



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

MARCUS AUGUSTO DE OLIVEIRA

**EM DIREÇÃO À COSTA BRASILEIRA FUGINDO DO INVERNO:
ROTAS MIGRATÓRIAS CONTRASTANTES E PLASTICIDADE
DIFERENCIAL DOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS**

BELÉM-PARÁ

2018

MARCUS AUGUSTO DE OLIVEIRA

**EM DIREÇÃO À COSTA BRASILEIRA FUGINDO DO INVERNO:
ROTAS MIGRATÓRIAS CONTRASTANTES E PLASTICIDADE
DIFERENCIAL DOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS**

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

Orientador:

Prof. Dr. Cristovam Wanderley
Picanço Diniz

BELÉM-PARÁ 2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

D278d De Oliveira, Marcus Augusto.
EM DIREÇÃO À COSTA BRASILEIRA FUGINDO DO INVERNO: ROTAS MIGRATÓRIAS
CONTRASTANTES E PLASTICIDADE DIFERENCIAL DOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS / Marcus
Augusto De Oliveira. — 2018.
73 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (), Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Aves Marinhas. 2. Migração. 3. Morfologia. 4. Astrócitos. 5. Cognição. I. Título.

CDD 573.8

MARCUS AUGUSTO DE OLIVEIRA

**EM DIREÇÃO À COSTA BRASILEIRA FUGINDO DO INVERNO:
ROTAS MIGRATÓRIAS CONTRASTANTES E PLASTICIDADE
DIFERENCIAL DOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS**

Apresentado em: 04 de Dezembro de 2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Orientador

Profa. Dra.

Marcis Consentino Kronka Sosthenes (Titular)

Profa. Dra.

Roseane Borner de Oliveira (Titular)

Prof. Dr.

João Bento Torres Neto (Titular)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Vânia Oliveira, que contra todas as expectativas, foi forte o suficiente pra levar eu e meu irmão ao lugar onde chegamos. Obrigado por ser o melhor exemplo que um filho, um amigo, um homem poderia ter. Essa tese é sua, foi sua garra, seu esforço e seu amor que materializou isso, eu só fiz o dever de casa. Mesmo distantes, eu vou estar sempre ao seu lado, especialmente nos momentos difíceis, porque foi isso que a senhora fez conosco, mostrando incansavelmente que deveríamos estudar, correr atrás, cair, mas logo levantar e observar as possibilidades, ser reto de caráter e trabalhar duro não importa o cenário. Aprendi tudo o que pude e continuo aprendendo todos os dias ao seu lado. Obrigado pelo prazer da sua companhia, pelas conversas, conselhos e puxões de orelha. Eu te amo incondicionalmente e daria minha vida pela sua. Obrigado, Mãe!

Ao meu irmão, Marcelo Augusto de Oliveira, que foi a maior parte da minha vida como um pai, sofrendo e nunca desistindo de me mostrar como as coisas deveriam ser feitas. Das, eu realmente não tenho palavras pra agradecer tudo o que fizestes e fazes por mim, sem ti eu realmente não seria nada. Obrigado por ser um exemplo ao meu lado, e por cuidar sempre de mim. Obrigado por mesmo longe arrumar um tempinho quando preciso conversar. Eu te amo, e vou estar pra sempre ao teu lado, sempre!

À minha esposa Gabriela Arrifano de Oliveira, eu preciso que você saiba o quanto sua chegada transformou a minha vida e me ajudou a chegar até aqui. São 13 anos de pesadelos e sonhos que nos deixam mais sólidos e serenos a cada dia. Algumas vezes um cai, outras vezes o outro, mas sempre um de nós está de pé, puxando o outro e ajudando a seguir. Obrigado por compartilhar sua vida comigo e me fazer gostar de compartilhar a minha; Obrigado por me dar uma filha, uma família e um lar pra onde voltamos com pressa todos os dias porque é o melhor lugar do mundo, e é onde somos recebidos todos os dias como se tivéssemos passado um ano longe (Zola e Kacau sempre na porta e com os narizes quebrados); Obrigado por ser um exemplo, por brigar pelo que acredita e por me mostrar o caminho quando as coisas parecem difíceis. Essa tese deveria ter os nossos nomes, porque sinto que você esteve comigo em cada cálculo, cada palavra, cada figura, cada tropeço e cada vitória. Muito obrigado por tudo, Bidu, pra sempre!

À minha filha e melhor amiga Fernanda, por me fazer sentir o melhor amor do mundo e por cuidar de mim quando a Gabriela não está. Meu amor, o pai ama você mais do que tudo nesse mundo e vai fazer tudo pra que você cresça do jeitinho que você é hoje: responsável, estudiosa, honesta, e com o melhor caráter desse mundo. Você nunca vai estar sozinha, meu amor, eu sempre vou estar com você pra tudo e qualquer coisa. Te amo, Fidu!

Ao meu orientador Cristovam Diniz, por ter me dado a chance de começar e por tudo que cresci com o nosso contato. Obrigado, professor!

Aos Laboratórios (Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção; Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia; AFAR – Advanced Facilities for Avian Research, CA da Universidade de Western Ontario) e seus integrantes que contribuíram de forma crítica, em especial: Patrick Pereira, Ediely Henrique, Diego Miranda e Lucas Siqueira.

RESUMO

Um dos maiores eventos sazonais do planeta é a migração de aves partindo do polo Ártico em direção ao hemisfério sul fugindo do inverno e retornando ao Ártico durante a primavera para o período reprodutivo. Bilhões de indivíduos precisam se lembrar das rotas aprendidas durante essa jornada épica, e encontrar os mesmos lugares para descansar e se alimentar. Esses pássaros podem navegar milhares de quilômetros com grande precisão, utilizando-se de suas memórias espacial e temporal associadas ao hipocampo, uma área-chave para a realização dessa tarefa. Recentemente, demonstramos que o maçarico semipalmado *Calidris pusilla*, depois de atravessar o Atlântico em direção à costa da América do Sul, revelou mudanças significativas em seus astrócitos do hipocampo. De fato, os astrócitos do hipocampo das aves capturadas no litoral de Bragança no Brasil, em comparação com os do hipocampo de indivíduos capturados na Baía de Fundy, no Canadá, eram menos numerosos e exibiam ramos encolhidos. No presente trabalho, utilizamos outro maçarico semipalmado, o *Charadrius semipalmatus*, que apesar de ter os mesmos pontos de início e término de migração do *C. pusilla*, usa uma estratégia migratória diferente, realizando um voo sobre o continente com paradas para descanso e alimentação ao longo da rota. Apropriando-nos da oportunidade oferecida pelos voos migratórios contrastantes, testamos a hipótese de que os astrócitos de pássaros em período de invernada da espécie *C. semipalmatus* capturados no litoral de Bragança (Brasil) mostrariam maiores complexidades morfológicas do que os astrócitos do hipocampo dessas aves migratórias capturadas na Baía de Fundy (Canadá). Baseados no fato de que as paradas para repouso e alimentação, assim como a mudança constante na paisagem constituiriam um ambiente enriquecido esperávamos encontrar um aumento da complexidade em *C. semipalmatus* em vez da redução em complexidade encontrada previamente em *C. pusilla*. Para testar essa hipótese, comparamos as características

morfológicas tridimensionais (3-D) dos astrócitos do *C. semipalmatus* adultos capturados na Baía de Fundy (n = 265 células) com as das aves capturadas na região costeira de Bragança, Brasil, durante o período de invernada (n = 242 células), e comparamos com os resultados obtidos com o *C. pusilla*. O programa Neurolucida foi utilizado para reconstruções tridimensionais e a análise de agrupamentos hierárquicos de astrócitos foi usada para classificar células. Essa análise mostrou duas famílias de astrócitos, que denominamos Tipo I e Tipo II, com base em várias características morfológicas. Contrariando nossa expectativa, os fenótipos Tipo I e Tipo II mostraram em média, independente da espécie, menor complexidade morfológica após a migração e essa variação foi significativamente maior no Tipo I do que no Tipo II. As magnitudes dessas alterações na complexidade morfológica foram significativamente maiores em *C. pusilla* do que em *C. semipalmatus*. Em conjunto, essas descobertas sugerem que estratégias contrastantes de voo migratório de longa distância podem afetar diferencialmente a morfologia dos astrócitos e que morfologias distintas de astrócitos podem estar associadas a diferentes papéis funcionais durante a migração.

Palavras-chave: aves marinhas, migração, hipocampo, morfologia dos astrócitos, *Charadrius semipalmatus*, *Calidris pusilla*.

ABSTRACT

One of the largest seasonal events on the planet is the migration of birds from the Arctic to the southern hemisphere fleeing from winter and returning to the Arctic during the spring to the breeding season. Billions of individuals need to remember the routes learned during this epic journey and find the same places to rest and feeding. These birds can navigate thousands of miles with great accuracy, utilizing their spatial and temporal memories associated with the hippocampus, a key area for accomplishing this task. Recently, we have shown that the semipalmated sandpiper *Calidris pusilla*, after crossing the Atlantic towards the coast of South America, revealed significant changes in its hippocampal astrocytes. In fact, the hippocampal astrocytes of birds captured on the coast of Bragança in Brazil, compared with those of the hippocampus of individuals caught in the Bay of Fundy, Canada, were less numerous and exhibited shrunken branches. In the present work, we used another semipalmated shorebird, *Charadrius semipalmatus*, which, although having the same start and end points of *C. pusilla* migration, uses a different migratory strategy, performing a flight over the continent with stops for rest and feeding. Taking advantage of the opportunity offered by contrasting migratory flights, we tested the hypothesis that wintering bird species of the *C. semipalmatus* caught on the coast of Bragança (Brazil) would show greater morphological complexities than the hippocampal astrocytes of these migratory birds captured in the Bay of Fundy (Canada). Since the stands for food and rest, as well as the constant change in the landscape would constitute an enriched environment of multisensory stimuli, we expected to find in the individuals of *C. semipalmatus* captured in Bragança, an increase of the complexity, in opposition to the reduction in complexity previously found in *C. pusilla*. To test this

hypothesis, we compared the three-dimensional (3-D) morphological characteristics of the adult *C. semipalmatus* astrocytes captured in the Bay of Fundy (n = 265 cells) with those of wintering birds captured in the coastal region of Bragança, Brazil, (n = 242 cells), and compared with the results obtained with *C. pusilla*. The NeuroLucida program was used for three-dimensional reconstructions and the hierarchical cluster analysis (Ward's method) was used to classify cells. This analysis showed two families of astrocytes, which we designated Type I and Type II, based on several morphological characteristics. Contrary to our expectations, Type I and Type II phenotypes showed, on average, independently of the species, lower morphological complexity after migration, and this reduction was significantly higher in Type I than in Type II. The magnitudes of these changes were significantly higher in *C. pusilla* than in *C. semipalmatus*. Taken together, these findings suggest that contrasting long-distance migratory flight strategies may differentially affect the astrocyte morphology and that distinct astrocyte morphologies may be associated with different functional roles during migration.

Key words: seabirds, migration, hippocampus, astrocyte morphology, *Charadrius semipalmatus*, *Calidris pusilla*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem de um exemplar da espécie <i>Charadrius semipalmatus</i> (Fonte: https://www.allaboutbirds.org).....	2
Figura 2. Mapa identificando as áreas de reprodução (em amarelo) e as áreas de invernada (em azul) habitadas pela espécie <i>Charadrius semipalmatus</i> . (Modificado de NatureServe 2007).....	3
Figura 3. Circuitos neurais que colocariam o hipocampo como um centro de processamento, integração e recuperação de informações sobre mapas e bússolas, envolvidas no processo de migração	5
Figura 4. Representação esquemática do azimute solar	7
Figura 5. Representação gráfica de um experimento demonstrando o uso da bússola solar associada ao ciclo circadiano.	8
Figura 6. Representação esquemática do uso da bússola celestial na navegação.....	9
Figura 7. Modelo esquemático representando as vias neurais envolvidas no processamento da bússola celestial.....	10
Figura 8. Modelo esquemático demonstrando o uso da biobússola magnética.....	11
Figura 9. Representação esquemática do hipocampo e giro denteado dos mamíferos e suas áreas homólogas nas aves.....	14
Figura 10. Ilustração do parcelamento da formação parahipocampal e hipocampo propriamente dito.	16
Figura 11. Esquema ilustrativo da diversidade morfológica dos astrócitos.....	17
Figura 12. Imagem da neurovasculatura coberta por processos astrogliais.	19
Figura 13. Comparação das complexidades morfológicas entre astrócitos, imunomarcados para GFAP.....	21
Figura 14. Fotomicrografias de baixo ganho da secção da formação hipocampal de <i>C. semipalmatus</i> imunomarcada com anticorpo anti-GFAP para definir os limites da área de interesse e a estratégia de amostragem. D-G representam um astrócito fotografado em vários ganhos	27
Figura 15. Fotomicrografias da região hipocampal de um exemplar da espécie <i>C. semipalmatus</i> , capturado em período de invernada na costa bragantina, ilustrando uma célula astrocítica em vários ganhos.....	31
Figura 16. Reconstruções tridimensionais de astrócitos encontrados na região hipocampal do <i>C. pusilla</i> . A e B representam uma célula do Tipo I com seu respectivo dendrograma. C e D representam uma célula do Tipo II com seu respectivo dendrograma. E e F representam uma glia radial com seu respectivo dendrograma.....	32
Figura 17. Representações gráficas da morfologia dos astrócitos da formação hipocampal de aves em migração (Canadá) da espécie <i>Charadrius semipalmatus</i> . Cluster, gráfico e tabela da análise discriminante e testes t para complexidade e volume do convex hull	33
Figura 18. Representações gráficas da morfologia dos astrócitos da formação hipocampal de aves em periodo de invernada (Brasil) da espécie <i>Charadrius semipalmatus</i> . Cluster, gráfico e tabela da análise discriminante e testes t para complexidade e volume do convex hull.....	34
Figura 19. Representações gráficas dos valores médios e respectivos erros padrão das variáveis morfométricas dos astrócitos reconstruídos tridimensionalmente a partir de	

secções do hipocampo das espécies <i>C. pusilla</i> e <i>C. semipalmatus</i> no período de migração (Baía de Fundy – Canadá) e no período de invernada (Bragança – Brasil).....	35
Figura 20. Representações gráficas dos valores de complexidade nas duas espécies <i>C. pusilla</i> e <i>C. semipalmatus</i>	36
Figura 21. Representações gráficas dos astrócitos do Tipo I e Tipo II de <i>C. semipalmatus</i> e <i>C. pusilla</i> no período de migração (Baía de Fundy – Canadá) e invernada (Bragança – Brasil), reconstruídos tridimensionalmente.....	37
Figura 22. Reconstruções tridimensionais de astrócitos médios com seus respectivos dendrogramas, representando as células do Tipo I e Tipo II das aves em migração (Baía de Fundy – Canadá) e células do Tipo I e Tipo II das aves em período de invernada (Bragança – Brasil).....	38
Figura 23. Ilustração da disposição celular demonstrando a posição relativa dos astrócitos Tipo I e Tipo II em relação à vasculatura e aos neurónios.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medidas morfológicas microscópicas a partir de reconstruções tridimensionais realizadas com o software Neurolucida.....	29
---	----

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. A Espécie <i>Charadrius semipalmatus</i> como Modelo para Investigação da neuroecologia de Aves Marinhas Migratórias.....	1
1.2. Aves Migratórias e Circuitos Neurais Envolvidos na Navegação: A Importância do Hipocampo.....	4
1.3. A Formação Hipocampal das Aves.....	13
1.4. Morfologia de Astrócitos.....	17
2. Objetivos.....	23
2.1. Geral.....	23
2.2. Específicos.....	23
3. Material e métodos.....	24
3.1 Perfusão e Histologia.....	24
3.2 Imunohistoquímica.....	24
3.3 Reconstrução tridimensional de astrócitos e morfologia quantitativa.....	25
3.4 Análise e estatística multivariada dos parâmetros morfométricos.....	26
3.5 Análise Estatística.....	30
4. Resultados.....	31
5. Discussão.....	39
5.1. Voos Contrastantes de Longa Duração e Morfologia de Astrócitos: Influências Potenciais de Outras Variáveis.....	40
5.2. Ambiente enriquecido e Exercício Durante a Migração Outonal.....	44
6. Conclusão.....	45
7. Referências.....	46
ANEXO 1: Valores de t e p para os gráficos.....	53
ANEXO 2: Autorizações de Órgãos Reguladores do Uso de Animais Silvestres.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Espécie *Charadrius semipalmatus* como Modelo de Investigação da Neuroecologia de Aves Marinhas Migratórias

A migração das aves envolvendo bilhões de indivíduos, estendendo-se do Ártico até à Antártica (Louchart 2008), é um dos maiores acontecimentos sazonais do planeta (<https://www.youtube.com/watch?v=mDz3w3PwVtg>). Normalmente essas rotas migratórias interconectam pontos de reprodução e invernada. Cerca de 40 espécies que habitam e se reproduzem no Hemisfério Norte migram para o Hemisfério Sul durante o inverno (Mestre 2007, Campos 2008). Durante a temporada de reprodução, a espécie migra em direção norte e retorna às regiões árticas e subárticas da América do Norte. Nesse período, essas aves se reproduzem em áreas entre o Alasca e Nova Escócia (Sick 1997).

A migração ocorre em pequenos ou grandes grupos até alcançarem o Caribe, a América Central e a Costa brasileira (Nobrega, Aguiar et al. 2015). Tais migrações, quando de longas distancias, podem ser feitas de duas principais maneiras: a primeira é feita em voos diretos, sem paradas, a exemplo da espécie *Calidris pusilla* (Figura 1a). Essa espécie completa um voo sem parada de mais do que 5000 Km sobre o atlântico desde a costa leste da América do Norte até alcançar a costa Norte e Central da América do Sul (Hicklin 2010, Brown 2014). A segunda é realizada com múltiplas paradas para descanso e alimentação, e um exemplo dessa estratégia migratória é a do *Charadrius semipalmatus* (Figura 1b). Esse modelo de migração parece envolver maior diversidade de ambientes e menor esforço sustentado, reduzindo o stress encontrado nos voos ininterruptos.

Um das primeiras hipóteses para tentar entender os motivos que levam aves migratórias empreenderem longas e perigosas jornadas, como a migração do norte da América do Norte até o sul da América do Sul, defendia que tais aves precisariam empreender migrações sazonais por não possuírem capacidade cognitiva suficiente para lidar com as mudanças drásticas de temperatura (Sol, Lefebvre et al. 2005). Mais recentemente, outro possível motivo, mais razoável, demonstra que ninhos de aves migratórias em locais com maiores latitudes apresentam um menor risco de predação (McKinnon, Smith et al. 2010), indicando fortes razões para a realização de tais jornadas periódicas.

O *Charadrius semipalmatus*, popularmente conhecido como Batuúra-de-Bando, pertence à família *Charadriidae* e à ordem dos Charadriiformes. Indivíduos adultos dessa espécie tem peso e tamanho que variam entre 28 e 69g e 17 e 19cm (Van Gils 1996, Smith 2000).

Essa espécie é territorialista, geralmente gregária, com dimorfismo sexual bem definido na coloração da plumagem e comprimento das asas. Os adultos possuem as plumagens superiores marrom escuras e as inferiores brancas em ambas as temporadas, de reprodução e de invernada. As fêmeas são ligeiramente maiores do que os machos (Cramp 1983, Teather 1997 , Nol 1999)

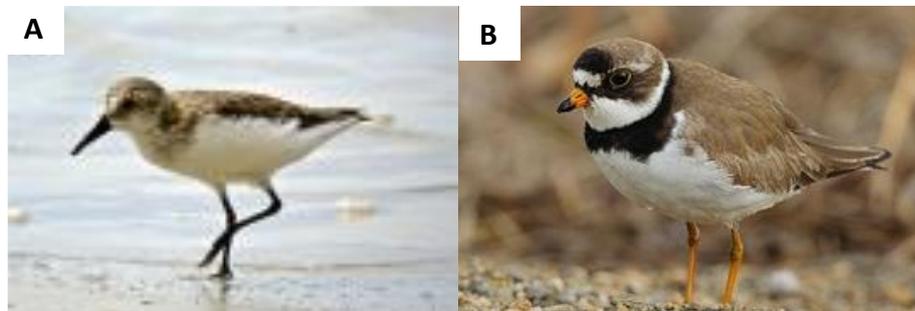


Figura 1. A- Imagem de um exemplar da espécie *Calidris pusilla* (Diniz, Magalhaes et al. 2016) B- Imagem de um exemplar da espécie *Charadrius semipalmatus* (Fonte: <https://www.allaboutbirds.org>).

Nos seus habitats de reprodução, essa ave prefere ocupar áreas abertas em terrenos de areia ou musgosos. Na Baía de Fundy, o primeiro ponto de parada rumo ao litoral brasileiro, seus principais *habitats* são arenques, salinas e lamas. Já em solos onde passam o período de invernada, seus *habitats* incluem praias, lagos e baías (Hicklin 1987, Nol 1999).

Com o objetivo de se proteger do rigoroso inverno nas regiões árticas, essa espécie viaja até a Baía de Fundy (Canadá), e então até a terra do fogo (Argentina), com vários pontos de parada para descanso (Figura 2). Tais pontos de parada estão distribuídos ao longo da costa dos Estados Unidos e Caribe, alcançando a costa brasileira entre agosto e setembro, permanecendo até março e abril (Sick 1997, Nol 1999 , Barbieri 2000).

Existe uma enorme diversidade de sítios de parada na costa brasileira, desde o estado do Amapá até o Rio Grande do Sul, sendo esses pontos fundamentais para a conservação dessas

espécies (Telino-Júnior 2003). Tais pontos de parada selecionados ao longo da migração em direção Sul, com temperaturas mais amenas, são fonte de alimentos que garantem o acúmulo de energia necessária ao término da viagem (Azevedo-Júnior 2001a.)

