarcações (Hoffmann *et al.*, 2002). Esses parcelamentos possibilitaram a geração de sugestões para limites do hipocampo em pombos, baseados na forte imunorreatividade para o anticorpo contra a substância P definindo o limite lateral do hipocampo (Hoffmann *et al.*, 2002). Em sua borda lateral aparece uma densa marcação da neurópila imunorreativa para substância P em posição rostral à área em forma de V da região hipocampal que penetra em direção ao pálido lateral, destacando-o das demais regiões a sua volta. Embora exista ainda muita controvérsia a respeito, essa configuração de fronteira parece delimitar com clareza a região extra hipocampal (Schwassmann, 1990).

Assim, poderia relacionar-se essa área em forma de V no pombo ao corno de Amon dos mamíferos em função da presença das células piramidais circundadas pelas células em cesto que são imunorreativas para a colecistocinina em ambas as classes (Antal *et al.*, 2006). Além disso, outras células morfológicamente semelhantes imunorreativas para somatostatina e neuropeptídeo Y são encontradas na área medial do hipocampo das aves e na região hilar dos mamíferos, (Atoji e Wild, 2004).



A imunomarcção para peptídeo intestinal vasoativo (VIP) nas camadas do giro denteado nos mamíferos pode ser relacionada à área das células imunomarcadas para VIP no pombo. Outros resultados também permitiram associar a camada alvear e fímbria-fórnix do mamífero à área das fibras do trato medial, em função da presença de aferentes colinérgicos, serotoninérgicos e catecolaminérgicos que formam os tratos ali existentes em ambas as regiões e esses aferentes contribuem para os circuitos neuroquímicos que modulam as respostas hipocampais em roedores (Bausch, 2006; Hauser *et al.*, 2006) descreveram a presença marcante de fibras serotoninérgicas na porção imediatamente inferior à região dorsomedial, o que repete o padrão encontrado em mamíferos onde as camadas granulares relacionam-se intimamente ao giro denteado.

Além das comparações de ordem morfológica entre a formação hipocampal de aves e mamíferos, é possível encontrar associação funcional entre seus vários sistemas neurais. Segundo alguns pesquisadores (Donascimento *et al.*, 1991; Rosa *et al.*, 1991) é possível correlacionar a estrutura hipocampal nessas classes com a aprendizagem e o processamento dos vários tipos de memória, tais como, a contextual e a espacial.

Em aves, as conexões telencefálicas que relacionam o hipocampo ao lobo paraolfatório, ao pálido lateral e à parte límbica do estriado, permitem inferir a participação dessas regiões na formação da memória, e isso foi feito com a utilização de técnicas de esquila inibitória principalmente em galináceos jovens (Obrebowski *et al.*, 2000). Experimentos realizados em labirinto aquático (Morris water-maze) com roedores mostraram que o dano hipocampal, interrompe a orientação espacial a partir de pistas visuais fora do labirinto (extra-maze cues), embora tenha sido verificado que a lesão não afeta a orientação com pistas dentro do labirinto (intra-maze cues) (Kleinrok *et al.*, 2000).

Os mamíferos possuem um circuito trissináptico no hipocampo que está envolvido no processamento do aprendizado e memória, e que é sensível à facilitação sináptica (Wylie e Frost, 1990). Os estudos das eferências e aferências dessa região em aves (Buttery *et al.*, 1990; Curcio e Allen, 1990; Oswaldocruz *et*



al., 1990) não permitiram até a presente data, estabelecer com segurança a equivalência dos circuitos hipocampais, tal como, observado em mamíferos, porém algum consenso foi obtido nessas aproximações.

Em mamíferos, a formação hipocampal contém uma rede de neurônios que se comunicam através de um circuito trissináptico bem definido funcionalmente como do tipo feed-forward. A chegada de informações sensoriais converge para o córtex entorrinal o qual projeta, via circuito perfurante, para o giro denteado. Do giro denteado saem projeções, via fibras musgosas, para a região de CA3, de onde, através das fibras colaterais de Schaeffer, projetam-se ipsilateralmente e contralateralmente para a região de CA1. De CA1 saem fibras para o subículo e daí para fora do hipocampo (Simas e Dasilva, 1989).

Em trabalhos eletrofisiológicos associados ao uso de traçadores sugeriu-se a ocorrência de similaridades na circuitaria interna da formação hipocampal de pombos e ratos (Inan *et al.*, 2006). Assim, as informações sensoriais chegam, no pombo, através da área dorsolateral que projeta para a área dorsomedial. Da área dorsomedial saem projeções para as duas porções do V hipocampal, na área ventromedial das aves. O braço medial do V projeta-se ipsi- e contralateralmente para a porção lateral do V, que por sua vez projeta-se para a região dorsomedial de onde saem os circuitos eferentes em direção às demais áreas palidais.

Substâncias traçadoras sugeriram similaridades entre os padrões de conexões extrínsecas da formação hipocampal de aves e mamíferos, principalmente as septo-hipocampais (Clarkson, 1993; Zanolli *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2004). O septo medial no rato é a maior via de envio de informações à formação hipocampal, com projeções ipsilaterais importantes para o giro dentado CA1, CA2, subículo e projeções bilaterais para o córtex entorrinal. O septo medial recebe, de volta, aferências das regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo do rato. No pombo, a região dorsomedial recebe a maior parte das vias que chegam do septo medial e as células presentes na área ventromedial, principalmente as porções medial e lateral do V hipocampal projetam de volta para o septo medial. As regiões CA1 e CA3 do rato podem ser similares às porções laterais e mediais do V



hipocampal das aves, respectivamente, porque existem conexões intrínsecas entre as duas áreas que dão suporte a essa relação (Bruckner *et al.*, 2000).

Entretanto a anatomia hipocampal de aves e mamíferos é tão diferente que se torna difícil comparar suas subdivisões. Da mesma forma, a localização de função nessas estruturas parece ser difícil, mas isto é igualmente verdadeiro em ambas as classes. Por outro lado é certo que a contribuição dessas áreas é quase idêntica em quase todos os aspectos com a exceção do papel do hipocampo na memória episódica. Mesmo que os aspectos funcionais não possam ser usados para estabelecer homologias, a imensa similaridade observada aqui subsidia fortemente a homologia determinada por outros aspectos (Beason-Held *et al.*, 1999).

Durante a embriogênese, os hipocampos de mamíferos e aves emergem da mesma região do telencéfalo (Kallen, 1962), compartilham os mesmos tipos celulares, incluindo as células piramidais (Ben Bederson, 2005), e parecem contar com os mesmos tipos de neurotransmissores e enzimas relacionadas a estes (Erichsen *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 1991). As conexões para áreas do cérebro como o septum, hipotálamo, núcleos da base e áreas de processamento sensorial são similares mas não idênticas (Casini *et al.*, 1986). É muito provável que as estruturas hipocampais observadas em aves e mamíferos sejam ambas descendentes de uma única e antiga estrutura (Beason-Held *et al.*, 1999).

Até em peixes dourados (*Carassius auratus*), foi demonstrado aprendizado espacial utilizando tarefas de labirinto utilizando 4 pontos de oferta de comida (Rodriguez *et al.*, 2002). Lesões nessa espécie no palium lateral, que é um potencial homólogo do hipocampo de mamíferos afetou dramaticamente o aprendizado espacial enquanto o aprendizado dependente de pistas visuais permaneceu inalterado. No mesmo estudo experimentos com tartarugas revelaram o mesmo efeito depois de lesão no córtex medial. Outros estudos com métodos diferentes confirmaram a analogia funcional entre o hipocampo dos mamíferos e o palium lateral do peixinho dourado (Buhusi e Meck, 2006), enquanto outros (Crockett and Eisenberg, 1987 ; Coull *et al.*, 1995) chegaram a conclusão diferente.



1.4- O Hipocampo das Aves, Plasticidade e Memória

Muitas pesquisas sobre a relação entre o meio ambiente, a memória e o hipocampo tem sido focadas em aves que utilizam a memória para recuperar alimentos escondidos (food-cache) em numerosos sítios de armazenagem (Sherry *et al.*, 1989); (Krebs *et al.*, 1991); Hampton, Sherry *et al.*, 1995; Pravosudov e Clayton, 2002). Ainda que haja controvérsias sobre os mecanismos subjacentes (Bolhuis e Macphail, 2001; Macphail e Bolhuis, 2001) parece que a especialização dedicada a esconder a comida e lembrar-se do sítio de armazenagem resultou em uma memória espacial bem desenvolvida e um hipocampo ampliado em aves e mamíferos (Krebs, Sherry *et al.*, 1989; Sherry, D. F. e Vaccarino, A. L., 1989; Krebs, Clayton *et al.*, 1995).

A aprendizagem e a memória espacial assim como, a atividade de estocagem de comida estão relacionadas ao hipocampo e têm sido muito bem estudadas em pombos e outros pássaros (Clayton, 1998; Colombo, Broadbent *et al.*, 2000b; Sherry e Hoshoooley, 2010). A região hipocampal em pombos é definida como a área entre o ventrículo lateral e a fissura interhemisférica sendo lateralmente separado da área parahipocampal por uma região imunorreativa aos anticorpos contra SP (substância P), LENK (leucina-encefalina) e TH (tirosina hidroxilase). Definida dessa forma essa área coincide com a estabelecida por trabalhos citoarquitetônicos com a coloração de Nissl (Krebs, Sherry *et al.*, 1989) dedicados a outras espécies de aves, principalmente *Zebra finch*, onde também se discute os limites entre o hipocampo e demais regiões vizinhas (Montagnese, Krebs *et al.*, 1996)

As primeiras pesquisas sobre o papel do hipocampo na memória para a localização espacial dos locais onde os pássaros armazenam alimentos mostraram que esses tipos de aves, recuperam o alimento por lembrarem onde os haviam colocado (Cowie, 1981 ; Sherry, D. F. e Vaccarino, A. L., 1989). Ao lembrarem-se da localização onde armazenaram os alimentos utilizam as marcas espaciais perto desses locais, utilizam-se das relações geométricas entre os sítios e dos pontos de



referência existentes na área. Além disso, utilizam a bússola solar para obter informações e se orientar na jornada em direção aos sítios de armazenamento (Balda, 1989; Wiltschko W., 1989; Balda R. P. , 1991; Duff Sj, Brownlie La et al., 1998).

A memória utilizada para lembrar-se dos sítios de armazenamento pode ser de longa duração (Hitchcock C. L, 1990; Balda R. P, 1992), e o comportamento de recuperação indica que a ave se lembra de qual o tipo de alimento armazenado em um sítio específico (Sherry, 1984; Clayton N.S E Dickinson, 1998). Além disso, parece que as aves integram a informação espacial, o tipo de alimento e o momento em que a comida foi estocada e nesse sentido sugere-se que reproduzem o que se tem denominado episodic-like memory em mamíferos (Dere, Huston et al., 2005). Embora trabalho subsequente tenha questionado a alegação de Clayton e Dickinson de 1998 de que a memória para sítios espaciais se assemelha memória episódica humana (Hampton R. R. E Schwartz, 2004; Hampton, Hampstead et al., 2005.), parece provável que as aves que armazenam alimentos retêm algumas informações de diferentes formas sobre os tipos de sítios de armazenagem. Dentre essas informações incluem-se as relacionadas ao risco de perda do alimento (e.g. alimentos perecíveis versus não perecíveis) (Hampton e Sherry) e se ou não a ave já recuperou outras vezes os alimentos lá armazenados (Sherry, 1984).

Lesões no hipocampo das aves que escondem e recuperam alimentos perturbam essa capacidade de (Sherry, D.F e Vaccarino, A.L. , 1989) e produzem um déficit seletivo na memória para localização espacial (Hampton e Shettleworth, 1996a; Hampton, 1996b; Shiflett, Smulders et al., 2003 ; Broadbent e Colombo, 2000). Portanto, o hipocampo é essencial para a recuperação precisa do local onde o alimento foi armazenado, pois sua lesão reduz a precisão da recuperação dos esconderijos, sem afetar a tendência para esconder ou procurá-los (Sherry, D.F e Vaccarino, A.L. , 1989).

As lesões do hipocampo têm efeitos seletivos semelhantes sobre os componentes de orientação em pombos-correio (Bingman, Jones et al., 1995), comprometendo seu desempenho em outras tarefas espaciais, sem interromper a



capacidade de formar associações espaciais simples (Sherry, D. F. e Vaccarino, A. L., 1989; Hampton e Shettleworth, 1996a).

O hipocampo de aves que armazenam alimentos e das que não armazenam são diferentes em vários aspectos. Em nível taxonômico a comparação de famílias e subfamílias mostrou que as aves que armazenam alimentos têm, em média, um hipocampo maior do que as aves que não armazenam alimento (Krebs, Sherry et al., 1989; Sherry, Vaccarino et al., 1989). Dentro das famílias de aves que armazenam alimentos, também há evidências de que as espécies que armazenam mais têm um hipocampo maior do que as espécies que armazenam menos (Healy e Krebs, 1992; Hampton, Sherry et al., 1995).

Já está demonstrado que existe uma diferença no tamanho do hipocampo, entre espécies semelhantes da Eurásia (que possuem hipocampo maior) do que o de espécies da América do Norte (com hipocampo menor), sendo isso verdadeiro tanto para aves que armazenam como para as que não armazenam (Garamszegi e Lucas, 2005). Entretanto, confirmou-se posteriormente que as aves que armazenam alimentos têm hipocampo consistentemente maior do que as espécies que não armazenam independente das diferenças continentais (Lucas *et al.*, 2004). Em um estudo similar em grande escala utilizando diferenças filogenéticas, Garamszegi e Eens, (2004) encontraram uma relação positiva entre o comportamento de estocagem de alimentos e o tamanho relativo do hipocampo (Odum, 1942; Haftorn, 1956; Ludescher, 1980.; Nakamura e Wako, 1988).

Uma versão seca do labirinto aquático de Morris, que consiste em achar a posição de um reservatório de comida escondido em um campo aberto onde os animais são soltos em diferentes pontos, foi empregada em pombos. O comportamento de pombos foi examinado utilizando-se esse procedimento e demonstrou-se que o aprendizado espacial é comprometido quando o hipocampo é lesado. Os animais com lesão hipocampal foram capazes de encontrar a comida escondida, entretanto o tempo de latência foi muito maior quando comparado aos animais controle com hipocampo íntegro (Fremouw *et al.*, 1997).



1.5 - Aves Migratórias e o Sistema Neural de Navegação

As espécies migratórias são reconhecidas por suas habilidades de navegação ao redor do mundo. Essas aves são capazes de navegar por distâncias muito longas até seus sítios de invernada, no hemisfério sul, e de volta na primavera a seus habitats onde nasceram e foram criados no hemisfério norte. Pássaros que escondem comida para recuperação posterior são capazes de encontrar os lugares onde esconderam comida com acurácia impressionante e os pombos em particular, acham sua casa mesmo quando soltos em territórios desconhecidos (Krebs, 1990).

Para orientação do processo de migração envolvendo longas distâncias a informação direcional pode ser extraída do campo magnético terrestre ou de pistas visuais como o sol e as estrelas. A primeira chamada de orientação por “bussola” tem sido amplamente estudada em diferentes espécies de pássaros nas últimas décadas (Wiltschko *et al.*, 2000; Wiltschko e Wiltschko, 2002; Mouritsen e Ritz, 2005; Wiltschko e Wiltschko, 2005; Muheim *et al.*, 2006; Hein *et al.*, 2011; Wiltschko e Wiltschko, 2012). Como outros mecanismos de orientação global, a orientação através de campo magnético também pode ser usada para localização de alvos em curtas distâncias (Voss *et al.*, 2007; Keary *et al.*, 2009). Entretanto, porque as bússolas de campo magnético, solar ou estelar somente disponibilizam informação sobre direção e não sobre distância elas não são suficientes para a localização de um determinado lugar. Isto pode ser alcançado usando o arranjo espacial de pistas visuais e a geometria do espaço circundante para orientação, uma habilidade denominada de “orientação espacial”. Para analisar a posição de um destino pretendido em relação as pistas visuais, os animais precisam de um mapa cognitivo que proporciona uma representação detalhada do ambiente (O'keefe e Nadel, 1978).

Tem sido sugerido que as aves migratórias possuem necessidade de usar um complexo sistema de navegação em que a aprendizagem e a memória devem ser importantes componentes (Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003). Para migrar longas distâncias é necessário lembrar a rota de migração e os locais de



paragem necessários ao reabastecimento das reservas de energia (Healy *et al.*, 1996; Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003), bem como, os detalhes de ambos os habitats de reprodução e invernada, já que ambos os habitats parecem ser reutilizados (Chilton, 1995).

A memória dependente do hipocampo também parece ser importante para aperfeiçoar a volta para casa (homing) (Strasser *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que enquanto as aves migratórias são jovens utilizam um sistema de navegação "simples" e inato, já os pássaros mais velhos usam um sistema de orientação mais complexo baseado na memória e aprendido (Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003). Se as espécies migratórias, de fato, possuem maiores exigências para a memória, seria de se esperar que tenham uma memória melhor com um hipocampo ampliado, em comparação às espécies não migratórias (Healy *et al.*, 1996).

As diferenças potenciais na memória e tamanho do hipocampo entre aves migratórias e não migratórias, podem ser, devidas à experiência migratória, que por si só provocam essas mudanças (Healy *et al.*, 1996) e se isso for verdade, os indivíduos das espécies migratórias que migram pela primeira vez devem ser semelhantes às espécies não migratórias em suas habilidades de lembrar possuindo volumes hipocampais equivalentes. Alternativamente, as aves migratórias podem ter evoluído para uma memória aumentada e um hipocampo ampliado como resultado do aumento da pressão de seleção onde indivíduos e seus descendentes com sistema de memória necessária e suficiente ao sucesso da migração teriam mais chance de sobreviver do que os outros. Nesse caso, não haveria diferenças entre os indivíduos inexperientes e os experientes no desempenho da memória e tamanho do hipocampo (Cristol *et al.*, 2003).

Pouca informação está disponível sobre a memória e o hipocampo de aves migratórias e não migratórias e os poucos estudos disponíveis apoiam à hipótese de que os hábitos migratórios podem afetar a memória e o hipocampo (Healy *et al.*, 1996; Cristol *et al.*, 2003; Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003).

A experiência migratória provoca um 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 memória melhor e um hipocampo maior do que as espécies não migratórias (Healy *et al.*, 1996). Entretanto 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* (Cristol *et al.*, 2003). Posteriormente confirmou-se a ocorrência de diferenças na memória de longo prazo entre as espécies migratórias (*Sylvia borin*) e não migratórias (*Sylvia melanocephala*), mas não ficou claro se essas diferenças foram relacionadas às diferenças no hipocampo e que tipo de memória foi afetada pelo comportamento migratório (Mettke-Hofmann e Gwinner, 2003).

A espécie migratória *Zonotrichia leucophrys gambelii*, possui memória espacial melhor e mais neurônios no hipocampo em relação aos seus co-específicos que não realizam migração (*Zonotrichia leucophrys nutalli*), 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 (Pravosudov *et al.*, 2006).

No entanto, existem outros fatores não relacionados ao comportamento migratório, que produziram diferenças registradas na memória e no hipocampo entre subespécies migratórias e não migratórias do 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, 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).

As diferenças na memória espacial e do hipocampo entre aves migratórias e não migratórias poderiam potencialmente ser experiência-dependente ou ser resultado tal como mencionado antes, da crescente pressão de seleção para uma



memória espacial mais eficiente em aves migratórias. O sistema detector do campo magnético terrestre presente nas aves migratórias talvez gere adaptações únicas que podem não estar presentes nos mamíferos (Lohmann, 2007).

No presente trabalho descrevemos a morfologia da formação hipocampal e estimamos o número de neurônios e micróglia na formação hipocampal de duas espécies de maçaricos migratórios com padrão de migração bastante distintos com a expectativa de detectar possíveis diferenças em seus hipocampus.

Entretanto, para a detecção precisa de possíveis correlações entre estratégia de migração e alterações hipocampus é crítica a utilização de metodologias estereológicas sem viés e não há na literatura até então nenhum trabalho na formação hipocampal em aves marinhas utilizando tais metodologias.

1.6- Estereologia Baseada em Design para Contagem de Células: O Fracionador Óptico

A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como: menores, maiores, mais largas, menos frequentes, mais frequentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (Schmitz e Hof, 2005). A análise microscópica, entretanto é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos, particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto é necessário considerar que se um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original será de fato analisada em detalhe (Howard e Reed, 2005). Esta é uma questão chave em neuromorfologia, assim como, em muitas outras áreas onde é necessária a distinção de diferenças entre condições fisiológicas e patológicas (Schmitz e Hof, 2005).

Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes,



apresentam resultados controversos que se devem à suposições prévias acerca do tecido e da geometria das células e suas distribuições no plano da secção (Geinisman *et al.*, 1995; Mayhew e Gundersen, 1996). Muitos dos estudos quantitativos introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (Mayhew e Gundersen, 1996; Gardella *et al.*, 2003; Mandarim-De-Lacerda, 2003; Howard e Reed, 2005), confocal (Peterson, 1999; Kubinova e Janacek, 2001) ou eletrônica (Fiala e Harris, 2001; Nyengaard e Gundersen, 2006).

A estereologia é um ramo da ciência que lida com a reconstrução das características de estruturas tridimensionais de objetos, a partir da reconstrução serial de estruturas bidimensionais (Weibel, 1989). O termo “baseado em design” é utilizado para definir sistemas de amostragem que são independentes das propriedades do tecido (Glaser e Glaser, 2000).

De fato a sonda e os parâmetros de amostragem são definidos a priori em estereologia, de forma que não é necessária a coleta de dados de tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (West, 2002). Os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas sem conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado (Glaser e Glaser, 2000; Schmitz e Hof, 2005).

As análises estereológicas do hipocampo das aves migratórias em comparação com aves que não migram, utilizando marcadores específicos, se resumem a estimativa do número de neurônios em duas subespécies do gênero *Zonotrichia* (Pravosudov *et al.*, 2006) e a estimativa de células da glia em *Poecile atricapillus* empregando o cresil violeta um marcador não seletivo que cora o DNA celular indistintamente (Roth *et al.*, 2013). Esses autores demonstraram que a espécie migratória apresenta melhor desempenho em testes de memória espacial de uma única tentativa do que a subespécie que não migra. As aves migratórias precisam lembrar-se da rota e dos locais de parada para alimentação e reposição de suas reservas energéticas, assim como, de detalhes dos locais de reprodução



para onde parecem retornar (Chilton, 1995; Mettke-Hofmann, Claudia e Gwinner, Eberhard, 2003). Entretanto, estimativas estereológicas ou ensaios morfométricos dedicados às células da glia ainda não estão disponíveis na literatura relacionada às aves marinhas migratórias. Por essa razão é relevante empreender esforços nessa direção.

1.7- Morfologias das Células Gliais em Aves e Mamíferos

Nos anos sessenta já era sabido que pelo menos quatro classes de células gliais eram partilhadas por aves, répteis e mamíferos com base em uma variedade de critérios morfológicos: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e endotélio (Stensaas e Stensaas, 1968). À época, a morfologia celular comparada era construída com base em reconstruções bidimensionais com alguma contribuição de estudos ultraestruturais. A Figura 06 é um exemplo desses ensaios morfológicos empregando a técnica de Golgi em secções da medula espinhal de pombos. No que concerne aos objetivos do presente trabalho interessou-nos particularmente comparar a morfologia da micróglia e o número, tanto de micróglia como de neurônios, em aves e mamíferos. O objetivo desse ensaio foi o de reunir achados morfológicos que possibilitassem a comparação da morfologia fina da micróglia do giro denteado dos mamíferos com as do hipocampo ventral das aves em função de sua possível homologia. Infelizmente não foi possível encontrar reconstruções tridimensionais detalhadas para a micróglia em aves, e isso nos impediu de comparar nosso ensaio com a literatura especializada em aves.

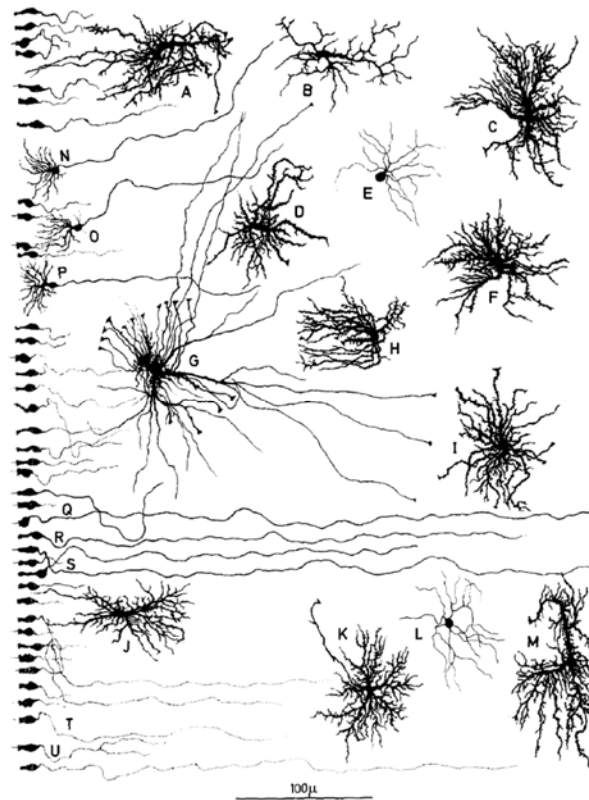


Figura 06. Desenho em câmara clara de células da glia a partir de secção longitudinal da medula espinal do pombo. A-D, F-K e M, correspondem a astrócitos protoplasmáticos; G é um astrócito fibroso; E e L são oligodendrócitos; N-P são astrócitos endimários; Q-U são endimócitos (Stensaas e Stensaas, 1968).

Por conta dessa lacuna decidimos comparar nossos ensaios morfológicos com aqueles de ratos adultos (*Rattus norvegicus*) da variedade Wistar, e com os de um primata do Novo Mundo com notáveis habilidades cognitivas, o *Cebus apella*. Para isso reconstruímos a morfologia tridimensional da micróglia da camada molecular do giro denteado de tais espécies e comparamos esses resultados àqueles do hipocampo ventral e dorsal das aves migratórias *Calidris pusilla* e *Acititis macularia*.

Reconstruções bidimensionais encontradas anteriormente em aves serviram como ponto de partida para esse ensaio morfológico microglial comparativo. A Figura 07 é um exemplo nessa direção no teto óptico das aves.

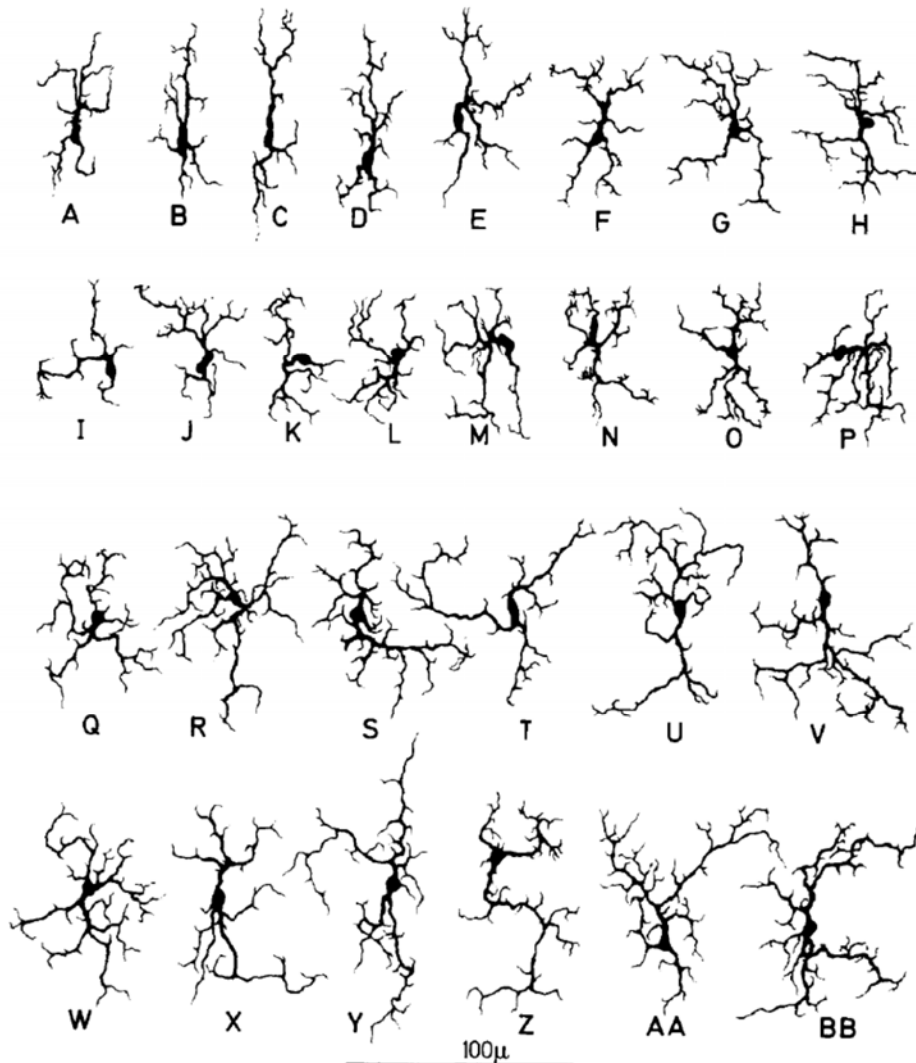


Figura 07. Morfologia microglial no teto óptico da galinha. A-P - Micróglia durante o desenvolvimento cerebral pós-natal imediato; Q-BB – Micróglia no cérebro adulto. Adaptada de (Stensaas e Stensaas, 1968).

Mais recentemente com a utilização de anticorpo monoclonal específico para marcação de micróglia e macrófagos (HIS C7) que reconhece a forma aviária do CD45 foi possível caracterizar morfológicamente a micróglia de galináceos em desenvolvimento e na vida adulta (Cuadros, Santos, Martin-Oliva, *et al.*, 2006). O CD45 é um antígeno que colocaliza sua imunomarcação com aquela dirigida contra a proteína de membrana IBA-1 (Ver Figura 08). Esses resultados obtidos por



imunomarcção contra esse antígeno se assemelham no que concerne à morfologia, àqueles obtidos com anticorpo anti-IBA-1, igualmente capaz de identificar células CD45 positivas, um marcador seletivo para micróglia e macrófagos em mamíferos (Ito *et al.*, 1998).

Da mesma forma, esses resultados se assemelham àqueles obtidos por histoquímica com NDPase e histoquímica para lectina RCA 1 no teto óptico das aves (Shin *et al.*, 2003; Cuadros, Santos, Martin-Oliva, *et al.*, 2006). Usando HIS C7

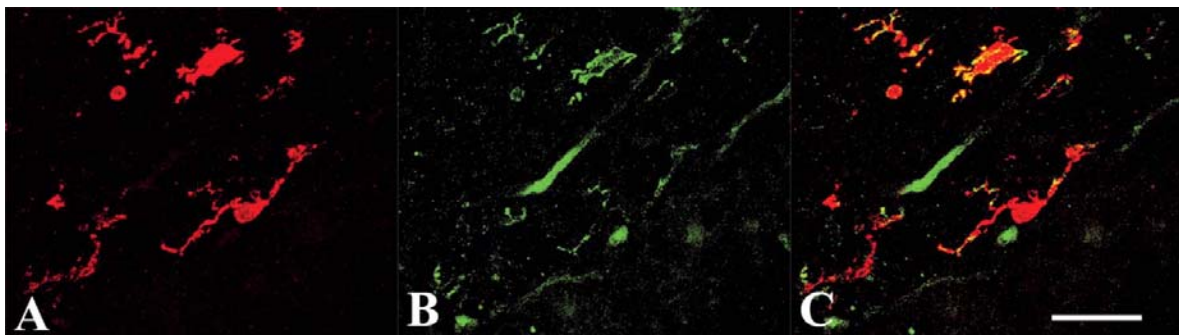


Figura 08. Microscopia confocal de células imunomarcadas no teto ótico da galinha no oitavo dia pós-natal, ilustrando que todas as micróglia dessa região estão imunomarcadas pelo anticorpo anti-IBA1 (em vermelho) enquanto que outras células CD45 positivas distintas da micróglia, estão marcadas pelo anticorpo anti-CD45 (em verde). A coloração amarela corresponde à dupla marcação. Escala=25µm (Cuadros, Santos, Martin-Oliva, *et al.*, 2006).

em secções do teto óptico de galinhas, esses autores encontraram morfologias celulares compatíveis com o padrão até então descrito para micróglia. A histoquímica para NDPase por sua vez foi igualmente utilizada para caracterizar a morfologia microglial em várias espécies incluindo aves (Fujimoto *et al.*, 1987) e mamíferos (Murabe e Sano, 1982) tendo sido encontrado processos celulares com morfologia semelhante. Não há, entretanto estudos detalhados empregando microscopia tridimensional em aves que permitam comparação detalhada com os estudos disponíveis em mamíferos. Assim, o presente trabalho pretende contribuir para reduzir a lacuna de estudos morfológicos comparativos detalhados e para tanto escolhemos trabalhar com anticorpo reativo para a proteína IBA-1 que tem reatividade simultânea para macrófagos e micróglia tanto em aves quanto em mamíferos (Cuadros, Santos, Martin-Oliva, *et al.*, 2006).



A morfologia microglial em mamíferos por outro lado tem sido objeto de análises mais detalhadas desde 1913 quando Cajal a denominou como “o terceiro elemento” para distingui-las dos astrócitos e dos neurônios; ver (Kettenmann *et al.*, 2011; Eyo e Dailey, 2013) para revisões recentes.

Outros estudos sistemáticos subsequentes revelaram desde então grande heterogeneidade na distribuição e morfologia da micróglia e.g. (Lawson *et al.*, 1990). Como um exemplo dessa heterogeneidade, no cérebro do camundongo a variação na distribuição da micróglia é de pelo menos 5 vezes entre uma região e outra, havendo maior concentração dessas células no hipocampo, no telencéfalo olfatório, nos núcleos da base e na substância negra, sendo sua morfologia em situação normal igualmente variável, tendo sido classificadas em pelo menos três categorias distintas (Lawson *et al.*, 1990).

Não se sabe ainda que fatores locais determinam essa variação numérica e morfológica ou se essas pequenas variações refletem contribuições funcionais diferentes, apesar de haver variações regionais de magnitude semelhante na expressão de receptores imunológicos (De Haas *et al.*, 2008); ver (Ransohoff e Perry, 2009) para revisão.

As micróglias em situação normal se apresentam em todas as regiões do SNC de forma organizada com ramificações em todas as direções e sem sobreposição, definindo domínios ou territórios circunscritos. No cérebro adulto, a micróglia pode responder a mudanças na atividade neural influenciando-a tanto no curto, quanto no longo prazo monitorando igualmente a função sináptica (Wake, Hiroaki *et al.*, 2011).

Essas células, portanto, normalmente têm suas funções inflamatórias reguladas para baixo por conta de numerosas influências inibitórias no microambiente que as circunda e que são produzidas em sua maioria por neurônios (ver figura 09) (Ransohoff e Perry, 2009). Apesar desse fenótipo regulado para baixo, no cérebro normal, estudos que coletaram imagens micrógliais *in vivo* revelaram que elas costumam deslocar seus processos de forma dinâmica, ao longo do território que ocupam para monitorar o microambiente local (Davalos *et*



al., 2005; Nimmerjahn, Axel *et al.*, 2005). Essa motilidade e eventuais mudanças em sua forma alteram a distribuição de seus ramos no território cerebral objeto do monitoramento tornando difícil a análise de sua morfologia utilizando métodos descritivos tradicionais. Para contornar essa dificuldade mais recentemente tem sido proposta a análise quantitativa da complexidade do padrão de ramificação da micróglia como instrumento útil para caracterizar sua morfologia (Karperien, Audrey *et al.*, 2013).

Nesse trabalho, a forma e as funções micrógliais são consideradas

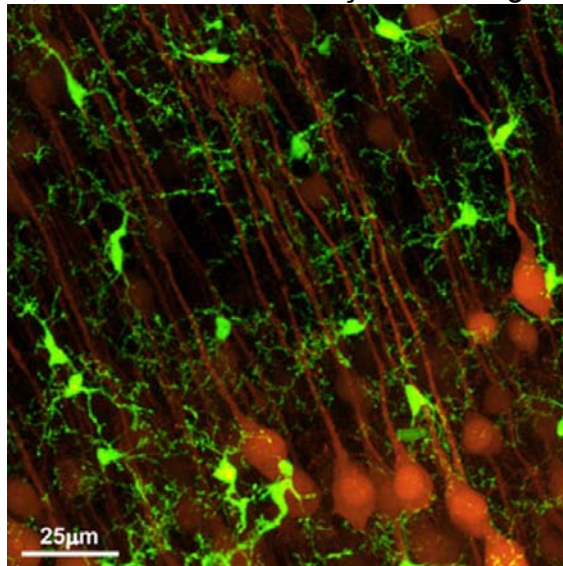


Figura 09. Morfologia de micróglia (em verde) e neurônios piramidais (em alaranjado) durante o desenvolvimento do neocórtex do camundongo. Imagens de microscopia confocal ilustrando micróglia expressando a proteína fluorescente verde (GFP-expressing micróglia) e neurônios piramidais expressando a proteína fluorescente amarela (YFP-expressing pyramidal neurons). Note as delgadas ramificações das micróglia em meio aos dendritos e somas neuronais [Figura adaptada de (Eyo e Dailey, 2013)].

intrinsecamente ligadas e é proposto que se adote a análise fractal como instrumento quantitativo dos fenótipos morfológicos que parecem variar ao longo de um gradiente. A posição relativa da morfologia da micróglia nesse gradiente pode ser expressa em graus de complexidade distintos que se refletem no valor da dimensão fractal (K-dim) de cada célula reconstruída (Karperien, Audrey *et al.*, 2013).



Além das mudanças associadas ao monitoramento, essas células podem mudar rapidamente seus fenótipos em resposta a qualquer distúrbio da homeostase do sistema nervoso passando a ser referidas como micróglia ativas com base na mudança de sua morfologia ou na expressão de antígenos em sua superfície (Ransohoff e Perry, 2009). A retração dos processos micrógliais é aparente durante a neurodegeneração e neuroinflamação e está fortemente correlacionada com sua transformação funcional para o estado pró-inflamatório ou ativado (Kettenmann *et al.*, 2011). As alterações morfológicas associadas à ativação consistem em: processos citoplasmáticos encurtados e mais espessos e um corpo celular arredondado representando um contínuo de estágios de ativação que para fins didáticos podem ser classificados em inicial, intermediário e avançado e são acompanhadas pelo aumento da expressão de genes envolvidos em respostas imunes (Zielasek e Hartung, 1996).

É fato que além da mudança morfológica à injúria, a ativação microglial também é caracterizada pela indução da liberação de várias moléculas, tais como marcadores mielóides, citocinas, radicais livres e óxido nítrico (Streit e Kreutzberg, 1988; Bechmann e Nitsch, 1997; Raivich *et al.*, 1999; Streit *et al.*, 1999). A ativação da célula microglial pode ocorrer em resposta a variados estímulos, tais como lesões, isquemia e processos inflamatórios, levando a micróglia a assumir um fenótipo ativado associado à proliferação, migração para o local da lesão, fagocitose das células infectadas e em processo de morte celular e liberação de fatores neurotóxicos e neurotróficos (Power e Proudfoot, 2001). Essa variação fenotípica inflamatória é igualmente observada em aves (Yang *et al.*, 2007) e em um de nossos animais removido de nossas análises comparativas pudemos confirmar a ocorrência de alterações morfológicas compatíveis com descrições anteriores dedicadas a processos inflamatórios em aves (Zelinka *et al.*, 2012).

No presente trabalho nosso interesse concentra-se, entretanto, em comparar micróglia cujas morfologias tridimensionais se enquadram em perfis não ativadas, em animais adultos, sem quaisquer sinais clínicos aparentes de doença ou de resposta inflamatória evidente no SNC. A quantificação de suas sutilezas



morfológicas será usada aqui para investigar possíveis distinções adaptativas no sistema imune entre espécies que são separadas entre si por distâncias evolutivas contrastantes.

Baseados na ausência de estudos sistemáticos empregando análises estereológicas em aves, o alvo do presente trabalho é estimar o número de neurônios e micróglias, assim como, analisar a morfologia tridimensional dessas últimas na formação hipocampal de duas das espécies de maçaricos, usando estereologia e reconstrução tridimensional computadorizada. O processo de análise quantitativa utilizará o método do fracionador óptico, que permite estimar o número de objetos de interesse de uma determinada estrutura cujos limites e objetos de interesse se reconhecem sem ambiguidades. Da mesma forma, empregar-se-á reconstrução tridimensional por microscopia automática para garantir melhor resolução a análise comparativa da morfologia microglial.



2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Implantar como modelo para estudo da formação hipocampal das aves migratórias as espécies *Calidris pusilla*, (Bausch e Mcnamara, 2000) e *Actitis macularia*, (Blackstad, 1956) apud (Silveira *et al.*, 1989).

2.2- Específicos

- 1) Descrever a morfologia da formação hipocampal de exemplares adultos dessas espécies estabelecendo seus limites arquitetônicos com diferentes marcadores visando a definição da área e dos objetos interesse dos estudos estereológicos e morfométricos.
- 2) Estimar o número de micróglia e de neurônios da formação hipocampal de *Actitis macularia* e *Calidris pusilla* com marcadores seletivos para neurônios e micróglia utilizando o método do fracionador óptico.
- 3) Reconstruir e realizar análise comparativa da morfologia da micróglia do hipocampo dorsal e ventral das aves estudadas com aquelas da camada molecular do giro denteado do rato (*Rattus norvegicus* da variedade Wistar) e do macaco (*Cebus apella*).



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Captura com Redes de Neblina

Em cada ponto de coleta, uma linha composta por nove redes de 12m x 2m e malha de 36mm será aberta até o momento de captura do número desejado de animais. As redes eram vistoriadas a cada trinta minutos, quando as aves capturadas são retiradas, obtendo-se informações referentes à identificação da espécie, horário de captura, peso, comprimento do bico, presença de muda e presença de gordura.

3.2- Perfusão, Corte, Coloração e Imunohistoquímica

Após a captura os animais foram perfundidos por via transcardíaca com solução salina 0,9% heparinizada por 10 minutos, seguida de paraformaldeído 4% pH 7.2-7.4 por 10 minutos. O início do fluxo de solução salina foi iniciado após o corte da veia jugular com incisão no lado direito do pescoço permitindo assim que o cérebro fosse melhor permeado pelas soluções salina e de paraformaldeído.

Após craniotomia o encéfalo foi cortado no plano coronal, axial e sagital em busca do melhor plano para os estudos estereológicos. Após a retirada do encéfalo, com as regiões encefálicas de interesse, fatias de 70 μ m foram obtidas em um vibrátomo (Vibratome Sectioning System, Pelco 120) ou em criostato após crioproteção com solução de sacarose a 30% ou de sacarose a 30% mais glicerol a 10%. As coleções cortadas no plano coronal foram coradas pelas técnicas de Nissl, assim como foram reagidas por imunohistoquímica para Neu-N (marcador de neurônios), GFAP (marcador de astrócito), IBA1(marcador par micróglia), Zenk (produto de gene de ativação imediata), C-Fos (produto de gene de ativação imediata) e DCX (dupla cortina).



3.2.1- Coloração de Nissl

A coloração de Nissl utiliza o cresil violeta e cora em violeta núcleos e nucléolos. Neurônios e glia são corados indistintamente pela técnica de Nissl.

Para preparar a solução de coloração é preciso aquecer o cresil violeta em banho-maria a 40°C, agitando-a por 5 minutos; filtrar a solução final em papel filtro; e acrescentar o ácido acético até que o pH da solução esteja entre 3 e 3,5. As fatias devem ser mergulhadas nas soluções e sequência indicadas no quadro 03.

Tabela 01: Etapas da Coloração de Nissl com Tempo de Imersão em Cada Reagente

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

3.2.2- Imunomarcção para GFAP, Neu-N, IBA1, ZENK e C-Fos

Após a realização da perfusão, dissecação, e corte, as seções do tecido cerebral são armazenadas em paraformoldeido 4% a 4°C. As seções selecionadas são lavadas com Tris 0,1 M pH 7.2-7.4 antes da incubação em ácido bórico 0.2M pH 9,0 a 70°C como descrito na Tabela 2, que mostra cada passo da imunohistoquímica. Os sítios de ligação não específicos são bloqueados pela incubação dos cortes em caseína a 10% durante 60 minutos. A incubação das



secções nos anticorpos primários (anticorpos primários Neu-N, C-Fos, Zenk, GFAP, IBA1 e DCX), específico para cada imunomarcação (Tabela 3), ocorreu durante três dias a 4°C com agitação suave.

Tabela 02: Passos das Reações de Imunohistoquímica com os tempos de Imersão e Enxágues em cada Reagente

SOLUÇÃO	TEMPO DE IMERSÃO OU ENXÁGUES
Ácido bórico	60 minutos
Tris salina Triton 5%	3x5 minutos
Tris salina	3x2 minutos
Caseína	60 minutos
Tris salina	3x2 minutos
Anticorpo primário	3 dias
Tris salina	3x2 minutos
Anticorpo secundário	12 horas
Peróxido de hidrogênio	15 minutos
Tris salina	3x 2 minutos
ABC	60 minutos
Tris 0,1 M	3x 2 minutos
Revelação com GND	máx 30 minutos
Tris 0,1 M	3x 2 minutos

A peroxidase endógena é inativada através de incubação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% dissolvido em tris salina, durante 15 minutos. Após lavagem os cortes são incubados durante 60 minutos no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector ABC kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA, 1:200). A atividade da enzima peroxidase é detectada usando reação 3'3-diaminobenzidine (DAB, Sigma) e β-D-glucose/glucose-oxidase empregando o protocolo descrito em (Shu, Ju et al., 1988). Depois que o produto da reação é formado gera-se um precipitado azul-acinzentado nos locais de interação antígeno-anticorpo e as reações quando então são interrompidas as reações em tris salina 0,1 M. Os cortes são montados em lâminas de vidro gelatinizadas e desidratados em séries de etanol (70, 80,90, 100,100%) seguido de xilol I e II.

Tabela 03: Informações de Diluição e Fabricantes dos Anticorpos utilizados.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	FABRICANTE / N° de REFERENCIA
Primário NeuN	1:2000	Milipore / MAB 377
Primário Iba -1	1:2500	Wako / 019-19741



Primário c-Fos	1:1000	Santa Cruz / SC-253G
Primário GFAP	1:1000	Santa Cruz / SC-6170
Primário Zenk	1:1000	Santa Cruz / SC-189
Primário DCX	1:1000	Santa Cruz / SC-8066
Secundário Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L)	1:250	Vector Laboratories / BA-9200
Secundário Biotinylated Anti-Goat IgG Reagent (H+L)	1:250	Vector Laboratories / BA-9500
Secundário Biotinylated Anti-Rabbit IgG Reagent (H+L)	1:250	Vector Laboratories / BA-1000

3.3- Estereologia

Um dos mais recentes avanços envolvendo o dissecor óptico é a combinação do *dissecor óptico* com o *fracionador de amostras*. Esta combinação conhecida na literatura como fracionador óptico (West, 2002), tem numerosas vantagens práticas, sendo a principal o fato de não ser afetado pela retração do tecido e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento. O fracionador óptico envolve contagem de objetos (neurônios e glia no presente trabalho), com sondas de dissecor ópticos, em uma amostra sistemática uniforme que constitui uma fração conhecida do volume da região sendo analisada. Na prática, isto é feito através de amostragem sistemática de uma fração conhecida da espessura da secção, de uma fração conhecida da área seccional e de uma fração conhecida do número de secções que incluem a região de interesse.

Tabela 04: Relação entre Magnificação de Objetivas Acromáticas. (Dorph-Petersen et al., 2001)

Magnificação	Abertura Numérica	Profundidade Focal (μm)
4	0,1	172,5
10	0,25	27,6
40	0,65	3
100	1,3	0,7

Cada análise estereológica começa com o delineamento das fronteiras da região de interesse em uma série de secções randômicas e sistemáticas (Howard e Reed, 2005). Em nosso caso as fronteiras das regiões de interesse podem ser facilmente reconhecidas em secções coradas com Nissl e os limites do hipocampo



podem ser traçados em imagens de vídeo em um computador acoplado a um microscópio utilizando objetivas de baixo aumento (e.g. 3.2x).

Para analisar sistematicamente a área delimitada em baixo aumento é necessário mudar para uma objetiva de grande aumento (100x) com elevada abertura numérica e reduzida profundidade de foco (Schmitz e Hof, 2005). A Tabela 04 ilustra a relação entre o aumento de objetivas acromáticas, abertura numérica e profundidade de foco.

Nos trabalhos empregando microscopia óptica onde apenas uma fração mínima do número de objetos de interesse é contada, só é possível falar de estimativas acerca do número deles dentro da região de interesse. Para obter estimativas confiáveis (que se aproximam do real) a partir de uma diminuta fração amostral, é necessária a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a terceira dimensão. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (Schmitz e Hof, 2005).

Entretanto mesmo com todos esses cuidados a incerteza nas estimativas ainda permanece e é decorrente de outras fontes de erro possíveis como aqueles introduzidos pelos pressupostos do operador acerca dos grupos experimentais, pelas alterações induzidas nas secções pelo processamento do tecido, pela ambiguidade no reconhecimento de áreas ou dos objetos de interesse. Para minimizar esse tipo de incerteza é necessário executar uma série de procedimentos controle como ensaio duplo cego, escolhas adequadas no processamento tecidual incluindo fixação, plano de corte, imunohistoquímicas seletivas, garantindo a cada passo que todas as regiões da estrutura tenham a mesma probabilidade de contribuir para a amostra reduzindo a ambiguidade no reconhecimento dos limites da região assim como nos objetos da contagem.

O processo inteiro consiste, em resumo, em dois passos:



1º Passo – Amostragem: que exige acesso à estrutura inteira com todas as regiões de interesse com chances similares de contribuição para a amostra assim como, o reconhecimento dos objetos de interesse sem ambiguidade.

2º Passo – Medidas: que exige o uso de métodos baseados em design (medidas tridimensionais) ao invés de métodos baseados em suposições (medidas bidimensionais).

As análises estereológicas para contagem neuronal e microglial foram realizadas através do programa Stereoinvestigator (MicroBrightField, Williston, VT, USA) integrado a um microscópio óptico Nikon com platina motorizada para os eixos X, Y e Z e um computador, onde os dados das coordenadas tridimensionais eram registrados, o controle da platina e a execução do programa era feito.

Ao iniciarmos o procedimento de contagem, caixas de contagem são geradas automaticamente pelo programa em cada um dos pontos de intersecção da sonda estereológica com o plano onde está situada a fatia (Figura 10). Para isso o experimentador alimenta o programa definindo as dimensões da caixa, da matriz de contagem e da fração amostral de secções.

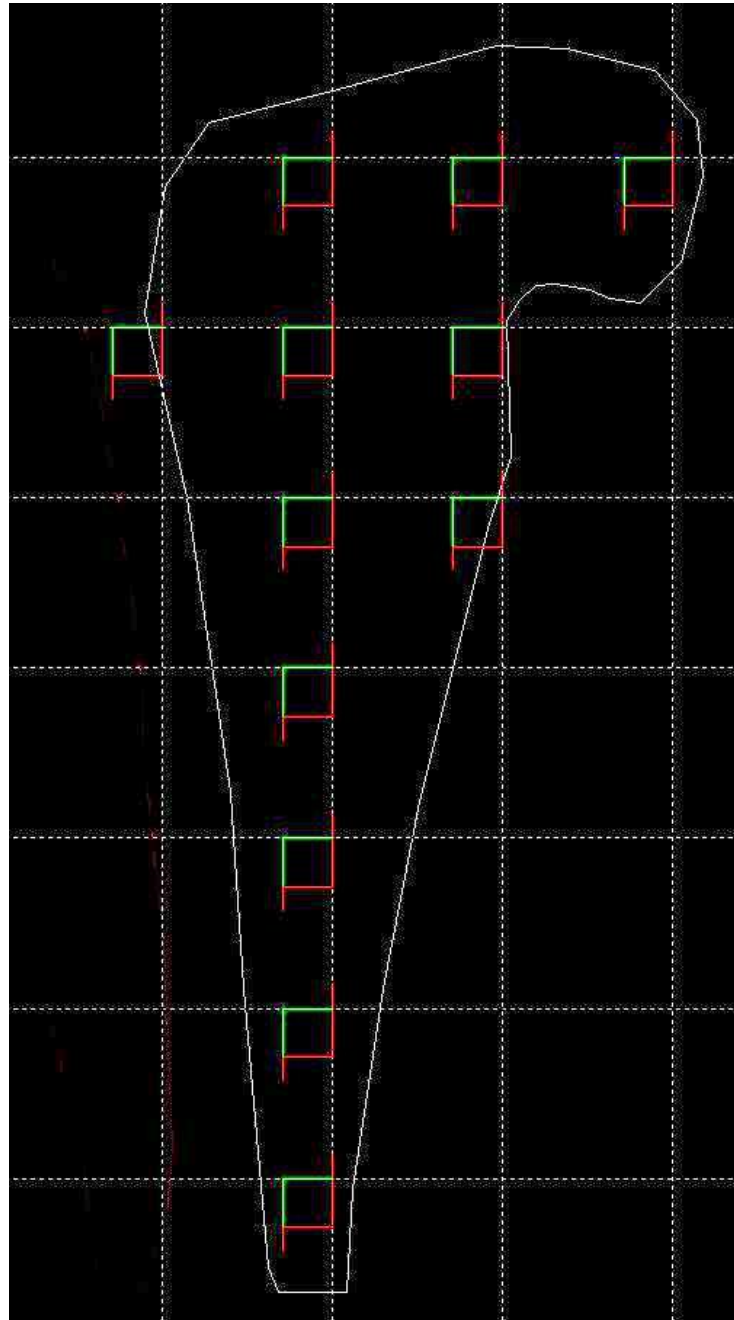


Figura 10. Contorno da formação hipocampal mostrando as caixas de contagem ($50 \times 50 \mu\text{m}$) geradas pelo programa em cada ponto de intersecção do contorno da secção com a sonda estereológica (grid de $350 \times 350 \mu\text{m}$).