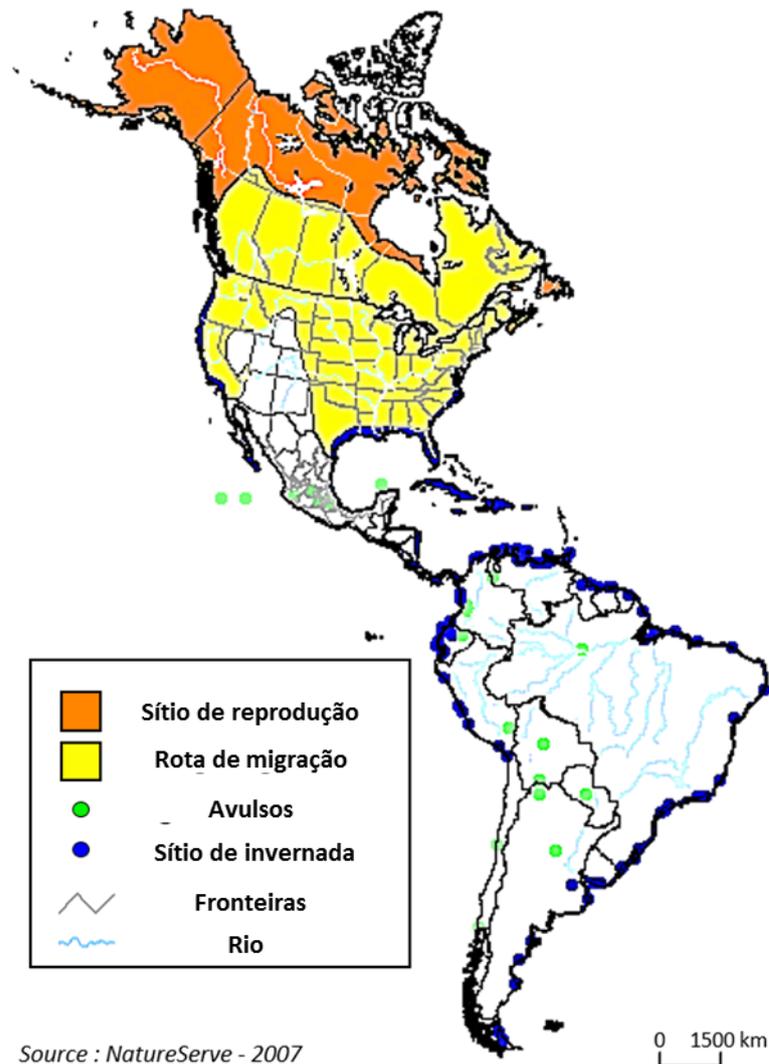


Figura 2. Mapa identificando as áreas de reprodução (em amarelo) e as áreas de invernada (em azul) habitadas pela espécie *Charadrius semipalmatus*. (Modificado de NatureServe - 2007).

O norte do Brasil é considerado uma importante porta de entrada para muitas dessas aves (Azevedo-Júnior 1994.) e o nordeste paraense é um dos sítios eleitos para invernada, por apresentar grande disponibilidade de alimentos para acúmulo da reserva energética necessária à migração de volta ao Ártico, além de possuir clima adequado para a troca de penas. A costa

de Bragança em particular, é eleita por uma variedade de espécies de aves marinhas migratórias incluindo o *Charadrius semipalmatus*, de particular interesse para o presente trabalho.

1.2. Aves migratórias e circuitos neurais envolvidos na navegação: a importância do hipocampo

Aves migratórias podem navegar milhares de quilômetros com enorme precisão. Tal navegação é um processo complexo que envolve a integração de muitas fontes de informação sensorial especializadas, provenientes de pistas disponíveis nos espaços próximos e distantes (Frost and Mouritsen 2006).

Uma literatura vasta e crescente demonstra que a formação hipocampal das aves é essencial para a memória e o aprendizado espacial (Sherry, Vaccarino et al. 1989, Colombo, Cawley et al. 1997, Gagliardo, Ioale et al. 1999, Shiflett, Smulders et al. 2003, Kahn and Bingman 2009, Herold, Coppola et al. 2015). Um exemplo convincente de tal envolvimento, é o de que o hipocampo de pássaros que estocam alimentos possui um volume maior do que o dos pássaros que não estocam (Krebs, Sherry et al. 1989). Um outro exemplo é o de que espécies de pássaros migratórios também apresentam um volume hipocampal maior quando comparados ao hipocampo dos pássaros que não migram (Pravosudov, Kitaysky et al. 2006). Esse volume é calculado tendo em conta o volume telencefálico total para que se estime a razão entre os volumes do hipocampo e do telencéfalo, removendo assim possível viés induzido pela variação de tamanho dos espécimes coletados. Essa razão (hipocampo/telencéfalo) é maior nos pássaros que estocam alimentos e naqueles que migram quando comparamos com as razões estimadas para as aves que não estocam alimentos ou que não migram.

Em humanos, já foi demonstrado mudanças na volumetria hipocampal relacionado à memória espacial. Com o uso de ressonância magnética, foi observado correlação entre o volume do hipocampo posterior e o tempo de trabalho em taxistas (Maguire, Gadian et al. 2000) e entre taxistas e motoristas de ônibus (Maguire, Woollett et al. 2006). Essas modificações ocorridas no hipocampo são fortemente relacionadas ao uso e construção de mapas espaciais de orientação (Erickson, Voss et al. 2011, Schriber, Anbari et al. 2017, Bootsman, Skinner et al. 2018).

Muitos estudos sugerem que o hipocampo atua como um centro de integração multissensorial, interagindo com estruturas que contêm mapas e bússolas, controlando constantemente as direções e alvos da migração (Figura 3), revisado por (Mouritsen, Heyers et al. 2016). Algumas áreas do cérebro das aves, com conexões com o hipocampo, podem suscitar homologias com o cérebro dos mamíferos. A área corticoidea dorsolateral, por exemplo, é comparável ao giro cingulado do mamífero. Já o nidopallium é comparável ao córtex pré-frontal (Csillag and Montagnese 2005). O entopallium, frequentemente comparado à via geniculoparietal no primata causa, quando lesionado, prejuízo em tarefas de discriminação espacial (Watanabe, Mayer et al. 2011). Algumas outras áreas, como o hyperpallium, ainda não possuem evidências suficientes para sustentar alguma homologia com alguma área específica do cérebro do mamífero.

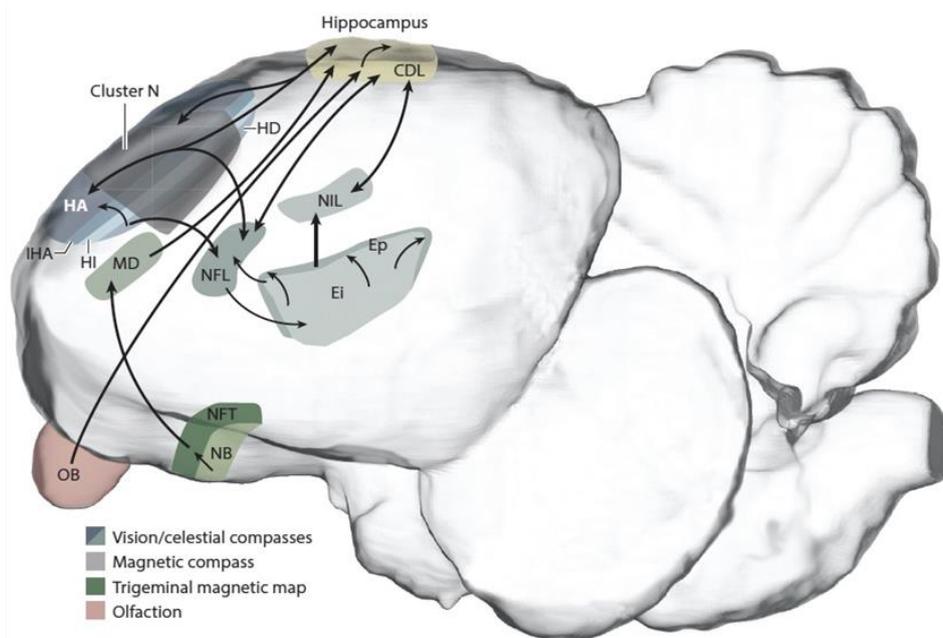


Figura 3. Circuitos neurais que colocariam o hipocampo como um centro de processamento, integração e recuperação de informações sobre mapas e bússolas, envolvidas no processo de migração. Abreviaturas: CDL, corticoidea dorsolateral; Ei, entopallium interno; Ep, faixa entopallia; Ha, hyperpallium apical; HD, hyperpallium dorsolateral; HI, hiperpallium intercalado; IHA, núcleo intersticial do HA; MD, mesopallium dorsal; NB, núcleo basal; NFL, nidopallium frontolateral; NFT, parte trigeminal do nidopallium frontal; NIL, nidopallium intermédio lateral; OB, bulbo olfatório. (Mouritsen, Heyers e Gunturkun, 2016).

A migração em si mesma exige um conjunto de habilidades cognitivas de alta hierarquia para as quais a contribuição do hipocampo como centro integrador é fundamental.

Características peculiares da formação hipocampal das aves, sugerem que ela se desenvolveu em resposta às pressões seletivas particularmente relevantes para o repertório comportamental associado à sobrevivência, dentre eles os mecanismos associados às funções cognitivas (Herold, Coppola et al. 2015).

Experimentos iniciais com pombos demonstraram que a integridade hipocampal é essencial para o aprendizado espacial e o reconhecimento de locais familiares, com um alcance de 10 a 20 Km (Gagliardo, Vallortigara et al. 2005) (Vallortigara *et al.*, 2003; Bingman, Cheng, 2005), e que a navegação em ambientes não familiares não depende da integridade do hipocampo (Wallraff, 2005). Recentemente, foram encontrados resultados consistentes com os achados acima, demonstrando que lesões hipocampais não parecem afetar a orientação da navegação em ambientes não familiares (Gagliardo, Ioale et al. 2009).

A contribuição do hipocampo permite a construção de mapas a partir de pontos de referência que podem ser prontamente reconhecidos (Gagliardo, Ioale et al. 1999), sendo esses pontos de referência relevantes para migrantes em ambientes familiares e durante a fase de aproximação na migração de longas distâncias. Nesse sentido já está consolidada a noção de que a complexidade da paisagem é um fator chave para a fidelidade de rotas, e que pombos formam memórias de maneira mais precisa quando a complexidade da paisagem é intermediária, nem muito alta e nem muito baixa (Mann, Armstrong et al. 2014).

Aparentemente os diferentes mecanismos de suporte à migração, como bússolas celestiais (solar e estelar) e magnéticas, são integrados na formação hipocampal (Mouritsen, Heyers et al. 2016). Ainda que as aves possam navegar durante algum tempo sem o hipocampo intacto, a implementação de medidas corretivas na rota de migração a partir de informações novas só se materializa em aves com formação hipocampal íntegra (Gagliardo, Ioale et al. 2009).

Embora não exista uma descrição exata do tipo de informação utilizada na migração realizada pelo *C. semipalmatus*, é muito provável que as disponíveis ao longo da jornada incluam pistas visuais e bússolas celestiais e magnéticas, de modo que a direção, a busca e o reconhecimento dos diversos sítios de parada, tanto quanto o alvo final, sejam eficientes.

Durante a migração, as aves podem usar dois tipos de bússolas celestiais: a solar e a estelar. O uso da bússola solar é relativamente simples e para que seja estabelecida, a ave precisa relacionar a posição do sol com seu ciclo circadiano (Wiltschko and Wiltschko 2009). A informação essencial é o azimute solar (Figura 4). Como o azimute muda durante o dia, devido ao movimento de rotação da terra, as aves necessitam de um “relógio interno” para estabelecer uma direção de voo dependente da hora do dia (Wiltschko and Wiltschko 2009).

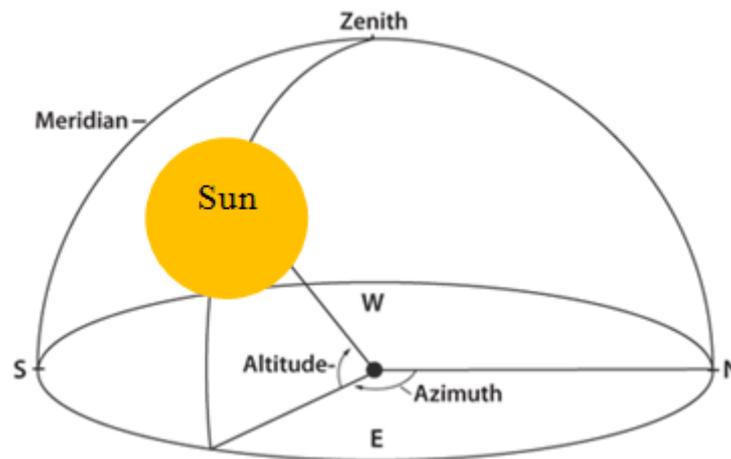


Figura 4. Representação esquemática do azimute. O azimute solar E , para o observador no centro da esfera, é o ângulo/distância entre o ponto de referência N (norte) e o vetor projetado verticalmente a partir do sol. (modificado de (M.H. Marhaban 2014). Com o movimento da terra, no eixo norte-sul, o sol muda de posição (leste no início da manhã e oeste no fim da tarde), e conseqüentemente seu azimute. Uma vez que essa movimentação é diária e previsível, os pássaros aprendem a associar esse deslocamento com o seu ciclo circadiano, permitindo a utilização do sol na orientação da navegação.

Primeiro foi demonstrado que as aves se orientavam pelo sol (Kramer 1950) e posteriormente foi demonstrado a associação da bússola solar com o ciclo circadiano (Schmidt-Koenig 1958). Nesse experimento de 1958, aves foram confinadas em uma sala com períodos luminosos adiantados ou atrasados em 6 horas, com o objetivo de reiniciar o “relógio interno” desses animais. Uma vez liberadas, as aves interpretaram a posição do sol com um erro paralelo ao erro temporal ao qual foram submetidas (Figura 5), demonstrando inequivocamente que o uso da bússola solar requer o uso do “relógio interno”.

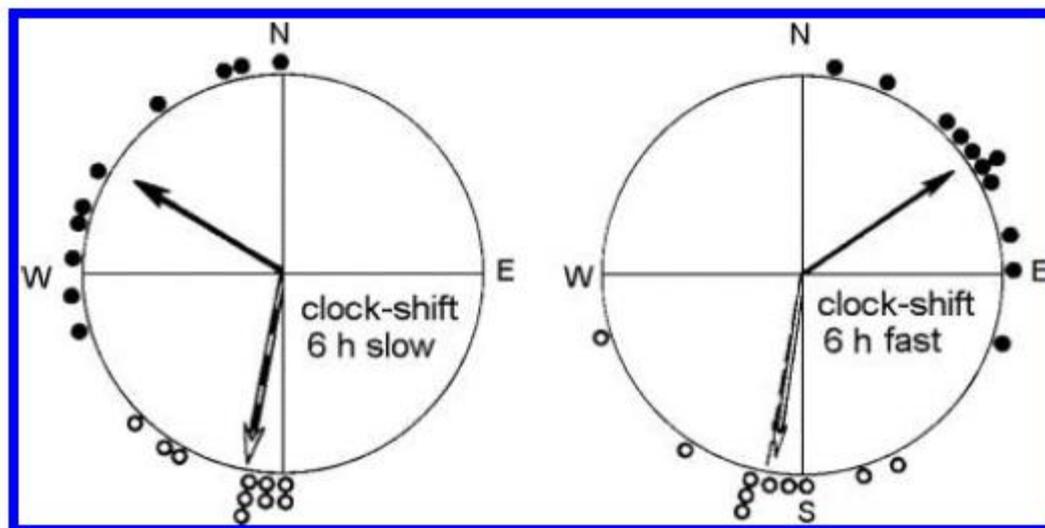


Figura 5. Aves foram liberadas ao norte, e o ponto de destino é indicado pelas linhas pontilhadas. As setas representam os vetores médios, os símbolos (círculos) abertos representam os pássaros controles, e os fechados representam os pássaros que tiveram o “relógio interno” alterado em 6 horas. (Adaptado de Schmidt-Koenig, 1958).

Já os pássaros migratórios noturnos usam a bússola celestial. Para usar esse tipo de bússola, as aves precisam observar e assimilar a informação da rotação dos pontos de luz no céu, e interpretam o centro como o Norte (Emlen 1975). Diferentemente da bússola solar, o uso da bússola celestial não requer o uso do “relógio interno” (Emlen 1967).

Em um experimento clássico demonstrando o uso da bússola celestial, dois grupos de aves foram criadas em um planetário; para um grupo, o “céu” foi rotacionado em torno da estrela *Polaris*, simulando uma situação natural; para o outro grupo, o “céu” foi rotacionado em torno da estrela *Betelgeuse*, uma estrela da constelação de Orion. Quando posteriormente testados sob o planetário parado, o primeiro grupo se direcionou para o seu sul migratório, se afastando da estrela *Polaris*, enquanto o segundo se afastou da estrela *Betelgeuse* (Figura 6) (Emlen 1970). Nessa tarefa, o próximo passo é o aprendizado da geometria relativa ao centro de rotação de modo que, durante a migração, já não precisem mais observar a rotação para detectar o Norte (Mouritsen and Larsen 2001).

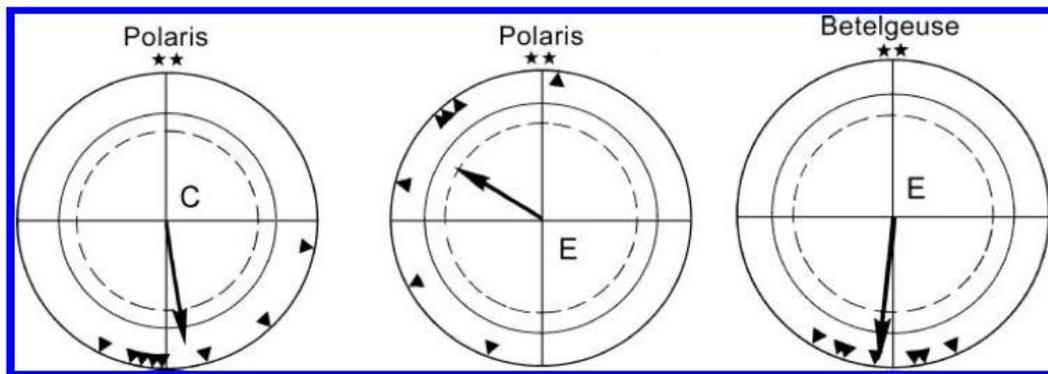


Figura 6. Demonstração da rotação celestial como referência na migração. C representa a orientação de aves controle com o planetário rotacionando em torno da estrela Polaris. E representa a orientação de aves com o planetário rotacionado em torno da estrela betelgeuse, plotado em relação à Polaris (meio) e à Betelgeuse (direita) (Emlen, 1970).

A exemplo do que foi dito acima, uma estratégia de memorização fotográfica (memorização da geometria estelar) seria usada para detectar o centro de rotação celestial (Alert, Michalik et al. 2015), onde a bússola celestial funcionaria comparando o padrão atual das estrelas com o padrão memorizado, usando essa habilidade para a orientação espacial (Pecchia, Gagliardo et al. 2011). Dando suporte indireto a essa ideia, foi reportado que alguns neurônios do núcleo geniculado lateral dorsal são ativados em baixa luminância (Yang, Zhang et al. 2005).

Essas células podem assim contribuir para a percepção do céu noturno estrelado, onde o hipocampo integraria as características visuais do ambiente com a informação espacial, estocando e recuperando essa informação para construir uma meta navegacional (Figura 7) (Kahn and Bingman 2009).

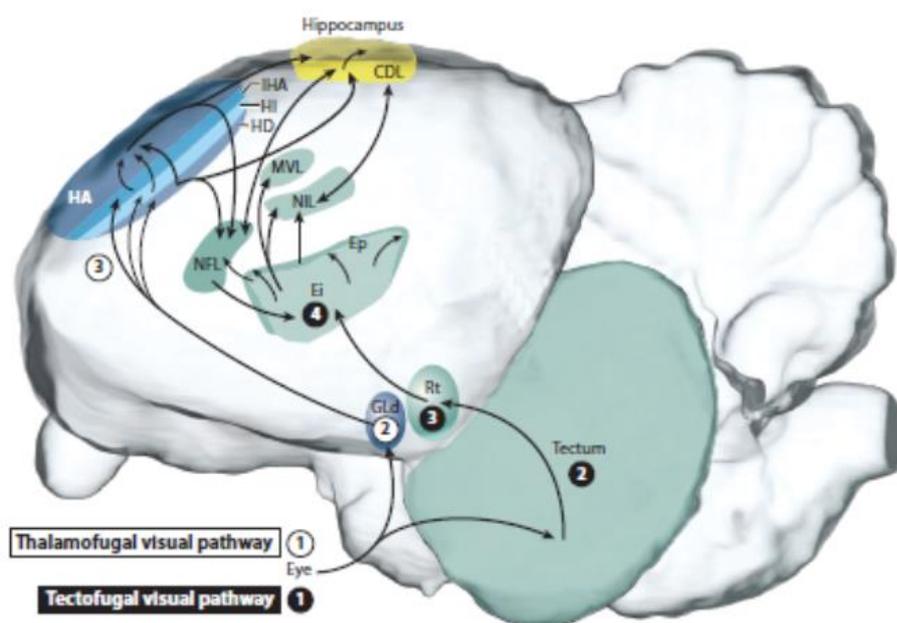


Figura 7. Modelo esquemático mostrando as vias neurais envolvidas no processamento da bússola celestial. Abreviaturas: CDL, corticoidea dorsolateral; Ei, entopallium interno; Ep, faixa entopallia; GLd, geniculado lateral dorsal; Ha, hyperpallium apical; HD, hyperpallium dorsolateral; HI, hiperpallium intercalado; IHA, núcleo intersticial do HA; MVL, mesopallium ventrolateral; NFL, nidopallium frontolateral; NIL, nidopallium intermédio lateral; Rt, núcleo rotundus (Mouritsen, Heyers e Gunturkun, 2016).

Curiosamente, foi demonstrado, em pombos, que o hipocampo esquerdo é suficiente para o aprendizado da bússola solar. No entanto, uma vez aprendido, o uso dessa bússola requer o hipocampo direito (Gagliardo, Vallortigara et al. 2005). Entretanto, foi sugerido recentemente uma transposição da assimetria das vias visuais para dentro da circuitaria hipocampal, sem a lateralização propriamente dita do hipocampo (Jonckers, Gunturkun et al. 2015), como sugere o trabalho anterior.

De forma semelhante, o hipocampo está envolvido no processamento e uso da bússola magnética. A bússola magnética nas aves é dependente de luz com comprimentos de onda curtos, entre 360nm e 565nm. Fora desse espectro, as aves perdem a capacidade de orientação magnética (Wiltschko and Wiltschko 2007). A hipótese mais difundida para orientação empregando a bússola magnética é a de que os sensores magnéticos estariam localizados na retina, onde neurônios contem pelo menos quatro diferentes criptocromos (Moller, Sagasser et al. 2004, Liedvogel and Mouritsen 2010). Tem sido sugerido que os criptocromos atuam como magnetoreceptores primários, essenciais ao uso da bússola magnética luz-dependente em aves

migratórias (Ritz, Wiltschko et al. 2009). A luz azul ou verde estimula os elétrons dessa proteína a produzir pares de radicais cujo sentido de rotação dos elétrons respondem ao campo magnético (para revisão, ver (Liedvogel and Mouritsen 2010). Além disso, foi encontrado recentemente uma proteína (magR), que além de ter expressão co-localizada com criptocromos, forma um complexo em forma de nano bastão com essas proteínas fotoativas, que é orientado do norte ao sul, como uma bússola de agulha (Figura 8) (Qin, Yin et al. 2016). É sugerido assim, que as aves detectem as linhas do campo magnético terrestre de forma parecida àquela que usamos quando percebemos a direção acima e abaixo devido à força da gravidade (Wiltschko and Wiltschko 2009).

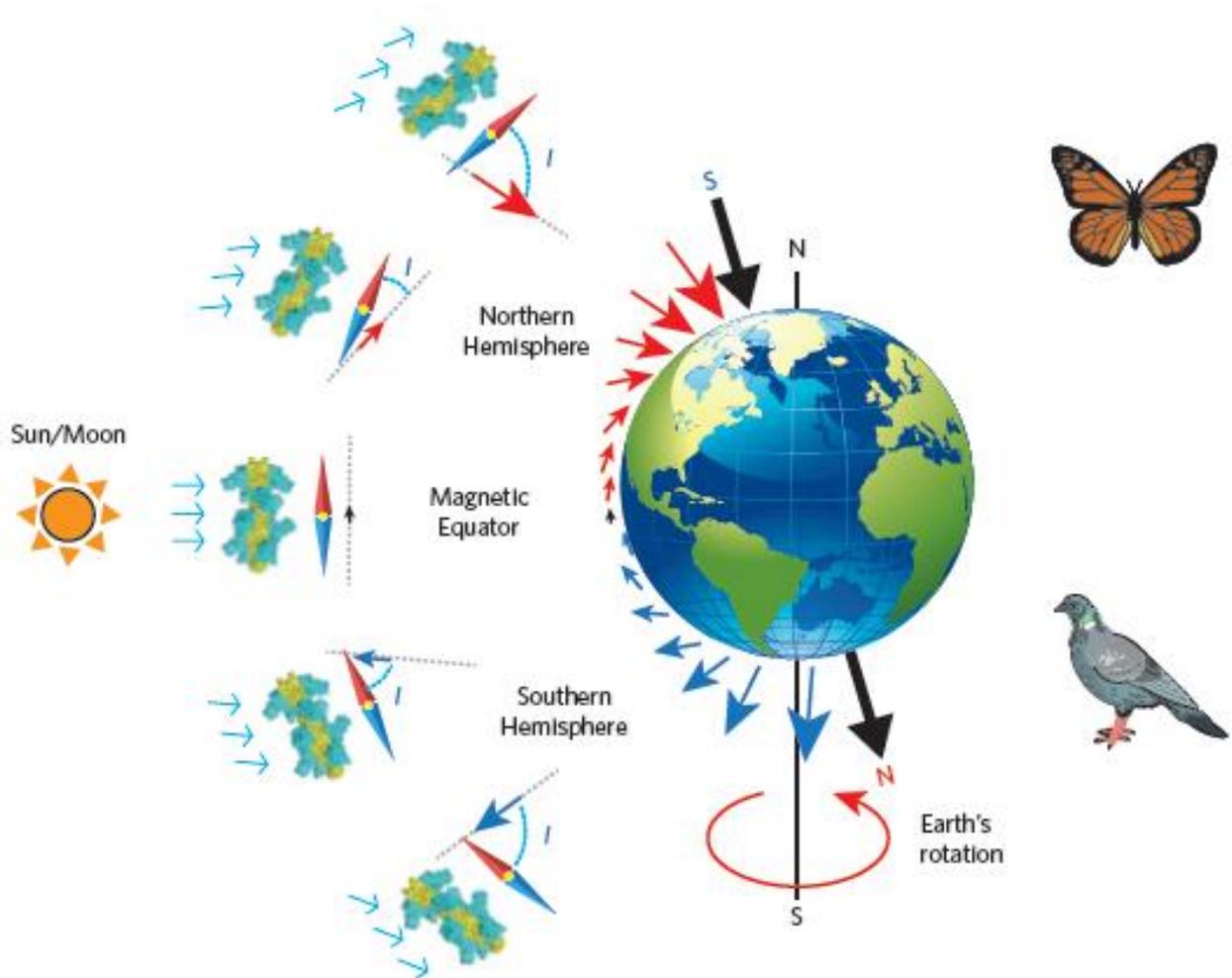


Figura 8. O modelo de biobússola magnética. Nesse modelo de navegação, o sensor magnético composto pelo complexo Cry/MagR atua como uma bússola magnética que detecta a informação do campo magnético terrestre com polaridade, intensidade e inclinação. Os ângulos de inclinação (I) e a intensidade do campo magnético são indicados pela direção e comprimento das setas (Vermelho no Norte e azul no Sul). A linha preta indica o eixo de rotação da terra. Esse modelo de bússola magnética foi testado em borboletas e pombos. (Modificado de Qin *et al.*, 2016).

Corroborando as evidências da participação desse sistema molecular retiniano na orientação magnética, as células ganglionares retinianas e o cluster N são as partes mais ativas do cérebro quando pássaros migratórios noturnos usam informação magnética para orientação. O Cluster N é uma região que recebe informação dos olhos pela via talamofugal (Mouritsen, Feenders et al. 2005, Zapka, Heyers et al. 2009). Esse seria o caso também do *C. semipalmatus* uma vez que eles voam também à noite. Coerentemente, pássaros migratórios noturnos com o cluster N inativado cirurgicamente, não conseguem usar a bússola magnética (Liedvogel, Feenders et al. 2007). Além da informação magnética, a bússola de inclinação (ferramenta que detecta as inclinações das linhas do campo magnético) precisa de *inputs* de sensores gravitacionais, sugerindo um envolvimento do sistema vestibular (Wu and Dickman 2011).

Como observado acima, a migração apresenta características em comum sendo a direção da meta/destino traçada preliminarmente e posteriormente localizada usando componentes navegacionais inatos e aprendidos. Mecanismos inatos, como a bússola magnética devem ser baseados em fatores estáveis e disponíveis de forma confiável. Já mecanismos como as bússolas solares e celestiais apresentam grande variedade temporal e espacial, requerendo das aves processos de adequação, obtidos por experiência (Wiltschko and Wiltschko 2009). A medida que as aves se aproximam de seus nichos reprodutivos no hemisfério norte, é essencial que as bússolas de diferentes origens e as pistas locais sejam combinadas para garantir maior precisão na localização espacial.

A integração desse conjunto de informações é sugerida ocorrer no hipocampo, que receberia informação magnética do cluster N e informação gravitacional do núcleo talâmico posterior (Ver Figura 3) (Mouritsen, Heyers et al. 2016). Essas ações envolvendo o hipocampo podem ser fonte de alterações moleculares e celulares envolvendo circuitos hipocampais afetando forma e função de células neurais e gliais. No presente trabalho examinamos parte dessas alterações com foco na morfologia dos astrócitos, uma célula chave nos processos metabólicos envolvendo a oferta de energia e controle do microambiente em torno das sinapses dos circuitos neuronais envolvidos com o processo migratório.

1.3. A Formação Hipocampal das Aves

O hipocampo é uma estrutura altamente conservada através das espécies (Figura 9) (Manns and Eichenbaum 2006) e é considerado central no entendimento das bases neurológicas da memória (Moscovitch, Cabeza et al. 2016) e na orientação durante a navegação nas aves (Sherry, Vaccarino et al. 1989, Atoji, Wild et al. 2002, Kahn and Bingman 2009, Herold, Coppola et al. 2015).

O prosencéfalo dorso medial em aves é uma área reconhecidamente homóloga ao hipocampo do mamífero, além de possíveis homologias ao córtex entorrinal (Atoji, Wild et al. 2002, Atoji and Wild 2006). Corroborando essas ideias, tem sido confirmado por estudos de expressão gênica (Puelles 2001, Gupta, Maurya et al. 2012, Abellan, Desfilis et al. 2014) que o hipocampo de aves e mamíferos possui a mesma origem embrionária e são amplamente homólogos (Belgard, Montiel et al. 2013), implicando assim que suas funções sejam altamente conservadas.

Atoji e Wild (2004) demonstraram, baseado em conectividade anatômica, que a área dorsomedial da formação hipocampal das aves é semelhante ao *subiculum* e aos *Cornos de Amon* (CAs) do mamífero, enquanto a camada em forma de “V” na porção ventromedial é similar ao giro denteado (Atoji and Wild 2004). Em trabalho mais recente, usando toxina colérica e expressão de RNAm de receptores glutamatérgicos, foi corroborada a analogia entre o “V” hipocampal do pássaro e o giro denteado do mamífero, além da constatação de que circuitaria glutamatérgica entre o hipocampo e o septo existente nos mamíferos também existe nas aves. Foi demonstrado ainda a ausência de conexões entre o septo lateral e o “V” hipocampal nas aves, também inexistente entre o septo e o giro denteado nos mamíferos (Atoji 2016).

Alguns trabalhos prévios estabeleceram definições e subdivisões na área hipocampal de algumas aves (Figura 10). Atoji e Wild descreveram as subdivisões da formação hipocampal em pombos usando o método de coloração de Nissl (Atoji and Wild 2004), e posteriormente usando imunomarcação para vGluT2, que demonstrou que muitos neurônios nessa área expressam vGluT2 intensamente, em especial o V hipocampal (Atoji 2016).

Recentemente, Diniz, e colaboradores, baseados no trabalho em pombos (Atoji and Wild, 2006) propuseram o parcelamento da formação parahipocampal e hipocampo propriamente dito na espécie de maçarico *Actitis macularia* (Diniz, Magalhaes et al. 2016),

presumindo analogia entre essas aves. O hipocampo propriamente dito foi delimitado ventral e lateralmente pelo ventrículo lateral, enquanto os limites dorsal e caudal correspondem à superfície cerebral. O limite medial foi definido pela fissura inter-hemisférica. Já o limite inferior foi definido por uma acentuada mudança na densidade celular na região do V hipocampal, próximo à área septal. A área parahipocampal foi localizada dorsal e lateralmente ao hipocampo, definida medialmente pelo sulco paraventricular (Diniz, Magalhaes et al. 2016).

Esse argumento ganha força quando se constata que as duas principais conexões do hipocampo em mamíferos se dão com o córtex pré-frontal e com o septo. De fato, a região hipocampal das aves faz conexões com o *nidopallium caudoateral*, área homóloga ao córtex pré-frontal do mamífero (Gunturkun 2005, Mouritsen, Heyers et al. 2016) da mesma forma o hipocampo das aves projeta para o septum (Atoji and Wild 2004, Atoji 2016), tal como acontece nos mamíferos (Allen and Fortin 2013).

Embora o hipocampo seja estruturalmente diferente entre pássaros e mamíferos, sua função no componente espacial da memória parece ser altamente conservada (Striedter 2016). Um exemplo da contribuição hipocampal para a memória espacial e outras funções cognitivas é o de que a lesão hipocampal em pombos prejudica esses processos (Scarf, Millar et al. 2014). Além do envolvimento das conexões hipocampais na memória espacial (Atoji, Wild et al. 2002, Kahn and Bingman 2009), foi sugerido que o hipocampo do *Taeniopygia guttata* tem um papel na memória episódica da percepção do canto (Bailey and Saldanha 2010).

Muitas das sinapses hipocampais mostram modificações associativas, como evidencia a “Long-Term Potentiation” (LTP) e a “Long-Term Depression” (LTD). A LTP é um fenômeno no qual a força da sinapse é potencializada por períodos prolongados seguindo breve, mas intensa ativação sináptica (Bliss and Lomo 1973). Já a LTD é uma redução duradoura, dependente de atividade, na eficácia sináptica (Massey and Bashir 2007). Essas modificações sinápticas são relacionadas ao aprendizado e à memória (Morris 2003, Jackson 2013).

Os fenômenos da LTD e LTP já foram demonstrados em aves (Wieraszko and Ball 1991, Wieraszko and Ball 1993, Margrie, Rostas et al. 1998, Margrie, Rostas et al. 1998), indicando o envolvimento dessa forma de plasticidade sináptica hipocampal nos processos de aprendizado (Margrie, Rostas et al. 1998).

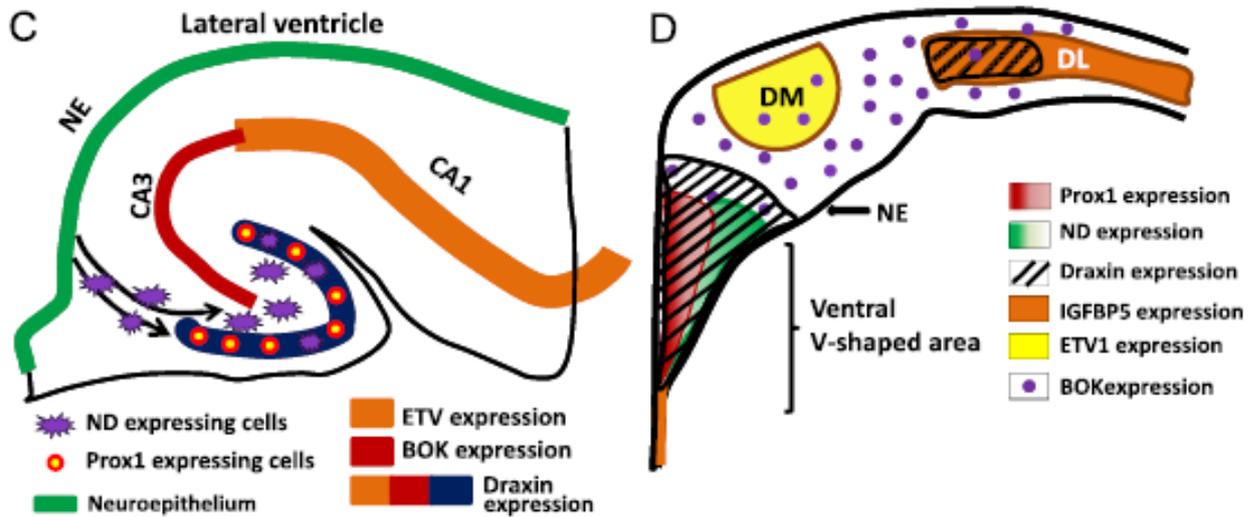


Figura 9. Representação esquemática do hipocampo e giro denteado dos mamíferos e suas áreas homólogas nas aves. As diferentes cores e diferentes formas indicam áreas e expressões proteicas, respectivamente (Retirado de Gupta *et al.*, 2012).

O hipocampo de pombos em seu ambiente natural é maior do que os de pombos mantidos em cativeiro (Cnotka, Mohle *et al.* 2008), da mesma forma que em pássaros que estocam alimento que mostram um hipocampo maior quando comparado com aqueles de pássaros que não estocam (Krebs, Sherry *et al.* 1989, Sherry, Vaccarino *et al.* 1989). Essas observações de que a estimulação multissensorial enriquecida pelo ambiente natural e a formação e reconhecimento de pontos de referência em mapas construídos para localização espacial sugerem que o hipocampo é usado para navegação espacial (ver (Sherry and Hoshooley 2010, Sherry and MacDougall-Shackleton 2015) para revisão).

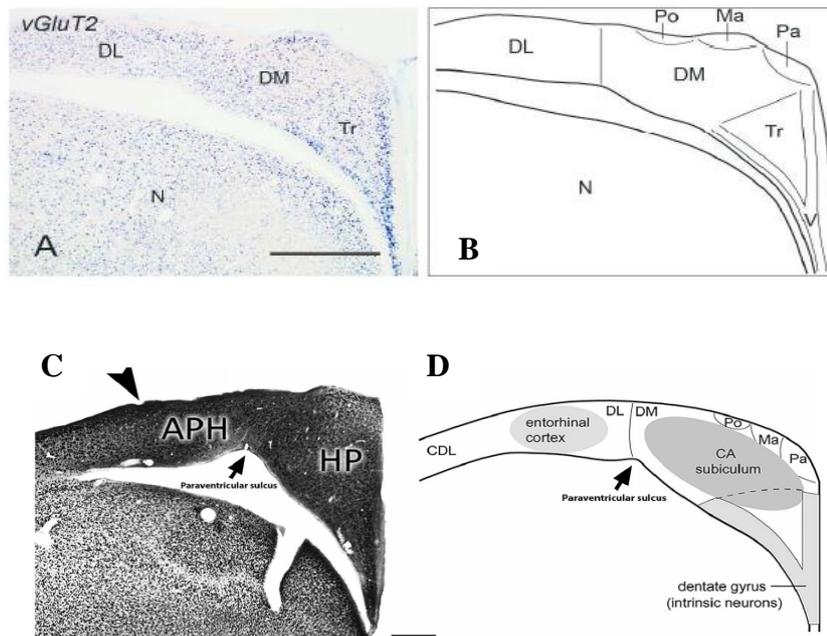


Figura 10. A, expressão de vGluT2 na formação hipocampal do pombo, com o padrão de coloração semelhante ao Nissl. B, a formação hipocampal com 7 subdivisões: DL, dorsolateral; DM, dorsomedial; Ma, magnocelular; Pa, parvocelular; Po, região pobre em células; N, nidopalium; Tr, região triangular; V, camada em forma de V. Escala 1mm. C, apresenta a formação hipocampal do *Actitis macularia* imunomarcada para NeuN. A ponta de seta indica o limite da área parahipocampal e a seta indica o sulco paraventricular, o limite lateral do hipocampo. (Adaptado de Atoji et al, 2006). D, a formação hipocampal no *Actitis macularia* com as mesmas regiões da figura B, além de indicar as analogias ao córtex entorrinal, subiculum e giro denteado da formação hipocampal dos mamíferos. Escala:500µm. (Adaptado de Diniz et al., 2016).

As funções hipocampais, são consequência da atividade neuronal e glial. Como o esforço de investigação anterior no hipocampo das aves foi concentrado nos neurônios, o presente projeto foi desenhado para investigar os astrócitos já que surgiram evidências recentes em mamíferos de que as células da glia, em particular os astrócitos e a micróglia, em condições homeostáticas são essenciais para a regulação da atividade sináptica (Allen 2014) para revisão). O astrócito em particular tem uma diversidade de funções que inclui suporte estrutural, metabólico e sináptico, contribuindo de maneira direta para a manutenção e regulação da homeostase cerebral, tanto quanto dos fenômenos de potenciação e depressão sinápticas associados à formação e consolidação de memória (para revisão (Sofroniew and Vinters 2010, Allen 2014, Rossi 2015).

1.4. Morfofisiologia dos Astrócitos

A glia compreende um conjunto celular não neuronal envolvido nas mais diversas tarefas do sistema nervoso central e periférico, sendo dividida em macróglia e micróglia. A macróglia, derivada de linhagem neural, é composta por oligodendrócitos, astrócitos, células de Schwann e células NG2, enquanto a micróglia, derivada do saco vitelino, é composta pelas micróglia, que são os macrófagos residentes do sistema nervoso central (Ver (Reemst, Noctor et al. 2016) para revisão). A taxa glia/neurônio varia entre as espécies, relacionada à grande variação dos tamanhos neuronais entre estruturas e espécies (Herculano-Houzel 2014). Dentre as células gliais, os astrócitos são os mais abundantes, além de apresentar uma grande diversidade entre espécies, entre as áreas onde são encontrados e mesmo entre as camadas dentro da mesma região (Figura 11) (Oberheim, Wang et al. 2006, Khakh and Sofroniew 2015).

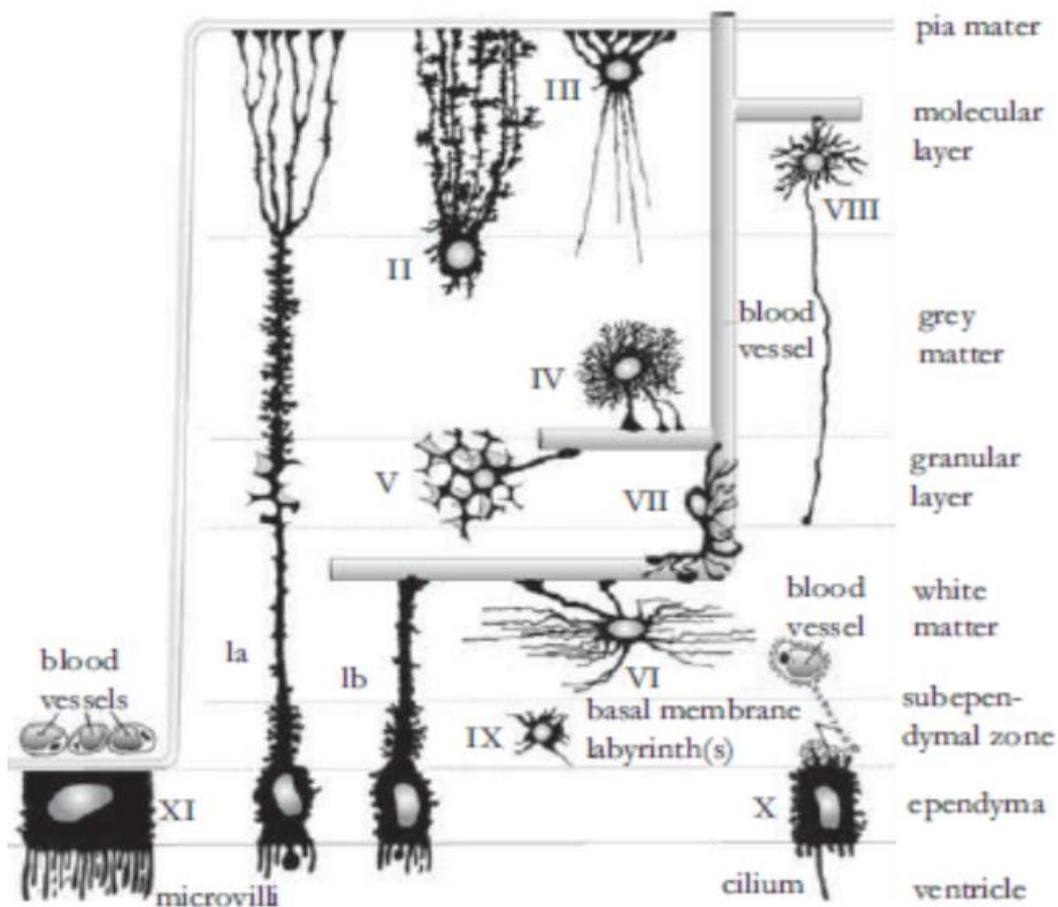


Figura 11. Esquema ilustrativo da diversidade morfológica e das subclasses de astrócitos. Ia-Tanicito pial, Ib-Tanicito vascular, II-Astrócito radial, III-Astrócito marginal, IV-Astrócito protoplasmático, V-Astrócito "velate", VI-Astrócito fibroso, VII-Astrócito perivascular, VIII-Astrócito interlaminar, IX-Astrócito imaturo, X-Ependimócito e XI-Célula do plexo coroide. (Modificado de Rechembach e Wolburg, 2005).