A escolha dessas dimensões e da fração amostral é feita em ensaio preliminar (por tentativa e erro) até que o coeficiente de erro de uma fatia individual seja adequado para obter resultados médios para o conjunto de secções com baixo



coeficiente de erro. Em cada caixa de contagem são marcados os objetos de interesse (neurônios e glia). Os neurônios marcados em cada caixa geram informações para o programa acerca do número e da posição das células contidas em cada caixa. A partir dessas informações colhidas sistematicamente na fração de secções eleitas para contagem, o programa estima o número esperado de objetos de interesse (neurônios e micróglia) na estrutura inteira.

A figura 11 mostra um bloco de $8\mu\text{m}$ de altura em planos de foco situados a cada $2\mu\text{m}$ ao longo do eixo Z. As linhas brancas do bloco são linhas de inclusão, ou seja, qualquer célula que cruze essa linha ou que esteja contida integralmente na caixa deve ser contada, enquanto que as células que interceptam as linhas negras não são contadas.

Em nosso protocolo, o corpo celular será utilizado como unidade de

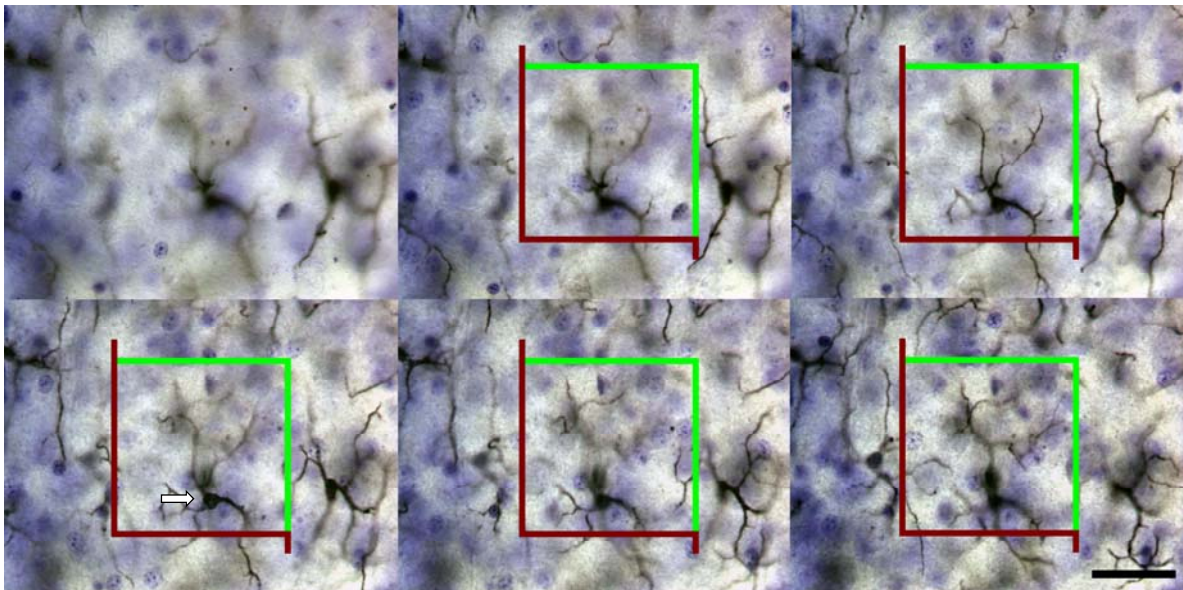


Figura 11. Contagem do número de micróglia em uma caixa de contagem de $10\mu\text{m}$ de altura. A figura mostra uma sequência de 6 fotomicrografias distanciadas de $2\mu\text{m}$ entre dois planos de foco consecutivos. A primeira fotomicrografia representa $2\mu\text{m}$ de zona de guarda onde células não são contadas. Em azul, células da glia e neurônios corados por Nissl e em preto micróglia coradas por IBA-1. Seta branca indica a única célula que foi contada nesta caixa de contagem. Magnificação: $100\times$. Escala: $25\mu\text{m}$.

contagem e o foco escolhido para posicionar o marcador, a cromatina nuclear das células da glia e o nucléolo do neurônio. No caso da micróglia o local do registro de contagem será feito quando seu soma estiver em foco. Cuidado especial será tomado para evitar contagens repetidas do mesmo objeto nos diferentes planos de



foco. Para isso o procedimento de focalização é repetido avançando e recuando o micrômetro do microscópio para obter os diferentes planos de foco ao longo do eixo Z, particularmente quando coexistiam muitas células na mesma caixa.

A estimativa do número total de neurônios dentro da região de interesse será obtida através do método do fracionador óptico, multiplicando-se o número de neurônios contados dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependem: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contém a região de interesse “section sampling fraction”; 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem “area sampling fraction”; e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos “thickness sampling fraction”, (Howard e Reed, 2005).

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

Onde,

N – número total de neurônios

$\sum Q$ – número de neurônios contados

ssf – “section sampling fraction” = fração amostral das secções de interesse = secções contadas/total de secções

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

tsf – “thickness sampling fraction” = fração amostral da espessura da secção contada = espessura da caixa de contagem/espessura da secção



3.4- Análise Estatística

Por razões metodológicas não se pode contar o número total de neurônios existentes numa dada região do encéfalo muito menos no cérebro como um todo. Assim, o máximo que se pode pretender é realizar estimativas que se aproximem ao máximo do que seria esperado (Cruz-Orive, 1994; Schmitz, 1998). Existem dois métodos estereológicos desenvolvidos para estimar o número total de objetos de interesse: o fracionador óptico já descrito e o método que estima o número total de células multiplicando a densidade média de células pelo volume da região de interesse. A densidade média é obtida a partir de amostragem aleatória e sistemática da região inteira que se pretende analisar (Schmitz e Hof, 2000). Para contornar o problema da impossibilidade de calcular o erro verdadeiro em experimentação biológica por conta de não se poder contar tudo, recentemente foi feita avaliação computacional simulando grandes quantidades amostrais.

Esse estudo demonstrou que as estimativas do número total de objetos de interesse (neurônios e/ou glia no caso presente), obtidas a partir do fracionador óptico, são do ponto de vista estatístico e do ponto de vista do esforço empreendido mais eficientes do que as estimativas a partir da densidade e volume (Schmitz e Hof, 2000). Além disso, várias maneiras de se estimar o erro foram testadas em amostras simuladas por computador de modo a encontrar um modo de calcular o coeficiente de erro que se aproximasse o mais possível do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (Glaser e Wilson, 1998). Assim, no presente trabalho deu-se preferência ao fracionador óptico como método estereológico e ao coeficiente de Scheaffer como instrumentos de medida. Utilizando esse coeficiente para estimar o erro, definiu-se que a grade e as dimensões da caixa de contagem seriam adequadas quando o coeficiente de Scheaffer fosse menor do que 0,05.



Assim, a precisão de estimativas individuais é expressa pelo coeficiente de erro que para amostras sistemáticas declina muito mais rápido do que para observações independentes (Gundersen *et al.*, 1999). Por conta do fato de que o coeficiente de erro representa a variação devido à incerteza metodológica intrínseca, associada com a estimativa estereológica, ele sempre contribui menos para o coeficiente de variação total do que a variação biológica.

A análise de variância (ANOVA um critério) será aplicada para estimar possíveis diferenças entre o número de células das várias regiões e diferenças morfológicas em todas as comparações envolvendo mais de dois grupos e o teste de Tukey será escolhido para detectar tais diferenças.

O Teste-T de Student será utilizado para detectar as diferenças quando a análise envolver apenas dois grupos. Quando o teste t bicaudal indicar valor de p menor que 0,05 os grupos serão considerados significativamente distintos.

3.5 Morfometria Baseada em Reconstrução Tridimensional

Para a reconstrução tridimensional das micróglias utilizamos o microscópio óptico (Eclipse 80i, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000 System, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para conversão digital da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto digitalizado. Esse sistema é acoplado a microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (NeuroLucida, MicroBrightfield, Williston, VT, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas reconstruções, a objetiva de 4,0x era substituída por outra PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2 μ m; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais realizadas.

O estudo morfológico fornece dados para uma análise qualitativa e quantitativa e permite também a determinação da distribuição dos objetos de interesse reconstruídos (Acsády *et al.*, 1998).



Parâmetros de medida para características individuais geralmente podem ser divididos em quatro classes: medidas de tamanho, forma, posição e brilho. Medidas de tamanho como área projetada, perímetro e comprimento são razoavelmente familiares à experiência humana. Ao contrário do tamanho que se pode estimar quantitativamente com certa facilidade, a forma é um conceito mais abstrato onde é necessário muitas vezes utilizar comparações para caracterização dos contornos de um objeto. A maioria das medidas de forma são combinações adimensionais de medidas de tamanho. Um parâmetro de forma que é relativamente familiar à experiência humana é a excentricidade, que é calculado como *comprimento* ÷ *largura*.

O recíproco deste parâmetro tem sido empregado por muitos anos em trabalhos antropométricos designado como índice cefálico. Outro parâmetro de forma amplamente utilizado em análise de imagens é o fator de forma, calculado como $4\pi \times \text{área} \div \text{perímetro}^2$. O fator de forma para um círculo perfeito é de 1.0. Qualquer outra forma terá maior perímetro para a mesma área e o fator de forma descreve esse aumento.

Para um quadrado o fator de forma (do inglês “form factor”) é de 0.785 e para formas mais irregulares ele se torna bem menor. Uma flor com muitas pétalas ou uma secção transversal de microvilosidade intestinal deve ter um fator de forma de 0,05 ou menos.

A esfericidade é muito parecida com o fator de forma (Figura 14). É calculada como $4\pi \times \text{área} \div \text{diâmetro max}$. Que mais uma vez é a fórmula da área do círculo onde o valor 1 corresponde a um círculo perfeito. Mas em vez de utilizar o perímetro, a esfericidade usa o maior diâmetro da estrutura, isso torna esta grandeza mais sensível a quão alongada é a estrutura ao invés de o quão irregular é seu perímetro. Não é incomum encontrarmos formas que variam independentemente em sua esfericidade e fator de forma (“form factor” Figura 14). A esfericidade detecta portanto a variação no alongamento das estruturas ao mesmo tempo em que é relativamente insensível a angulação. O fator de forma (Figura 14) pode discernir



estruturas mais anguladas da esquerda das mais curvas da direita e ao mesmo tempo ser insensível ao quanto uma estrutura é alongada (A - F).

Outro parâmetro de medida utilizado nesta investigação é a solidez que é a relação entre a área circular projetada (área do círculo que melhor se adapta a figura em análise) dividida pela parte da área da figura que faz intersecção com a área circular projetada; convexidade que é a razão entre perímetro do fecho convexo (contorno que especifica o menor polígono convexo no qual o objeto pode ser colocado) e o perímetro (Russ e Rovner, 1989). O ângulo planar (Figura 15) é definido como o par de ângulos que duas ou mais ramificações fazem com o ramo parental que lhes deu origem.

As reconstruções das micróglia foram feitas a partir do giro denteado dos mamíferos, mais especificamente da sua camada molecular e dos hipocampus dorsal e ventral das aves. Foram selecionadas para reconstrução apenas as micróglia que apresentavam terminações completas. Micróglia seccionadas durante o corte foram excluídas. Nós aplicamos correção para retração induzida pelo processamento histológico nos dados da morfometria de forma linear para todos os grupos experimentais exclusivamente para o eixo z, onde, presumiu-se 75% de retração tal como previamente sugerido (Carlo, C. e Stevens, C., 2011). Foram reconstruídas 72 células no *Calidris pusilla*, 72 no *Actitis macularia*, 90 no *Rattus norvegicus*, 240 no *Cebus apella*, perfazendo um total de 474 micróglia. Essas células foram submetidas à análise morfométrica realizada com o programa Neuroexplorer (Microbrightfield, Williston, VT, USA).

Os itens morfológicos analisados estão expressos na tabela 05. A média aritmética e o desvio padrão foram calculados para cada variável morfológica para todos os grupos experimentais.

Tabela 05 – Definição dos Parâmetros morfológicos analisados.

Perímetro do Soma	Medida do contorno do corpo celular (ver figura 12).
Área do Soma	Área definida pelo contorno do corpo celular (ver figura 12).
Convexidade	Comprimento do envoltório convexo dividido pelo comprimento do perímetro real. O envoltório convexo é um contorno imaginário, no qual o ângulo entre quaisquer dois



	segmentos de linhas adjacentes é convexo, de tal forma que este contorno imaginário se encaixa no contorno real o mais próximo possível.
Número de Espinhas	Soma do número total de espinhas presentes em cada micróglia.
Número de Pontos de Ramificações	Soma total de todos os pontos de ramificação originando dois ou mais segmentos.
Número de Finalizações	Número total de finalizações verdadeiras (que não interceptam os planos de corte das secções) de cada micróglia.
Comprimento dos Ramos (segmentos)	Soma dos valores do comprimento de todos os ramos (segmentos) pertencente a cada árvore microglial.
Área de Secção Cruzada dos Ramos (segmentos)	O início e o fim de cada segmento tem como raio o valor determinado pelo tamanho da inserção circular da cruz do cursor usado durante o traçado. Para estimá-la basta multiplicar os valores dos raios pelo comprimento do segmento. $A_s = \pi \times (r_1 + r_2) \times SQRT[(r_1 - r_2) \times (r_1 - r_2) + (L \times L)]$, onde L = comprimento do segmento; R1 = raio no início do segmento; R2 = raio no fim do segmento.
Volume dos Ramos (segmentos)	É calculado de acordo com a seguinte equação: $V = \frac{1}{3} \times \pi \times L \times [(r_1 \times r_1) + (r_2 \times r_2) + (r_1 \times r_2)]$, onde: L = comprimento do segmento; R1=raio no início do segmento. R2 = raio no fim do segmento.
Tortuosidade	A tortuosidade da arborização microglial é a razão entre o comprimento de um ramo e a distância entre os seus pontos de finalizações (ver figura 13).
Ângulo Planar	Ângulo entre um a continuação do ramo primário e os ramos secundários (ver figura 15).
Diâmetro da Base do Ramo Primário	O diâmetro do círculo contido na base da forma cilíndrica do primeiro ramo a sair do corpo celular.
Dimensão Fractal	Limite inferior do número de variáveis essenciais necessárias para descrever a dinâmica de um sistema; aqui ela representa o grau de complexidade morfológica da micróglia (ver figura 16).

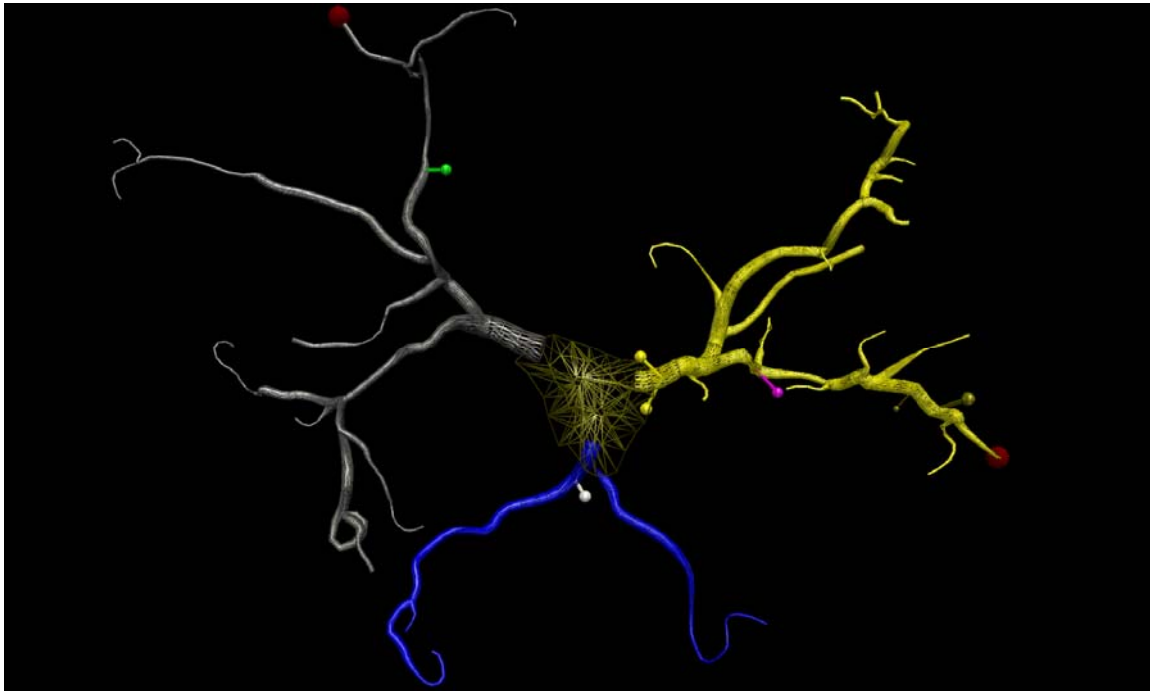


Figura 12. Reconstrução tridimensional de uma micróglia de *Actitis macularia*. Cada árvore é colorida de forma distinta. Protrusões presentes na estrutura são representadas em forma de pirulito e varicosidades são representadas como esferas vermelhas.

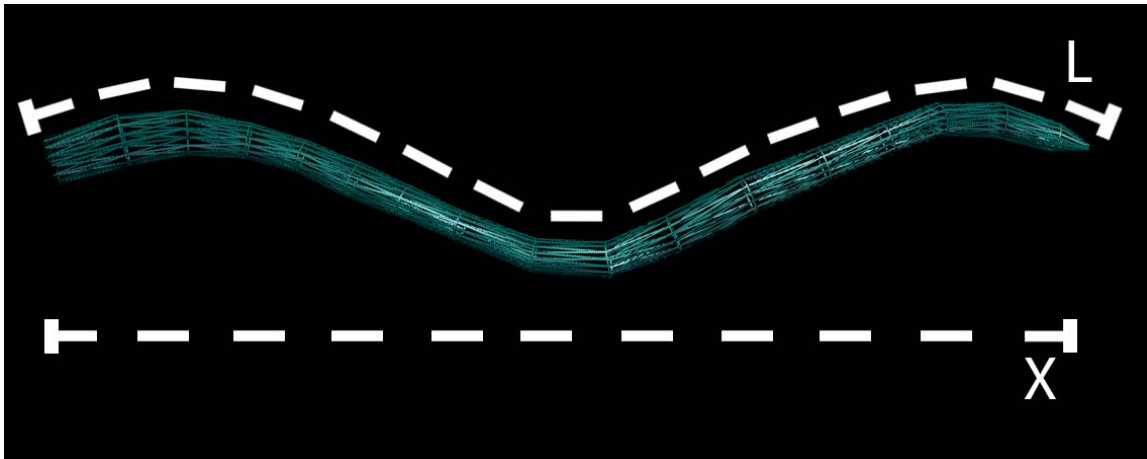


Figura 13. O valor da tortuosidade de um ramo microglial é definido pela razão L/X onde L representa o comprimento real do ramo microglial e X a menor distância entre as extremidades do ramo em questão.

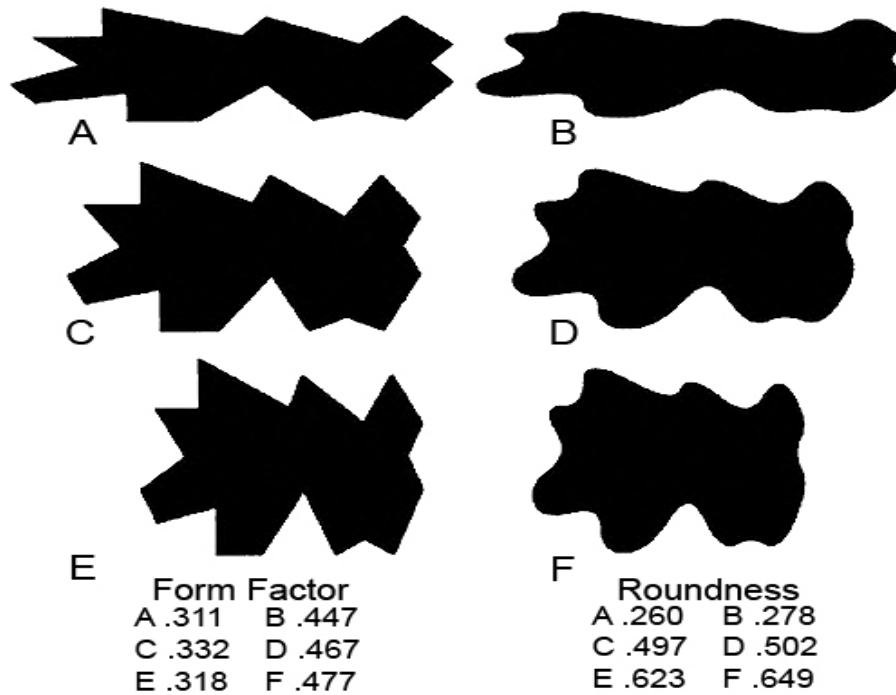


Figura 14. Figuras com variações em suas formas comparadas por seu fator de forma (“form factor”) e esfericidade (“roundness”).

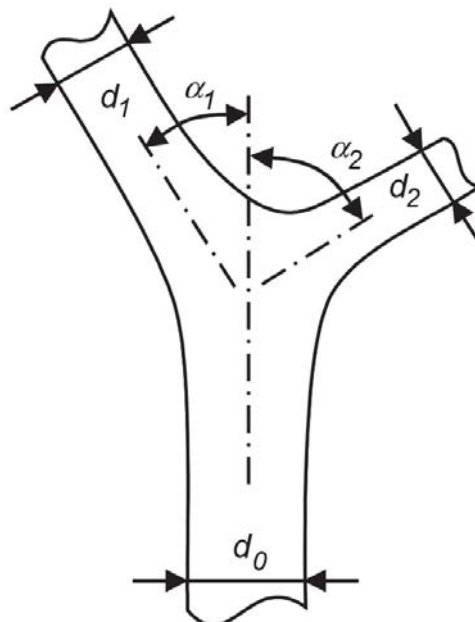


Figura 15. A geometria de um ramo é caracterizada pelo diâmetro dos ramos primários (d_0), e dos ramos secundários (d_1 , d_2) e pelos ângulos planares formados entre esses ramos (α_1, α_2). Nós medimos esses parâmetros em micróglias de maçarcos, ratos e macacos e comparamos as diferenças interespecíficas (Shefi *et al.*, 2004).



Dimensão Fractal

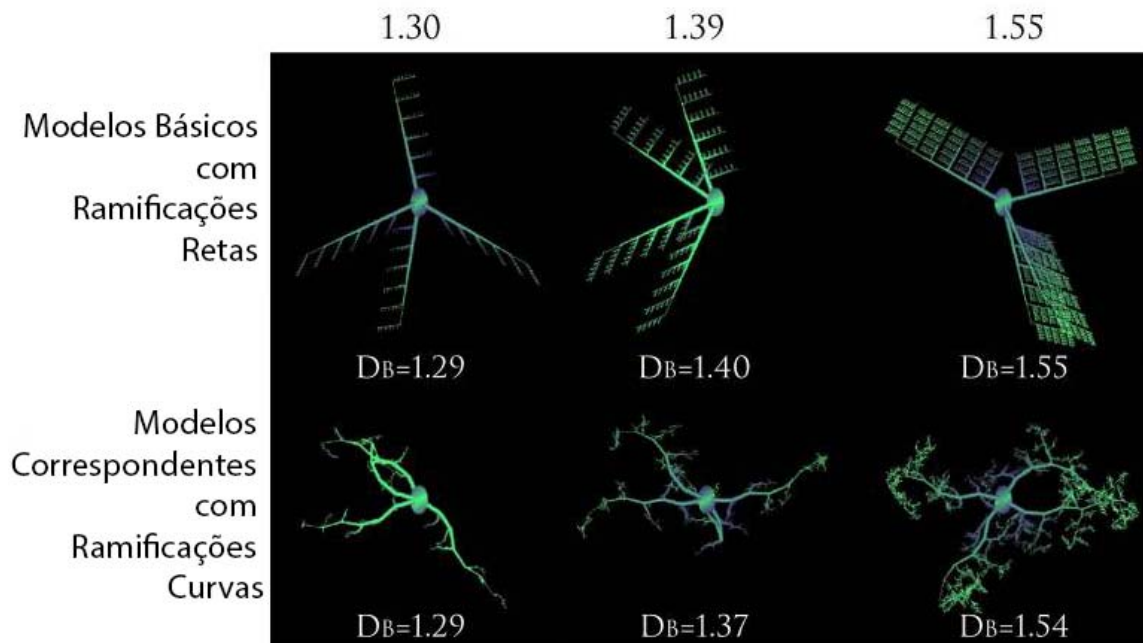


Figura 16. A Dimensão Fractal reflete a complexidade de padrões de ramificação. As estruturas ramificadas foram geradas por modelagem computacional de acordo com regras preestabelecidas. Em cada nova ramificação a relação entre os comprimentos do ramo parental e do novo ramo foram alteradas para mostrar como as propriedades dos ramos influenciam a dimensão fractal e a dimensão de caixa de contagem. Em ambas as séries a direção permitida para o crescimento do ramo foi aleatória. A única diferença entre as duas séries está na curvatura permitida aos processos. Os valores para a dimensão de caixa de contagem são médias para grupos similares e não representam apenas os modelos mostrados na figura. Modelado com o software Micromod Free (Karperien, 1999; Jelinek *et al.*, 2002).



Em raras ocasiões valores extremos foram detectados e excluídos de todas as amostras com base em análises de quartis para detectar valores extremos em amostras com distribuição normal. Esse teste de normalidade foi feito com auxílio do software Bioestat 5.0.



4- RESULTADOS

4.1- Descrição da Formação Hipocampal em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*

As Figuras 17 e 18 ilustram a formação hipocampal em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* a partir de uma série de secções coronais imunomarcadas para NeuN. A formação hipocampal em ambas as espécies compreende duas regiões distintas, a região em forma de V, de localização medial correspondente ao hipocampo propriamente dito e a área parahipocampal de limites menos definidos de localização dorsal e superior ao ventrículo lateral. Os limites lateral (indicados pelas setas) e medial (a linha média definida pela fissura inter-hemisférica) da formação hipocampal são prontamente identificados nas fatias das Figuras 17 e 18.