Os astrócitos representam 20–40% da população celular do cérebro. Com uma considerável variação, são mais numerosos do que os neurônios no córtex, e menos numerosos no cerebelo (Herculano-Houzel 2014). Além dessa diversidade em densidade, astrócitos também apresentam uma notável diversidade morfológica (Oberheim, Wang et al. 2006, Diniz, de Oliveira et al. 2016), permitindo sua atuação nas mais variadas funções dentro do SNC (Allen 2014, Khakh and Sofroniew 2015, Rossi 2015).

A classificação de astrócitos em diferentes subtipos é tradicionalmente baseada na expressão de marcadores presumivelmente astrócito-específicos, que tornam possível a visualização celular por imunomarcação. Além da proteína acida fibrilar glial (GFAP), estão entre os marcadores mais usados a glutamina sintetase (GS), a Vimentina, os transportadores de glutamato astrocítico (GLAST/EAAT1 e GLT1/EAAT2) e a proteína ligante de cálcio S100 β (Reichenbach, Derouiche et al. 2010). Os níveis de expressão de GFAP variam bastante entre as áreas do cérebro. No hipocampo, por exemplo, cerca de 80% dos astrócitos protoplasmáticos expressam GFAP, um número elevado quando comparado aos 20% no córtex (Middeldorp and Hol 2011).

Essas células estendem diversos processos que demarcam volumes corticais (Nedergaard, Ransom et al. 2003, Sofroniew and Vinters 2010), e alguns desses processos contatam as paredes da vasculatura, enquanto outros envolvem as sinapses (Magistretti and Allaman 2015).

Os processos astrocíticos em contato com a vasculatura são chamados de pés terminais (end feet) (Figura 12), e é sugerido possuírem um papel metabólico importante para a manutenção da atividade neuronal adequada. Consistente com seu alto gasto energético, neurônios funcionam em uma elevada taxa de metabolismo oxidativo comparados à glia (Lebon, Petersen et al. 2002, Boumezbeur, Petersen et al. 2010). Embora os astrócitos, como dito acima, apresentem baixas taxas de metabolismo oxidativo comparados ao neurônio, eles apresentam uma elevada captação de glicose, caracterizando-os como células altamente glicolíticas (Itoh, Esaki et al. 2003, Bittner, Loaiza et al. 2010, Bolanos 2016). Essa elevada porção de glicose entrando nos astrócitos é liberada como lactato no meio extracelular (Bouzier-Sore, Voisin et al. 2006, Lovatt, Sonnewald et al. 2007), de onde é transportado para o neurônio para produção de ATP, com o objetivo principal de manter o potencial de membrana e a

atividade sináptica (Hall, Klein-Flugge et al. 2012, Harris, Jolivet et al. 2012, Ivanov, Malkov et al. 2014).

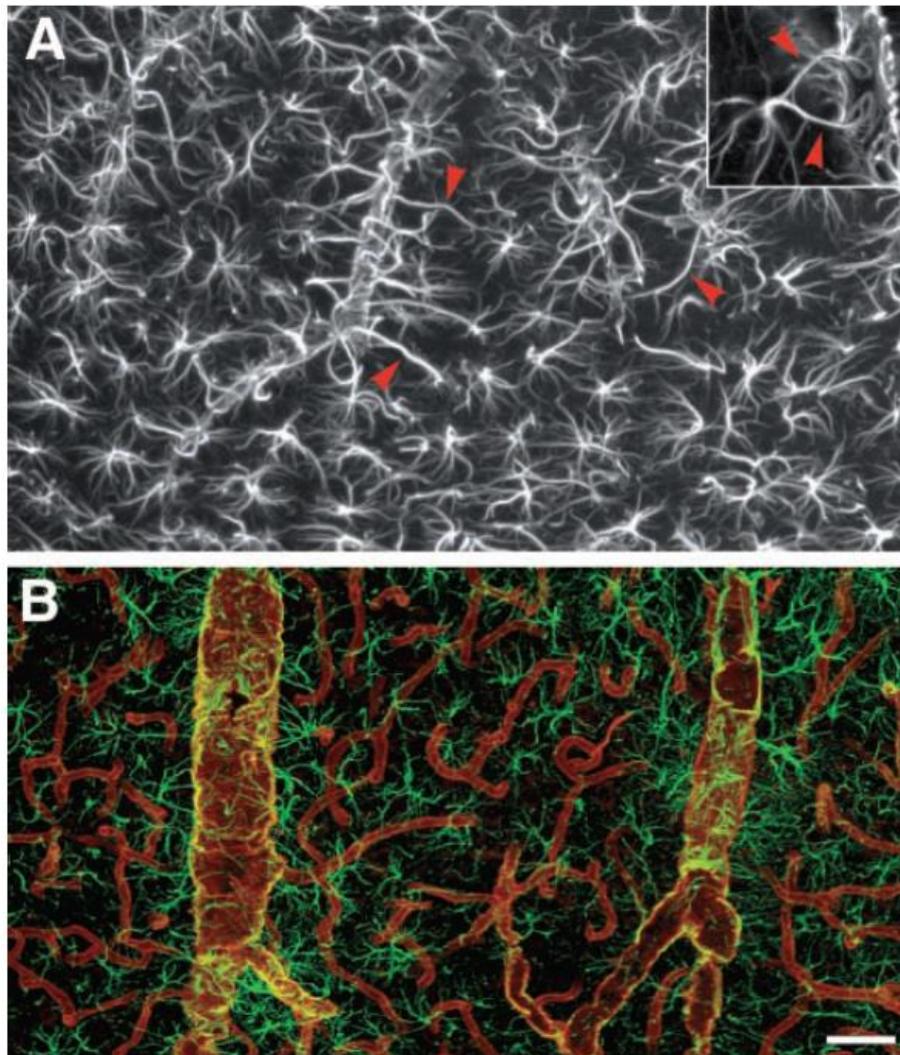


Figura 12. Imagem da neurovasculatura coberta por processos astrogliais. A, astrócitos imunomarcados para GFAP, com seus pés terminais (cabeças de setas vermelhas) tocando a vasculatura. A imagem no quadro superior direito apresenta um astrócito com dois processos vasculares. B, dupla marcação para aquaporina 4 (vermelho) e GFAP (verde). A aquaporina é uma proteína de membrana que forma canais específicos em astrócitos e a proteína ácida fibrilar glial – GFAP que compõe o citoesqueleto astrocítico. Escala: A:10 μ m; Quadro dentro da figura A: 40 μ m; B: 60 μ m. (Adaptado de Simard *et al.*, 2003).

A superfície neurovascular é densamente coberta pelos processos astrogliais, que contém elementos imunomarcados para GFAP. Tais pés terminais são distinguidos de outros processos por serem relativamente retos e sem ramificações (Simard and Nedergaard 2004) (Ver Figura 12), característica que contribui para uma menor complexidade nesse grupo celular.

É sugerido que os astrócitos estelares em contato com as sinapses apresentam maior complexidade morfológica uma vez que essas células contatam grande quantidade de sinapses, para as quais os astrócitos regulam a homeostase (Newman 2003). Por exemplo, um único astrócito chega a contatar cerca de 100.000 sinapses no hipocampo de roedores (Bushong, Martone et al. 2002), podendo chegar a 2.000.000 em humanos (Oberheim, Takano et al. 2009). Além desse contato (astrócito – sinapse) que se estabelece no início do desenvolvimento e permanece na vida adulta, parece que os astrócitos pré-existentes modulam ainda sinapses de neurônios provenientes da neurogênese adulta (Krzisch, Temprana et al. 2015), contribuindo para a integração funcional e estrutural dessas novas células, através do controle da formação e maturação dendrítica, e da sobrevivência do neurônio recém-nascido (Sultan, Li et al. 2015).

Dentro desse contexto, astrócitos liberam os chamados gliotransmissores, incluindo glutamato, d-serina, GABA e purinas (ATP e adenosina) (Nedergaard, Ransom et al. 2003, Halassa, Fellin et al. 2007, Shigetomi, Bowser et al. 2008, Perea, Navarrete et al. 2009, Parpura and Zorec 2010). Essa liberação de gliotransmissores ocorre em resposta às mudanças na atividade sináptica/neuronal e está associada à excitabilidade astrocítica e às mudanças na concentração de cálcio em seu interior (Di Castro, Chuquet et al. 2011, Santello, Cali et al. 2012). Como dito acima, uma grande quantidade de sinapses pode ser examinada ao mesmo tempo, devido à alta complexidade astrocítica.

A complexidade e diversidade astrocítica estão entre as características mais acentuadas do cérebro (Figura 13). Astrócitos protoplasmáticos humanos apresentaram um diâmetro três vezes maior e dez vezes mais processos primários do que os de roedores (Oberheim, Wang et al. 2006), e mesmo grandes diferenças na complexidade astrocítica já foram registradas na região hipocámpal e giro denteado de roedores sob influência do ambiente, do exercício físico, e da idade (Diniz, de Oliveira et al. 2016, Diniz, Silva et al. 2016, Salois and Smith 2016, Fahimi, Baktir et al. 2017).

Apesar de a maneira com que os astrócitos alcançam sua complexidade permanecer um mistério, evidências apontam para um forte envolvimento neuronal. Além do envolvimento neuronal determinante na regulação do perfil molecular e funcional do astrócito (Farmer, Abrahamsson et al. 2016), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) derivado de neurônios

tem sido sugerido como um fator chave na elaboração morfológica dos astrócitos *in vivo* (Stork, Sheehan et al. 2014).

Em um experimento recente, foi transplantado no prosencéfalo de camundongos células progenitoras gliais humanas (Han, Chen et al. 2013). Tais células sobreviveram, migraram e originaram astrócitos, que apresentaram características, incluindo a morfometria, de astrócitos humanos no cérebro dos roedores. Surpreendentemente, os camundongos transplantados apresentaram uma melhora na LTP e no aprendizado, sugerindo uma potencial importância dos astrócitos nas acentuadas habilidades cognitivas humanas (Han, Chen et al. 2013).

Essa relação entre a morfologia astrocítica e a função sináptica tem sido confirmada em trabalhos mais recentes. Consistente com os achados acima, tem sido sugerido diferentes papéis fisiológicos a astrócitos com base em sua complexidade morfológica, além de uma possível associação entre os efeitos deletérios do envelhecimento na memória e a redução da diversidade morfológica astrocítica em camundongos de ambiente empobrecido (Diniz, Silva et al. 2016). Esse trabalho utilizou a análise hierárquica de cluster para diferenciar possíveis famílias de astrócitos com base na complexidade morfológica. O emprego dessa ferramenta estatística para a identificação de diferentes subtipos celulares baseados na morfologia se mostra eficiente e bem estabelecido na literatura (Yamada and Jinno 2013, Santos-Filho, de Lima et al. 2014, Diniz, de Oliveira et al. 2016, Ohgomori, Yamada et al. 2016, Fernandez-Arjona, Grondona et al. 2017).

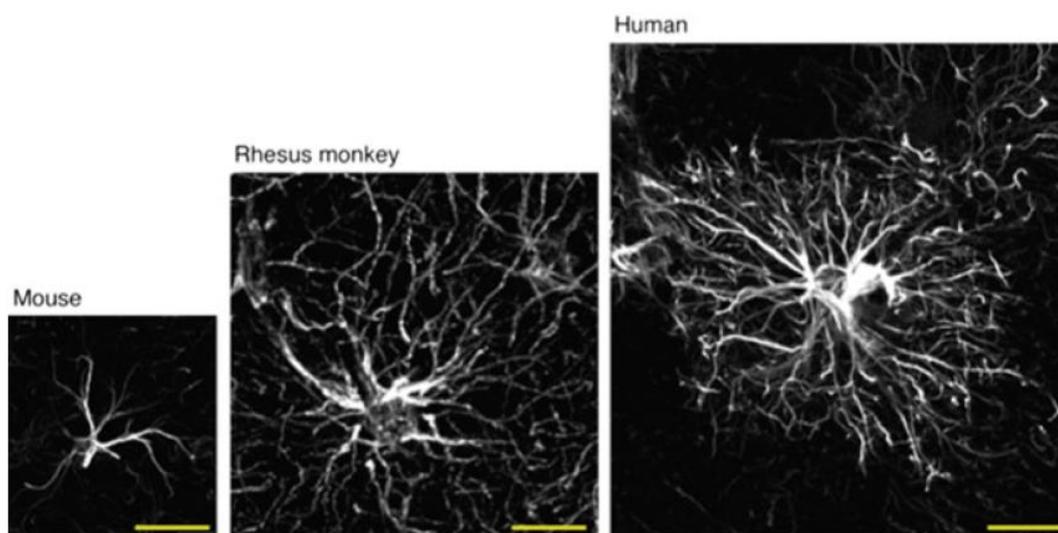


Figura 13. Comparação das complexidades morfológicas interespecíficas entre astrócitos, imunomarcados para GFAP, aqui representadas por astrócitos do camundongo, macaco e homem. Escala: 20 μ m.

Diante da ampla plasticidade morfológica e funcional em resposta aos mais variados estímulos, o astrócito se apresenta como um alvo direto para investigar a plasticidade morfológica celular frente aos desafios energéticos e cognitivos impostos pela migração de longa distância. Nós hipotetizamos que a migração do *Charadrius semipalmatus*, com uma série de paradas em lugares específicos, exerceria influência no aparato cognitivo das aves, tanto pelo uso de pistas (visuais, magnéticas, olfatórias) quanto pela atividade física não extenuante e que haveria um aumento da complexidade morfológicas dos astrócitos hipocampais após a migração outonal dessa espécie.

Assim, o intuito deste trabalho é descrever os possíveis efeitos da migração de longa distância e os estímulos inerentes a ela, sobre a complexidade e sobre outros parâmetros morfológicos de astrócitos hipocampais imunomarcados para GFAP, utilizando a análise hierárquica de *cluster*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Caracterizar as possíveis diferenças morfológicas dos astrócitos da formação hipocampal da espécie *Charadrius semipalmatus* durante o período de migração e no período de invernada.

2.2. Específicos

- Avaliar através da análise hierárquica de *cluster* os parâmetros morfométricos de astrócitos, obtidos através da reconstrução microscópica em três dimensões, com o objetivo de classifica-los morfologicamente.
- Medir as alterações morfológicas dos astrócitos induzidas pelo processo migratório, comparando as morfologias dos astrócitos da formação hipocampal de indivíduos capturados na Baía de Fundy (Canadá) com a daqueles capturados na costa de Bragança (Brasil).
- Realizar análises comparativas entre as espécies *C. pusilla* e *C. semipalmatus* que adotam estratégias de migração contrastantes para medir potenciais influências do padrão migratório sobre a morfologia dos astrócitos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Cinco exemplares da espécie *Charadrius semipalmatus* foram capturados em agosto de 2012 na baía de Fundy, no Canadá (45 ° 50'19,3 "N e 64 ° 31'5,39" W) e outros cinco indivíduos foram capturados em outubro de 2015, na Ilha de Canela, zona costeira bragantina no norte do Brasil (00°47'09.07 "S e 46°43'11.29" W), compondo dois grupos experimentais distintos.

As aves foram capturadas sob a licença N° 44551-2 do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e a licença de Captura Científica ST2783 do Serviço Canadense de Vida Selvagem. Todos os procedimentos foram realizados em concordância com os Institutos Nacionais de Saúde (EUA) e os regulamentos brasileiros para procedimentos científicos em animais e contou com a aprovação do subcomitê de Usuários de Animais da Universidade de Western Ontario. Além disso, foram adotados todos os procedimentos possíveis para minimizar o número de animais e o estresse dos mesmos.

3.1 *Perfusão e Histologia*

Os animais, sob anestesia profunda à base de isoflurano, foram perfundidos com solução salina tamponada com fosfato 0,1M, com subsequente aplicação de fixadores aldeídicos (paraformol a 4%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4). Após a craniotomia, os encéfalos dissecados foram armazenados em tampão fosfato salina 0,05M (PBS) e subsequentemente cortados com o uso do vibrátomo (Leica VT1000S) no plano coronal, em secções com espessuras de 80µm (Canadá) e 60µm (Brasil), de modo a obter intervalos de secções de 1:6.

As secções foram imunomarcadas com anticorpo anti-GFAP (Santa Cruz SC-6170) flutuando livremente em solução. Subsequentemente à imunomarcção, as secções foram montadas em lâminas de vidro revestidas com uma solução aquosa de gelatina (10%) e alumen de cromo (0,5%). Após isso, as secções foram colocadas para secar ao ar à temperatura ambiente, posteriormente desidratadas e clareadas em álcool e xileno.

3.2 *Imunohistoquímica*

As secções passaram por um processo de recuperação antigênica em solução de ácido bórico 0,2M (pH 9) a 70°C durante 60 minutos flutuando livremente em solução, e posteriormente lavadas com tampão fosfato salina e triton a 1% (PBST) seguido de três lavagens em PBS. Após isso, as secções ficaram imersas em soro normal de cavalo a 5% diluído em PBST e então transferidas para a solução de anticorpo primário (anti-GFAP produzido em cabra SC-6170 Santa Cruz Biotechnology) diluída em PBST 0,3% (1:500), onde permaneceram incubadas por 12h a 4°C sob agitação contínua.

Então, as secções foram lavadas em PBST 1% e incubadas novamente, desta vez em anticorpo secundário (Vector Laboratories, Inc. produzido em cavalo e dirigido contra imunoglobulina de cabra, 1: 400 em PBST 0,3%) durante toda a noite. As secções foram, então, imersas em peróxido de hidrogênio a 0,3% durante 15min.

Subsequentemente, as secções foram lavadas três vezes em PBST por 2min cada vez, sendo imersas em seguida, em solução de complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA; 37,5 µl A, 37,5 µl B em 13,12 ml de 0,3% PBST) durante 60 minutos. Após isso, as secções foram lavadas uma vez em PBS e reagidas para a visualização dos processos astrocíticos imunomarcados para a proteína ácida fibrilar glial – GFAP, através do método de glicose-oxidase-DAB-níquel (Shu, Ju et al. 1988). A reação foi interrompida com PB 0,1M quando os ramos astrocíticos finos terciários ou de maior ordem foram visualizados ao microscópio.

Interrompida a reação, as secções foram lavadas 4 vezes por 5 min cada vez, em PBS 0,1M, e montadas em lâminas gelatinizadas. Após desidratação em álcool e xileno, foram em seguida cobertas com Entellan (Merck). As secções imunomarcadas para GFAP dos cinco animais de cada grupo foram utilizadas para a análise. A especificidade da reação foi confirmada com a observação da ausência de outras marcações quando da retirada do anticorpo primário (Saper and Sawchenko 2003).

3.3 *Reconstrução tridimensional de astrócitos e morfologia quantitativa*

Para a reconstrução celular das secções cerebrais previamente imunomarcadas para GFAP, foi utilizado um microscópio NIKON Eclipse 80i (Nikon, Japão) equipado com uma placa motorizada (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, EUA). Os astrócitos foram reconstruídos com objetiva Pan Fluoreto de 100X de imersão em óleo, de alta resolução (Nikon, NA 1.3, DF = 0.19 μm). As imagens foram adquiridas com o software Neurolucida e analisadas com o software Neurolucida Explorer (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, EUA).

Embora o encolhimento no eixo z não seja um evento linear, corrigimos tal encolhimento com base em evidências anteriores de encolhimento de 75% (Carlo and Stevens 2011). Sem a correção, este encolhimento distorceria significativamente as medições de comprimento ao longo desse eixo.

Foram selecionadas para a reconstrução 3D apenas células inequivocamente completas, sendo descartadas as células que apresentavam ramos artificialmente interrompidos ou imunomarcção incompleta. Os ramos terminais da marcação seletiva de astrócitos usando anticorpo anti-GFAP eram tipicamente finos.

3.4 Análise e estatística multivariada dos parâmetros morfológicos.

Para realizar essa análise, foram usados 10 indivíduos, cinco de cada grupo. A partir desses grupos, reconstruiu-se digitalmente 500 astrócitos em três dimensões. Os astrócitos para reconstruções 3-D foram selecionados tal como informado previamente por amostragem aleatória e sistemática (ver Figura 14).

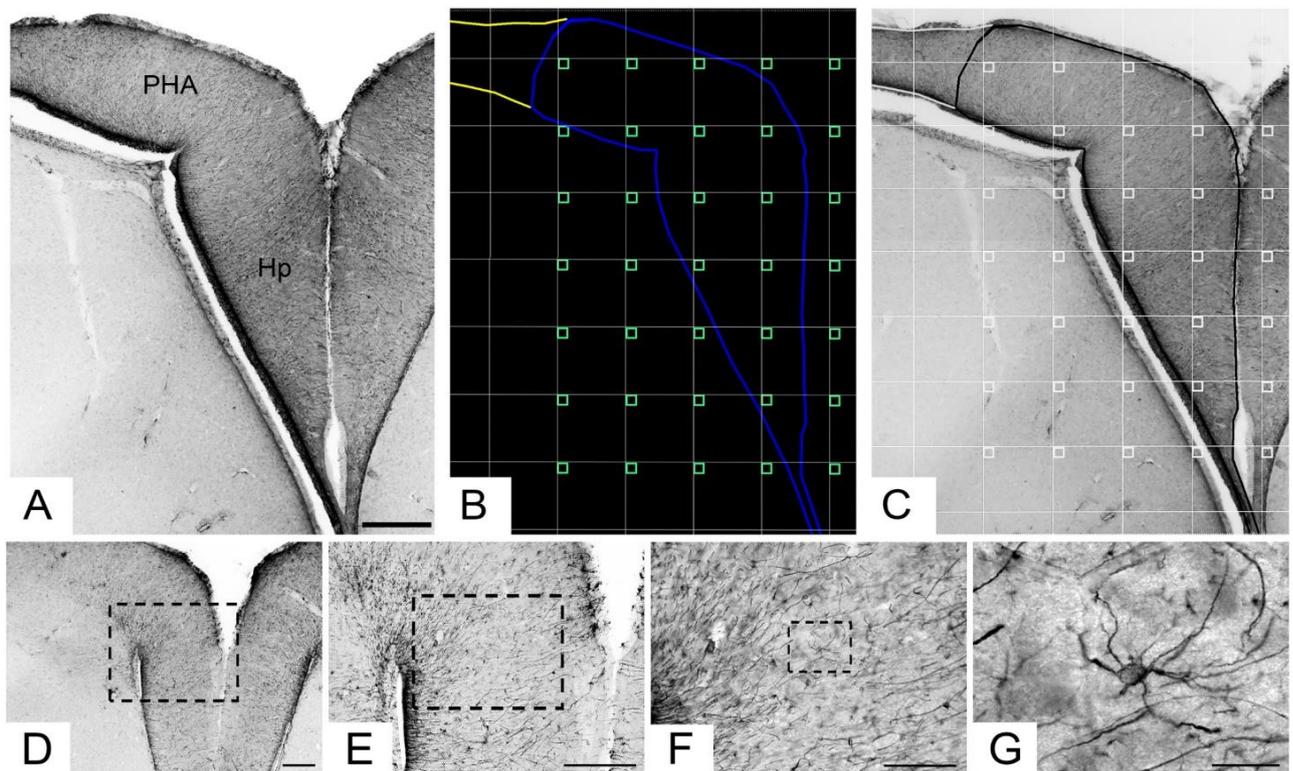


Figura 14. Fotomicrografias de baixo ganho de uma secção da formação hipocampal de *C. semipalmatus* imunomarcada com anticorpo anti-GFAP para definir os limites da área de interesse, o objeto de interesse e a estratégia de amostragem (A – C). As linhas da grade com espaçamento regular estabelecem os intervalos entre as caixas e ilustra a amostragem aleatória sistemática. O número de caixas em cada secção foi proporcional à área coberta pela formação hipocampal. Um único astrocito localizado dentro de cada caixa foi selecionado para reconstrução 3-D. (D – G) apresentam um astrócito imunomarcado com anti-GFAP, em diferentes ganhos. PHA = área para-hipocampal, Hp = hipocampo. Escalas:(A), (B) e (C): 250 μ m; D:250 μ m; E:250 μ m; F:125 μ m; G:25 μ m.

Com base em descrição anterior (Atoji and Wild 2006), definimos a formação hipocampal do maçarico como compreendendo o hipocampo propriamente dito e a área para-hipocampal. Para o hipocampo (Hp), os limites lateral e ventral foram definidos pelo ventrículo lateral, os limites dorsal e caudal corresponderam à superfície cerebral, o limite medial foi definido pela fissura interhemisférica e o limite inferior foi definido por uma mudança acentuada na densidade celular da região "V" do hipocampo na transição quando se identifica uma transição bem marcada para área septal (ver Figura 10). A área para-hipocampal (PHA) foi localizada dorsal e lateral ao hipocampo, conforme definido medialmente pelo sulco paraventricular (Atoji and Wild 2006).

Com o objetivo de gerar resultados estatisticamente válidos, foram combinadas amostras sistemáticas e aleatórias (garantindo assim a contribuição uniforme de todas as regiões

da formação hipocampal) (ver Figura 14) e análise estatística multivariada. Desse modo, as amostras foram retiradas de uma série de seções contendo a formação hipocampal, dorsal e ventral, ao longo do eixo antero-posterior do cérebro. Cada caixa está ocupando coordenadas com espaçamento regular dentro da formação hipocampal (Figura 14) indicando um sítio a partir do qual selecionamos um único astrócito para reconstrução 3-D.

Foi investigada a presença de características morfométricas compartilhadas pelos astrócitos selecionados em nossas amostras, dentro de cada grupo experimental. Com todas as células reconstruídas e os parâmetros morfométricos processados, foi estimado o índice de multimodalidade (MMI) nas amostras de cada variável dentro de um mesmo grupo (Tabela 1) O objetivo era encontrar aquelas com $MMI > 0,55$, exigência mínima para caracterizar amostras com distribuição bi ou multimodal para a realização da análise de cluster (Schweitzer e Renehan, 1997). Para isso usamos a seguinte equação: $MMI = [M3^2 + 1] / [M4 + 3(n - 1)^2 / (n - 2) \cdot (n - 3)]$, onde o MMI é o índice de multimodalidade, M3 é a distorção, M4 a curtose e n o tamanho da amostra.

A distorção (assimetria) e curtose descrevem a forma da curva amostral, permitindo dizer se a amostra é unimodal, bimodal ou multimodal. Foram selecionados para a composição do cluster somente os parâmetros morfométricos que obtiveram o $MMI > 0,55$. No cluster, as medidas de distância entre eles foram estimadas usando a distância euclidiana (raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças entre os valores dos elementos) pelo método de Ward (Ward 1963).

Tabela 1. Medidas morfológicas microscópicas a partir de reconstruções tridimensionais realizadas com o software Neurolucida.

<i>Análise de Estrutura Ramificada</i>	
Segmento	Qualquer porção da estrutura astrocítica ramificada com terminações que são nós ou terminações sem nós intermediários.
Segmentos/mm	Número de segmentos / comprimento total dos segmentos expressos em milímetros.
Nº de Árvores	Número de árvores nos astrócitos
Nº Total de Segmentos	Referem-se ao número total de segmentos da árvore.
Comprimento dos Ramos	Comprimento total da linha dos segmentos utilizados para traçar o ramo de interesse.
Comprimento Médio dos Ramos (μm)	Média = [Comprimento total] / [Número de ramos]
Comprimento Total dos Ramos (μm)	Comprimento total de todos os ramos da árvore.
Tortuosidade	= [Comprimento real do segmento] / [Distância entre os pontos finais do segmento]. O menor valor é 1; Isso representa um segmento reto. A tortuosidade permite comparar segmentos de diferentes comprimentos em termos da complexidade dos caminhos que eles tomam.
Área de Superfície Média dos Ramos (μm^2)	Calculado pela modelagem de cada ramo como um tronco (truncado cone circular reto) dividido pelo número de ramos.
Área de Superfície Total das Árvores (μm^2)	Área de superfície 2D da árvore de um astrócitos calculado com base na área definida pelas extremidades de todas as árvores.
Volume dos Ramos (μm^3)	Calculado pela modelagem cada peça de cada ramo como um tronco.
Volume Total dos Ramos	O volume total para todos os ramos da árvore.
Diâmetro da Base dos Ramos Primários (μm)	Diâmetro da base do 1º segmento.
Ângulo planar	Calculado com base nos pontos de extremidade dos segmentos. Refere-se à mudança de direção de um segmento em relação ao segmento anterior.
Dimensão fractal	o "K-dim" da análise fractal, descreve a forma como a estrutura de interesse preenche o espaço. Diferenças estatísticas significativas em K-dim sugerem dissimilaridades morfológicas.
Convex Hull - Perímetro (μm), Área (μm^2) 2D, Área de Superfície (μm^2) 3D e Volume (μm^3)	Convex hull mede o tamanho do campo dos ramos interpretando a estrutura ramificada como um sólido, controlando uma dada quantidade de espaço físico. A quantidade de espaço físico é determinada em termos de convex-hull volume, área de superfície, área ou perímetro.
Complexidade	Complexidade = [Soma das ordens terminais + Número de terminais] \times [Comprimento total da ramificação / Número de ramos primários]

Para a identificação das variáveis que mais contribuíram para a formação dos clusters, os dados empregados na análise de cluster foram submetidos à análise discriminante passo a passo, o que foi realizado com o auxílio do software Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK). Na análise de função discriminante (step-forward), o programa constrói um modelo de discriminação passo a passo. Nesse modelo, em cada etapa, todas as variáveis são revisadas e avaliadas para determinar qual variável contribui mais para a discriminação entre grupos. O

objetivo desse procedimento é determinar se os grupos diferem quanto à média de uma variável e, em seguida, usar essa variável para prever a associação ao grupo.

3.5 Análise Estatística

Subsequentemente calculamos a média aritmética e o erro padrão para as variáveis identificadas como os melhores preditores para os subtipos morfométricos astrogliais. Análises estatísticas e testes t, foram aplicadas para comparar grupos de astrócitos dentro do mesmo grupo e entre grupos experimentais. Tais procedimentos foram aplicados em nossas amostras com o objetivo de identificar potenciais subtipos astrogliais baseados em sua morfometria dentro e entre os grupos experimentais. Para identificar a morfologia típica do que representaria o aspecto morfológico típico do astrócito dentro de cada grupo empregamos estatística multivariada.

Para a escolha da célula representativa de cada grupo, que ilustra os dois tipos celulares de ambas janelas amostrais, a matriz de distância é utilizada para obter a soma das distâncias de cada célula em relação a todas as outras. Postula-se que a célula que melhor representa um grupo apresenta o menor valor de somatório das distâncias. As matrizes são construídas com a combinação de todas as células de determinado grupo tomadas par a par, seguido do cálculo ponderado de uma distância euclidiana escalar entre as células utilizando todas as variáveis morfométricas.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização morfológica do objeto de interesse

A figura 15 apresenta um astrócito no hipocampo de um indivíduo da espécie *Charadrius semipalmatus* imunomarcado para GFAP, sob o foco de lentes com diferentes ampliações. Os detalhes morfológicos astrocíticos são melhor analisados sob a objetiva de 100X e óleo de imersão, pela qual foi realizada a reconstrução tridimensional, e seus valores armazenados como coordenadas nos eixos X, Y e Z.

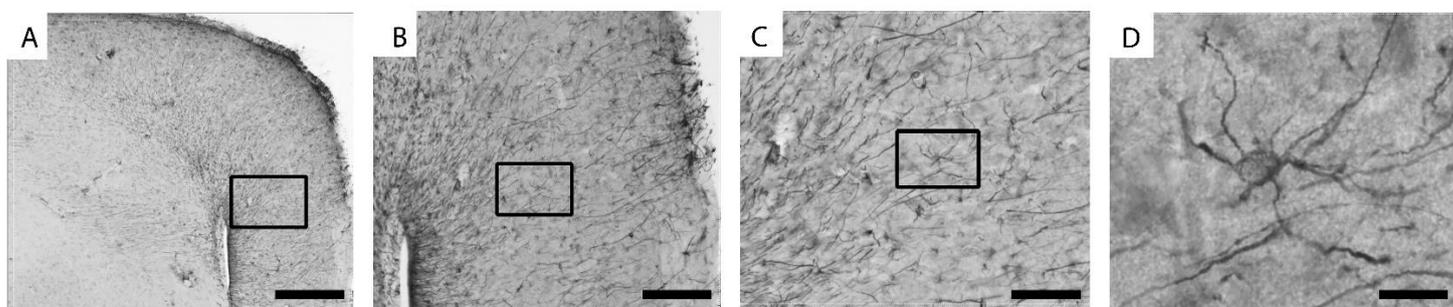


Figura 15. Fotomicrografias da região hipocampal de um exemplar da espécie *C. semipalmatus*, capturado em período de invernada na costa bragantina, ilustrando uma célula astrocítica em vários ganhos (A-4x; B-10x; C-20x; D-100x). Barras de escalas: A=625 μ m; B=250 μ m; C=125 μ m; D=25 μ m.

A imunomarcção para GFAP na região hipocampal do *C. pusilla* previamente estudado (Carvalho-Paulo, de Moraes Magalhães et al. 2017) identificou três tipos astrocíticos morfológicamente distintos (Figura 16): a glia radial, astrócitos estrelados possivelmente relacionados à vasculatura, e astrócitos estrelados possivelmente relacionados às sinapses e sem vínculo com a vasculatura. O presente trabalho encontrou resultados semelhantes quanto a tipologia astrocítica (não ilustrado) e tem como objeto de estudo morfológico os dois últimos tipos morfológicos na espécie *C. semipalmatus*. Os estudos morfométricos foram realizados entre os tipos morfológicos antes e após a migração outonal se completar comparando-os aos resultados previamente encontrados para os mesmos subtipos, nas mesmas janelas temporais em *C. pusilla*.

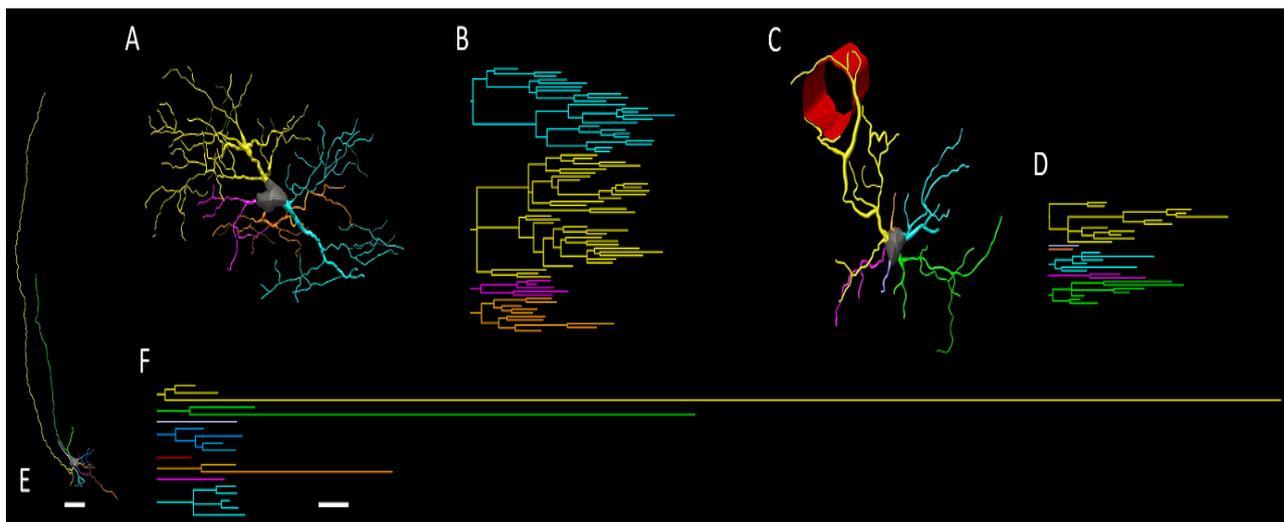


Figura 16. Reconstruções tridimensionais de astrócitos encontrados na região hipocampal do *C. pusilla*. A e B representam uma célula do Tipo I com seu respectivo dendrograma. C e D representam uma célula do Tipo II com seu respectivo dendrograma. E e F representam uma glia radial com seu respectivo dendrograma. Barra de escala: 10 μ m. (Fonte: Carvalho-Paulo 2017)

Utilizando os critérios de bi ou multimodalidade ($MMI > 0.55$) e independente do local/momento de captura das aves (Baía de Fundy - Canadá ou Bragança – Brasil), a análise de *cluster* indicou a existência de duas famílias de astrócitos, classificadas com base em diferenças morfométricas. A complexidade e o volume do *convex hull* foram as variáveis que mais contribuíram para essa divisão em ambos os grupos experimentais, testados pela análise discriminante. Os astrócitos pertencentes aos dois grupos celulares separados pela análise de *cluster* foram designados como Tipo I e Tipo II. Quando comparados aos astrócitos do Tipo I, os astrócitos do tipo II são significativamente menos complexos, tanto no período de migração (Figura 17) quanto no período de invernada (Figura 18).

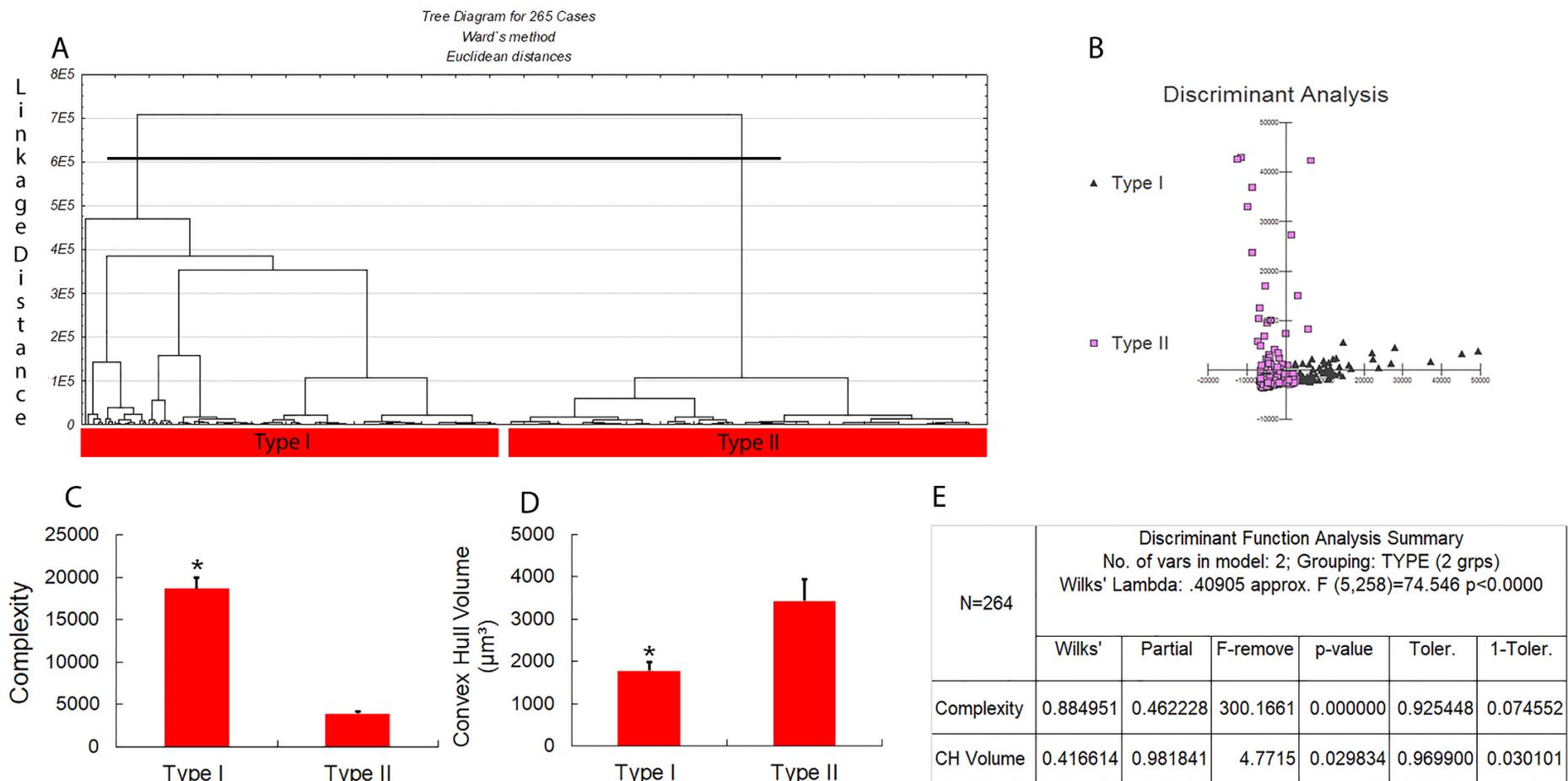


Figura 17. Representações gráficas da morfologia dos astrócitos da formação hipocampal de aves em migração (Canadá) da espécie *Charadrius semipalmatus*. (A) Análise hierárquica de cluster de 265 astrócitos indicando a presença de dois principais tipos astrocíticos (Tipo I e Tipo II), morfologicamente distintos. (B) Análise discriminante realizada para indicar a(s) variável(eis) que mais contribuiu(ram) para a formação do cluster: complexidade e volume do convex hull. (C e D) apresentam as diferenças de complexidade e volume do convex hull entre os dois tipos de astrócitos separados pelo cluster, indicando valores de média e erro padrão para cada variável. (E) Resumo dos resultados da análise da função discriminante indicando a complexidade como a variável de maior influência na formação dos clusters.

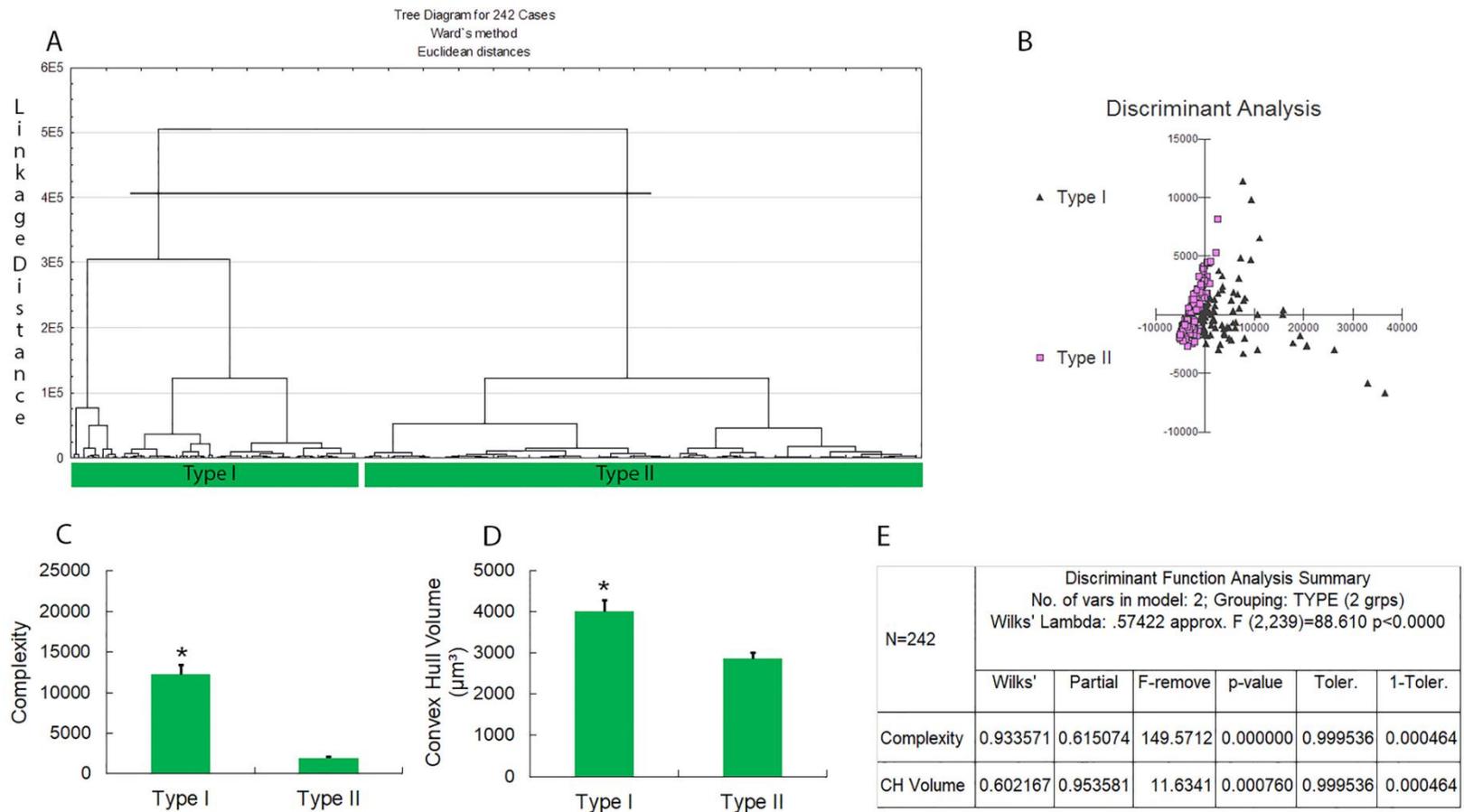


Figura 18. Representações gráficas da morfologia dos astrócitos da formação hipocampal de aves em período de invernada (Brasil) da espécie *Charadrius semipalmatus*. A, análise hierárquica de cluster de 242 astrócitos indicou a presença de dois principais tipos astrocíticos (Tipo I e Tipo II), morfologicamente distintos. B, Análise discriminante, realizada para indicar a(s) variável(eis) que mais contribuíram para a formação do cluster: complexidade e volume do convex hull. C, D Representações gráficas para ilustrar as diferenças de complexidade, volume do convex hull entre os dois tipos de astrócitos distinguidos pela análise de cluster, indicando valores de média e erro padrão para cada variável.