Em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* como esperado, o hipocampo (Hp) não foge à regra das aves em geral, sendo relativamente estreito e localizado na região dorsomedial do telencéfalo. É mais largo na região dorsal na junção com a área parahipocampal e mais estreito em sua porção ventral à medida que se aproxima da região septal. A região parahipocampal (APH) em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* é a mais proeminente da formação hipocampal, ocupando larga extensão do eixo rostro-caudal. Para (Atoji e Wild, 2006) o sulco paraventricular indicado pelas setas nas figuras 17 e 18 separa o hipocampo propriamente dito da área parahipocampal. Em cortes onde o sulco paraventricular não está claramente definido, os limites entre o hipocampo e a área parahipocampal são imprecisos. Também são imprecisos os limites dessas regiões com o hiperpallium acessório em cortes mais rostrais.

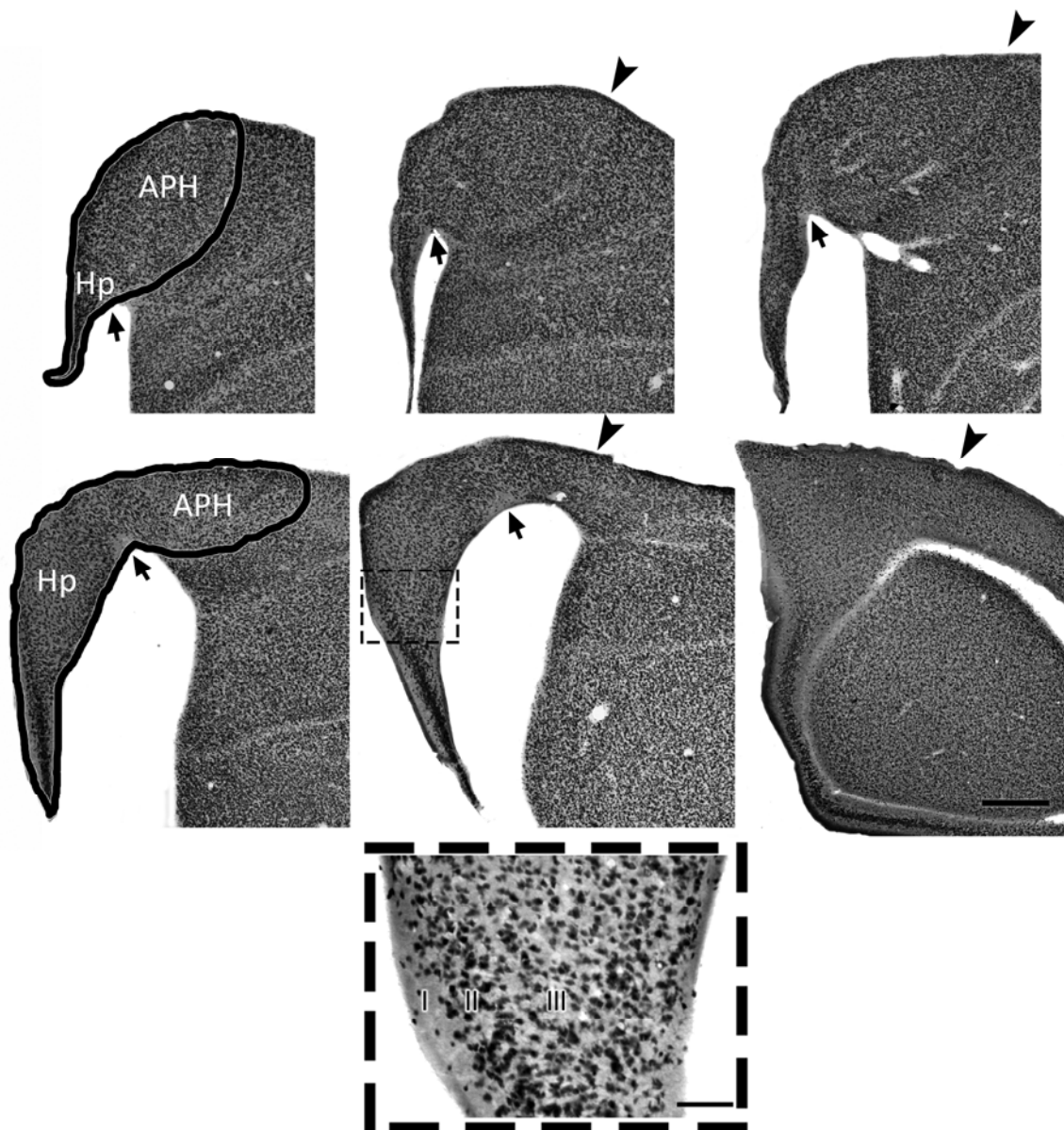


Figura 17. Fatias coronais começando pela extremidade rostral (fileira superior) e finalizando na extremidade caudal (fileira inferior) da formação hipocampal de *Calidris pusilla* imunomarcada para identificação de neurônios (NeuN). Os primeiros cortes das fileiras superior e inferior ilustram os contornos para delimitação da área de interesse. As cabeças de setas indicam o limite lateral da área de interesse. As setas indicam o sulco paraventricular. Em médio aumento as camadas I, II e III. APH = Área parahipocampal; Hp = Hipocampo. Escalas: Baixo aumento = 500 μ m; Médio aumento = 50 μ m;



A região dorsomedial do palium de *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*, em imunomarcção para o NeuN é formada por três camadas. A camada mais superficial (camada I) contem poucos somas neuronais dispersos na neurópila. A camada subsequente (camada II) é formada por duas a três fileiras de corpos celulares neuronais densamente compactados. A terceira camada é formada por somas neuronais mais dispersos do que os da camada II suprajacente (ver o detalhe em médio aumento na figura 17). Organização similar é vista em *Actitis macularia* (figura 18).

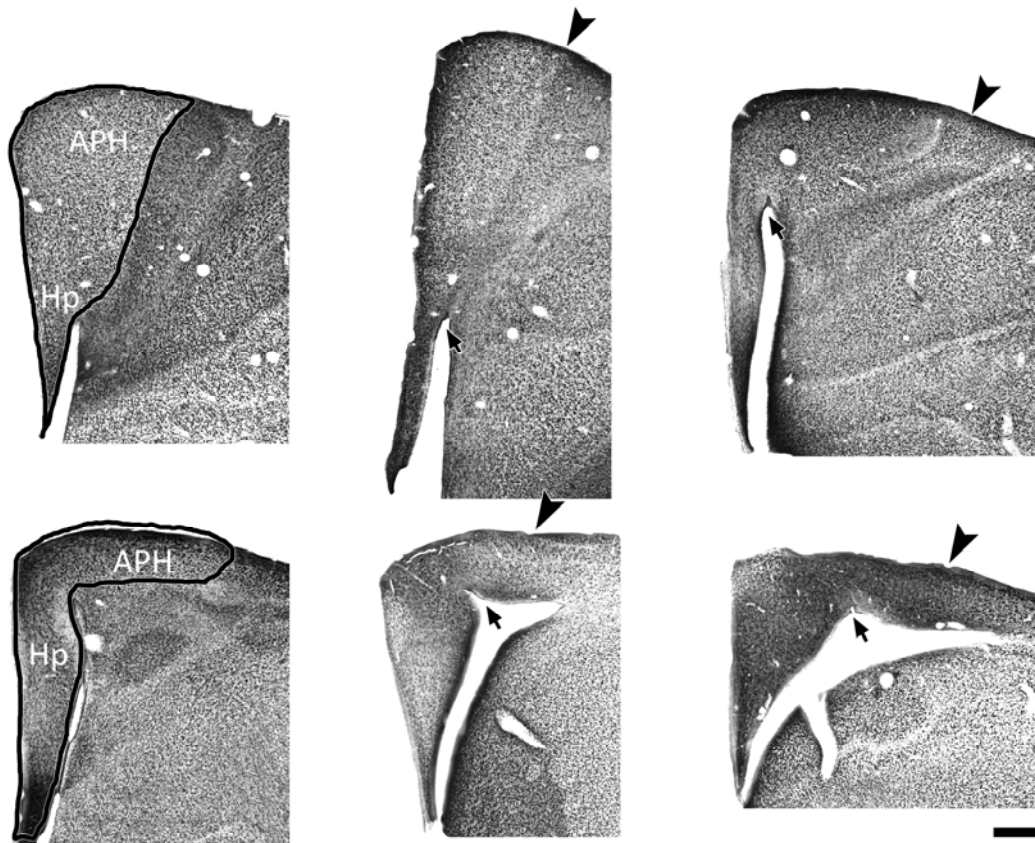


Figura 18. Fatias coronais começando pela extremidade rostral (fileira superior) e finalizando na extremidade caudal (fileira inferior) da formação hipocampal de *Actitis macularia* imunomarcada para identificação de neurônios (NeuN). Os primeiros cortes das fileiras superior e inferior ilustram os contornos para delimitação da área de interesse. As cabeças de setas indicam o limite lateral da área de interesse. As setas indicam o sulco paraventricular. APH = Área parahipocampal; Hp = Hipocampo. Escala: 500 μ m;



4.2 – Ensaio Estereológicos

No presente trabalho, definimos a área de interesse como constituída pelo hipocampo propriamente dito e a área parahipocampal com os seguintes limites: a borda lateral e ventral como sendo definidas pelo ventrículo lateral, as bordas dorsal e caudal como correspondentes à superfície do cérebro, o limite medial como correspondendo à linha média e o limite inferior como uma mudança robusta na densidade celular em forma de V na vizinhança do septum. A área APH foi definida em posição dorsal e lateral ao Hp sendo separada daquele pelo sulco paraventricular. Além disso, adotamos sugestão prévia de (Atoji *et al.*, 2002) para subdividir o hipocampo em dorsal e ventral de modo a investigar possíveis diferenças na morfologia microglial em função da homologia destas regiões com o hipocampo propriamente dito e o giro denteado dos mamíferos (Rattenborg, N. C. e Martinez-Gonzalez, D., 2011).

Após a imunomarcagem seletiva para neurônios, definimos os parâmetros estereológicos que estão ilustrados nas Tabelas 06 a 09. Nessas tabelas também estão incluídos os resultados das estimativas individuais e as médias do número de neurônios na formação hipocampal unilateral esquerda das espécies *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*. Foram utilizados para os ensaios estereológicos quatro animais de cada espécie capturados aleatoriamente na Ilha Canelas no litoral do Município de Bragança em Julho de 2011. Os números de caixas de contagem e de secções variaram entre os indivíduos, mas nenhuma correlação simples foi encontrada entre aqueles e o número de células contadas ou o volume da formação hipocampal. Como se depreende dos valores das tabelas 06 e 08 empregou-se o mesmo protocolo de contagem com frações amostrais idênticas ($asf = 0,02$ e $ssf = 0,2$) em todos os indivíduos das duas espécies estudadas. Em função das diferenças encontradas nos volumes da formação hipocampal de indivíduo para indivíduo o número de secções e de caixas de contagens variou dentro da mesma espécie e entre as espécies estudadas. O valor médio das estimativas do número de neurônios da formação hipocampal não foi significativamente diferente entre as



espécies (*C pusilla* = 909540 ± 138470 versus *A macularia* = 764767 ± 104962 , teste t bicaudal para amostras independentes, $p > 0.05$); ver Tabelas 7 e 9 para dados estereológicos detalhados.

Tabela 06: Parâmetros Estereológicos utilizados para a estimativa celular de células NeuN positivas na formação hipocampal esquerda do *Calidris pusilla*.

	a(frame) (μm^2)	A(x,y step) (μm^2)	asf	tsf	ssf	N° Counting Frames	N° Sections	$\Sigma Q-$
C. pusilla 01	50x50	350x350	0,02	0,574	0,2	106	9	1664
C. pusilla 02	50x50	350x350	0,02	0,537	0,2	149	13	2135
C. pusilla 03	50x50	350x350	0,02	0,556	0,2	177	14	2168
C. pusilla 04	50x50	350x350	0,02	0,562	0,2	100	10	2012

Tabela 07: Resultados estereológicos das células imunomarcadas com NeuN da formação hipocampal esquerda do *Calidris pusilla*.

	N	Thickness	CE (Scheaffer)	Volume (mm^3)
C. pusilla 01	723297	17,7	0,040	3,869
C. pusilla 02	1040384	19,3	0,042	3,794
C. pusilla 03	982961	18,3	0,037	4,730
C. pusilla 04	891518	18,1	0,041	2,790
Média	909540	18,35	0,040	3,796
SD	138470	0,681		0,794
CV²	0,023			
CE²	0,000075			
CE²/CV²	-0,0231			
CE²-CV²	-99,676			
CVB² (%)	-99,985			

(¹)CVB² = CV² - CE² (CE, coeficiente de erro de Scheaffer; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). O valor negativo indica simplesmente que o coeficiente de erro metodológico (CE de Scheaffer) é menor do que o coeficiente de variação (CV).

Tabela 08: Parâmetros Estereológicos utilizados para a estimativa celular de células NeuN positivas na formação hipocampal esquerda do *Actitis macularia*.

	a(frame) (μm^2)	A(x,y step) (μm^2)	asf	tsf	ssf	N° Counting Frames	N° Sections	$\Sigma Q-$
Am 07 HE	50x50	350x350	0,02	0,614	0,2	154	13	1401
Am 08 HE	50x50	350x350	0,02	0,602	0,2	199	17	1522
Am 09 HE	50x50	350x350	0,02	0,650	0,2	186	18	1759
Am 13 HE	50x50	350x350	0,02	0,539	0,2	141	14	980



Tabela 09: Resultados estereológicos das células imunomarcadas com Neu-N da formação hipocampal esquerda do *Actitis macularia*.

	N	Thickness	CE Scheaffer	Volume (mm ³)
Am 07 HE	778022,880	17,400	0,040	5,294
Am 08 HE	831024,750	17,100	0,040	7,582
Am 09 HE	837535,940	15,800	0,042	6,752
Am 13 HE	612484,380	19,500	0,045	4,953
Média	764766,988	17,450	0,042	6,145
SD	104962,093	1,533		1,235
CV ²	0,019			
CE ²	0,002			
CE ² /CV ²	0,094			
CE ² -CV ²	-0,017			
CVB ² (%)	-90,640			

(*)CVB² = CV² – CE² (CE, coeficiente de erro de Scheaffer; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). O valor negativo indica simplesmente que o coeficiente de erro metodológico (CE de Scheaffer) é menor do que o coeficiente de variação (CV).

Entretanto o volume da formação hipocampal do *Actitis macularia* (6.14 ± 1.23) é significativamente maior do que o de *Calidris pusilla* (3.80 ± 0.79 ; teste t bicaudal $p < 0.02$).



A Figura 19 ilustra o valor médio dos volumes e a média das estimativas do número de neurônios das formações hipocâmpais de *Actitis macularia* (barras azuis)

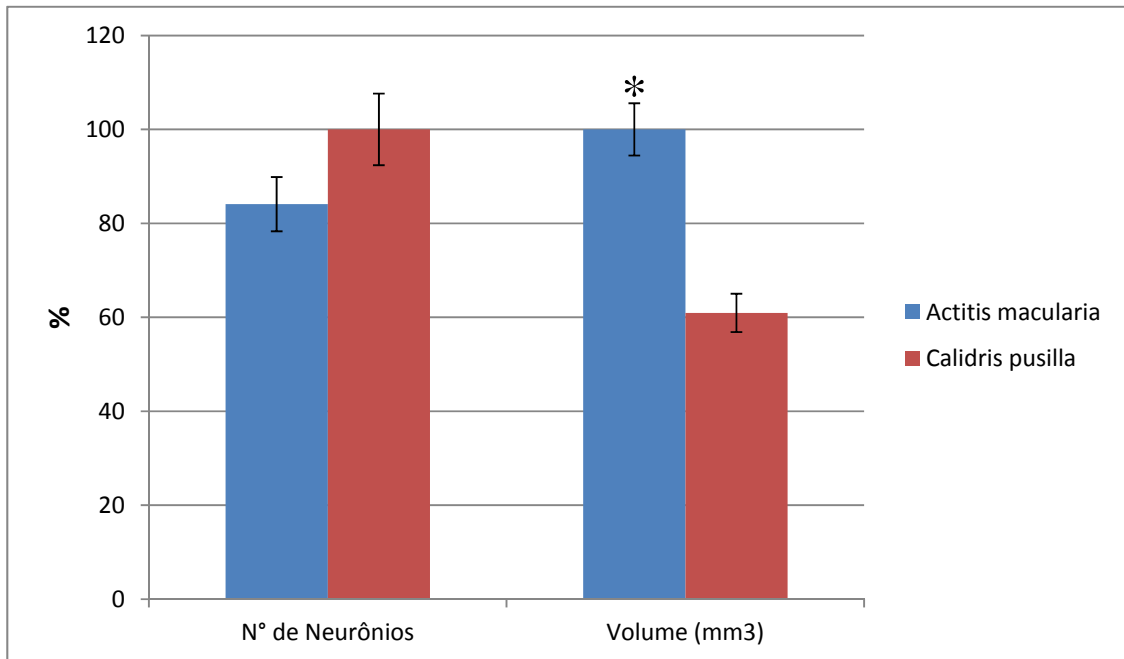


Figura 19. Gráfico ilustrando o valor médio dos volumes e número de neurônios das formações hipocâmpais de *Actitis macularia* (barras azuis) e *Calidris pusilla* (barras vermelhas). Barras de erro exprimem o erro padrão de cada parâmetro. O asterisco indica a existência de diferença significativa entre os valores de volume da formação hipocâmpal entre as espécies quando comparadas com teste T e $\alpha < 0,05$.

e *Calidris pusilla* (barras vermelhas). Notar que embora se detecte diferenças significativas entre os volumes, essa diferença não é acompanhada por diferenças proporcionais significantes no número de neurônios.

As Tabelas 10 a 13 ilustram os parâmetros experimentais utilizados e os resultados das estimativas do número de células imunomarcadas para IBA-1 de cada animal e respectivos valores médios encontrados em cada formação hipocâmpal unilateral das espécies *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*. Empregou-se protocolo de contagem para estimar o número de micróglia diferente daquele empregado para estimativas do número de neurônios. O motivo para adoção de protocolos de contagens diferentes num caso e noutro foi função do valor coeficiente de erro de Scheaffer.

Tabela 10: Parâmetros Estereológicos utilizados para a estimativa do número de células IBA-1 positivas na formação hipocâmpal esquerda do *Calidris pusilla*.



	a(frame) (μm^2)	A(x,y step) (μm^2)	asf	tsf	ssf	N° Counting Frames	N° Sections	$\Sigma\text{Q-}$
C. pusilla 01	100x100	400x400	0,0625	0,638	0,2	101	12	340
C. pusilla 02	100x100	400x400	0,0625	0,619	0,2	104	11	311
C. pusilla 03	100x100	400x400	0,0625	0,293	0,2	77	13	210
C. pusilla 04	100x100	400x400	0,0625	0,384	0,2	111	12	307

Tabela 11: Resultados estereológicos das células imunomarcadas com IBA-1 da formação hipocampal esquerda do *Calidris pusilla*.

	N	Thickness	CE (Scheaffer)	Volume (mm^3)
C. pusilla 01	43937	16	0,045	3,074
C. pusilla 02	41620	16,7	0,049	3,211
C. pusilla 03	60749	36,2	0,071	4,687
C. pusilla 04	66750	27,2	0,041	3,895
Média	53263,918	24,025	0,051	3,717
SD	12389,254	9,598		0,740
CV²	0,054			
CE²	0,002647			
CE²/CV²	0,0489			
CE²-CV²	-0,051			
CVB²(%)	-95,108			

(^o)CVB² = CV² - CE² (CE, coeficiente de erro de Scheaffer; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). O valor negativo indica simplesmente que o coeficiente de erro metodológico (CE de Scheaffer) é menor do que o coeficiente de variação (CV).

Tabela 12: Parâmetros Estereológicos utilizados para a estimativa celular de células IBA-1 positivas na formação hipocampal esquerda do *Actitis macularia*.

	a(frame) (μm^2)	A(x,y step) (μm^2)	asf	tsf	ssf	N° Counting Frames	N° Sections	$\Sigma\text{Q-}$
Am 05	100x100	350x350	0,081	0,771	0,2	285	15	1018
Am 07	100x100	350x350	0,081	0,598	0,2	240	14	723
Am 09	100x100	350x350	0,081	0,658	0,2	258	18	1062
Am 11	100x100	350x350	0,081	0,740	0,2	215	13	801

Tabela 13: Resultados estereológicos das células imunomarcadas com IBA-1 da formação hipocampal esquerda do *Actitis macularia*.

	N	Espessura	CE Scheaffer	Volume (mm^3)
Am 05	86327,59	13,08	0,03	7,16
Am 07	77772,14	17,06	0,03	5,74
Am 09	102051,47	15,07	0,03	6,53
Am 11	70299,55	14,03	0,04	5,31



Média	84112,69	14,81	0,03	6,18
Desvio Padrão	13634,65	0,004		0,82
CV²	0,026			
CE²	0,0009			
CE²/CV²	0,034			
CE²-CV²	-0,025			
CVB² (%)	-96,574			

(*) $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro de Scheaffer; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). O valor negativo indica simplesmente que o coeficiente de erro metodológico (CE de Scheaffer) é menor do que o coeficiente de variação (CV).

De fato embora se tenham mantido iguais as frações amostrais do número das secções contadas ($ssf = 0,2$), as frações amostrais em área (asf) foram respectivamente 0,0625 e 0,081 no *Calidris* e no *Actitis*.

Na Figura 20 ilustra-se o número de micróglia e o volume na formação hipocampal das espécies *Calidris pusilla* e *Actitis macularia*. As barras de erro representam o erro padrão da média e os asteriscos indicam que a diferença entre as médias é significativa (teste t bicaudal, $\alpha < 0,05$). Essa diferença entre os valores médios das estimativas revelou-se 37% maior em *Actitis macularia* em comparação ao *Calidris pusilla*. Da comparação desses números com aqueles obtidos nas estimativas do número de neurônios encontrou-se diferentes proporções neurônio/glia nas espécies estudadas. De fato encontramos que embora o número de neurônios tenha sido igual em ambas as espécies o número de micróglia e o volume hipocampal foram significativamente maiores em *Actitis macularia*, e que a razão entre o número de neurônios e o número de micróglia num caso e noutro foi significativamente diferente, sendo duas vezes maior em *C. pusilla* quando comparado ao *A. macularia* ($C. pusilla = 17,75 \pm 1,07$ vs $A. macularia = 9,15 \pm 5,03$, teste t bicaudal, $p = 0,039$).

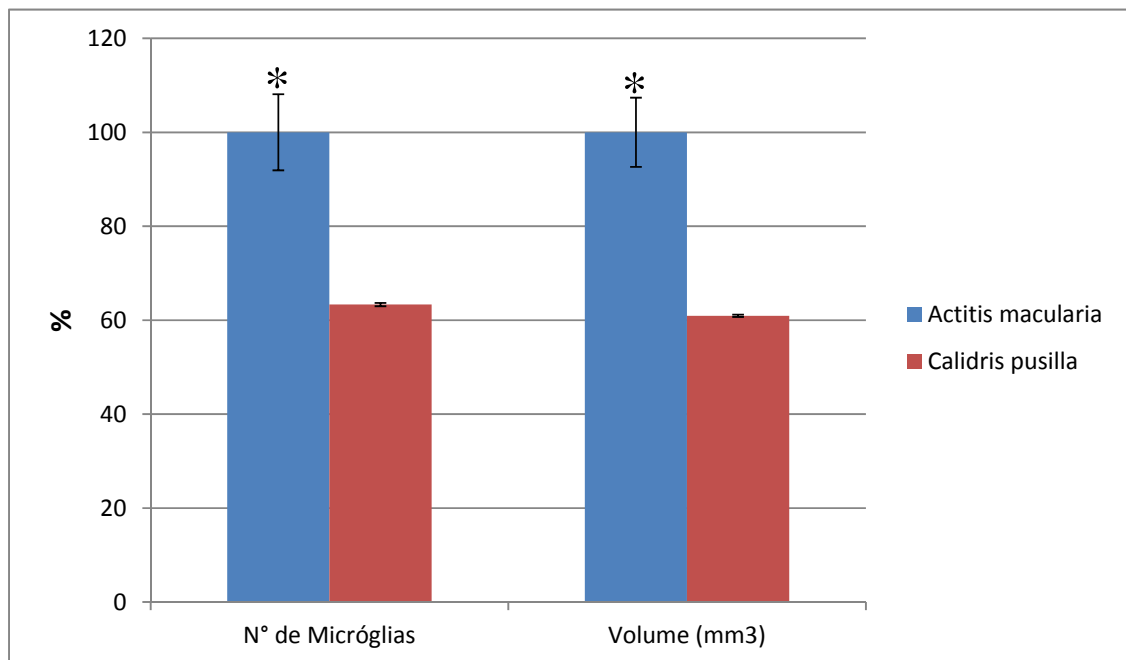


Figura 20: Número de micróglias e volume da formação hipocampal de *Actitis macularia* e *Calidris pusilla*. As barras de erro representam o erro padrão da média e asterisco indica diferença estatística significativa, acessadas utilizando-se teste T com $\alpha < 0,05$.