Além da complexidade e do volume do convex hull, outras variáveis morfométricas apresentaram diferenças significativas, com os astrócitos do Tipo I apresentando sempre os maiores valores quando comparados aos do Tipo II. Astrócitos do Tipo I, nas duas espécies de aves e nos dois diferentes momentos de captura, apresentaram maior comprimento total dos ramos, maior área de superfície dos ramos, maior K-dim, e maior perímetro, área e superfície do *convex hull* quando comparados aos do Tipo II (Figura 20).

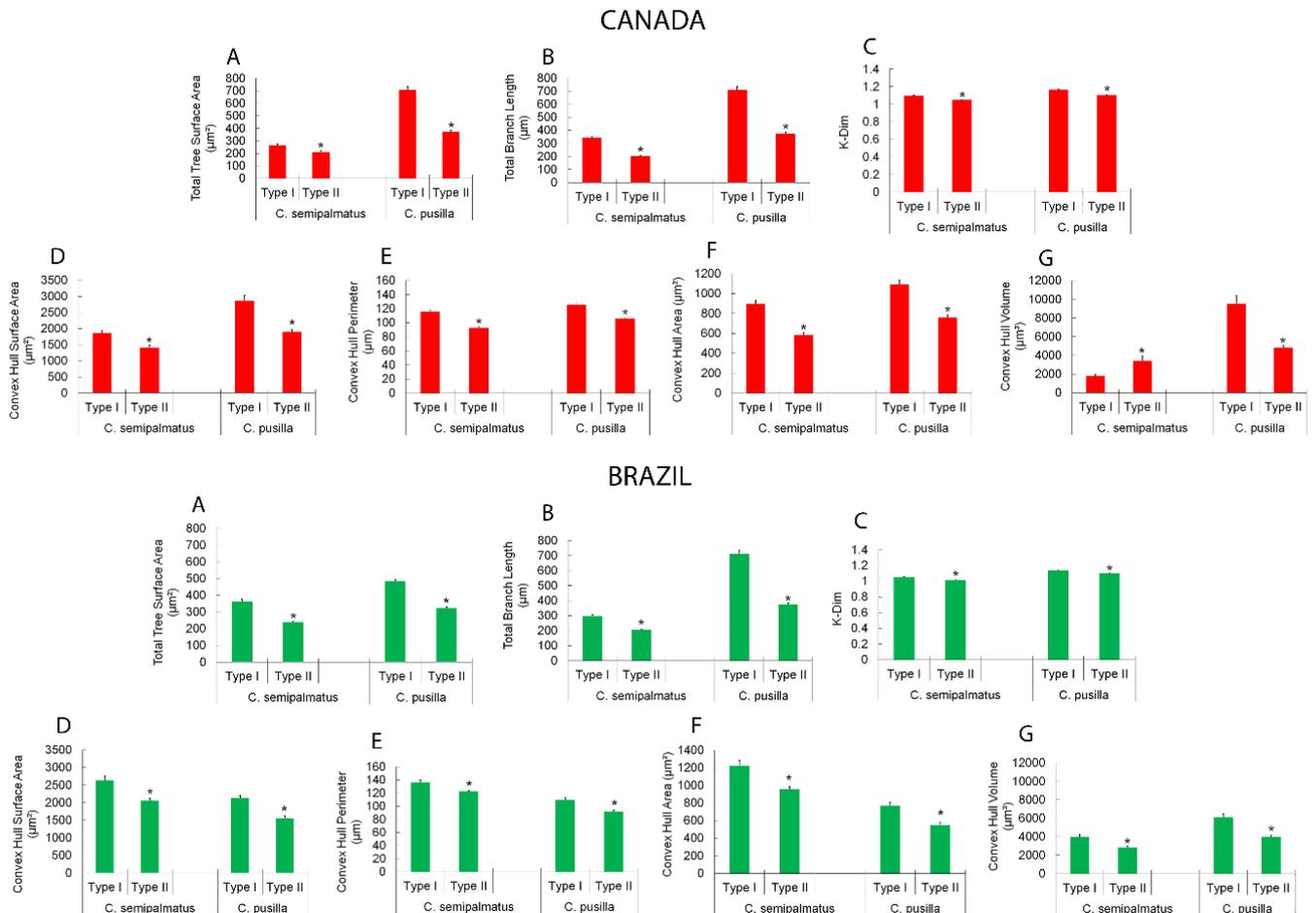


Figura 19. Representações gráficas dos valores médios e respectivos erros padrão das variáveis morfométricas dos astrócitos reconstruídos tridimensionalmente a partir de secções do hipocampo das espécies *C. pusilla* e *C. semipalmatus* no período de migração (Baía de Fundy – Canadá) e no período de invernada (Bragança – Brasil). A-G ilustram as diferenças significativas entre as médias (Teste-t bicaudal) das células do Tipo I e Tipo II, obtidas a partir de 7 variáveis, com as diferenças significativas indicadas por um asterisco.

De forma notável, o impacto da migração com paradas para descanso e alimentação realizada pelo *C. semipalmatus*, e da migração transatlântica realizada pelo *C. pusilla*, fez com que as aves no período de invernada apresentassem astrócitos Tipo I e Tipo II significativamente

menos complexos quando comparados aos astrócitos Tipo I e Tipo II das aves em período de migração, com uma redução mais acentuada nos astrócitos Tipo I da espécie *C. pusilla* (Figura 21). Enquanto que os astrócitos das duas espécies sofrem redução de suas complexidades após a viagem migratória, outras variáveis morfométricas exibem mudanças em direções opostas. Por exemplo, enquanto as células do Tipo I do *C. semipalmatus* sofrem uma significativa redução na área total de superfície dos ramos, no volume, na área, na área de superfície e no perímetro do convex hull, astrócitos do *C. pusilla* apresentam comportamento inverso, com um aumento significativo nessas variáveis. Similarmente os astrócitos do Tipo II, mostram quadro de mudanças que apontam na mesma direção, embora essa variação seja significativamente de menor amplitude. Faz exceção a essa tendência o volume do convex hull, que sofre uma redução significativa nas duas espécies ainda que em amplitudes significativamente diferentes (Figura 22).

Complexity

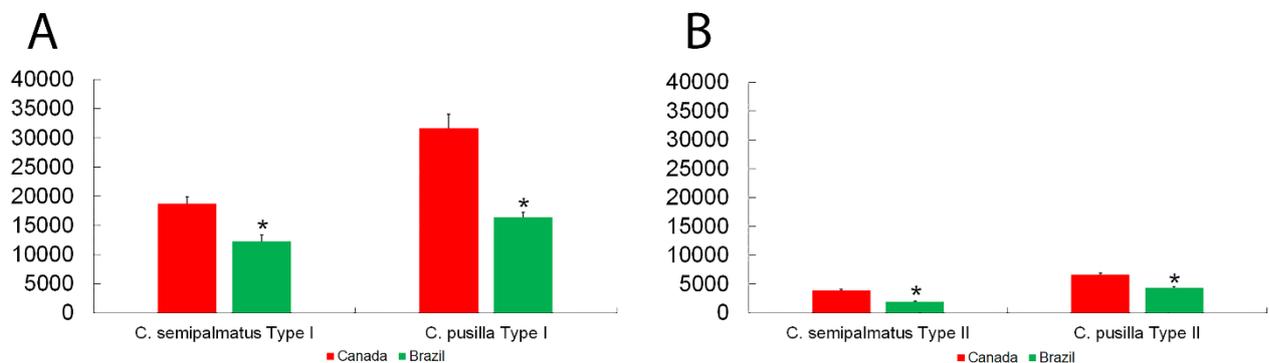


Figura 20. Representações gráficas dos valores de complexidade nas duas espécies *C. pusilla* e *C. semipalmatus*. Os gráficos relacionados aos valores de complexidade do Tipo I (A) e do tipo II (B) foram plotados com os valores de média e erro padrão e as diferenças significativas (Teste t bicaudal) estão indicadas por um asterisco “*”.

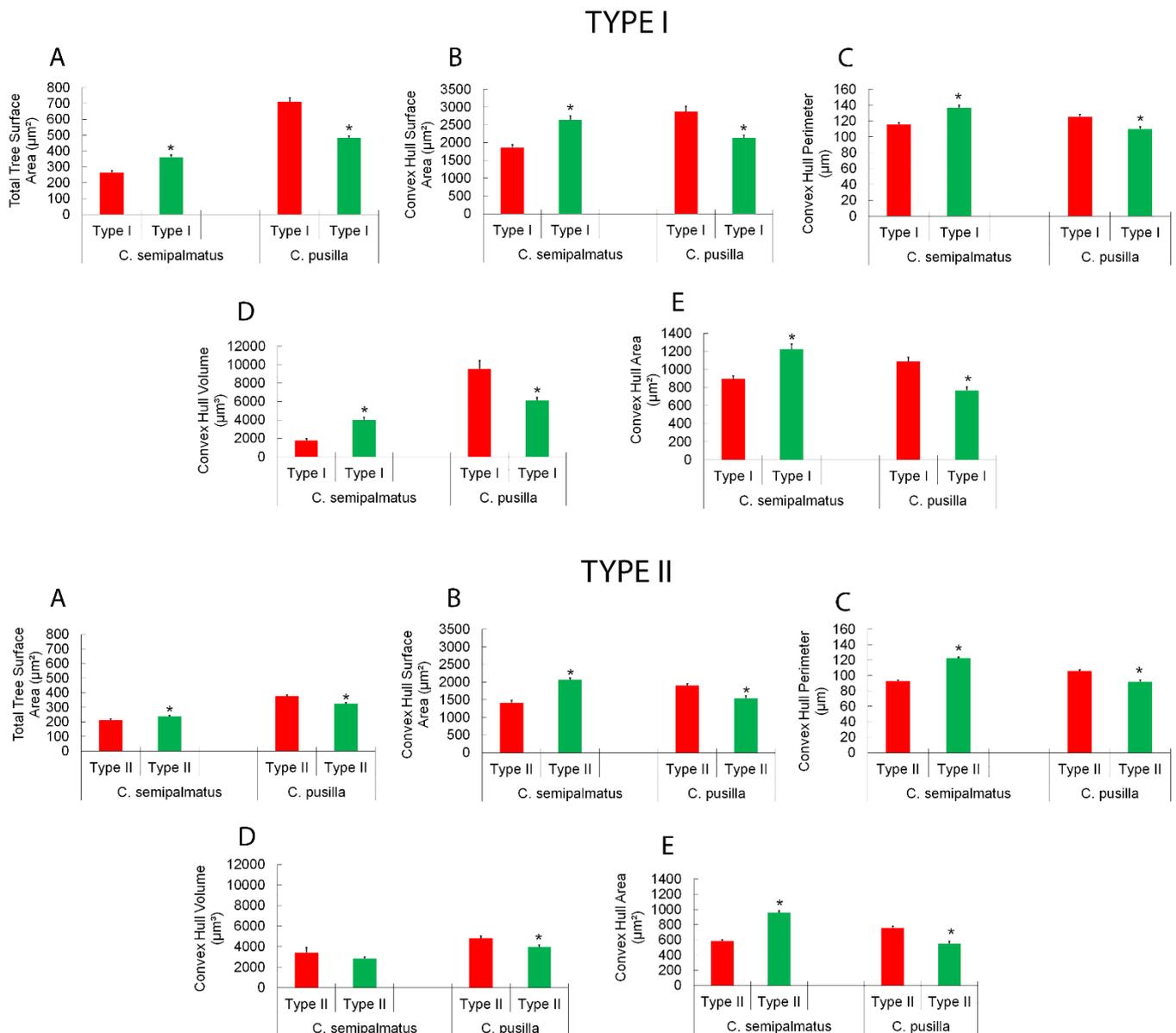


Figura 21. Representações gráficas dos astrócitos do Tipo I e Tipo II de *C. semipalmatus* e *C. pusilla* no período de migração (Baía de Fundy – Canadá) e invernada (Bragança – Brasil), reconstruídos tridimensionalmente. A-E Representações gráficas para ilustrar as diferenças significativas entre aos valores das médias e respectivos erros padrão (Teste-t bicaudal) de aves capturadas nos dois períodos, de 5 variáveis. (*) indica diferenças significantes.

Para acesso aos valores de t e p dos gráficos, ver Anexo I.

A Figura 22 ilustra reconstruções tridimensionais de astrócitos que representam as mudanças morfológicas sofridas pelos astrócitos a partir de comparações entre os exemplos estatisticamente mais próximos da morfologia média dos Tipos I e II e seus respectivos dendrogramas, selecionados a partir de análise estatística multivariada de todas as células reconstruídas a partir de secções da formação hipocampal de grupos de aves capturados em período de migração (Baía de Fundy – Canadá) e em período de invernada (Ilha de canela,

Bragança – Brasil). Como poder ser observado a magnitude das mudanças nas árvores dos astrócitos estimadas a partir da comparação dos astrócitos dessas aves capturadas antes e após a migração é significativamente menor nos astrócitos do Tipo II, tanto em *C. psulla* quanto em *C. semipalmatus*. De fato as mudanças morfométricas mais intensas são observadas nos astrócitos Tipo I da espécie *C. psulla* seguido pelos astrócitos do mesmo tipo em *C. semipalmatus*.

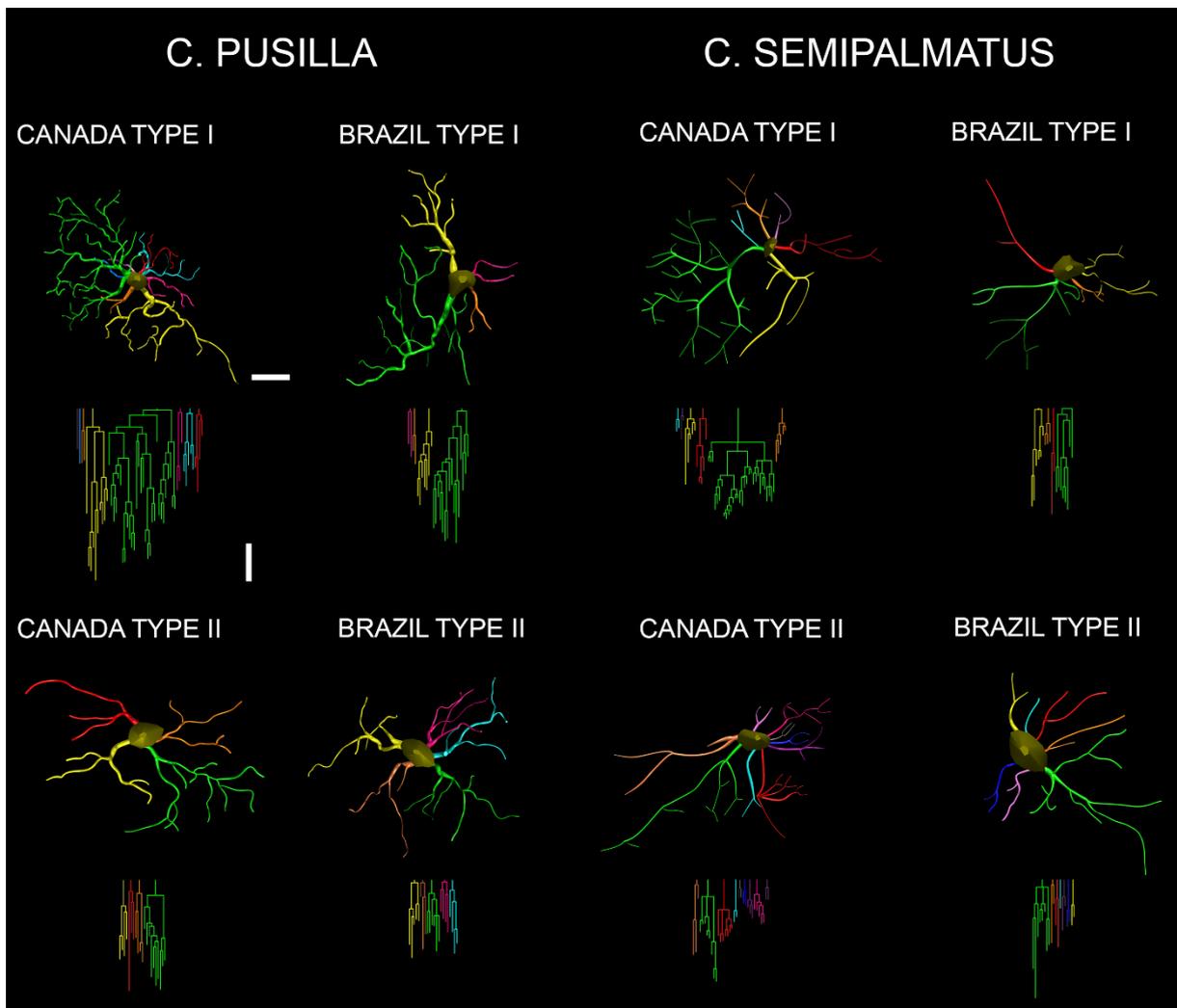


Figura 22. Reconstruções tridimensionais de astrócitos médios com seus respectivos dendrogramas, representando as células do Tipo I e Tipo II das aves em migração (Baía de Fundy – Canadá) e células do Tipo I e Tipo II das aves em período de invernada (Bragança – Brasil). É notável a menor complexidade da célula média do Tipo I do grupo capturado no período de invernada quando comparada com a célula média do Tipo I do grupo em migração. Escala: 10 μ m.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, comparamos as morfologias dos astrócitos do hipocampo de indivíduos das espécies *C. pusilla* e *C. semipalmatus*, capturados antes e depois das migrações outonais. Essas duas espécies de aves migratórias possuem estratégias contrastantes nos vôos de longa distância. O *C. pusilla* chega a locais de invernada através de um vôo sem escalas sobre o Oceano Atlântico, enquanto *C. semipalmatus* migra majoritariamente sobre o continente, com várias escalas para descanso e alimentação. Nossa análise comparativa com *C. pusilla* foi baseada em características morfométricas multimodais selecionadas de astrócitos 3D reconstruídos da formação hipocampal nos mesmos indivíduos utilizados em nosso estudo anterior (Carvalho-Paulo, de Moraes Magalhães et al. 2017).

Com base na análise hierárquica de cluster das características morfológicas dos astrócitos, categorizamos os astrócitos em dois grupos designados por astrócitos Tipo I e Tipo II, e a complexidade foi a característica morfométrica que melhor distinguiu esses dois grupos em ambas as espécies. Ficou evidente a partir dessas análises que os astrócitos do Tipo I foram mais afetados que os astrócitos Tipo II pelo vôo transatlântico, sugerindo que essas populações podem ter papéis fisiológicos distintos. De fato a plasticidade dos astrócitos aos estímulos produzidos pela migração outonal parece ser muito menor nos astrócitos do tipo II. Como a maioria dos astrócitos Tipo II estava fisicamente mais próxima dos vasos sanguíneos cerebrais do que os astrócitos do Tipo I (Figura 25), sugerimos que os astrócitos Tipo II podem estar mais envolvidos nas funções associadas à unidade neurovascular (Brown 2014).

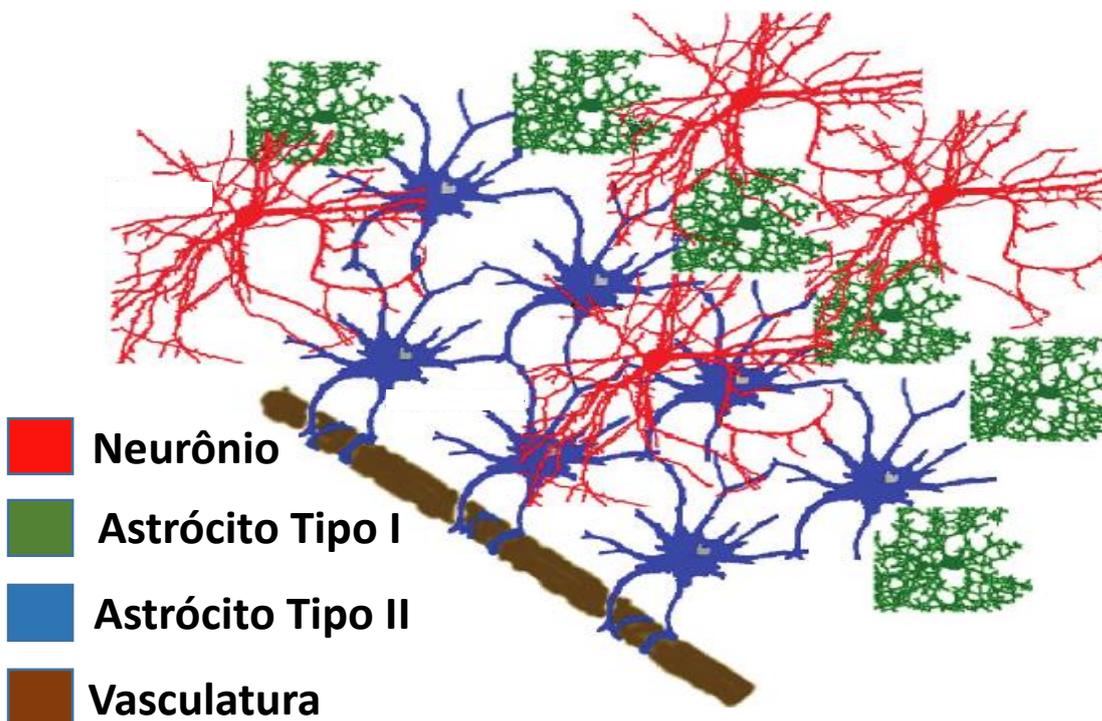


Figura 23. Ilustração da disposição celular demonstrando a posição relativa dos astrócitos Tipo I e Tipo II em relação à vasculatura e aos neurônios.

A análise estatística comparativa das morfologias dos astrócitos mostrou que, após o voo transatlântico, ocorreu uma redução das complexidades morfológicas dos astrócitos Tipo I e Tipo II, mas em maior extensão em *C. pusilla* do que em *C. semipalmatus*. Embora os achados morfológicos nos astrócitos tipo II tenham a mesma tendência, a magnitude das mudanças é significativamente muito menor em ambas as espécies.

Nenhum estudo anterior comparou as alterações dos astrócitos hipocâmpais em aves migratórias após vôos de longa distância, transatlânticos e terrestres, e nunca se realizou reconstruções tridimensionais de astrócitos com uma abordagem amostral que respeita os princípios estereológicos em aves marinhas.

5.1. Vôos Migratórios Contrastantes de Longa Distância e Morfologia de Astrócitos: influências potenciais de outras variáveis

Devemos ter em mente, como apontado anteriormente (Carvalho-Paulo, de Moraes Magalhães et al. 2017), que as morfologias gliais das aves coletadas em agosto na Baía de Fundy, e aquelas observadas nos astrócitos das aves coletadas de setembro a março na Ilha de Canela são claramente diferentes, tanto em *C. pusilla* quanto em *C. semipalmatus*. Estamos

atribuindo valor ponderal maior em nossa discussão e interpretação do que foi observado, às formas migratórias contrastantes (voo transatlântico sem paradas vs migração continental com várias paradas). Entretanto, como essas aves passaram pelo menos um mês (agosto a setembro) e talvez até sete meses (agosto a março) no Brasil, podemos ter muitas outras possibilidades para explicar as diferenças encontradas na morfologia glial.

Tal como apontado por Carvalho-Paulo e colaboradores (Carvalho-Paulo, de Moraes Magalhães et al. 2017), os vôos migratórios contrastantes em associação a muitas outras diferenças no ambiente da Baía de Fundy e na Ilha Canela, podem mudar o cérebro das aves durante o período de permanência naqueles locais. No entanto, como as duas espécies foram submetidas às mesmas variações na oferta de alimento, as mesmas condições fisiológicas pré e pós-acasalamento na Baía de Fundy e no Brasil, assim como a dias muito longos no verão ártico e a dias de 12 horas no equador, não é razoável propor que essas influências sejam as principais responsáveis pelas mudanças morfológicas contrastantes nas árvores astrocíticas dessas espécies.

Assim, as evidências sugerem que, desconsiderando as distinções filogenéticas, é útil e importante associar as alterações morfológicas astrocíticas contrastantes aos vôos de longa distância por via continental e transatlântica em *C. semipalmatus* e *C. pusilla*. De fato, a estimulação cognitiva provida pelo enriquecimento ambiental, a dieta e o estresse metabólico já são conhecidos por afetarem a morfofisiologia dos astrócitos, pelo menos em mamíferos (Soffie, Hahn et al. 1999, Diniz, Foro et al. 2010, Diniz, Foro et al. 2012, Rodríguez, Yeh et al., 2014, Yeh, Yeh e outros 2015, Diniz, de Oliveira et al., 2016, Tsai, Chen et al., 2016, Verkhatsky, Matteoli et al., 2016). Assim, com as espécies *C. pusilla* e *C. semipalmatus* foram expostos a essas variáveis em intensidades muito diferentes durante o processo migratório, é razoável sugerir que elas possam ter contribuído significativamente para as contrastantes alterações morfológicas dos astrócitos. As mudanças na dieta associada às distintas rotas migratórias, por sua vez, poderiam produzir mudanças importantes as quais em associação às induzidas por alterações dos níveis de glicocorticóides igualmente contrastantes, poderiam contribuir para aumentar ou reduzir os efeitos potenciais do enriquecimento ambiental, e isso poderia afetar as vias metabólicas com influências significativas na morfologia dos astrócitos.

Neste trabalho propomos a distinção de dois tipos de astrócitos com fenótipos morfológicos que foram diferencialmente afetados pelos vôos transatlânticos e sobre o continente de longa distância. Os ramos dos dois tipos de astrócitos encolheram em proporção significativamente diferentes após o longo vôo, e os dois tipos também mostraram diferenças em termos da porcentagem de células que estavam conectadas aos vasos sanguíneos. Em *C.*

pusilla, por exemplo uma maior porcentagem de astrócitos Tipo II (72,5%) interagiu com os vasos sanguíneos em comparação com os astrócitos Tipo I (27,5%), tanto durante a migração quanto na invernada, e como essa interação pode refletir sua contribuição relativa à unidade neurovascular, nós sugerimos que os astrócitos Tipo II podem estar mais envolvidos na barreira hemato-encefálica (BHE) do que os astrócitos Tipo I. A barreira hemato-encefálica inclui células endoteliais microvasculares cerebrais, astrócitos, neurônios e pericitos, todos contribuindo para a formação da unidade neurovascular (Weiss et al., 2009; Almutairi et al., 2016; Canfield et al., 2016; McConnell, HL et al., 2017). Como o voo longo afetou diferencialmente os astrócitos Tipo I versus Tipo II, sugerimos que essas células podem ter papéis fisiológicos distintos. Se os astrócitos Tipo II estão, de fato, mais envolvidos na unidade neurovascular do que os astrócitos Tipo I, então a integridade dos astrócitos Tipo II é provavelmente essencial para a integridade da barreira hemato-encefálica (BHE), e sua morfologia deve ser conservada mesmo em condições adversas. A BHE forma uma barreira física e metabólica entre o sangue e o cérebro e ajuda a determinar a polaridade do controle astrocitário do fluxo sanguíneo sobre as arteríolas em resposta às demandas bioenergéticas (Gordon et al., 2008). Para garantir a integridade da BHE, sugerimos que os astrócitos Tipo II possam aumentar os níveis de atividade redox das vias metabólicas alternativas para controlar o fluxo sanguíneo e para assegurar a atividade e sobrevivência neuronal durante o vôo transatlântico sem escala, enquanto que voo sobre o continente com múltiplas paradas pode reabastecer de glicose e estocar glicogênio, sempre que parar para repouso e alimentação. As aves de voo transatlântico devem jejuar por 6 dias durante o vôo longo (Brown, 2014), e quando a glicose é escassa, o cérebro aumenta o metabolismo dos corpos cetônicos. Isso pode levar a uma alta demanda de astrócitos para absorver, sintetizar e liberar ácidos graxos, que são fontes alternativas de energia que podem ser liberadas como β -hidroxibutirato, um corpo cetônico que pode alimentar células cerebrais, incluindo astrócitos, neurônios e oligodendrócitos (Achanta e Rae, 2017). De fato, foi demonstrado que níveis mais elevados de β OHB no sangue, como é esperado durante o período de jejum associado ao vôo transatlântico, podem atender a todas as necessidades básicas e cerca de metade de toda a energia necessária para atividade neuronal (Chowdhury et al., 2014). Notavelmente, β OHB reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio associadas à bioenergética mitocondrial, sugerindo que pode haver uma via alternativa em astrócitos Tipo II usando corpos cetônicos em associação com o período de jejum imposto pelo longo vôo do *C. pusilla*. No entanto, como essa via alternativa não suporta a atividade sináptica (Arakawa et al., 1991), sugerimos que a atividade sináptica dependeria dos astrócitos do Tipo I. De fato, durante a neurotransmissão, o glutamato na fenda sináptica ativa seus

receptores nos neurônios e astrócitos antes da recaptação pelos astrócitos; isso requer energia. Embora o mecanismo detalhado de captação de glutamato usado pelos astrócitos permaneça controverso, os astrócitos são conhecidos por armazenar glicogênio, particularmente em áreas com alta atividade sináptica, e o lactato derivado de glicogênio pode sustentar a atividade neuronal, especialmente durante a hipoglicemia (Bolaños, 2016). Essas limitações metabólicas impostas aos voos transatlânticos podem não se aplicar na mesma extensão à espécie *C. semipalmatus* que voa sobre o continente com múltiplas paradas e que a cada sítio de parada poderia repor seus estoques de glicogênio e reativar a via glicolítica. Tomados em conjunto, estes resultados apoiam a ideia de que estas distintas vias metabólicas de astrócitos são diferencialmente ativadas em astrócitos Tipo I versus Tipo II, induzindo diferentes níveis de stress oxidativo nas aves *C. pusilla* e *C. semiplamatus*.

Outra possível explicação é de que, como a área de reprodução das duas espécies é extensa, não há razão para supor que as aves capturadas no Canadá sejam da mesma população que as aves capturadas no Brasil.

Finalmente, é importante ter em mente que, com base na análise morfológica de 3 marcadores astrogliais seletivos (GFAP, glutamina sintetase e S-100 β), há uma visão emergente de que “astrócitos” compreendem uma população heterogênea mesmo dentro de uma determinada região. (Rodríguez, Yeh et al. 2014). Nossos achados, limitados a astrócitos marcados com GFAP, podem mostrar apenas algumas das alterações morfológicas dos astrócitos da formação hipocampal de *C. pusilla* e *C. semipalmatus* em resposta a uma variedade de estímulos ambientais ao longo da rota migratória, incluindo àqueles relacionados à intensidade contrastante de exercício associado aos voos interrompidos sobre o continente e transatlânticos sem escala.

Como não temos informações na literatura sobre a influência potencial do sexo e da idade na morfologia dos astrócitos do hipocampo em aves migratórias de longa distância, e não registramos a idade dos indivíduos em nossa amostra devido a limitações técnicas, é difícil discutir essas potenciais influências em detalhe. No entanto, experiência e sexo são variáveis importantes que foram previamente demonstradas como influenciando as tarefas dependentes de hipocampo em aves (Astié, Scardamaglia et al. 2015, Rensel, Ellis et al. 2015, Guigueno, MacDougall-Shackleton et al. 2016, Bingman e MacDougall-Shackleton 2017), e o comportamento migratório é acompanhado por alterações morfológicas do hipocampo, incluindo volume e neurogênese (Barkan, Roll et al. 2016, Barkan, Yom-Tov et al. 2017, Morais Magalhães, Guerreiro Diniz et al. 2017). Assim, essas variáveis devem ser consideradas

em estudos futuros de morfologia dos astrócitos do hipocampo em aves migratórias de longa distância para que os motivos das alterações morfológicas possa ser esclarecido.

Devido à natureza correlacional da análise, as diferenças nas morfologias foram associadas ao papel do hipocampo como centro de integração multissensorial usando bússolas celestes e magnéticas, assim como, no âmbito local, pistas visuais e olfatórias para navegação. No entanto, como afirmado em nosso estudo anterior (Carvalho-Paulo, de Moraes Magalhães et al. 2017), a história poderia ser diferente se outra área do cérebro de ordem superior, menos envolvida na migração, exibisse diferenças astrocitárias semelhantes e isso fosse uma limitação potencial do presente estudo, que poderia ser evitado se outra área fosse explorada.

5.2. Ambiente Enriquecido e Exercício Durante a Migração Outonal

O ambiente pelo qual *C. pusilla* e *C. semipalmatus* voam durante a migração de outono, muda drasticamente durante o voo e as aves provavelmente integram pistas globais e aprendem a reconhecer as pistas locais para completar com sucesso a migração (Bingman e Cheng 2005, Mouritsen, Heyers et al., 2016). A navegação terrestre transoceânica e trans-continental de longa distância faz uso de informações celestes e geomagnéticas (Frost e Mouritsen 2006, Thorup e Holland 2009), enquanto mapas e pontos de referência locais provenientes de várias modalidades sensoriais estão associados a comportamento migratório de curta distância (Biro, Meade e outros 2004, Frost e Mouritsen 2006).

Assim, a migração pode ser considerada como uma espécie de enriquecimento ambiental que poderia contribuir para aumentar a complexidade dos astrócitos (Ramírez-Rodríguez, Ocaña-Fernández et al. 2014, Diniz, de Oliveira et al. 2016). Entretanto nossos achados revelam um panorama complexo onde o ambiente enriquecido isoladamente não os explica. De fato nossa hipótese original indicava que encontraríamos aumento da complexidade astrócítica nos animais de invernada da espécie *C. semiplamatus*. O que encontramos entretanto foi uma diminuição da complexidade morfológica em ambas as espécies nos dois tipos de astrócitos sendo que de maior magnitude nos astrócitos do tipo I.

Por outro lado, tem sido demonstrado em mamíferos, que o exercício intenso, pode causar apoptose excessiva e danos na plasticidade sináptica através da sobrecarga de Ca^{2+} e da via de apoptose induzida por estresse do retículo endoplasmático (Ding, Chang et al. 2014). Considerando que os níveis de estresse oxidativo podem ter sido igualmente contrastantes em decorrência das diferenças no padrão do voo migratório, o grau de encolhimento distinto observado nos astrócitos das aves invernante num caso e noutro, poderia estar associado aos diferentes níveis de estresse. Embora esses efeitos precisem ser confirmados em outras aves, é

razoável especular que o exercício intenso durante o vôo transatlântico de longa distância sem paradas, poderia contribuir para a maior redução da complexidade morfológica em *C. pusilla* (Bacellar, Lessa et al., 2002).

Assim, nossos achados sugerem que, se o enriquecimento ambiental ao longo da jornada realmente aumenta a complexidade morfológica, seus efeitos não são suficientes para permitir o aumento da complexidade morfológica que seria esperada nas aves invernantes de *C. semipalmatus*.

6. Conclusão

Embora *C. semipalmatus* e *C. pusilla* difiram filogeneticamente e em uma variedade de outras maneiras, pode ser significativo que a morfologia dos astrócitos do hipocampo tenha diminuído sua complexidade em maior proporção nas espécies que são submetidas ao maior nível de estresse metabólico durante a migração. Esse voo transoceânico requer um voo sem paradas de cinco dias, associado a um exercício contínuo e vigoroso, que não é observado no voo com múltiplas paradas de *C. semipalmatus*.

No entanto, como este estudo é explicitamente correlacional, os resultados levantam questões importantes sobre as relações entre as alterações morfológicas dos astrócitos do hipocampo e os voos migratórios de longa distância contrastantes nas aves limícolas. Para esclarecer melhor essa questão, estudos futuros exigirão uma análise comparativa em escala muito maior de mais espécies de maçaricos, incluindo ferramentas analíticas complementares para correlacionar, comportamento, análise celular e molecular.

7. REFERÊNCIAS

- Abellan, A., E. Desfilis and L. Medina (2014). "Combinatorial expression of Lef1, Lhx2, Lhx5, Lhx9, Lmo3, Lmo4, and Prox1 helps to identify comparable subdivisions in the developing hippocampal formation of mouse and chicken." *Front Neuroanat* **8**: 59.
- Alert, B., A. Michalik, S. Helduser, H. Mouritsen and O. Gunturkun (2015). "Perceptual strategies of pigeons to detect a rotational centre--a hint for star compass learning?" *PLoS One* **10**(3): e0119919.
- Allen, N. J. (2014). "Astrocyte regulation of synaptic behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**: 439-463.
- Allen, T. A. and N. J. Fortin (2013). "The evolution of episodic memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110 Suppl 2**: 10379-10386.
- Atoji, Y. (2016). "Gene expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the tectofugal pathway of the pigeon." *Neuroscience* **316**: 367-377.
- Atoji, Y. and J. M. Wild (2004). "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* **475**(3): 426-461.
- Atoji, Y. and J. M. Wild (2006). "Anatomy of the avian hippocampal formation." *Rev Neurosci* **17**(1-2): 3-15.
- Atoji, Y., J. M. Wild, Y. Yamamoto and Y. Suzuki (2002). "Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*)." *J Comp Neurol* **447**(2): 177-199.
- Azevedo-Júnior, S. M. D. M. E. L. (1994.). "Censo de aves limícolas na Coroa do Avião, Pernambuco, Brasil, informações de 1991 a 1992." *Revista Nordestina de Zoologia, Recife*. **1** (1): 263-277.
- Azevedo-Júnior, S. M. D. M. D. M. E. L. (2001a.). "Plumagens e mudas de Charadriiformes (Aves) no litoral de Pernambuco, Brasil.
- . " *Revista Brasileira de Zoologia*, **18** (3) 657- 672.
- Bailey, D. J. and C. J. Saldanha (2010). "Ecological Validity and the Study of Procedural and Episodic Memory Function in Songbirds." *Cogn Sci (Hauppauge)* **5**(1): 1-20.
- Barbieri, E. M., J.T.** & S.C. Xavier (2000). "DISTRIBUIÇÃO DA BATUÍRA-DE-BANDO (*Charadrius semipalmatus*) AO LONGO DO ANO DE 1999 NA PRAIA DA ILHA COMPRIDA." *Notas Técnicas Facimar* **4**: 69-76.
- Belgard, T. G., J. F. Montiel, W. Z. Wang, F. Garcia-Moreno, E. H. Margulies, C. P. Ponting and Z. Molnar (2013). "Adult pallium transcriptomes surprise in not reflecting predicted homologies across diverse chicken and mouse pallial sectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(32): 13150-13155.
- Bittner, C. X., A. Loaiza, I. Ruminot, V. Larenas, T. Sotelo-Hitschfeld, R. Gutierrez, A. Cordova, R. Valdebenito, W. B. Frommer and L. F. Barros (2010). "High resolution measurement of the glycolytic rate." *Front Neuroenergetics* **2**.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* **232**(2): 331-356.
- Bolanos, J. P. (2016). "Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity." *J Neurochem* **139 Suppl 2**: 115-125.
- Bootsman, N. J. M., T. L. Skinner, R. Lal, D. Glindemann, C. Lagasca and G. Peeters (2018). "The relationship between physical activity, and physical performance and psycho-cognitive functioning in older adults living in residential aged care facilities." *J Sci Med Sport* **21**(2): 173-178.
- Boumezbeur, F., K. F. Petersen, G. W. Cline, G. F. Mason, K. L. Behar, G. I. Shulman and D. L. Rothman (2010). "The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy." *J Neurosci* **30**(42): 13983-13991.
- Bouzier-Sore, A. K., P. Voisin, V. Bouchaud, E. Bezancon, J. M. Franconi and L. Pellerin (2006). "Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study." *Eur J Neurosci* **24**(6): 1687-1694.
- Brown, S. (2014). "The Remarkable Odyssey of a Semipalmated Sandpiper." <http://shorebirdscience.org/coats-2014-06/>: <http://shorebirdscience.org/>.

Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J Neurosci* **22**(1): 183-192.

Campos, C., Naiff, R.H. and Araujo, A.S. (2008). "Censo de aves migratórias (Charadriidae e Scolopacidae) da Porção Norte da Bacia Amazônica, Macapá, Amapá, Brasil." *Ornitologia* **3**: 38-46.

Carlo, C. N. and C. F. Stevens (2011). "Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology." *J Comp Neurol* **519**(14): 2803-2810.

Carvalho-Paulo, D., N. G. de Moraes Magalhães, D. de Almeida Miranda, D. G. Diniz, E. P. Henrique, I. A. M. Moraes, P. D. C. Pereira, M. A. D. de Melo, C. M. de Lima, M. A. de Oliveira, C. Guerreiro-Diniz, D. F. Sherry and C. W. P. Diniz (2017). "Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper." *Front Neuroanat* **11**: 126.

Cnotka, J., M. Mohle and G. Rehkemper (2008). "Navigational experience affects hippocampus size in homing pigeons." *Brain Behav Evol* **72**(3): 233-238.

Colombo, M., S. Cawley and N. Broadbent (1997). "The effects of hippocampal and area parahippocampalis lesions in pigeons: II. Concurrent discrimination and spatial memory." *Q J Exp Psychol B* **50**(2): 172-189.

Cramp, S. K. S. (1983). "Handbook of the birds of Europe, the Middle East, and North Africa." *Waders to Gulls. Oxford, Oxford Univ. Press. vol. 3*: 230p.

Csillag, A. and C. M. Montagnese (2005). "Thalamotelencephalic organization in birds." *Brain Res Bull* **66**(4-6): 303-310.

Di Castro, M. A., J. Chuquet, N. Liaudet, K. Bhaukaurally, M. Santello, D. Bouvier, P. Tiret and A. Volterra (2011). "Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes." *Nat Neurosci* **14**(10): 1276-1284.

Diniz, C. G., N. G. Magalhaes, A. A. Sousa, C. Santos Filho, D. G. Diniz, C. M. Lima, M. A. Oliveira, D. C. Paulo, P. D. Pereira, D. F. Sherry and C. W. Picanco-Diniz (2016). "Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers." *Braz J Med Biol Res* **49**(1): e5005.

Diniz, D. G., M. A. de Oliveira, C. M. de Lima, C. A. Foro, M. C. Sosthenes, J. Bento-Torres, P. F. da Costa Vasconcelos, D. C. Anthony and C. W. Diniz (2016). "Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes." *Behav Brain Funct* **12**(1): 28.

Diniz, D. G., G. O. Silva, T. B. Naves, T. N. Fernandes, S. C. Araujo, J. A. Diniz, L. H. de Farias, M. C. Sosthenes, C. G. Diniz, D. C. Anthony, P. F. da Costa Vasconcelos and C. W. Picanco Diniz (2016). "Hierarchical Cluster Analysis of Three-Dimensional Reconstructions of Unbiased Sampled Microglia Shows not Continuous Morphological Changes from Stage 1 to 2 after Multiple Dengue Infections in *Callithrix penicillata*." *Front Neuroanat* **10**: 23.

Emlen, S. T. (1970). "Celestial rotation: its importance in the development of migratory orientation." *Science* **170**(3963): 1198-1201.

Emlen, S. T. (1975). "The stellar-orientation system of a migratory bird." *Sci Am* **233**(2): 102-111.

Emlen, S. T. (1967). "Migratory orientation in the indigo bunting, *Passerina cyanea*. Part I: the evidence for use of celestial cues." *Auk* **84**: 309-352.

Erickson, K. I., M. W. Voss, R. S. Prakash, C. Basak, A. Szabo, L. Chaddock, J. S. Kim, S. Heo, H. Alves, S. M. White, T. R. Wojcicki, E. Mailey, V. J. Vieira, S. A. Martin, B. D. Pence, J. A. Woods, E. McAuley and A. F. Kramer (2011). "Exercise training increases size of hippocampus and improves memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(7): 3017-3022.

Fahimi, A., M. A. Baktir, S. Moghadam, F. S. Mojabi, K. Sumanth, M. W. McNerney, R. Ponnusamy and A. Salehi (2017). "Physical exercise induces structural alterations in the hippocampal astrocytes: exploring the role of BDNF-TrkB signaling." *Brain Struct Funct* **222**(4): 1797-1808.

Farmer, W. T., T. Abrahamsson, S. Chierzi, C. Lui, C. Zaelzer, E. V. Jones, B. P. Bally, G. G. Chen, J. F. Theroux, J. Peng, C. W. Bourque, F. Charron, C. Ernst, P. J. Sjöström and K. K. Murai (2016). "Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling." *Science* **351**(6275): 849-854.

Fernandez-Arjona, M. D. M., J. M. Grondona, P. Granados-Duran, P. Fernandez-Llebregz and M. D. Lopez-Avalos (2017). "Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis." *Front Cell Neurosci* **11**: 235.

Frost, B. J. and H. Mouritsen (2006). "The neural mechanisms of long distance animal navigation." Curr Opin Neurobiol **16**(4): 481-488.

Gagliardo, A., P. loale and V. P. Bingman (1999). "Homing in pigeons: the role of the hippocampal formation in the representation of landmarks used for navigation." J Neurosci **19**(1): 311-315.

Gagliardo, A., P. loale, M. Savini, G. Dell'Omo and V. P. Bingman (2009). "Hippocampal-dependent familiar area map supports corrective re-orientation following navigational error during pigeon homing: a GPS-tracking study." Eur J Neurosci **29**(12): 2389-2400.

Gagliardo, A., G. Vallortigara, D. Nardi and V. P. Bingman (2005). "A lateralized avian hippocampus: preferential role of the left hippocampal formation in homing pigeon sun compass-based spatial learning." Eur J Neurosci **22**(10): 2549-2559.