4.4- Análise Comparativa da Morfologia da Micróglia da Camada Molecular do Giro Denteado de Mamíferos e do Hipocampo Dorsal e Ventral de Aves Marinhas

A Figura 21 ilustra série fotográfica em diferentes planos de foco de micróglia residentes na formação hipocampal de aves marinhas (*C. pusilla* e *A. macularia*, fileiras A, B) e mamíferos (*Rattus novergicus* da variedade Wistar e um

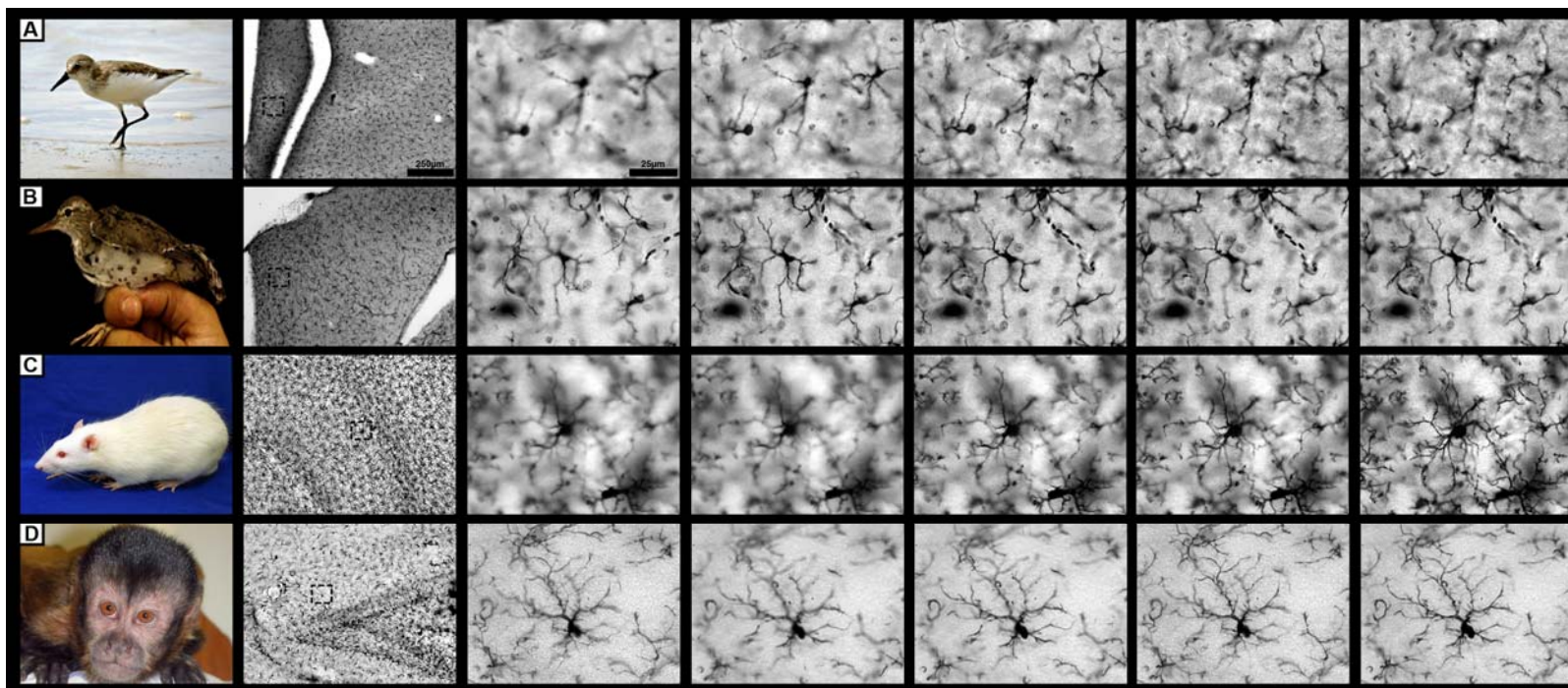


Figura 21. Série fotográfica em diferentes planos de foco de micróglia típica da formação hipocampal ventral de *C. pusilla* e *A. macularia* (fileiras A e B), e da camada molecular do giro denteado do *Rattus novergicus*, variedade Wistar e do *Cebus apella* (fileiras C e D). A região delimitada pelo quadrado pontilhado nas fotomicrografias em baixo aumento (2ª coluna) ilustra a posição laminar relativa da micróglia fotografada em grande aumento. Note que as micróglia dos mamíferos têm somas maiores e são mais ramificadas que as das aves.



primata do Novo Mundo o *Cebus apella*, fileiras C e D respectivamente) a partir de secções imunomarcadas para IBA-1.

Os limites da formação hipocampal nas aves descritos previamente neste trabalho e os do giro denteado no rato Wistar (Amaral e Lavenex, 2007) e no macaco prego (Guerreiro-Diniz, C., De Melo Paz, R. B., Hamad, M. H., Filho, C. S., Martins, A. A., Neves, H. B., De Souza Cunha, E. D., Alves, G. C., De Sousa, L. A., Dias, I. A., Trevia, N., *et al.*, 2010) são prontamente visíveis em baixo aumento nas preparações imunomarcadas para IBA-1 (Figura 17, 2ª coluna). Com o intuito de quantificar as diferenças morfológicas da micróglia em detalhe e compara-las nas aves marinhas, no rato e no macaco, empregou-se reconstrução tridimensional com auxílio dos softwares Neurolucida e Neuroexplorer, e as tabelas 14 a 25 ilustram os valores morfométricos médios e individuais e para cada espécie, a partir de tais reconstruções. Apesar de que não se detectou diferenças estatísticas significativas entre as morfologias das micróglia das regiões dorsal e ventral da formação hipocampal das aves comparando-se regiões equivalentes, preferiu-se manter essa subdivisão quando da comparação daquelas com os mamíferos de modo a permitir comparações entre regiões homólogas. Assim as regiões ventral e dorsal do hipocampo das aves para fins comparativos foram consideradas homólogas ao giro denteado e ao hipocampo propriamente dito (CA1-CA3) dos mamíferos (Rattenborg, N. C. e Martinez-Gonzalez, D., 2011).

As tabelas 14 a 21 ilustram valores individuais e médios dos parâmetros morfométricos das árvores e do soma microglial nas regiões dorsal e ventral da formação hipocampal das aves enquanto que as tabelas 22 a 25 ilustram os correspondentes à micróglia da camada molecular do giro denteado do *Cebus apella* e do *Rattus norvegicus* da variedade Wistar. Da análise comparativa desses dados tabulares emergiram dois padrões morfológicos distintos, um mais simples para as aves e outro mais complexo para os mamíferos.



Tabela 14. Valores morfométricos dos ramos e complexidade celular do grupo dorsal de micróglia da formação hipocampal de *Actitis macularia*.

Dorsal	Comprimento Médio (μm)	Tortuosidade	Área de Superfície (μm^2)	Volume dos Ramos (μm^3)	Diâmetro da Base (μm)	Total Segmentos	Varicosidade	Segmentos / mm	Nº de Árvores	K-dim	Angulo Planar	Nº de Espinhas	Volume de Espinha
Am3	6.050	1.238	8.718	69.504	0.699	51.889	2.111	171.863	4.556	1.065	52.451	9.556	0.227
Am4	6.591	1.131	8.561	40.847	0.723	32.111	9.111	153.128	3.111	1.028	49.913	5.444	0.292
Am7	8.260	1.258	7.120	25.841	0.460	37.667	4.556	123.212	4.667	1.034	50.655	9.667	0.295
Am13	5.773	1.166	6.817	28.234	0.582	31.333	4.222	180.942	4.000	1.024	57.975	3.000	0.297
Média	6.669	1.198	7.804	41.106	0.616	38.250	5.000	157.286	4.083	1.038	52.748	6.917	0.278
Desvio Padrão	0.965	0.052	0.844	17.358	0.105	8.244	2.552	22.082	0.616	0.016	3.156	2.830	0.029

Tabela 15. Valores morfométricos dos ramos e complexidade celular do grupo ventral de micróglia da formação hipocampal de *Actitis macularia*.

Ventral	Comprimento Médio (μm)	Tortuosidade	Área de Superfície (μm^2)	Volume dos Ramos (μm^3)	Diâmetro da Base (μm)	Total Segmentos	Varicosidade	Segmentos / mm	Nº de Árvores	K-dim	Angulo Planar	Nº de Espinhas	Volume de Espinha
Am3	4.626	1.207	7.627	85.534	0.752	65.333	2.333	220.630	3.556	1.089	55.463	15.222	0.448
Am4	5.835	1.171	9.431	59.755	0.858	32.222	7.889	174.595	4.111	1.025	52.692	5.667	0.401
Am7	7.067	1.161	7.994	27.421	0.552	29.333	2.111	144.679	4.111	1.023	49.576	4.778	0.251
Am13	6.544	1.183	8.493	42.915	0.678	34.333	3.444	155.620	3.889	0.935	54.539	6.111	0.243
Média	6.018	1.180	8.386	53.906	0.710	40.306	3.944	173.881	3.917	1.018	53.068	7.944	0.336
Desvio Padrão	0.915	0.017	0.677	21.545	0.111	14.558	2.333	29.035	0.227	0.055	2.249	4.229	0.091



Tabela 16. Valores morfométricos dos ramos e complexidade celular do grupo dorsal de micróglia da formação hipocampal de *Calidris pusilla*.

Dorsal	Comprimento Médio (μm)	Tortuosidade	Área de Superfície (μm^2)	Volume dos Ramos (μm^3)	Diâmetro da Base (μm)	Total Segmentos	Varicosidade	Segmentos / mm	Nº de Árvores	K-dim	Angulo Planar	Nº de Espinhas	Volume de Espinha
Cp02	7.645	1.204	6.684	21.801	0.451	31.444	8.000	141.839	4.889	1.005	58.462	5.000	0.129
Cp03	7.189	1.173	9.796	43.883	0.604	34.556	8.556	144.721	5.000	1.016	51.018	8.333	0.137
Cp14	9.861	1.149	11.767	30.947	0.665	18.444	8.444	105.587	3.556	1.013	50.753	2.778	0.336
Cp16	8.267	1.376	9.530	37.028	0.552	30.778	13.111	130.129	4.222	1.032	56.158	2.333	0.331
Média	8.241	1.226	9.444	33.415	0.568	28.806	9.528	130.569	4.417	1.017	54.098	4.611	0.233
Desvio Padrão	1.011	0.089	1.813	8.118	0.079	6.150	2.079	15.424	0.579	0.010	3.315	2.375	0.100

Tabela 17. Valores morfométricos dos ramos e complexidade celular do grupo ventral de micróglia da formação hipocampal de *Calidris pusilla*.

Ventral	Comprimento Médio (μm)	Tortuosidade	Área de Superfície (μm^2)	Volume dos Ramos (μm^3)	Diâmetro da Base (μm)	Total Segmentos	Varicosidade	Segmentos / mm	Nº de Árvores	K-dim	Angulo Planar	Nº de Espinhas	Volume de Espinha
Cp02	6.963	1.190	5.866	17.688	0.467	32.222	7.667	149.427	4.333	1.029	49.365	6.778	0.129
Cp03	7.248	1.166	8.402	25.932	0.562	26.556	4.556	144.791	5.111	1.012	46.658	4.333	0.138
Cp14	8.833	1.151	9.689	21.337	0.610	15.444	3.444	110.296	3.556	1.004	44.423	2.333	0.273
Cp16	7.630	1.344	9.129	54.774	0.542	45.111	12.222	133.330	5.444	1.038	58.460	5.556	0.355
Média	7.668	1.213	8.272	29.933	0.545	29.833	6.972	134.461	4.611	1.021	49.727	4.750	0.224
Desvio Padrão	0.713	0.077	1.462	14.636	0.051	10.688	3.403	15.132	0.731	0.014	5.337	1.641	0.095



Tabela 18: Valores morfométricos dos corpos celulares do grupo dorsal de micróglia da formação hipocampal de *Actitis macularia*.

Dorsal	Perímetro (μm)	Area (μm^2)	Feret Max (μm)	Feret Min (μm)	Aspect Ratio	Compactness	Convexity	Form Factor	Roundness	Solidity
Am3	20.111	24.207	7.156	4.778	1.505	0.788	0.947	0.750	0.630	0.965
Am4	23.678	26.158	9.256	4.767	2.010	0.647	0.968	0.618	0.432	0.869
Am7	15.978	16.446	5.800	3.822	1.536	0.797	0.971	0.809	0.640	0.973
Am13	18.878	19.611	6.489	4.256	1.534	0.778	0.919	0.697	0.610	0.951
Média	19.661	21.606	7.175	4.406	1.647	0.753	0.951	0.718	0.578	0.939
Desvio Padrão	2.762	3.811	1.293	0.397	0.210	0.061	0.021	0.070	0.085	0.041

Tabela 19: Valores morfométricos dos corpos celulares do grupo ventral de micróglia da formação hipocampal de *Actitis macularia*.

Ventral	Perímetro (μm)	Area (μm^2)	Feret Max (μm)	Feret Min (μm)	Aspect Ratio	Compactness	Convexity	Form Factor	Roundness	Solidity
Am3	19.933	24.017	7.244	4.533	1.611	0.770	0.961	0.756	0.597	0.960
Am4	24.022	32.278	9.267	4.844	1.931	0.706	0.966	0.731	0.507	0.958
Am7	18.556	20.047	6.722	4.156	1.618	0.760	0.949	0.739	0.581	0.964
Am13	21.444	23.794	7.978	4.278	1.951	0.694	0.955	0.646	0.489	0.909
Média	20.989	25.034	7.803	4.453	1.778	0.732	0.958	0.718	0.544	0.948
Desvio Padrão	2.028	4.470	0.956	0.264	0.164	0.033	0.006	0.043	0.046	0.022



Tabela 20: Valores morfométricos dos corpos celulares do grupo dorsal de micróglia da formação hipocampal de *Calidris pusilla*.

Dorsal	Perímetro (μm)	Area (μm^2)	Feret Max (μm)	Feret Min (μm)	Aspect Ratio	Compactness	Convexity	Form Factor	Roundness	Solidity
Cp02	17.389	18.199	6.189	4.156	1.505	0.789	0.957	0.767	0.628	0.960
Cp03	23.722	29.627	8.378	5.433	1.595	0.721	0.937	0.649	0.525	0.888
Cp14	19.833	21.669	7.567	4.411	1.745	0.703	0.969	0.697	0.502	0.914
Cp16	16.778	17.708	6.089	4.111	1.508	0.779	0.974	0.789	0.611	0.947
Média	19.431	21.801	7.056	4.528	1.588	0.748	0.959	0.726	0.567	0.927
Desvio Padrão	2.729	4.770	0.961	0.535	0.098	0.037	0.014	0.056	0.054	0.028

Tabela 21: Valores morfométricos dos corpos celulares do grupo ventral de micróglia da formação hipocampal de *Calidris pusilla*.

Ventral	Perímetro (μm)	Area (μm^2)	Feret Max (μm)	Feret Min (μm)	Aspect Ratio	Compactness	Convexity	Form Factor	Roundness	Solidity
Cp02	18.844	19.932	6.956	4.533	1.562	0.727	0.967	0.705	0.533	0.937
Cp03	16.511	17.120	6.111	3.867	1.581	0.771	0.976	0.795	0.599	0.973
Cp14	18.522	19.812	6.744	4.356	1.601	0.751	0.966	0.736	0.569	0.940
Cp16	18.600	21.220	6.611	4.533	1.463	0.792	0.960	0.788	0.631	0.958
Média	18.119	19.521	6.606	4.322	1.552	0.760	0.967	0.756	0.583	0.952
Desvio Padrão	0.936	1.492	0.311	0.273	0.053	0.024	0.006	0.037	0.036	0.014



Tabela 22. Valores morfométricos dos ramos e complexidade celular de micróglias da camada molecular do giro denteado do *Cebus apella*.

Camada Molecular	Comprimento Médio (μm)	Tortuosidade	Área de Superfície (μm^2)	Volume dos Ramos (μm^3)	Diâmetro da Base (μm)	Total Segmentos	Segmentos / mm	Nº de Árvores	K-dim
Floriano	4.758	1.130	10.403	319.720	1.076	140.321	211.025	5.964	1.103
Madona	6.527	1.126	9.715	93.834	0.675	70.778	155.125	4.852	1.074
Jaco	5.675	1.124	12.034	318.577	1.031	132.172	132.172	6.833	1.101
Smeagol	5.316	1.139	7.807	137.856	0.700	121.618	191.896	5.912	1.111
Média	5.569	1.130	9.990	217.497	0.871	116.222	172.554	5.890	1.097
Desvio Padrão	0.371017	0.003457	0.875062	59.3731	0.106296	15.62447	17.768215	0.405547	0.00798

Tabela 23. Valores morfométricos dos corpos celulares de micróglias da camada molecular do giro denteado do *Cebus apella*.

Camada Molecular	Perímetro (μm)	Area (μm^2)	Feret Max (μm)	Feret Min (μm)	Aspect Ratio	Compactness	Convexity	Form Factor	Roundness	Solidity
Floriano	31.189	50.848	10.821	6.668	1.651	0.743	0.916	0.651	0.555	0.920
Madona	27.722	41.574	9.593	5.981	1.612	0.757	0.909	0.676	0.574	0.954
Jaco	33.383	57.529	12.377	6.673	1.895	0.690	0.939	0.650	0.481	0.928
Smeagol	26.774	41.101	9.897	5.885	1.728	0.738	0.968	0.728	0.552	0.925
Média	29.767	47.763	10.672	6.302	1.721	0.732	0.933	0.676	0.541	0.932
Desvio Padrão	1.534132	3.953674	0.625425	0.21372	0.062808	0.014381	0.01324	0.018337	0.020484	0.007575



Tabela 24. Valores morfométricos dos ramos e complexidade celular de micróglia da camada molecular do giro dentado do *Rattus norvegicus*.

Camada Molecular	Comprimento Médio (μm)	Tortuosidade	Área de Superfície (μm^2)	Volume dos Ramos (μm^3)	Diâmetro da Base (μm)	Total de Segmentos	Segmentos / mm	Nº de Árvores	K-dim
CAB G56 EXP143	5,209	1,110	10,579	233,398	0,853	123,750	194,788	6,000	1,097
DOR G56 EXP142	5,234	1,103	10,938	155,253	0,850	78,250	192,669	6,375	1,075
VIDE G41 EXP105	4,872	1,079	9,771	157,149	0,844	87,500	207,229	5,500	1,067
VSDA+VME G47 EXP106	5,796	1,097	10,898	155,294	0,784	83,875	173,588	6,750	1,073
PPD+PAD	5,464	1,130	11,047	199,112	0,838	92,600	183,771	2,800	1,077
PPE G52	5,624	1,126	10,111	164,561	0,773	98,000	181,509	4,600	1,086
SM G32	6,023	1,109	11,330	161,958	0,791	81,000	166,332	5,667	1,072
SM G52	5,722	1,085	11,213	175,000	0,828	91,500	178,889	4,000	1,063
VSDE	5,791	1,067	13,446	189,242	0,972	104,000	174,913	3,000	1,043
VMD G36 C01	5,760	1,137	9,504	135,958	0,685	89,833	180,760	4,500	1,103
VID G37 C01	6,534	1,143	9,944	143,078	0,682	95,167	154,792	4,167	1,101
VIDE G37 C01	6,370	1,154	9,753	119,961	0,665	84,667	158,644	4,333	1,090
VSD G36 C01	5,723	1,134	9,337	167,372	0,692	119,167	178,437	4,000	1,139
CAB DOR C01	6,561	1,153	11,986	192,781	0,846	87,500	159,431	5,000	1,099
Média	5,763	1,116	10,704	167,865	0,793	94,058	177,554	4,764	1,085
Desvio Padrão	0,131817	0,007407	0,296975	7,704988	0,023274	3,595249	3,940473181	0,316702	0,006182



Tabela 25. Valores morfométricos dos corpos celulares de micróglia da camada molecular do giro denteado do *Rattus norvegicus*.

Camada Molecular	Perímetro	Area	Feret Max	Feret Min	Aspect	Compactness	Convexity	Form Factor	Roundness	Solidity
	(μm)	(μm^2)	(μm)	(μm)	Ratio					
CAB G56 EXP143	26,838	44,183	10,075	6,275	1,615	0,749	0,981	0,773	0,567	0,940
DOR G56 EXP142	26,688	44,292	10,263	5,950	1,763	0,737	0,990	0,783	0,549	0,951
VIDE G41 EXP105	24,525	38,616	9,275	5,663	1,632	0,764	0,985	0,813	0,589	0,963
VSDA+VME G47 EXP106	25,113	39,924	9,438	5,838	1,679	0,766	0,989	0,803	0,597	0,967
PPD+PAD	22,100	30,022	8,420	4,880	1,733	0,739	0,970	0,775	0,552	0,981
PPE G52	28,220	43,567	10,540	6,000	1,772	0,733	0,969	0,716	0,551	0,919
SM G32	22,367	32,273	8,433	5,033	1,691	0,762	0,979	0,812	0,583	0,972
SM G52	24,750	39,223	9,075	6,150	1,484	0,785	0,976	0,808	0,620	0,981
VSDE	26,767	46,445	10,267	5,933	1,747	0,752	0,981	0,815	0,568	0,985
VMD G36 C01	28,717	45,073	10,283	5,567	1,855	0,739	0,908	0,679	0,550	0,979
VID G37 C01	23,083	31,205	7,883	5,383	1,474	0,801	0,920	0,737	0,644	0,979
VIDE G37 C01	28,467	41,013	9,733	6,000	1,624	0,754	0,889	0,638	0,576	0,954
VSD G36 C01	26,183	38,378	9,117	5,900	1,554	0,769	0,910	0,707	0,593	0,971
CAB DOR C01	32,350	47,340	9,725	6,250	1,571	0,812	0,814	0,576	0,668	0,986
Média	26,155	40,111	9,466	5,773	1,657	0,762	0,947	0,745	0,586	0,966
Desvio Padrão	0,747229	1,50534	0,217174	0,113709	0,030002	0,006418	0,013831	0,01977	0,009784	0,005127



A figura 22 (A-L) por sua vez reúne representações gráficas dos valores médios tabulares para 12 parâmetros morfométricos (oito dos quais se referem às diferenças encontradas entre as árvores e quatro deles às diferenças encontradas entre os somas microgliais).

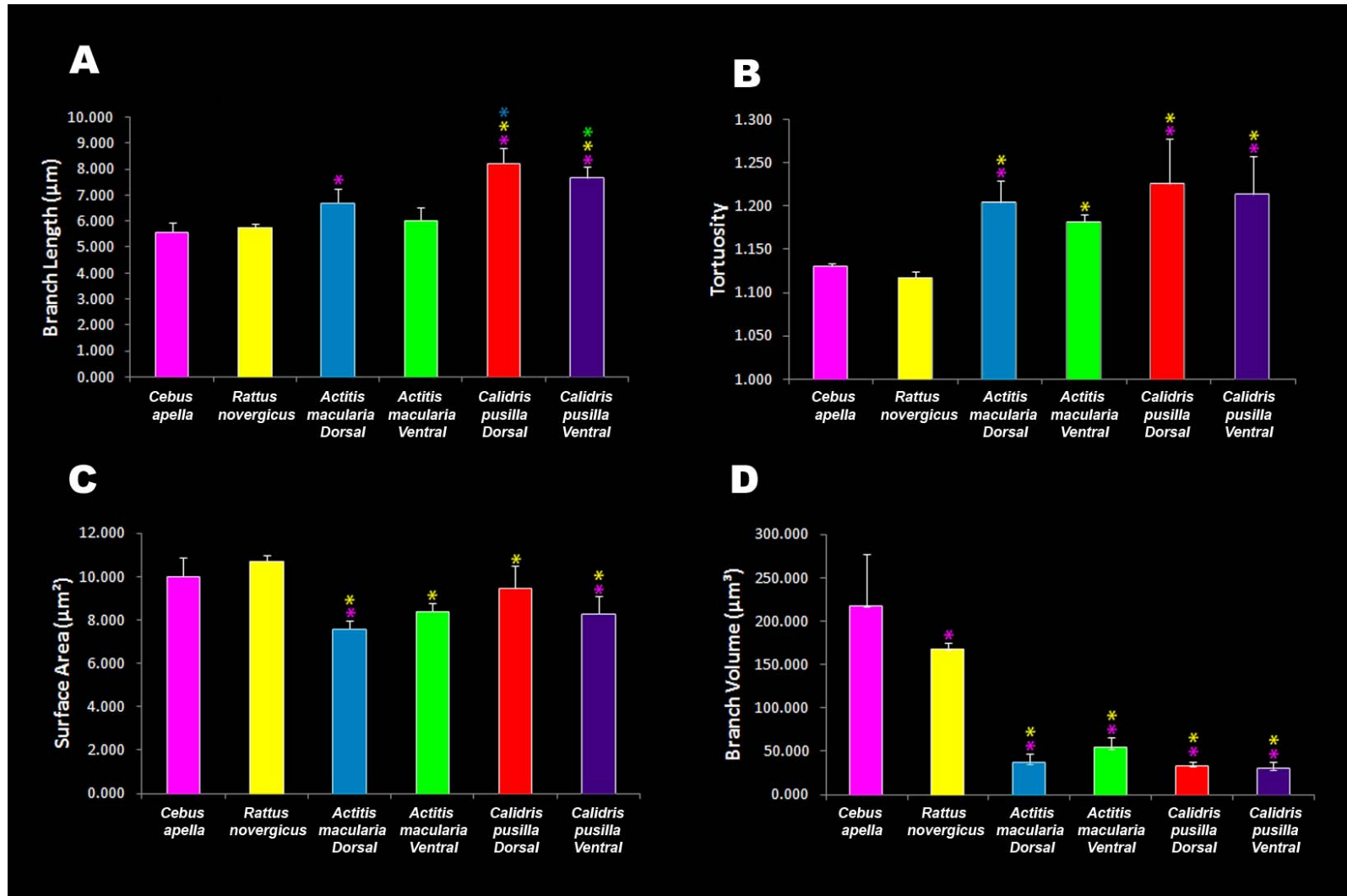
Tal como mencionado previamente as diferenças significativas nas reconstruções tridimensionais da micróglia foram estimadas com auxílio de análise de variância ANOVA um critério, adotando o teste *a priori* de Bonferroni com nível de significância pré-estabelecido em 0,05. Tais diferenças estão indicadas nas representações gráficas da Figura 22 por asteriscos, cujas cores revelam os grupos envolvidos em cada comparação. A comparação entre os valores médios dos parâmetros morfométricos relacionados ao padrão de ramificação ou aos somas microgliais facilmente distinguem a micróglia do hipocampo das aves daquela da camada molecular do giro denteado dos mamíferos. Por exemplo, o comprimento médio dos ramos ilustrado na Fig. 22(A) revela que em média os ramos individuais das micróglia do *Calidris pusilla* são de longe os mais longos. De fato são maiores do que os de *Actitis macularia* tanto na região dorsal quanto ventral (*C. pusilla* Dorsal = $8,24 \pm 1,01$ versus *A. macularia* Dorsal = $6.67 \pm 0,96\mu\text{m}$, Média \pm S.D.; Cp Ventral = $7,67 \pm 0,71$ vs Am Ventral = $6,02 \pm 0,91$, $p < 0.05$) e do que os do rato ($5,76 \pm 0.13$) e do macaco ($5,57 \pm 0,37$). Por outro lado o volume dos ramos (“Branch Volume”, Fig 22D), o número total dos segmentos (“Total Number of Segments”, Fig 22F) e a dimensão fractal (“Fractal dimension”, Fig 22H) mostram valores mais altos na camada molecular dos mamíferos do que no hipocampo das aves, e tais diferenças significativas se aplicam a ambas as regiões dorsal e ventral do hipocampo das aves. (**Volume dos Ramos** - macaco = $217,50 \pm 59.37\mu\text{m}^3$; rato = $167,86 \pm 7,70$; *C. pusilla* Ventral = $29,93 \pm 14,6$; *A. macularia* Ventral = $53,91 \pm 21,54$; *C. pusilla* Dorsal = $33,41 \pm 8,12$; *A. macularia* Dorsal = $41,11 \pm 17,36$; **Número Total de Segmentos** – macaco = $116,22 \pm 15,62$; rato = $94,06 \pm 3,59$; *C. pusilla* Ventral = $29,83 \pm 10,69$; *A. macularia* Ventral = $40,31 \pm 14,56$; *C. Pusilla* Dorsal = $28,81 \pm 6.15$; *A. macularia* Dorsal = $38,25 \pm 8,24$; **Dimensão Fractal** – macaco = $1,10 \pm 0,008$; rato = $1,08 \pm 0,006$; *C. pusilla* Ventral = $1,02 \pm 0,01$; *A.*