Gunturkun, O. (2005). "Avian and mammalian "prefrontal cortices": limited degrees of freedom in the evolution of the neural mechanisms of goal-state maintenance." Brain Res Bull **66**(4-6): 311-316.

Gupta, S., R. Maurya, M. Saxena and J. Sen (2012). "Defining structural homology between the mammalian and avian hippocampus through conserved gene expression patterns observed in the chick embryo." Dev Biol **366**(2): 125-141.

Halassa, M. M., T. Fellin, H. Takano, J. H. Dong and P. G. Haydon (2007). "Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte." J Neurosci **27**(24): 6473-6477.

Hall, C. N., M. C. Klein-Flugge, C. Howarth and D. Attwell (2012). "Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing." J Neurosci **32**(26): 8940-8951.

Han, X., M. Chen, F. Wang, M. Windrem, S. Wang, S. Shanz, Q. Xu, N. A. Oberheim, L. Bekar, S. Betstadt, A. J. Silva, T. Takano, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2013). "Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice." Cell Stem Cell **12**(3): 342-353.

Harris, J. J., R. Jolivet and D. Attwell (2012). "Synaptic energy use and supply." Neuron **75**(5): 762-777.

Herculano-Houzel, S. (2014). "The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution." Glia **62**(9): 1377-1391.

Herold, C., V. J. Coppola and V. P. Bingman (2015). "The maturation of research into the avian hippocampal formation: Recent discoveries from one of the nature's foremost navigators." Hippocampus **25**(11): 1193-1211.

Hicklin, P. W. (1987). "The migration of shorebirds in the Bay of Fundy." Wilson Bull. **99**: 540-570.

Hicklin, P. W., and Gratto-Trevor, C.L. (2010). "Semipalmated Sandpiper (*Calidris pusilla*). In The birds of North America online." No. 6. Edited by A. Poole. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, N.Y. Available from <http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/006/>

Itoh, Y., T. Esaki, K. Shimoji, M. Cook, M. J. Law, E. Kaufman and L. Sokoloff (2003). "Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4879-4884.

Ivanov, A. I., A. E. Malkov, T. Waseem, M. Mukhtarov, S. Buldakova, O. Gubkina, M. Zilberter and Y. Zilberter (2014). "Glycolysis and oxidative phosphorylation in neurons and astrocytes during network activity in hippocampal slices." J Cereb Blood Flow Metab **34**(3): 397-407.

Jackson, M. B. (2013). "Recall of spatial patterns stored in a hippocampal slice by long-term potentiation." J Neurophysiol **110**(11): 2511-2519.

Jonckers, E., O. Gunturkun, G. De Groof, A. Van der Linden and V. P. Bingman (2015). "Network structure of functional hippocampal lateralization in birds." Hippocampus **25**(11): 1418-1428.

Kahn, M. C. and V. P. Bingman (2009). "Avian hippocampal role in space and content memory." Eur J Neurosci **30**(10): 1900-1908.

Khakh, B. S. and M. V. Sofroniew (2015). "Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits." Nat Neurosci **18**(7): 942-952.

Kramer, G. (1950). "Weitere Analyse der Faktoren, welche die Zugaktivität des geküfigten Vogels orientieren." Naturwissenschaften **37**

377-378.

Krebs, J. R., D. F. Sherry, S. D. Healy, V. H. Perry and A. L. Vaccarino (1989). "Hippocampal specialization of food-storing birds." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1388-1392.

Krzisch, M., S. G. Temprana, L. A. Mongiat, J. Armida, V. Schmutz, M. A. Virtanen, J. Kocher-Braissant, R. Kraftsik, L. Vutskits, K. K. Conzelmann, M. Bergami, F. H. Gage, A. F. Schinder and N. Toni (2015). "Pre-existing astrocytes form functional perisynaptic processes on neurons generated in the adult hippocampus." Brain Struct Funct **220**(4): 2027-2042.

Lebon, V., K. F. Petersen, G. W. Cline, J. Shen, G. F. Mason, S. Dufour, K. L. Behar, G. I. Shulman and D. L. Rothman (2002). "Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism." J Neurosci **22**(5): 1523-1531.

Liedvogel, M., G. Feenders, K. Wada, N. F. Troje, E. D. Jarvis and H. Mouritsen (2007). "Lateralized activation of Cluster N in the brains of migratory songbirds." Eur J Neurosci **25**(4): 1166-1173.

Liedvogel, M. and H. Mouritsen (2010). "Cryptochromes--a potential magnetoreceptor: what do we know and what do we want to know?" J R Soc Interface **7 Suppl 2**: S147-162.

Louchart, A. (2008). "Emergence of long distance bird migrations: a new model integrating global climate changes." Naturwissenschaften **95**(12): 1109-1119.

Lovatt, D., U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, W. He, J. H. Lin, X. Han, T. Takano, S. Wang, F. J. Sim, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2007). "The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex." J Neurosci **27**(45): 12255-12266.

M.H. Marhaban, M. H. M. S. W. Z. W. H. M. Z. A. A. K. S. S. M. A. M. R. S. A. A. (2014). "GPS based portable dual-axis solar tracking system using astronomical equation." IEEE International Conference on Power and Energy (PECon): 245-249.

Magistretti, P. J. and I. Allaman (2015). "A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging." Neuron **86**(4): 883-901.

Maguire, E. A., D. G. Gadian, I. S. Johnsrude, C. D. Good, J. Ashburner, R. S. Frackowiak and C. D. Frith (2000). "Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4398-4403.

Maguire, E. A., K. Woollett and H. J. Spiers (2006). "London taxi drivers and bus drivers: a structural MRI and neuropsychological analysis." Hippocampus **16**(12): 1091-1101.

Mann, R. P., C. Armstrong, J. Meade, R. Freeman, D. Biro and T. Guilford (2014). "Landscape complexity influences route-memory formation in navigating pigeons." Biol Lett **10**(1): 20130885.

Manns, J. R. and H. Eichenbaum (2006). "Evolution of declarative memory." Hippocampus **16**(9): 795-808.

Margrie, T. W., J. A. Rostas and P. Sah (1998). "Long-term potentiation of synaptic transmission in the avian hippocampus." J Neurosci **18**(4): 1207-1216.

Margrie, T. W., J. A. Rostas and P. Sah (1998). "Presynaptic long-term depression at a central glutamatergic synapse: a role for CaMKII." Nat Neurosci **1**(5): 378-383.

Massey, P. V. and Z. I. Bashir (2007). "Long-term depression: multiple forms and implications for brain function." Trends Neurosci **30**(4): 176-184.

McKinnon, L., P. A. Smith, E. Nol, J. L. Martin, F. I. Doyle, K. F. Abraham, H. G. Gilchrist, R. I. Morrison and J. Bety (2010). "Lower predation risk for migratory birds at high latitudes." Science **327**(5963): 326-327.

Mestre, L. (2007). "Registros das migrações de trinta-réis-boreal *Sterna hirundo*: análise das recuperações de indivíduos marcados na América do Norte (1928 - 2005) e Brasil (1983 - 2005)." Ornitologia **2**: 81-87.

Middeldorp, J. and E. M. Hol (2011). "GFAP in health and disease." Prog Neurobiol **93**(3): 421-443.

Moller, A., S. Sagasser, W. Wiltschko and B. Schierwater (2004). "Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass." Naturwissenschaften **91**(12): 585-588.

Morris, R. G. (2003). "Long-term potentiation and memory." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1432): 643-647.

Moscovitch, M., R. Cabeza, G. Winocur and L. Nadel (2016). "Episodic Memory and Beyond: The Hippocampus and Neocortex in Transformation." *Annu Rev Psychol* **67**: 105-134.

Mouritsen, H., G. Feenders, M. Liedvogel, K. Wada and E. D. Jarvis (2005). "Night-vision brain area in migratory songbirds." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8339-8344.

Mouritsen, H., D. Heyers and O. Gunturkun (2016). "The Neural Basis of Long-Distance Navigation in Birds." *Annu Rev Physiol* **78**: 133-154.

Mouritsen, H. and O. N. Larsen (2001). "Migrating songbirds tested in computer-controlled Emlen funnels use stellar cues for a time-independent compass." *J Exp Biol* **204**(Pt 22): 3855-3865.

Nedergaard, M., B. Ransom and S. A. Goldman (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends Neurosci* **26**(10): 523-530.

Newman, E. A. (2003). "New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission." *Trends Neurosci* **26**(10): 536-542.

Nobrega, P. F., J. A. Aguiar and J. E. Figueira (2015). "First records of *Charadrius semipalmatus*, Bonaparte 1825 (Charadriidae) and *Gelochelidon nilotica* Gmelin 1789 (Sternidae) in the State of Minas Gerais, Brazil." *Braz J Biol* **75**(2): 451-454.

Nol, E. B., M.S. (1999). "Semipalmated Plover (*Charadrius semipalmatus*). The Birds of North America Online." <http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/444doi:10.2173/bna.444>.

Oberheim, N. A., T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann, B. R. Ransom, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2009). "Uniquely hominid features of adult human astrocytes." *J Neurosci* **29**(10): 3276-3287.

Oberheim, N. A., X. Wang, S. Goldman and M. Nedergaard (2006). "Astrocytic complexity distinguishes the human brain." *Trends Neurosci* **29**(10): 547-553.

Ohgomori, T., J. Yamada, H. Takeuchi, K. Kadomatsu and S. Jinno (2016). "Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Eur J Neurosci* **43**(10): 1340-1351.

Parpura, V. and R. Zorec (2010). "Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes." *Brain Res Rev* **63**(1-2): 83-92.

Pecchia, T., A. Gagliardo and G. Vallortigara (2011). "Stable panoramic views facilitate snap-shot like memories for spatial reorientation in homing pigeons." *PLoS One* **6**(7): e22657.

Perea, G., M. Navarrete and A. Araque (2009). "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information." *Trends Neurosci* **32**(8): 421-431.

Pravosudov, V. V., A. S. Kitaysky and A. Omanska (2006). "The relationship between migratory behaviour, memory and the hippocampus: an intraspecific comparison." *Proc Biol Sci* **273**(1601): 2641-2649.

Puelles, L. (2001). "Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1414): 1583-1598.

Qin, S., H. Yin, C. Yang, Y. Dou, Z. Liu, P. Zhang, H. Yu, Y. Huang, J. Feng, J. Hao, J. Hao, L. Deng, X. Yan, X. Dong, Z. Zhao, T. Jiang, H. W. Wang, S. J. Luo and C. Xie (2016). "A magnetic protein biocompass." *Nat Mater* **15**(2): 217-226.

Reemst, K., S. C. Noctor, P. J. Lucassen and E. M. Hol (2016). "The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development." *Front Hum Neurosci* **10**: 566.

Reichenbach, A., A. Derouiche and F. Kirchhoff (2010). "Morphology and dynamics of perisynaptic glia." *Brain Res Rev* **63**(1-2): 11-25.

Ritz, T., R. Wiltschko, P. J. Hore, C. T. Rodgers, K. Stapput, P. Thalau, C. R. Timmel and W. Wiltschko (2009). "Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity." *Biophys J* **96**(8): 3451-3457.

Rossi, D. (2015). "Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death." *Prog Neurobiol* **130**: 86-120.

Salois, G. and J. S. Smith (2016). "Housing Complexity Alters GFAP-Immunoreactive Astrocyte Morphology in the Rat Dentate Gyrus." *Neural Plast* **2016**: 3928726.

Santello, M., C. Cali and P. Bezzi (2012). "Gliotransmission and the tripartite synapse." Adv Exp Med Biol **970**: 307-331.

Santos-Filho, C., C. M. de Lima, C. A. Foro, M. A. de Oliveira, N. G. Magalhaes, C. Guerreiro-Diniz, D. G. Diniz, P. F. Vasconcelos and C. W. Diniz (2014). "Visuospatial learning and memory in the Cebus apella and microglial morphology in the molecular layer of the dentate gyrus and CA1 lacunosum molecular layer." J Chem Neuroanat **61-62**: 176-188.

Saper, C. B. and P. E. Sawchenko (2003). "Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry." J Comp Neurol **465**(2): 161-163.

Scarf, D., J. Millar, N. Pow and M. Colombo (2014). "Inhibition, the final frontier: the impact of hippocampal lesions on behavioral inhibition and spatial processing in pigeons." Behav Neurosci **128**(1): 42-47.

Schmidt-Koenig, K. (1958). "Experimentelle Einflußnahme auf die 24-Stundenperiodik bei Brieftauben und deren Auswirkungen unter besonderer Berücksichtigung des € Heimfindevermögens. ." € Z. Tierpsychol **15** 301-331.

Schriber, R. A., Z. Anbari, R. W. Robins, R. D. Conger, P. D. Hastings and A. E. Guyer (2017). "Hippocampal volume as an amplifier of the effect of social context on adolescent depression." Clin Psychol Sci **5**(4): 632-649.

Sherry, D. F. and J. S. Hoshoooley (2010). "Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1542): 933-943.

Sherry, D. F. and S. A. MacDougall-Shackleton (2015). "Seasonal change in the avian hippocampus." Front Neuroendocrinol **37**: 158-167.

Sherry, D. F., A. L. Vaccarino, K. Buckenham and R. S. Herz (1989). "The hippocampal complex of food-storing birds." Brain Behav Evol **34**(5): 308-317.

Shiflett, M. W., T. V. Smulders, L. Benedict and T. J. DeVoogd (2003). "Reversible inactivation of the hippocampal formation in food-storing black-capped chickadees (Poecile atricapillus)." Hippocampus **13**(4): 437-444.

Shigetomi, E., D. N. Bowser, M. V. Sofroniew and B. S. Khakh (2008). "Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons." J Neurosci **28**(26): 6659-6663.

Shu, S. Y., G. Ju and L. Z. Fan (1988). "The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system." Neurosci Lett **85**(2): 169-171.

Sick, H. (1997). "Ornitologia Brasileira." Nova Fronteira.

Simard, M. and M. Nedergaard (2004). "The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis." Neuroscience **129**(4): 877-896.

Smith, A. C. N., E. (2000). "Winter foraging behavior and prey selection of the Semipalmated Plover on coastal Venezuela. ." Wilson Bull. **112**(4): 467-472.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 7-35.

Sol, D., L. Lefebvre and J. D. Rodriguez-Teijeiro (2005). "Brain size, innovative propensity and migratory behaviour in temperate Palaearctic birds." Proc Biol Sci **272**(1571): 1433-1441.

Stork, T., A. Sheehan, O. E. Tasdemir-Yilmaz and M. R. Freeman (2014). "Neuron-glia interactions through the Heartless FGF receptor signaling pathway mediate morphogenesis of Drosophila astrocytes." Neuron **83**(2): 388-403.

Striedter, G. F. (2016). "Evolution of the hippocampus in reptiles and birds." J Comp Neurol **524**(3): 496-517.

Sultan, S., L. Li, J. Moss, F. Petrelli, F. Casse, E. Gebara, J. Lopatar, F. W. Pfrieder, P. Bezzi, J. Bischofberger and N. Toni (2015). "Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes." Neuron **88**(5): 957-972.

Teather, K., and Nol, E. (1997). "Mixed sexual dimorphism in Semipalmated Plovers." Condor **99**: 803-806.

- Telino-Júnior, S. M. d. A.-J. R. M. d. L.-N. (2003). "Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil." Revista Brasileira de Zoologia **20** 451–456.
- Van Gils, J. W., P. (1996). "Family Charadriidae (Plovers)." In Handbook of the birds of the world: Hoatzin to Auks (J. del Hoyo, A. Elliot & J. Sangatal, eds). Lyns Edicions, Barcelona 425-426.
- Ward, J. H. (1963). "Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function." Journal of the American Statistical Association **58**(301): 236-244.
- Watanabe, S., U. Mayer and H. J. Bischof (2011). "Visual Wulst analyses "where" and entopallium analyses "what" in the zebra finch visual system." Behav Brain Res **222**(1): 51-56.
- Wieraszko, A. and G. F. Ball (1991). "Long-term enhancement of synaptic responses in the songbird hippocampus." Brain Res **538**(1): 102-106.
- Wieraszko, A. and G. F. Ball (1993). "Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor." Synapse **13**(2): 173-178.
- Wiltschko, R. and W. Wiltschko (2009). "Avian Navigation." The Auk **126**(4): 717-743.
- Wiltschko, R. and W. Wiltschko (2009). "'Fixed direction'-responses of birds in the geomagnetic field." Commun Integr Biol **2**(2): 100-103.
- Wiltschko, W. and R. Wiltschko (2007). "Conditioning to magnetic directions." Neuroreport **18**(10): 949-950.
- Wu, L. Q. and J. D. Dickman (2011). "Magnetoreception in an avian brain in part mediated by inner ear lagena." Curr Biol **21**(5): 418-423.
- Yamada, J. and S. Jinno (2013). "Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis." J Comp Neurol **521**(5): 1184-1201.
- Yang, J., C. Zhang and S. R. Wang (2005). "Comparisons of visual properties between tectal and thalamic neurons with overlapping receptive fields in the pigeon." Brain Behav Evol **65**(1): 33-39.
- Zapka, M., D. Heyers, C. M. Hein, S. Engels, N. L. Schneider, J. Hans, S. Weiler, D. Dreyer, D. Kishkinev, J. M. Wild and H. Mouritsen (2009). "Visual but not trigeminal mediation of magnetic compass information in a migratory bird." Nature **461**(7268): 1274-1277.

ANEXO 1: Valores de t e p para os gráficos.

	Aves em migração tipo 1 vs tipo 2		Aves em invernada tipo 1 vs tipo 2		Em migração tipo 1 vs. em invernada tipo 1		Em migração tipo 2 vs em invernada tipo 2	
	<i>Calidris pusilla</i>							
	t	p	t	p	t	p	t	p
Comprimento Total dos Ramos (μm)	10.208	< 0.0001	9.4986	< 0.0001				
Área de Superfície Total das Árvores (μm^2)	8.7447	< 0.0001	7.2698	< 0.0001	7.258	< 0.0001	3.6801	0.0002
Complexidade	11.5298	< 0.0001	13.6678	< 0.0001	93.836	< 0.0001	3.9988	< 0.0001
Convex-Hull Volume (μm^3)	7.273	< 0.0001	5.4634	< 0.0001	44.698	< 0.0001	2.6592	0.0088
Convex-Hull Área de Superfície (μm^2) 3D	6.8692	< 0.0001	5.1218	< 0.0001	50.217	< 0.0001	4.0886	< 0.0001
Convex-Hull Área (μm^2) 2D	6.7008	< 0.0001	4.5554	< 0.0001	54.998	< 0.0001	5.5785	< 0.0001
Convex-Hull Perímetro (μm)	5.9732	< 0.0001	5.1506	< 0.0001	37.493	0.0003	5.2994	< 0.0001
k-Dim	12.284	< 0.0001	8.9477	< 0.0001				
	<i>Charadrius semipalmatus</i>							
	t	p	t	p	t	p	t	p
Comprimento Total dos Ramos (μm)	13.2833	< 0.0001	10.7903	< 0.0001				
Área de Superfície Total das Árvores (μm^2)	3.4992	< 0.0006	-4.0976	< 0.0001	3.7003	< 0.0003	27.249	0.0001
Complexidade	11.7264	< 0.0001	9.0727	< 0.0002	3.8056	< 0.0002	8.6413	< 0.0001
Convex-Hull Volume (μm^3)	-2.9433	< 0.0039	3.8214	< 0.0001	-6.6467	< 0.0001	1.0488	0.2963
Convex-Hull Área de Superfície (μm^2) 3D	4.0693	< 0.0001	4.5223	< 0.0001	-5.7103	< 0.0001	-7.0113	< 0.0001
Convex-Hull Área (μm^2) 2D	7.6218	< 0.0001	4.3404	< 0.0001	-5.0518	< 0.0001	-	10.9339
Convex-Hull Perímetro (μm)	8.2882	< 0.0001	3.9328	< 0.0001	-5.366	< 0.0001	-	12.3523
k-Dim	11.3547	< 0.0001	12.1786	< 0.0001				

ANEXO 2: Autorizações de Órgãos Reguladores do Uso de Animais Silvestres.

Licença Ambiental para Captura e Sacrifício dos Animais



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

Cronograma de atividades

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

Observações e ressalvas

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

Outras ressalvas

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

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

Código de autenticação: 28969837



Página 1/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

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

Dados do titular

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

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

Equipe

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

Locais onde as atividades de campo serão executadas

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

Atividades X Táxons

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

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

Material e métodos

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 28969837



Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 28969837



Página 3/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Licença para Importação de Cérebros

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09670 - CEP 70818-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 20/06/2016 3) Válido Até/Valid Until: 20/12/2016											
4) Licença nº/Permit n°: 16BR020816/DF		6) Selo nº/Stamp n°: ***** 7) Selo/Stamp *****		8) Controle/Check 1: H4DWYY4RWX5YIHJ 9) Autoridade Adm. Emissora/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature											
5) Licença de/Permit for Importação/Import		10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URUTÁ 001 BRAGANÇA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) David Francis Sherry 69 Lonsdale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA											
12) País Importador/Country of Import Brasil - BR		13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Canada - CA		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Maria Izabel Soares Gomes CITES Management Authority											
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Científico/Fins científicos...															
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations															
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/AI Belém Data Provável/Probable Date: 15/08/2016															
ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.															
17) Item		18) Produto/Product		19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit											
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		21) Anexo/Origem Appendix/Source		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark											
23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date		24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date													
17) 1		18) CEREBRO/BRAIN		19) - - 10.00 UN - -											
20) 1. Calidris pusilla Maçarico-rasteirinho Semipalmated-sandpiper		21) NC W		22) cerebro/brain 10,00 UN -											
----- Fim dos Itens/Items End -----															
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement															
Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty	Item	Qtd./Qty
ASSINATURA/SIGNATURE															
1 Verificar/Verify: http://ibama.gov.br/cites/verificar E-mail: cites.sede@ibama.gov.br 1ª Via - Original - Importador Exportador - Brasil Importer Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador Importador - Estrangeiro Exporter Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA															



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
 E DOS RECURSOS NATURAIS
 RENOVÁVEIS - IBAMA



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

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

4) Licença nº/Permit n°: 16BR020816/DF	6) Selo nº/Stamp n°: ***** 7) Selo/Stamp *****	8) Controle/Check 1: H4DWYY4RWX5YIHJ 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature
5) Licença de/Permit for Importação/Import		

10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URUTÁ 001 BRAGANCA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) David Francis Sherry 69 Lonsdale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA	Maria Izabel Soares Gomes CITES Management Authority
---	--	---

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

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction
S - Científico/Fins científicos...

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

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

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

Fim dos Itens/Items End

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement													
Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.

ASSINATURA/SIGNATURE

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

Instruções e explicações

(Os números das instruções correspondem aos do formulário)

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

Instructions and Explanations

(The listing numbers are equivalent to the forms)

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