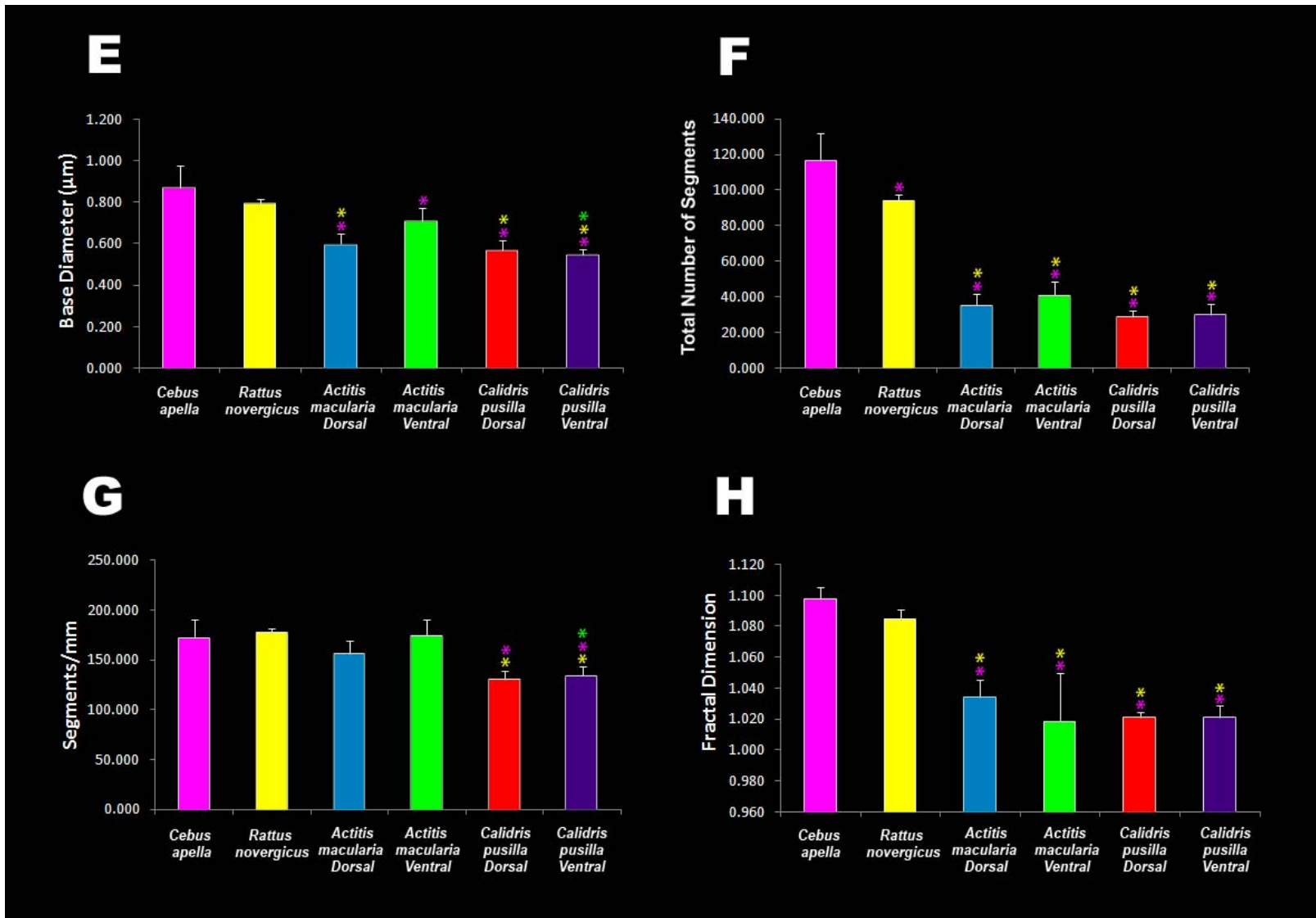


macularia Ventral = $1,02 \pm 0,05$; *C. pusilla* Dorsal = $1,02 \pm 0,01$; *A. macularia* Dorsal = $1,04 \pm 0,02$). No que concerne às diferenças entre os valores médios estimados para a morfologia do soma todos os parâmetros morfométricos sem distinção, mostraram diferenças significativas entre as camadas molecular do giro dentado do rato e do macaco e o hipocampo das aves, independente da sub-região hipocampal objeto da comparação (ventral ou dorsal). De fato essas diferenças mostraram de forma sistemática que o perímetro (“Perimeter”, Fig. 22(I)), a Area (“Area”, Fig. 22(J)) e os diâmetros (“Ferret Max” Fig. 22(K) e “Ferret Min” Fig. 22(L)) dos somas microgliais são maiores na camada molecular do giro dentado dos mamíferos do que nas regiões dorsal e ventral do hipocampo das aves. Além disso, observaram-se diferenças significativas em todos os parâmetros do soma entre os mamíferos, com os valores mais altos no macaco em comparação ao rato (**Perímetro do Soma** - macaco = $29,77 \pm 1,53\mu\text{m}$; rato = $26,15 \pm 0,75$; *C. pusilla* Ventral = $18,12 \pm 0,94$; *A. macularia* Ventral = $20,99 \pm 2,03$; *C. pusilla* Dorsal = $19,43 \pm 2,73$; *A. macularia* Dorsal = $19,66 \pm 2,76$; **Área do Soma** – macaco = $47,76 \pm 3,95\mu\text{m}^2$; rato = $40,11 \pm 1,50$; *C. pusilla* Ventral = $19,52 \pm 1,49$; *A. macularia* Ventral = $25,03 \pm 4,47$; *C. pusilla* Dorsal = $21,80 \pm 4,77$; *A. macularia* Dorsal = $21,61 \pm 3,81$; **Diâmetro Ferret Máximo** – macaco = $10,67 \pm 0,62\mu\text{m}$; rato = $9,47 \pm 0,22$; *C. pusilla* Ventral = $6,61 \pm 0,31$; *A. macularia* Ventral = $7,80 \pm 0,96$; *C. pusilla* Dorsal = $7,06 \pm 0,96$; *A. macularia* Dorsal = $7,17 \pm 1,29$; **Diâmetro Ferret Mínimo** = macaco = $6,30 \pm 0,21$; rato = $5,77 \pm 0,11$; *C. pusilla* Ventral = $4,32 \pm 0,27$; *A. macularia* Ventral = $4,45 \pm 0,26$; *C. pusilla* Dorsal = $4,53 \pm 0,53$; *A. macularia* Dorsal = $4,41 \pm 0,40$). A essas diferenças generalizadas que distinguem claramente dois padrões morfológicos microgliais, um para o hipocampo dorsal e ventral das aves e outro para a camada molecular do giro dentado dos mamíferos, somam-se outras que não ocorrem de forma generalizada. Um exemplo dessas é aquela relacionada à tortuosidade dos ramos (“Tortuosity”, Fig 22B) que mostra valores médios mais altos na micróglia das aves em comparação com a dos mamíferos, com uma única exceção que ocorre quando da comparação da região ventral do hipocampo do *Actitis macularia* com a camada molecular do *Cebus apella* onde essa diferença



desaparece. Somam-se a essas diferenças àquela encontrada entre os valores médios do diâmetro da base de cada ramo microglial medido na origem de cada ramificação e que revelam que os ramos da micróglia das aves são mais delgados do que os do macaco e do rato com exceção da micróglia da região ventral do hipocampo de *Actitis macularia* que não se distingue nesse parâmetro daquelas da camada molecular do rato, ver Fig. 22 (E). Para consulta dos valores médios e individuais e seus respectivos desvios padrão para tais variáveis cujas diferenças significativas não são encontradas de forma generalizada consultar as tabelas 14 a 21 para as aves e 22 a 25 para os mamíferos.





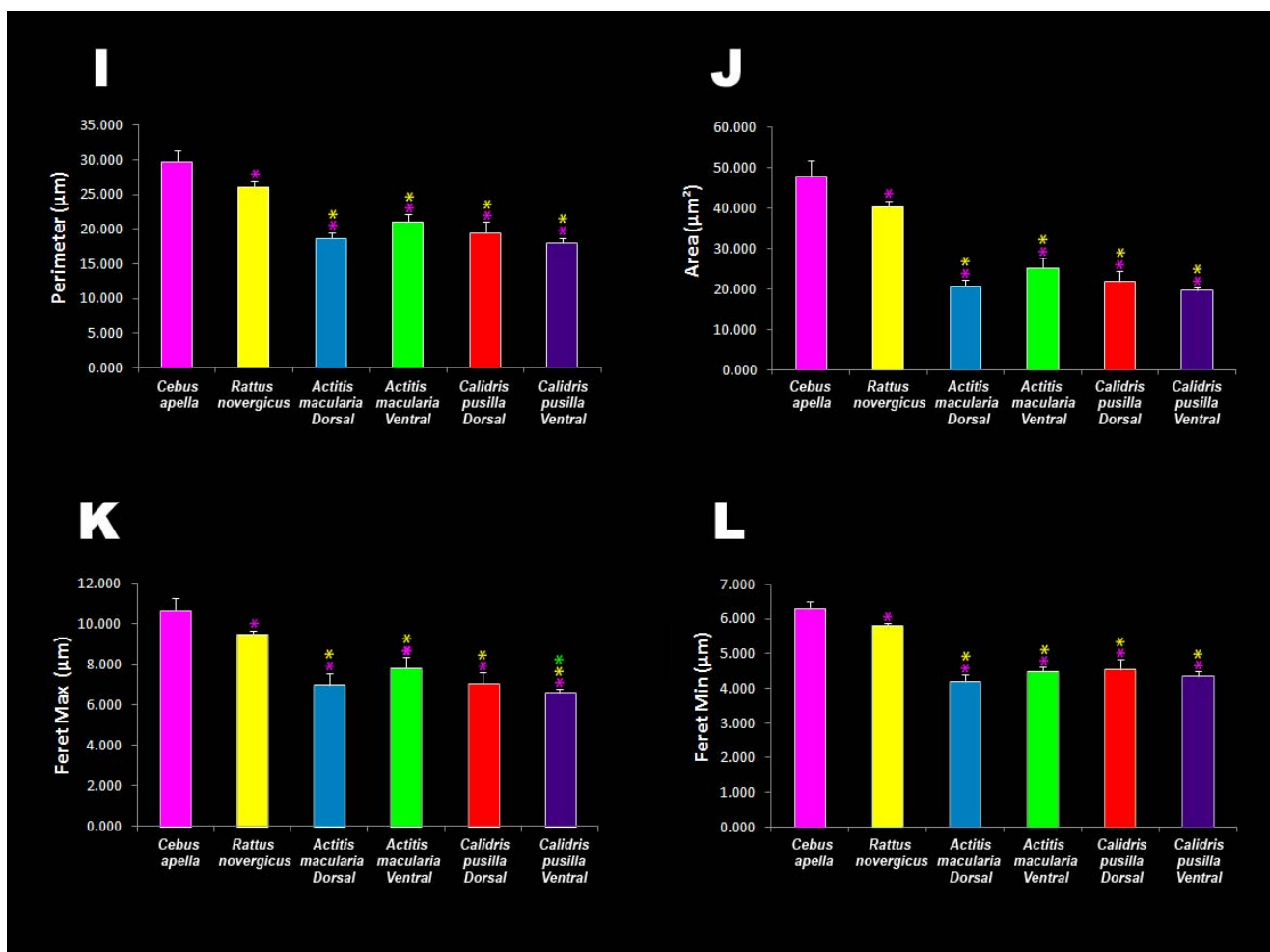


Figura 22. Representações gráficas dos valores médios e respectivos erros padrão de 12 parâmetros morfológicos que apresentaram diferenças estatísticas significativas. Oito desses parâmetros (A-H) se referem às diferenças morfométricas encontradas nas árvores da micróglia e outros 4 se referem às diferenças encontradas nas medidas do soma (I-L). As cores distinguem cada uma das espécies estudadas e no caso das aves também distinguem as regiões dorsal e ventral. As cores e a posição dos asteriscos indicam a comparação que gerou a diferença significativa apontada por eles.



5- DISCUSSÃO

No presente trabalho estudamos a formação hipocampal dos maçaricos *Actitis macularia* e *Calidris pusilla*, duas aves marinhas com estratégias de migração bastante diferentes com o intuito de adotá-las como modelos para o estudo da neurobiologia do processo migratório. Com essa finalidade descreveu-se a organização morfológica qualitativa e quantitativa da formação hipocampal, empregando-se citoarquitetonia com cresil violeta e imunomarcacão seletiva para neurônios e micróglia com a utilização de métodos estereológicos para estimar seu número. Além disso, caracterizou-se a morfologia da micróglia do hipocampo dorsal e ventral desses maçaricos comparando-a às da camada molecular do giro denteado do *Rattus norvegicus* (variedade Wistar) e do *Cebus apella* empregando reconstrução tridimensional.

As estimativas estereológicas revelaram em média número similar de neurônios nas duas espécies enquanto que no hipocampo de *Actitis macularia* observou-se número de micróglia 37% maior do que no de *Calidris pusilla*. Coerentemente encontrou-se que em média o volume da formação hipocampal do *Actitis macularia* é 38% maior do que o encontrado em *Calidris pusilla*.

A comparação entre os valores médios dos parâmetros morfométricos relacionados ao padrão de ramificação ou aos somas microgliais distinguiram dois padrões distintos, um para o hipocampo das aves e outro para a camada molecular do giro denteado dos mamíferos. De fato o comprimento médio dos ramos da micróglia em *C. pusilla* é maior do que em *Actitis macularia* tanto na região dorsal quanto ventral e maior do que os da micróglia do rato e do macaco. Por outro lado o volume dos ramos, o número total dos segmentos e a dimensão fractal revelaram valores mais altos para a micróglia da camada molecular dos mamíferos do que na do hipocampo das aves, independente da região considerada.

Na morfologia do soma constataram-se igualmente diferenças significativas entre as camadas molecular do giro denteado do rato e do macaco e o hipocampo



das aves incluindo perímetro, área, e diâmetros Além disso, observaram-se diferenças significativas nos mesmos parâmetros somáticos entre o rato e o macaco, com os valores mais altos no *Cebus apella* em comparação ao *Rattus norvegicus*.

5.1- Limites Arquitetônicos

A formação hipocampal das aves (Atoji e Wild, 2006; Rattenborg, N. C. e Martinez-Gonzalez, D., 2011) parece exibir um padrão morfológico bastante

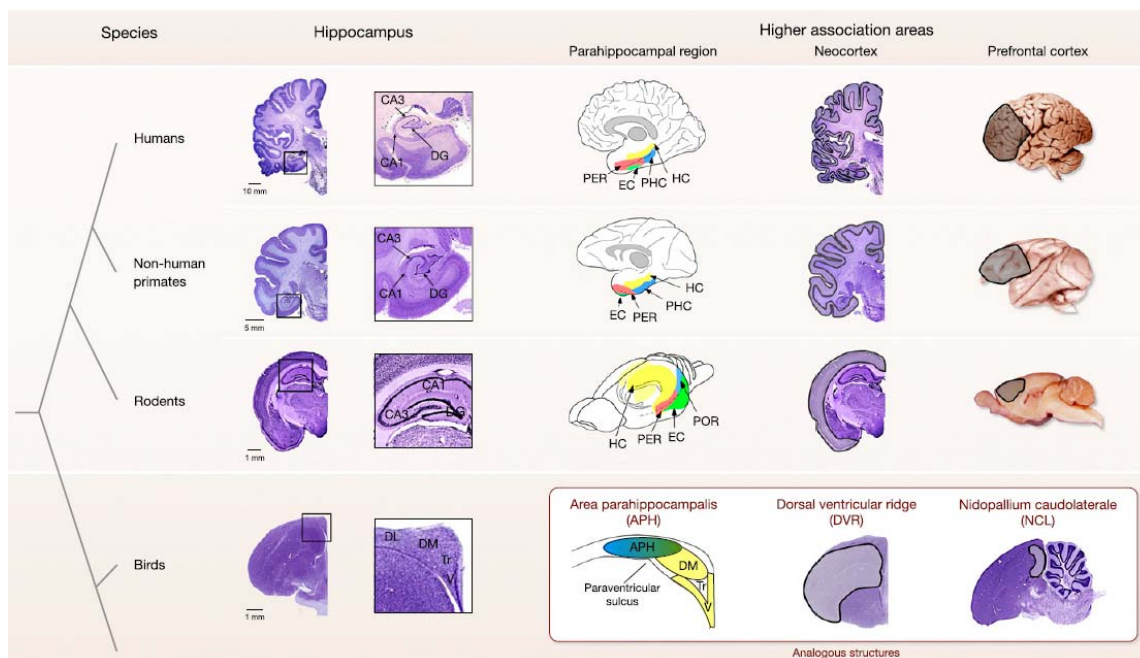


Figura 23. Regiões cerebrais importantes para formação de memória episódica em aves e mamíferos. Comparação entre mamíferos (hipocampo, região parahipocampal, neocórtex associativo e córtex pré-frontal) e aves (hipocampo, área parahipocampal, palium e nidopallio caudo-lateral). O hipocampo dos mamíferos é formado por distintas subregiões que não são tão evidentes no hipocampo das aves. A região parahipocampal dos mamíferos é ilustrada em desenhos diagramáticos para realçar o padrão da posição anatômica relativa que parece ser conservada entre as classes, posição essa que também foi preservada nas aves. As áreas neocorticais nos mamíferos e as paliais associativas nas aves (dorsal ventricular ridge) são identificadas nos contornos. O córtex pré-frontal é indicado nos cérebros dos mamíferos (em secção coronal no rato) e das aves (em secção parassagital no pombo). As secções foram obtidas de primata não humano (*Macaca mullatta*) roedor (*Rattus norvegicus*) e ave (*Taeniopygia gutatta* – *Zebra finch*). DG, giro denteado; DL região dorsolateral; DM região dorsomedial; EC córtex entorrinal; HC hipocampo; PER córtex perirrinal; PHC córtex parahipocampal; POR córtex pós-rinal; TR região triangular; V camada em forma de V.

conservado entre as diferentes espécies retendo homologias importantes com a formação hipocampal dos mamíferos (Figura 23). Essas homologias são baseadas



em relações funcionais, hipocampais e parahipocampais em aves e mamíferos (Manns e Eichenbaum, 2006) e são moduladas por circuitos paliais (neocorticais nos mamíferos) que se projetam em última instância através de áreas associativas para o hipocampo e por circuitos intrínsecos próprios da formação hipocampal (Allen e Fortin, 2013).

Adaptada de (Rattenborg, N. C. e Martinez-Gonzalez, D., 2011) a Figura 24 compara lado a lado uma secção coronal de *Actitis macularia* e um diagrama esquemático de uma secção coronal através da formação hipocampal das aves, adotando o modelo de parcelamento proposto por (Atoji e Wild, 2006) em suas homologias com as áreas da formação hipocampal dos mamíferos. De forma similar em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* como esperado, o hipocampo (Hp) parece seguir esse modelo de parcelamento, sendo relativamente estreito e localizado na região dorsomedial do telencéfalo. É mais largo na região dorsal na junção com a

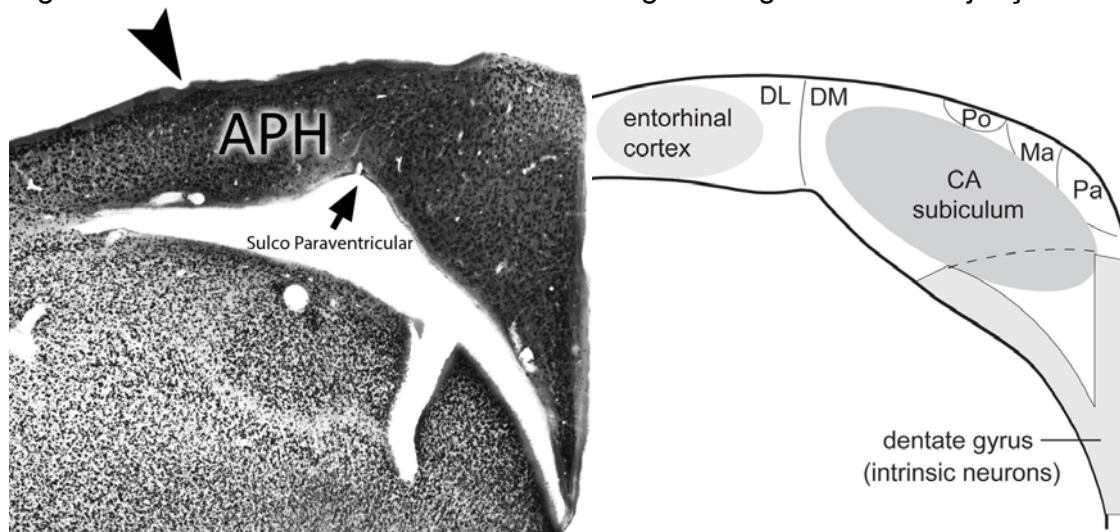


Figura 24. À direita: Homologias hipotéticas entre as subregiões da formação hipocampal de mamíferos e de aves. À esquerda secção da formação hipocampal de *Actitis macularia* imunomarcada para NeuN. A cabeça de seta aponta o limite lateral da área parahipocampal adotada no presente trabalho e a seta indica o sulco paraventricular que é o limite lateral do hipocampo. A região médioventral em forma de V à esquerda (em cinza claro) é comparável ao giro denteado dos mamíferos, a região dorsomedial (DM) é comparável ao corno de Amon (CA) e ao subículo e a região dorsolateral (DL) comparável ao córtex entorrinal. Outras regiões histologicamente distintas incluem a região magnocelular (Ma), a parvocelular (Pa) e a região pobre em elementos celulares (Po). APH: Área parahipocampal; Hp – Hipocampo. Escala: 500µm (Rattenborg et al., 2011).

área parahipocampal e mais estreito em sua porção ventral à medida que se aproxima da região septal.



Em resumo, encontramos no presente trabalho organização estrutural similar entre a formação hipocampal dos maçaricos *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* com aquela previamente descrita para as aves em geral, com o sulco paraventricular definindo o limite entre a área parahipocampal e o hipocampo (Atoji e Wild, 2006). Essa estreita similaridade dos resultados arquitetônicos embasaram a definição dos limites arquitetônicos da área de interesse adotados nos ensaios estereológicos.

5.2- Ensaio Estereológico na Formação Hipocampal de Aves: Efeitos do ambiente sobre a plasticidade neuronal e glial.

É importante ter em consideração que a memória de eventos contextualizados relacionados ao processo migratório em larga ou pequena escala, inclui tal como nos mamíferos, o reconhecimento do lugar (o quê?), de sua localização espacial (onde?) e do momento em que esse reconhecimento se deu (quando?). Essa habilidade nos animais tem sido tratada como memória semelhante à episódica dado que o termo memória episódica tem sido reservada a memória declarativa humana onde a linguagem tem um papel de relevo; para revisão ver (Allen e Fortin, 2013).

Para as aves que estocam comida, em particular, durante os últimos anos, um conjunto robusto de evidências em diferentes espécies tem demonstrado de forma sistemática que aquelas são capazes de lembrar que tipo de comida esconderam, onde esconderam e quando (Clayton e Dickinson, 1998; Feeney *et al.*, 2009; Salwiczek *et al.*, 2010; Feeney *et al.*, 2011b; a) e que para que isso seja possível, a integridade da formação hipocampal é essencial.



Diferente da dos mamíferos, entretanto, onde a memória episódica parece ser construída a partir da integração hipocampal de aferências multimodais provenientes de numerosas áreas associativas do neocórtex (derivadas do palium dorsal), para consolidação da memória semelhante à episódica nos pássaros, as vias olfatórias e visuo-espaciais que convergem sobre a área dorsoventral do palium (DVR, derivada do palium ventro-lateral) parecem suficientes (Figura 25).

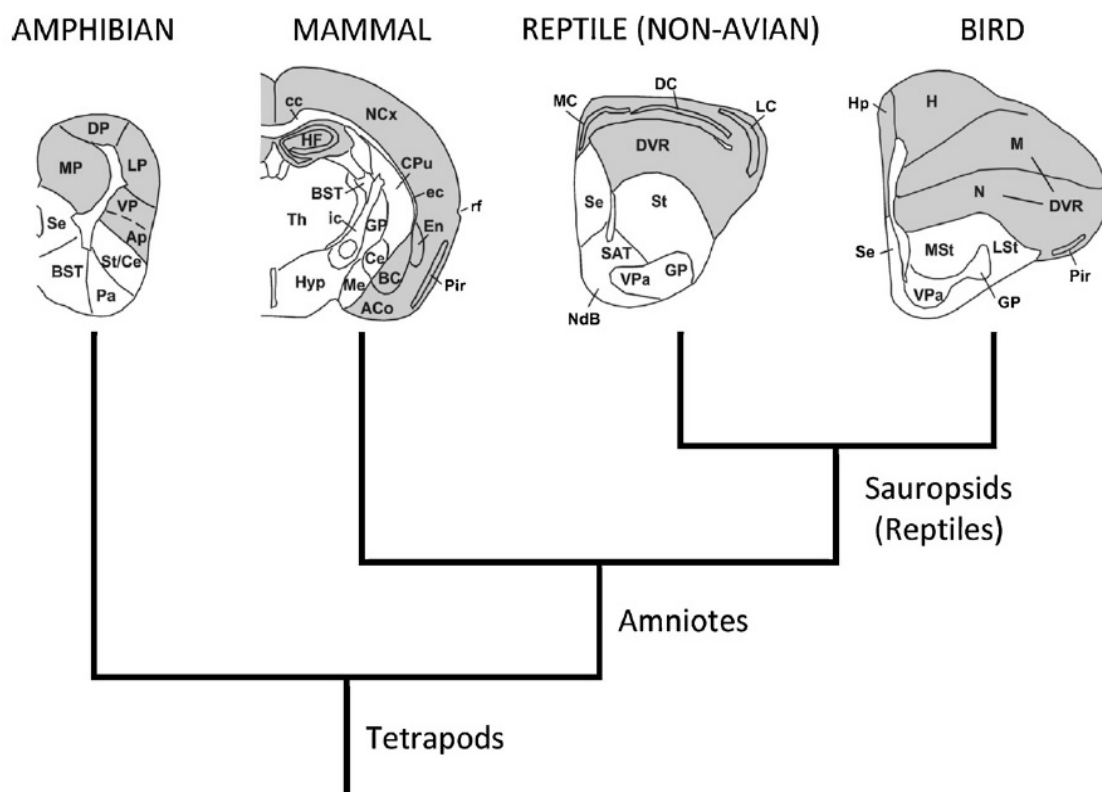


Figura 25. Diagrama esquemático do palium (em cinza) em espécies representativas de diferentes vertebrados. Diagramas esquemáticos de seções coronais através do telencéfalo da rã (*Xenopus*), do camundongo (*Mus*), do lagarto (*Psammotromus*), e do pombo (*Columbia*). No camundongo e na maioria dos mamíferos a estrutura palial mais representativa é o neocórtex (uma região derivada do palio dorsal) enquanto que em pássaros e lagartos e outros répteis a área palial mais importante é a DVR ('dorsoventricular ridge' região homóloga às áreas associativas dos mamíferos). ACo – área amigdalóide cortical anterior; Ap – amígdala palial (rã); BC – complexo amigdalóide basal; BST – núcleo do leito da estria terminal; cc – corpo caloso; Ce – amígdala central; Cpu – caudado/putamen (estriado dorsal); DC – córtex dorsal do lagarto; DP – palium dorsal; DVR – (dorsal ventricular ridge) palium associativo dorsoventral; ec – capsula externa; En – núcleo endopiriforme; H – hiperpalium (aves); HF – formação hipocampal; Hyp – hipotálamo; ic – capsula interna; GP – globo pálido; córtex lateral (olfatório) dos lagartos; LGE – eminência ganglionar lateral; LP – palium lateral; LSt – estriado lateral das aves; M mesopalium (região dorsal do DVR) das aves; MC – cortex medial dos lagartos; MGE – eminência ganglionar média; MP – palium medial; MSt – estriado medial das aves; N, nidopalium das aves (região ventral do DVR); NCx – neocórtex; P – palium; Pa – palidum; Pir córtex piriforme (olfatório); rf – fissura rinal; S – subpalium; SAT – área de transição estriado-amidaloide dos lagartos; Se septum; St – estriado; Th tálamo (tálamo dorsal); va – valécula; VPa – pallidum ventral (Rattenborg, N. e Martinez-Gonzalez, D., 2011).



Para começarmos a compreender tais diferenças é útil estimar o número de neurônios e de células da glia do alvo principal dessas projeções (o hipocampo) como ponto de partida para o entendimento das diferenças comportamentais envolvendo memória e aprendizado. Baseado em citoarquitetonia utilizando o Cresil violeta e a imunomarcção para NeuN, definimos os limites da formação hipocampal e estimamos, empregando marcadores seletivos e estereologia, o número de neurônios e de micróglia nessa região em duas aves marinhas com diferentes estratégias de migração: o *Calidris pusilla* e o *Actitis macularia*. Com o intuito de comparar nossas estimativas a de mamíferos reunimos na Tabela 26 os dados relacionados ao volume e ao número de neurônios do giro denteado e hipocampo de duas espécies de macaco, uma do Novo Mundo (*Cebus apella*) e outra do Velho Mundo (*Macaca mullata*) comparando-as àquelas do rato e das aves migratórias do presente trabalho (Tabela 26).

Tabela 26. Número de Neurônios e Volume do Hipocampo em Mamíferos e Aves.

	<i>A. macularia</i> (Tabela 09)	<i>C. pusilla</i> (Tabela 07)	<i>R. norvegicus</i>	<i>C. apella</i> (Guerreiro-Diniz, C et al., 2010)	<i>M. mulatta</i> (Keuler et al., 2003)
Volume (mm ³)	6,18	3,72	5,76 (Miki et al., 2005)	34,2	42
Neurônios	0,765 x 10 ³	0,909x10 ³	1,59 x10 ³ (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007)	2.683x10 ³	8.907x10 ³

Da análise dos dados compilados na tabela 26 resta evidente a enorme variação no número de neurônios do hipocampo entre as espécies consideradas. Apesar dessa variação em número de neurônios e do repertório comportamental distinto, todas as espécies reunidas na tabela 26 exibem habilidades cognitivas que lhes garantem memória semelhante à episódica e essa capacidade parece essencial para as respostas adaptativas de cada qual ao ambiente que partilham.

Nas aves estudadas, apesar de diferenças significativas no volume da formação hipocampal, as estimativas conduzidas com coeficientes de erro compatíveis com medidas precisas e acuradas (CE de Scheaffer <0.05) não



revelaram diferenças significativas no número de neurônios. Com base nesse resultado não há como explicar a variação de volume hipocampal entre as espécies em função do número de neurônios, restando investigar a possível contribuição das células da glia nesse processo.

No caso das aves em particular esse esforço para compreensão das bases neurobiológicas da plasticidade hipocampal foi direcionado à alterações volumétricas e estimativas numéricas da neurogênese hipocampal (Pravosudov e Omanska, 2005; Hoshooley e Sherry, 2007; Tarr *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2010; Ladage *et al.*, 2010; Sherry e Hoshooley, 2010; Vellema *et al.*, 2010; Chancellor *et al.*, 2011; Ladage *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2012; Pravosudov *et al.*, 2013) não tendo sido feito quase nada em busca de possíveis correlações estruturais e funcionais envolvendo as células da glia (Roth *et al.*, 2013). De fato um único trabalho dedicou-se a examinar as variações numéricas em células da glia em pássaros que estocam e recuperam comida empregando estereologia, e esse trabalho mediu o efeito das influências ambientais sobre o número daquelas no hipocampo de *Poecile atricapilus* comparando animais em natureza com aqueles mantidos em cativeiro (Chiesa *et al.*, 2005). Esses autores encontraram que os animais vivendo em liberdade, sob influência das pressões ambientais naturais tendem a ter números significativamente maiores de células da glia do que aqueles vivendo em cativeiro sugerindo que a regulação genética do número de células gliais sofre influência do ambiente a que são submetidos os pássaros. Além disso, demonstraram que o volume hipocampal aumenta em função do aumento do número de células gliais, mas não é influenciado com o aumento da neurogênese (Chiesa *et al.*, 2005).

Em linha com tais observações, no caso das aves marinhas estudadas no presente trabalho, diferente dos valores das estimativas no número de neurônios que foram semelhantes, o número de micróglias foi significativamente diferente nas duas espécies, com valores 37% mais altos em *Actitis macularia* em comparação com as estimativas no *Calidris pusilla*. Num caso e noutro a contribuição para a dispersão dos valores foi acompanhada de coeficientes de variação biológica acima



de 90% nos dois marcadores sugerindo que ela não se deve a erros metodológicos, mas a diferenças individuais.

É interessante destacar que no presente trabalho, utilizamos maçaricos submetidos a ambientes bastante distintos em sua rota de migração e que portanto, podem ter sua gliogênese sob influência de pressões ambientais bastante diferentes. Nós sugerimos que pressões ambientais diferentes poderiam alterar de forma distinta o número de células da glia na formação hipocampal, modificando a relação neurônio/micróglia de forma distinta em cada espécie. De fato encontramos que embora o número de neurônios tenha sido igual em ambas as espécies o número de micróglia e o volume hipocampal foram significativamente maiores em *Actitis macularia*, e que a razão entre o número de neurônios e o número de micróglia num caso e noutro foi significativamente diferente, sendo duas vezes maior em *C. pusilla* quando comparado ao *A. macularia*.

Difícil dizer com o presente conjunto de evidências indiretas se essa relação e suas diferenças estão ou não associadas à resposta adaptativa expressa no padrão de migração, mas é relevante manter em mente para análises comparativas subsequentes que o *Calidris pusilla* é um migrante de longa distância com voos transoceânicos contínuos enquanto que o *Actitis macularia* é um migrante de voos curtos e interrompidos seguindo uma trilha continental com pressões ambientais e estimulação multissensorial, somatomotoras e visuoespaciais bastante diferentes. De fato seria importante para esclarecer tais questões estimar em observações futuras de forma comparativa, a relação neurônio/glia e a taxa de neurogênese e gliogênese antes e depois do processo migratório se completar.

Com essas características é razoável levantar a hipótese de que a orientação pelo campo magnético pode ser determinante para que o *Calidris* encontre a rota adequada de migração particularmente durante o trecho transoceânico de sua viagem quando as pistas visuais estelares em céus nublados não estão disponíveis. Por outro lado esperar-se-ia para o padrão migratório continental do *Actitis macularia* maior dependência do reconhecimento adequado de pistas visuoespaciais ao longo da rota escolhida.



5.3- Morfologia Tridimensional da Micróglia no Hipocampo Dorsal e Ventral de Maçaricos e na Camada Molecular do Giro Denteado de Mamíferos.

Muito se tem investigado acerca do papel da micróglia na resposta imune e uma quantidade assustadora de trabalhos de revisão, (mais de 400) nos últimos dois anos e meio, pode ser recuperada da base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), usando as palavras chave “microglia” and “review”. Muito menos se tem feito acerca de seu papel funcional em condições homeostáticas e sua influência sobre a plasticidade sináptica e regulação da atividade neural; ver para revisão recente (Kettenmann *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a micróglia eleita para os estudos comparativos de sua morfologia é a micróglia ramificada em condições homeostáticas, quando o seu papel é voltado para monitoramento e modulação da atividade sináptica e reorganização de circuitos sinápticos (Wake, H. *et al.*, 2011; Miyamoto *et al.*, 2013; Wake *et al.*, 2013). A micróglia nessas circunstâncias no cérebro saudável é constituída por células móveis que estendem e retraem seus processos à medida que monitoram o microambiente no sistema nervoso central (Nimmerjahn, A. *et al.*, 2005; Raivich, 2005; Tremblay *et al.*, 2011). A micróglia sob essas condições libera substâncias neurotróficas solúveis que aumentam e estendem a proliferação de células progenitoras (Choi *et al.*, 2008). Nesse sentido, de particular interesse é o fato de que a estimulação da neurogênese e da proliferação microglial pelo enriquecimento ambiental com o subsequente aumento na performance em testes de memória espacial são reduzidas em animais imunodeficientes (Ziv *et al.*, 2006; Ziv e Schwartz, 2008). Mais diretamente, a micróglia derivada de animais exercitados induz um aumento do número de células progenitoras em culturas de neurônios de hipocampo de animais sedentários (Vukovic *et al.*, 2012). Esses achados, portanto, parecem sugerir que a micróglia ramificada (ou não ativada), alvo do estudo morfológico do presente trabalho está implicada na neurogênese do adulto, na integração dos novos neurônios nos circuitos e na remodelação daqueles



e que essa contribuição para a plasticidade neural é essencial para aprender e lembrar (Wake *et al.*, 2013).

Sob essa óptica a caracterização da morfologia fina da micróglia ramificada associada a condições homeostáticas é de interesse em estudos comparativos dedicados a revelar a filogenia das respostas adaptativas na interface dos sistemas nervoso e imune.

No presente trabalho, a simples comparação da morfologia bidimensional da micróglia hipocampal de *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* revela semelhança imediata com as descrições prévias bidimensionais na medula espinhal do pombo (Stensaas e Stensaas, 1968), no teto óptico de galinhas (*Gallus domesticus*) (Stensaas e Stensaas, 1968; Cuadros, Santos, Martín-Oliva, *et al.*, 2006) ou na retina de codornas (Jeon *et al.*, 2004). Infelizmente não há estudos morfológicos anteriores na micróglia da formação hipocampal das aves empregando reconstrução tridimensional, o que impõe aos achados morfológicos 3D deste trabalho comparação mais restrita. Assim sendo os achados das tabelas 14 a 25, representados nas figuras 21 e 22 são discutidos à luz dos resultados de trabalhos anteriores e.g. (Karperien, A. *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2013). De uma forma geral os valores dos parâmetros morfológicos resultantes da análise das reconstruções tridimensionais do rato no presente trabalho são compatíveis com descrições anteriores (Soltys *et al.*, 2005) não havendo, entretanto como comparar os achados do *Cebus* com outros primatas. De fato nossos achados descrevendo a morfologia tridimensional da micróglia da camada molecular do giro denteado do *Cebus* é o primeiro na ordem dos primatas.

Nas aves estudadas além das diferenças numéricas encontradas no número de micróglia, há na análise comparativa com os mamíferos, expressivas diferenças morfológicas. De fato emergem da análise quantitativa dois padrões de complexidade morfológica distintos, o mais simples para as aves e o mais complexo para os mamíferos. Essa distinção está evidente tanto nas comparações entre as árvores microgliais (comprimento médio e volume dos ramos, número total dos segmentos e na dimensão fractal), quanto nas dimensões do soma (perímetro, área



e diâmetros). Entre os mamíferos também se observaram diferenças significativas em todos os parâmetros do soma, com os valores mais altos associados ao macaco em comparação ao rato. Da comparação entre as aves encontrou-se apenas que em média, os ramos individuais das micróglias do *Calidris pusilla* são mais longos. De fato no *Calidris pusilla* seu comprimento médio é significativamente maior do que no *Actitis macularia* tanto na região dorsal quanto ventral, mas essa diferença não se estende a outros parâmetros morfométricos.

Tomados em conjunto, os dados sugerem que a despeito da enorme variedade de comportamentos a morfologia microglial parece se conservar entre espécies filogeneticamente mais próximas e divergir entre espécies não relacionadas. Estudos subsequentes são necessários para investigar o significado funcional e as vantagens adaptativas dessas semelhanças e diferenças.

5.4- Limitações Técnicas

5.4.1- Ambiguidades não Estereológicas nas Estimativas

A Tabela 27 adaptada de (Guerreiro-Diniz, C., De Melo Paz, R. B., Hamad, M. H., Filho, C. S., Martins, A. A., Neves, H. B., De Souza Cunha, E. D., Alves, G. C., De Sousa, L. A., Dias, I. A., Trévia, N., *et al.*, 2010) ilustra uma análise comparativa entre diferentes estimativas para o macaco Rhesus e para dois outros primatas neotropicais, realizadas por diferentes laboratórios chamando atenção para o fato de que é possível, às vezes até mesmo na mesma espécie, obter resultados distintos.

É difícil dizer, entretanto, em que extensão as diferentes metodologias, a simples variação biológica ou as ambiguidades na definição dos limites das regiões e objetos de interesse contribuem para essa distinção. Por essa razão é preciso considerar em estudos estereológicos que a variação nos procedimentos histológicos, a utilização de diferentes marcadores e até mesmo as expectativas do experimentador introduzem vieses que alteram os parâmetros metodológicos possibilitando estimativas incorretas.



Tabela 27. Estimativas do número de neurônios ($\times 10^6$) no hipocampo e giro denteado de diferentes espécies de primatas.

Espécie e Referência	Hipocampo	Giro Denteado
<i>Macaca mulatta</i>		
(Keuker <i>et al.</i> , 2003)	1.97	7.47
(Jabes <i>et al.</i> , 2010)		7.21
(Christensen <i>et al.</i> , 2007)	2.52	
Rapp <i>et al.</i> , dados não publicados (Amaral e Lavenex,	2.57 ^(*)	
<i>Cebus apella</i>		
Imunomarcção para NeuN	1.45	2.0
Coloração de Nissl	1.13	1.64
<i>Callitrix jachus</i>		
(Kozorovitskiy <i>et al.</i> , 2005)		1.82

(*) indica Lavenex *et al.*, dados não publicados (Amaral e Lavenex, 2007)

No presente trabalho escolhemos o fracionador óptico como método estereológico que é imune em grande extensão às alterações induzidas pelos procedimentos de fixação (West, 2002). Além disso, empregamos marcadores seletivos para os objetos de interesse, tendo o cuidado de contracorar as secções imunomarcadas com o cresil violeta para remover as ambiguidades na definição dos limites da área de interesse.

Para facilitar a comparação entre os resultados mantivemos o mesmo protocolo de contagem para o mesmo marcador em todos os animais. Mesmo assim, restaram imprecisões difíceis de serem corrigidas e um exemplo ilustrativo é aquele relacionado ao grau de retração não linear no eixo Z durante o processo de desidratação (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007; Carlo, C. N. e Stevens, C. F., 2011)

5.4.2 Limitações nas Reconstruções Tridimensionais

É igualmente importante chamar atenção para as limitações técnicas associadas ao processamento do tecido utilizado para imunomarcção seletiva para micróglia em sua reconstrução tridimensional. Impostas pela fixação e pelos fatores mecânicos associados ao seccionamento do encéfalo dos animais, assim como pelo subsequente processo de desidratação, o tecido sofre retração não uniforme



no eixo z em comparação aos eixos x-y prontamente evidente nas secções montadas em lâmina (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007).

Assim as estimativas de possíveis modificações nos eixos x/y após o processo de desidratação não podem ser extrapoladas linearmente para o eixo z. Essa impossibilidade difícil de ser circunscrita por sua influência multifatorial, impõe limitações que precisam ser consideradas quando analisando o conjunto dos dados aqui apresentados. Entretanto é preciso realçar que uma indicação segura da ocorrência de retração severa do eixo z é a ondulação frequente dos ramos retraídos, normalmente mais evidentes na superfície das secções, o que indica que os processos individuais não retraem de forma homogênea como um todo, mas refletem variações de retração regionais da fatia que tendem a ser de maior amplitude na superfície, decrescendo em profundidade no eixo z. Esse padrão, entretanto, não foi observado nas micróglia eleitas para reconstrução neste estudo que normalmente foram selecionadas da região média do eixo z, onde o impacto dessas alterações são menores.

Ensaio sistemáticos anteriores mostraram que a taxa de retração nos eixos x-y é desprezível e que é em média 75% menor do que a do eixo z (Carlo, C. N. e Stevens, C. F., 2011). Para minimizar esse efeito imposto por tal retração assimétrica aplicou-se fator de correção linear para o eixo z na mesma proporção para cada micróglia reconstruída e nenhum fator de correção para os eixos x-y.



6- CONCLUSÕES

- Empregando citoarquitetonia com cresil violeta e imunomarcção seletiva para neurônios e micróglia definiu-se os limites da formação hipocampal de *Calidris pusilla* e *Actitis macularia* encontrando um padrão de organização similar ao já descrito para as aves em geral.

- Usando o fracionador óptico estimou-se o número de neurônios e de micróglia da formação hipocampal dessas aves não se encontrando diferenças significativas entre os primeiros revelando, entretanto que o número de micróglia em *Actitis macularia* é 37% maior do que o de *Calidris pusilla* e que o volume da formação hipocampal do primeiro é 38% maior do que o do último.

- A partir de reconstruções tridimensionais encontrou-se dois padrões distintos para morfologia da micróglia, um mais simples para o hipocampo das aves e outro para a camada molecular do giro denteado dos mamíferos.

- Os ramos da micróglia em *Calidris pusilla* são mais longos do que os de *Actitis macularia* e do que os do rato e do macaco enquanto que o volume dos ramos, o número total dos segmentos e a dimensão fractal da micróglia dos mamíferos são maiores do que os do hipocampo das aves tanto na região dorsal quanto ventral.

- Perímetro, área, e diâmetros do soma são maiores nos mamíferos do que nas aves e na comparação entre mamíferos, os do macaco são maiores do que os do rato.



7- REFERÊNCIAS

ACSÁDY, L. et al. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. **The Journal of neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 3386-3403, 1998. ISSN 0270-6474.

ALLEN, T. A.; FORTIN, N. J. The evolution of episodic memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110 Suppl 2, p. 10379-86, Jun 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23754432> >.

AMARAL, D. G. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. **Curr Opin Neurobiol**, v. 3, n. 2, p. 225-9, Apr 1993. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8390320 >.

AMARAL, D. G.; LAVENEX, P. Hippocampal Neuroanatomy. In: ANDERSEN, P.; MORRIS, R. G., et al (Ed.). **The Hippocampus Book**. New York: Oxford University Press, 2007. cap. 03, p.37-114. ISBN 13:978-019-510027-3.

ANTAL, M. et al. External tufted cells in the main olfactory bulb form two distinct subpopulations. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 1124-36, Aug 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16930438 >.

ANTAS, P. T. de TZ 1983. Migration of nearctic shorebirds (Charadriidae and Scolopacidae) in Brasil-flyways and their different seasonal use. **Wader Study Group Bulletin**, v. 39, p. 52-56, 1989.

ANTAS, P. T. Z. Migration on nearctic shorebirds (Charadriidae and Scolopacidae) Brasil-flyways and their- different seasonal use. **Wader Study Group**, 1983.

ARIENS-KAPPERS; HUBER; CROSBY. The comparative anatomy of the nervous system of the vertebrates, including man. **New York: Macmillan**, 1936.

ASHKENAZIE, S.; SAFRIEL, U. N. Breeding cycle and behavior of the Semipalmated Sandpiper at Barrow, Alaska. **The Auk**, p. 56-67, 1979. ISSN 0004-8038.

ATOJI, Y.; WILD, J. M. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the pigeon as revealed by tract tracing and kainic acid lesions. **J Comp Neurol**, v. 475, n. 3, p. 426-61, Jul 26 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15221956 >.



_____. Anatomy of the avian hippocampal formation. **Rev Neurosci**, v. 17, n. 1-2, p. 3-15, 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16703939 >.

ATOJI, Y. et al. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). **J Comp Neurol**, v. 447, n. 2, p. 177-99, May 27 2002. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11977120> >.

AZEVEDO-JÚNIOR. Censo de aves limícolas na Corôa do Avião, Pernambuco, Brasil, informações de 1991 a 1992. **Revista Nordestina de Zoologia**, v. 1, n. 1, p. 263-277, 1998.

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

BAUSCH, S. B. Potential roles for hyaluronan and CD44 in kainic acid-induced mossy fiber sprouting in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 339-50, Nov 17 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16949761 >.

BAUSCH, S. B.; MCNAMARA, J. O. Synaptic connections from multiple subfields contribute to granule cell hyperexcitability in hippocampal slice cultures. **J Neurophysiol**, v. 84, n. 6, p. 2918-32, Dec 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11110821 >.

BEASON-HELD, L. L. et al. Hippocampal formation lesions produce memory impairment in the rhesus monkey. **Hippocampus**, v. 9, n. 5, p. 562-74, 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10560927 >.

BECHMANN, I.; NITSCH, R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. **Glia**, v. 20, n. 2, p. 145-154, 1997. ISSN 1098-1136.

BEN BEDERSON, B. L., CYNTHIA PARR, SVETLANA YAROSH. Taxon Tree. Maryland, 2005.



BENOWITZ, L. I.; KARTEN, H. J. The tractus infundibuli and other afferents to the parahippocampal region of the pigeon. **Brain Res**, v. 102, n. 1, p. 174-80, Jan 30 1976. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=55293>.

BINGMAN et al. Hippocampal ablated homing pigeons show a persistent impairment in the time taken to return home. **J Comp Physiol**, 1988.

BINGMAN; YATES, G. Hippocampal lesions impair navigational learning in experienced homing pigeons. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 1, p. 229-32, Feb 1992. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1554434>.

BINGMAN, V. P. et al. Representing the richness of avian spatial cognition: properties of a lateralized homing pigeon hippocampus. **Reviews in the Neurosciences**, v. 17, n. 1-2, p. 17-28, 2006. ISSN 2191-0200.

BLACKSTAD, T. W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J Comp Neurol**, v. 105, n. 3, p. 417-537, Oct 1956. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13385382>.

BRUCKNER, G. et al. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. **J Comp Neurol**, v. 428, p. 616-629, 2000.

BUHUSI, C. V.; MECK, W. H. Time sharing in rats: A peak-interval procedure with gaps and distracters. **Behav Processes**, v. 71, n. 2-3, p. 107-15, Feb 28 2006. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16413701>.

BUTTERY, R. G.; HAIGHT, J. R.; BELL, K. VASCULAR AND AVASCULAR RETINAE IN MAMMALS - A FUNDUSCOPIC AND FLUORESCIN ANGIOGRAPHIC STUDY. **Brain Behavior and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 156-&, Mar 1990. ISSN 0006-8977. Disponível em: <<Go to ISI>://A1990DH59200003 >.

BUZSÁKI, G.; MOSER, E. I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 130-138, 2013. ISSN 1097-6256.

CAMPBELL, C. B.; HODOS, W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. **Brain Behav Evol**, v. 3, n. 5, p. 353-67, 1970. Disponível em: <



http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5522599 >.

CARLO, C.; STEVENS, C. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 14, p. 2803-2810, 2011. ISSN 1096-9861.

CARLO, C. N.; STEVENS, C. F. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 14, p. 2803-10, Oct 2011. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21491430> >.

CASINI, G.; BINGMAN, V. P.; BAGNOLI, P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and 3H-proline. **J Comp Neurol**, v. 245, n. 4, p. 454-70, Mar 22 1986. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2422224 >.

CHANCELLOR, L. V. et al. The effect of environmental harshness on neurogenesis: a large-scale comparison. **Dev Neurobiol**, v. 71, n. 3, p. 246-52, Mar 2011. ISSN 1932-846X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20949526> >.

CHIESA, R. et al. Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 1, p. 238-243, Jan 2005. ISSN 0027-8424.

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 >.

CHOI, S. H. et al. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. **Neuron**, v. 59, n. 4, p. 568-80, Aug 2008. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760694> >.

CHRISTENSEN, J. R. et al. Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 290, n. 3, p. 330-40, Mar 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17525948 >.

CLARKSON, T. W. Mercury: major issues in environmental health. **Environ Health Perspect**, v. 100, p. 31-8, Apr 1993. Disponível em: <



http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8354179 >.

CLAYTON, N. S.; DICKINSON, A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 272-4, Sep 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751053> >.

COULL, J. T. et al. Differential effects of clonidine, haloperidol, diazepam and tryptophan depletion on focused attention and attentional search. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, n. 2, p. 222-30, Sep 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8545528 >.

CRAIGIE, E. Studies on the brain of the kiwi (*Apteryx australis*). **J Comp Neurol** 1930.

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.

CROCKETT AND EISENBERG, S., CHENEY, SEYFARTH, WRANGHAM, AND STRUHSAKER. **Howlers: Variations in group size and demography**. . Chicago: The University of Chicago Press, 1987 54–68.

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

CUADROS, M. A. et al. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. **J Histochem Cytochem**, v. 54, n. 6, p. 727-38, Jun 2006. ISSN 0022-1554 (Print) 0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461367> >.

CUADROS, M. A. et al. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. **J Histochem Cytochem**, v. 54, n. 6, p. 727-38, Jun 2006. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461367> >.

CURCIO, C. A.; ALLEN, K. A. TOPOGRAPHY OF GANGLION-CELLS IN HUMAN RETINA. **Journal of Comparative Neurology**, v. 300, n. 1, p. 5-25, Oct 1990. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <Go to ISI>://A1990ED85400002 >.



DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005. ISSN 1097-6256.

DE HAAS, A. H.; BODDEKE, H. W.; BIBER, K. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. **Glia**, v. 56, n. 8, p. 888-894, 2008. ISSN 1098-1136.

DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. Handbook of the Birds of the World. Barcelona: Lynx Editions. 1992.

DONASCIMENTO, J. L. M. et al. THE NEURONS OF THE RETINAL GANGLION-CELL LAYER OF THE GUINEA-PIG - QUANTITATIVE-ANALYSIS OF THEIR DISTRIBUTION AND SIZE. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 2, p. 199-214, 1991. ISSN 0100-879X. Disponível em: <<Go to ISI>://A1991FF12400013 >.

DORPH-PETERSEN, K. A.; NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. **J Microsc**, v. 204, n. Pt 3, p. 232-46, Dec 2001. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11903800](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11903800)>.

ERICHSEN, J. T.; BINGMAN, V. P.; KREBS, J. R. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. **J Comp Neurol**, v. 314, n. 3, p. 478-92, Dec 15 1991. ISSN 0021-9967 (Print). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1726107>.

EYO, U. B.; DAILEY, M. E. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, p. 1-16, 2013. ISSN 1557-1890.

FEENEY, M. C.; ROBERTS, W. A.; SHERRY, D. F. Memory for what, where, and when in the black-capped chickadee (*Parus atricapillus*). **Anim Cogn**, v. 12, n. 6, p. 767-77, Nov 2009. ISSN 1435-9456. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466468>>.

_____. Black-capped chickadees (*Parus atricapillus*) anticipate future outcomes of foraging choices. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 37, n. 1, p. 30-40, Jan 2011a. ISSN 1939-2184. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718548>>.

_____. Mechanisms of what-where-when memory in black-capped chickadees (*Parus atricapillus*): do chickadees remember "when"? **J Comp Psychol**, v. 125,



n. 3, p. 308-16, Aug 2011b. ISSN 1939-2087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639614> >.

FIALA, J. C.; HARRIS, K. M. Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes. **J Am Med Inform Assoc**, v. 8, n. 1, p. 1-16, Jan-Feb 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11141509 >.

FOX, R. A. et al. No effect of social group composition or size on hippocampal formation morphology and neurogenesis in mountain chickadees (*Poecile gambeli*). **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 7, p. 538-47, Jun 2010. ISSN 1932-846X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336697> >.

FREMOUW, T.; JACKSON-SMITH, P.; KESNER, R. P. Impaired place learning and unimpaired cue learning in hippocampal-lesioned pigeons. **Behav Neurosci**, v. 111, n. 5, p. 963-75, Oct 1997. ISSN 0735-7044 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9383517 >.

FUJIMOTO, E.; MIKI, A.; MIZOGUTI, H. Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. **Histochemistry**, v. 87, n. 3, p. 209-216, 1987. ISSN 0301-5564.

G.B.I.F., G. B. I. F. **Global Biodiversity Information Facility**: GBIF Data Portal www.gbif.net 2008.

GARAMSZEGI; LUCAS, J. R. Continental variation in relative hippocampal volume in birds: the phylogenetic extent of the effect and the potential role of winter temperatures. **Biol. Lett.**, v. 1, p. 330–33, 2005.

GARDELLA, D. et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. **J Neurosci Methods**, v. 124, n. 1, p. 45-59, Mar 30 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12648764 >.

GEINISMAN, Y. et al. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. **Prog Neurobiol**, v. 45, n. 3, p. 223-52, Feb 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7777673 >.



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.

GLASER, J. R.; GLASER, E. M. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. **J Chem Neuroanat**, v. 20, n. 1, p. 115-26, Oct 2000. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11074348>.

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

GUERREIRO-DINIZ, C. et al. Hippocampus and dentate gyrus of the Cebus monkey: architectonic and stereological study. **J Chem Neuroanat**, v. 40, n. 2, p. 148-59, Oct 2010. ISSN 1873-6300 (Electronic) 0891-0618 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558278>>.

GUERREIRO-DINIZ, C. et al. Hippocampus and dentate gyrus of the Cebus monkey: architectonic and stereological study. **J Chem Neuroanat**, v. 40, n. 2, p. 148-59, Oct 2010. ISSN 1873-6300. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558278>>.

GUNDERSEN, H. J. et al. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. **J Microsc**, v. 193, n. Pt 3, p. 199-211, Mar 1999. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10348656>.

HAFTORN, S. **Contribution to the food biology of tits especially about storing of surplus food.** . Norske Vidensk. Selsk. Skr. , 1956. 54.

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. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-001-0831-2> >.

HARRINGTON, B. A.; ANTAS, P. D. Z.; SILVA, F. Observations of Common Terns in Southern Brazil, 29 April-3 May 1984. **Journal of Field Ornithology**, v. 57, n. 3, p. 222-224, Sum 1986. ISSN 0273-8570. Disponível em: < <Go to ISI>://A1986D672200005 >.

HARSANYI, K.; FRIEDLANDER, M. J. Transient synaptic potentiation in the visual cortex .1. Cellular mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 3, p. 1269-



1283, Mar 1997. ISSN 0022-3077. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997WP11600015 >.

HAUSER, F. et al. A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. **Prog Neurobiol**, v. 80, n. 1, p. 1-19, Sep 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17070981 >.

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 >.

HEIN, C. M. et al. Robins have a magnetic compass in both eyes. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. E11-2; discussion E12-3, Mar 31 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455128> >.

HOFFMANN, K. P. et al. Directional asymmetry of neurons in cortical areas MT and MST projecting to the NOT-DTN in macaques. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, n. 4, p. 2113-2123, Apr 2002. ISSN 0022-3077. Disponível em: < <Go to ISI>://000174736000042 >.

HOSHOOLEY, J. S.; SHERRY, D. F. Greater hippocampal neuronal recruitment in food-storing than in non-food-storing birds. **Dev Neurobiol**, v. 67, n. 4, p. 406-14, Mar 2007. ISSN 1932-8451. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17443797> >.

HOSSEINI-SHARIFABAD, M.; NYENGAARD, J. R. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 206-14, May 15 2007. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368561> >.

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

INAN, M. et al. Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. **J Neurosci**, v. 26, n. 16, p. 4338-49, Apr 19 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16624954 >.



ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Molecular brain research**, v. 57, n. 1, p. 1-9, 1998. ISSN 0169-328X.

JABES, A. et al. Quantitative analysis of postnatal neurogenesis and neuron number in the macaque monkey dentate gyrus. **Eur J Neurosci**, Jan 13 2010. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20074220 >.

JELINEK, H. et al. MicroMod—an L-systems approach to neuron modelling. Proceedings of the Sixth Australasia-Japan Joint Workshop on Intelligent and Evolutionary Systems, Australian National University, Canberra, 2002. p.156-163.

JEON, G. S. et al. Microglial responses in the avascular quail retina following transection of the optic nerve. **Brain Res**, v. 1023, n. 1, p. 15-23, Oct 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364014> >.

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

KALLEN, B. II. Embryogenesis of brain nuclei in the chick telencephalon. **Ergeb Anat Entwicklungsgesch**, v. 36, p. 62-82, 1962. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14030342 >.

KARPERIEN, A. FracLac for ImageJ, version 2.5. **Introduction. htm**, v. 2007, 1999.

KARPERIEN, A.; AHAMMER, H.; JELINEK, H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, 2013.

KARPERIEN, A.; AHAMMER, H.; JELINEK, H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 3, 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386810> >.

KARTEN HJ, H. W. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). . **Johns Hopkins Press**,, 1967.

KEARY, N. et al. Oscillating magnetic field disrupts magnetic orientation in Zebra finches, *Taeniopygia guttata*. **Front Zool**, v. 6, p. 25, 2009. ISSN 1742-9994 (Electronic)



1742-9994 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852792> >.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011. ISSN 0031-9333.

KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron**, v. 77, n. 1, p. 10-8, Jan 2013. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312512> >.

KEUKER, J. I.; LUITEN, P. G.; FUCHS, E. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 1, p. 157-65, Jan-Feb 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12493561 >.

KLEINROK, J. et al. [Investigations on the prevalence of headache associated with mandibular dysfunction]. **Neurol Neurochir Pol**, v. 34, n. 3, p. 475-86, May-Jun 2000. ISSN 0028-3843 (Print) 0028-3843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979542> >.

KOZOROVITSKIY, Y. et al. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 48, p. 17478-82, Nov 29 2005. 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=16299105 >.

KREBS, J. R. Food-storing birds: adaptive specialization in brain and behaviour? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 329, n. 1253, p. 153-60, Aug 29 1990. ISSN 0962-8436 (Print) 0962-8436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978360> >.

KREBS, J. R.; ERICHSEN, J. T.; BINGMAN, V. P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). **J Comp Neurol**, v. 314, n. 3, p. 467-77, Dec 15 1991. ISSN 0021-9967 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1687688 >.

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. Disponível em: <



http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2919184 >.

KUBINOVA, L.; JANACEK, J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. **Microsc Res Tech**, v. 53, n. 6, p. 425-35, Jun 15 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11525261 >.

LADAGE, L. D. et al. Ecologically relevant spatial memory use modulates hippocampal neurogenesis. **Proc Biol Sci**, v. 277, n. 1684, p. 1071-9, Apr 2010. ISSN 1471-2954. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939840> >.

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.). **Proc Biol Sci**, v. 278, n. 1702, p. 138-43, Jan 2011. ISSN 1471-2954. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20659933> >.

LARRAZÁBAL, M.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. D.; PENA, O. Monitoramento de aves limícolas na Salina diamante Branco, galinhos, Rio grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de zoologia**, v. 19, n. 4, p. 1081-1089, 2002.

LAWSON, L. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-170, 1990. ISSN 0306-4522.

LEUNER, B.; GLASPER, E. R.; GOULD, E. Parenting and plasticity. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 10, p. 465-473, 2010. ISSN 0166-2236.

LOHMANN, K. J. Sea turtles: navigating with magnetism. **Curr. Biol.**, v. 17, p. 102-104., 2007.

LUCAS, J. R.; BRODIN, A. S. R.; CLAYTON, N. S. Does hippocampal size correlate with the degree of caching specialization? . **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** , v. 271, p. 2423–29, 2004.

LUDESCHER, F.-B. Fressen und Verstecken von Samen bei der Weidenmeise *Parus montanus* im Jahresverlauf unter konstanten Ernährungsbedingungen. . **Ökologie der Vogel** v. 2, p. 135–44, 1980.

LYRA-NEVES, R. D.; DE AZEVEDO-JÚNIOR, S.; TELINO-JUNIOR, 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.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14605681 >.

MANNS, J. R.; EICHENBAUM, H. Evolution of declarative memory. **Hippocampus**, v. 16, n. 9, p. 795-808, 2006. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16881079 >.

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **J Anat**, v. 188 (Pt 1), p. 1-15, Feb 1996. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8655396 >.

MCNEIL, R. Hivernage et estivage d'oiseaux aquatiques nordaméricains dans le nord-est du Venezuela (mue, accumulation de graisse, capacité de vol et routes de migration). **L'oiseaux et la Revue Française d'Ornithologie**, v. 4, p. 185-302, 1970.

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: < 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**. 100: 5863-5866 p. 2003.

MIKI, T. et al. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus.



Anat Sci Int, v. 80, n. 3, p. 153-62, Sep 2005. ISSN 1447-6959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158978> >.

MIYAMOTO, A. et al. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 70, 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720611> >.

MONTAGNESE, C. M.; KREBS, J. R.; MEYER, G. The dorsomedial and dorsolateral forebrain of the zebra finch, *Taeniopygia guttata*: a Golgi study. **Cell Tissue Res**, v. 283, n. 2, p. 263-82, Feb 1996. ISSN 0302-766X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8593656 >.

MORRISON, R. Migration systems of some New World shorebirds. In: BURGER, J. e OLLA, B. (Ed.). **Shorebirds: migration and foraging behaviour**. New York, New Yoor, USA: Plenum Press, 1984. p.125-202.

MORRISON, R.; ROSS, R. K. **Atlas of Nearctic shorebirds on the coast of South America**. Canadian Wildlife Service Ottawa (Canada), 1989. ISBN 0662167996.

MOURITSEN, H.; RITZ, T. Magnetoreception and its use in bird navigation. **Curr Opin Neurobiol**, v. 15, n. 4, p. 406-14, Aug 2005. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006116> >.

MUHEIM, R.; MOORE, F. R.; PHILLIPS, J. B. Calibration of magnetic and celestial compass cues in migratory birds--a review of cue-conflict experiments. **J Exp Biol**, v. 209, n. Pt 1, p. 2-17, Jan 2006. ISSN 0022-0949 (Print) 0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354773> >.

MURABE, Y.; SANO, Y. Morphological studies on neuroglia. **Cell and tissue research**, v. 225, n. 3, p. 469-485, 1982. ISSN 0302-766X.

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

NADEL, J. O. K. L. The Hippocampus as a Cognitive Map **Oxford University Press**, 1978.

NAKAMURA, H.; WAKO, Y. Food storing behaviour of willow tit *Parus montanus*. . **J. Yamashina Inst. Ornithol.**, v. 20, p. 1-20, 1988.



NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, May 27 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831717> >.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005. ISSN 0036-8075.

NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. Direct and efficient stereological estimation of total cell quantities using electron microscopy. **J Microsc**, v. 222, n. Pt 3, p. 182-7, Jun 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16872417 >.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Res**, v. 34, n. 1, p. 171-5, Nov 1971. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915> >.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford: Clarendon Press.**, p. 1-296, 1978.

OBREBOWSKI, A. et al. [Diagnostic problems in a rapid course of Wegener's disease with sudden sensorineural hearing loss]. **Otolaryngol Pol**, v. 54 Suppl 31, p. 118-9, 2000. ISSN 0030-6657 (Print) 0030-6657 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974861> >.

ODUM, E. P. Annual cycle of the blackcapped chickadee 3. . **Auk** v. 59, p. 499-531, 1942.

OKANO, H.; HIRANO, T.; BALABAN, E. Learning and memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 23, p. 12403-4, Nov 7 2000. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11035781 >.

OSWALDOCRUZ, E. et al. ASYMMETRIES OF THE REPRESENTATION OF THE CONTRALATERAL VISUAL-FIELD ON AREA-17 OF THE CORTEX OF THE ANESTHETIZED AGOUTI DO NOT MATCH THE RETINAL GANGLION-CELL REGIONAL DENSITIES. **Journal of Physiology-London**, v. 422, p. P8-P8, Mar 1990. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://A1990CU50400042 >.



PEICHL, L. ALPHA GANGLION-CELLS IN MAMMALIAN RETINAE - COMMON PROPERTIES, SPECIES-DIFFERENCES, AND SOME COMMENTS ON OTHER GANGLION-CELLS. **Vis Neurosci**, v. 7, n. 1-2, p. 155-169, Jul-Aug 1991. ISSN 0952-5238. Disponível em: < <Go to ISI>://A1991GC32000018 > .

PETERSON, D. A. Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. **Methods**, v. 18, n. 4, p. 493-507, Aug 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10491280 > .

PIERSMA, T. Family Charadriidae. In: (Ed.). **Handbook of the Birds of the World**. Barcelona: Lynx Edicions, v.vol. 3, 1996.

PIERSMA, T. et al. Fuel storage rates before northward flights in Red Knots worldwide. **Birds of Two Worlds: the ecology and evolution of migration**, p. 262-273, 2005.

PITELKA, F. A.; HOLMES, R. T.; MACLEAN, S. F. Ecology and evolution of social organization in arctic sandpipers. **American Zoologist**, v. 14, n. 1, p. 185-204, 1974. ISSN 1540-7063.

POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 417-424, 2001. ISSN 1471-4892.

PRATER, A. J., MARCHANT, J. H. E VOURINEN, J. . Guide to the identification and Ageing of Holarctic Waders. **British Trust for Ornithology**, 1977.

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 > .

PRAVOSUDOV, V. V.; OMANSKA, A. Dominance-related changes in spatial memory are associated with changes in hippocampal cell proliferation rates in mountain chickadees. **J Neurobiol**, v. 62, n. 1, p. 31-41, Jan 2005. ISSN 0022-3034. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15389686> > .

PRAVOSUDOV, V. V. et al. Differential hippocampal gene expression is associated with climate-related natural variation in memory and the hippocampus in food-



caching chickadees. **Mol Ecol**, v. 22, n. 2, p. 397-408, Jan 2013. ISSN 1365-294X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23205699> >.

RAIVICH, G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 11, p. 571-3, Nov 2005. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16165228> >.

RAIVICH, G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain research reviews**, v. 30, n. 1, p. 77-105, 1999. ISSN 0165-0173.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 119-145, 2009. ISSN 0732-0582.

RATTENBORG, N.; MARTINEZ-GONZALEZ, D. A bird-brain view of episodic memory. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 236-245, 2011. ISSN 0166-4328.

RATTENBORG, N. C.; MARTINEZ-GONZALEZ, D. A bird-brain view of episodic memory. **Behav Brain Res**, v. 222, n. 1, p. 236-45, Sep 2011. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420438> >.

RATTENBORG, N. C. et al. Hippocampal memory consolidation during sleep: a comparison of mammals and birds. **Biological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 658-691, 2011. ISSN 1469-185X.

RODRIGUES. **Aves da Reserva biológica do Lago Piratuba e Entorno, Amapá, Brasil**. PROBIO. Amapá, p.218. 2006

RODRIGUES, A. A. F. **Migrações, Abundância Sazonal e Alguns Aspectos Sobre a Ecologia de Aves Limícolas na Baía de São Marcos, Marabá-Brasil**. Belém. 1993. (Dissertação de Mestrado)

_____. Cajual Island wildlife research and conservation station, Gulf of Maranhão, Brazil. **Wader Study Group Bulletin**, v. 80: 79, 1996.

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 Sucuriju e Região do lago, Amapá:**



Relatório Final PROBIO. Macapá: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, p. 188-195, 2006.

RODRIGUEZ, F. et al. Conservation of Spatial Memory Function in the Pallial Forebrain of Reptiles and Ray-Finned Fishes. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 7, p. 2894-2903, April 1, 2002. Disponível em: < <http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/22/7/2894> >.

ROSA, M. G. P.; GATTASS, R.; SOARES, J. G. M. A QUANTITATIVE-ANALYSIS OF CYTOCHROME OXIDASE-RICH PATCHES IN THE PRIMARY VISUAL-CORTEX OF CEBUS MONKEYS - TOPOGRAPHIC DISTRIBUTION AND EFFECTS OF LATE MONOCULAR ENUCLEATION. **Experimental Brain Research**, v. 84, n. 1, p. 195-209, 1991. ISSN 0014-4819. Disponível em: < <Go to ISI>://A1991FD25700019 >.

ROTH, T. C., 2ND et al. Variation in hippocampal glial cell numbers in food-caching birds from different climates. **Dev Neurobiol**, v. 73, n. 6, p. 480-5, Jun 2013. ISSN 1932-846X (Electronic) 1932-8451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382130> >.

ROTH, T. C. 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 2012. ISSN 1471-2954. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21715407> >.

RUSS, J. C.; ROVNER, I. Stereological identification of opal phytolith populations from wild and cultivated Zea. **American antiquity**, p. 784-792, 1989. ISSN 0002-7316.

SALLAZ, L. et al. [Chondrosarcoma of the infratemporal fossa with intracranial extension. Case report and review of the literature]. **Rev Stomatol Chir Maxillofac**, v. 101, n. 3, p. 138-41, Jun 2000. ISSN 0035-1768 (Print) 0035-1768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981298> >.

SALWICZEK, L. H.; WATANABE, A.; CLAYTON, N. S. Ten years of research into avian models of episodic-like memory and its implications for developmental and comparative cognition. **Behav Brain Res**, v. 215, n. 2, p. 221-34, Dec 2010. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600352> >.

SANDI, C.; ROSE, S. P.; PATTERSON, T. A. Unilateral hippocampal lesions prevent recall of a passive avoidance task in day-old chicks. **Neurosci Lett**, v. 141, n. 2, p. 255-8, Jul 20 1992. ISSN 0304-3940 (Print). Disponível em: <



http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1436644 >.

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

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 >.

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

SCHWASSMANN, H. O. ASPECTS OF RETINOTECTAL TOPOGRAPHY - TECTAL MAGNIFICATION OF SPECIALIZED RETINAL AREAS AND A POSSIBLE CENTER FOR BINOCULAR INPUT. **Journal of Experimental Zoology**, p. 117-120, 1990. ISSN 0022-104X. Disponível em: < <Go to ISI>://A1990FK90600015 >.

SHEFI, O. et al. Biophysical constraints on neuronal branching. **Neurocomputing**, v. 58, p. 487-495, 2004. ISSN 0925-2312.

SHERRY; VACCARINO, A. L. Hippocampus and Memory for Food Caches in Black-Capped Chickadees. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 308-318, Apr 1989. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <Go to ISI>://A1989U042800009 >.

SHERRY et al. The hippocampal complex of food-storing birds. **Brain Behav Evol**, v. 34, n. 5, p. 308-17, 1989. ISSN 0006-8977 (Print) 0006-8977 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2611638> >.

SHERRY, D. F. The hippocampus of food-storing birds. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 78, n. 2, p. 133-135, 2011. ISSN 1421-9743.

SHERRY, D. F.; HOSHOOLEY, J. S. Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1542, p. 933-43, Mar 2010. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156817> >.

SHIN, D. H.; LEE, E.; CHO, S. S. Glial cells in the chicken optic tectum. **Brain research**, v. 962, n. 1, p. 221-225, 2003. ISSN 0006-8993.



SICK, H. Migração de aves na América do Sul continental. **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, v. II, p. 86, 1983.

SICK, H. **Migração de aves na América do Sul continental**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. II: 86p p. 1997.

SILVEIRA, L. C. L.; YAMADA, E. S.; PICANCODINIZ, C. W. DISPLACED HORIZONTAL CELLS AND BIPLEXIFORM HORIZONTAL CELLS IN THE MAMMALIAN RETINA. **Vis Neurosci**, v. 3, n. 5, p. 483-488, 1989. ISSN 0952-5238. Disponível em: < <Go to ISI>://A1989CE21100010 >.

SIMAS, M. L. D.; DASILVA, J. A. BRAZILIAN STUDIES ON VISUAL PSYCHOPHYSICS AND NEUROPHYSIOLOGY. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 27, n. 3, p. 249-252, May 1989. ISSN 0090-5054. Disponível em: < <Go to ISI>://A1989U424400016 >.

SOLTYS, Z. et al. Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. **J Neurosci Methods**, v. 146, n. 1, p. 50-60, Jul 2005. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935220> >.

SPAANS, A. L. Status numerical fluctuations of some North American waders along the Surinam coast. . **Wilson Bulletin**, v. 60-83, 1978.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 872-83, Nov 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17948032 >.

STENSAAS, L. J.; STENSAAS, S. S. Light microscopy of glial cells in turtles and birds. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v. 91, n. 3, p. 315-40, 1968. ISSN 0340-0336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4894065> >.

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

STREIT, W. J.; KREUTZBERG, G. W. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 268, n. 2, p. 248-263, 1988. ISSN 1096-9861.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563-581, 1999. ISSN 0301-0082.



SZEKELY, A. D. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. **Behav Brain Res**, v. 98, n. 2, p. 219-25, Feb 1 1999. ISSN 0166-4328 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10683110 >.

SZEKELY, A. D.; KREBS, J. R. Efferent connectivity of the hippocampal formation of the zebra finch (*Taenopygia guttata*): an anterograde pathway tracing study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J Comp Neurol**, v. 368, n. 2, p. 198-214, Apr 29 1996. ISSN 0021-9967 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8725302 >.

TARR, B. A. et al. Captivity reduces hippocampal volume but not survival of new cells in a food-storing bird. **Dev Neurobiol**, v. 69, n. 14, p. 972-81, Dec 2009. ISSN 1932-846X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19813245> >.

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.

TREMBLAY, M. et al. The role of microglia in the healthy brain. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16064-9, Nov 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072657> >.

VELLEMA, M.; VAN DER LINDEN, A.; GAHR, M. Area-specific migration and recruitment of new neurons in the adult songbird brain. **J Comp Neurol**, v. 518, n. 9, p. 1442-59, May 1 2010. ISSN 1096-9861 (Electronic) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20187140> >.

VIANA, L. C. et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: Stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v. 238, p. 280-96, May 2013. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454543> >.

VICENTE, E. et al. Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 771-7, Sep 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15288508 >.

VOSS, J.; KEARY, N.; BISCHOF, H. J. The use of the geomagnetic field for short distance orientation in zebra finches. **Neuroreport**, v. 18, n. 10, p. 1053-7, Jul 2 2007. ISSN 0959-4965 (Print)



0959-4965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558295>>.

VUKOVIC, J. et al. Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. **J Neurosci**, v. 32, n. 19, p. 6435-43, May 2012. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573666> >.

WAKE, H. et al. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 4, p. 209-17, Apr 2013. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23260014> >.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system—beyond the immune response. **Neuron Glia Biology**, v. 7, n. 01, p. 47-53, 2011. ISSN 1741-0533.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system - beyond the immune response. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011. ISSN 1741-0533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22613055> >.

WEIBEL, E. R. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. **J Microsc**, v. 155, n. Pt 3, p. 393-403, Sep 1989. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2795652>.

WEST, M. J. Design-based stereological methods for counting neurons. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 43-51, 2002. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12143362>.

WIKIPEDIA. **Bluffer's Park (Toronto, Canada, 2005)**: Bluffer's Park (Toronto, Canada, 2005) p. 2005.

_____. **Semipalmated Sandpiper** Cobourg, Ontario, Canada Wikipedia, the free encyclopedia. 206 KB 2006.

WILTSCHKO, R.; WALKER, M.; WILTSCHKO, W. Sun-compass orientation in homing pigeons: compensation for different rates of change in azimuth? **J Exp Biol**, v. 203, n. Pt 5, p. 889-94, Mar 2000. ISSN 0022-0949 (Print)
0022-0949 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667971>>.



WILTSCSKO, W.; WILTSCSKO, R. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 10, p. 445-52, Oct 2002. ISSN 0028-1042 (Print)
0028-1042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384718> >.

_____. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 191, n. 8, p. 675-93, Aug 2005. ISSN 0340-7594 (Print) 0340-7594 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886990> >.

_____. Global navigation in migratory birds: tracks, strategies, and interactions between mechanisms. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22, n. 2, p. 328-35, Apr 2012. ISSN 1873-6882 (Electronic)
0959-4388 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22244742> >.

WYLIE, D. R.; FROST, B. J. BINOCULAR NEURONS IN THE NUCLEUS OF THE BASAL OPTIC ROOT (NBOR) OF THE PIGEON ARE SELECTIVE FOR EITHER TRANSLATIONAL OR ROTATIONAL VISUAL FLOW. **Vis Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 489-495, Nov 1990. ISSN 0952-5238. Disponível em: < <Go to ISI>://A1990EL67500008 >.

YANG, T. C. et al. On the role of CD4+ T cells in the CD8+ T-cell response elicited by recombinant adenovirus vaccines. **Mol Ther**, v. 15, n. 5, p. 997-1006, May 2007. ISSN 1525-0016 (Print)
1525-0016 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17375073 >.

ZANOLI, P.; CANNAZZA, G.; BARALDI, M. Prenatal exposure to methyl mercury in rats: focus on changes in kynurenine pathway. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 2, p. 235-8, May 15 2001. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11470321 >.

ZELINKA, C. P. et al. The reactivity, distribution and abundance of Non-astrocytic Inner Retinal Glial (NIRG) cells are regulated by microglia, acute damage, and IGF1. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44477, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22973454> >.

ZIELASEK, J.; HARTUNG, H.-P. Molecular mechanisms of microglial activation. **Advances in neuroimmunology**, v. 6, n. 2, p. 191-222, 1996. ISSN 0960-5428.



ZIV, Y. et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. **Nat Neurosci**, v. 9, n. 2, p. 268-75, Feb 2006. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415867> >.

ZIV, Y.; SCHWARTZ, M. Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 2, p. 167-76, Feb 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17905567 >.