

## UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES EM NEURODEGENERAÇÃO E INFECÇÃO

EMANUEL RAMOS DA COSTA

# MUDANÇAS MORFOLÓGICAS NOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS NO PERÍODO DE INVERNADA EM Arenaria interpres

Belém - Pará 2020



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES EM NEURODEGENERAÇÃO E INFECÇÃO

# EMANUEL RAMOS DA COSTA

# MUDANÇAS MORFOLÓGICAS NOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS NO PERÍODO DE INVERNADA EM Arenaria interpres

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração em Neurociências.

Linha de Pesquisa: Neurofisiologia

**Orientador**: Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz **Coorientador**: Prof. Dr. Cristovam Guerreiro Diniz

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)

C837m Costa, Emanuel Ramos da. Mudanças morfológicas nos astrócitos hipocampais no período de invernada em Arenaria interpres / Emanuel Ramos da Costa. — 2020. 103 f. : il. color.

> Orientador(a): Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz Coorientador(a): Prof. Dr. Cistovam Guerreiro Diniz Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém, 2020.

Aves migratórias. 2. Reconstrução tridimensional.
Formação hipocampal. 4. Morfometria. 5. Vira-pedras.
Título.

# MUDANÇAS MORFOLÓGICAS NOS ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS NO PERÍODO DE INVERNADA EM Arenaria interpres

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração em Neurociências.

Bragança - PA, 08 de janeiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz (Orientador) UFPA - Campus Belém

Prof. Dr. Mauro André Damasceno de Melo (Membro) IFPA - Campus Bragança

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Gyzely, de Morais Magalhães (Membro) IFPA - Campus Bragança

Prof. Dr. Carlos Santos Filho (Suplente) UFPA - Campus Belém

#### AGRADECIMENTOS

A minha família (Manoel Teles da Costa, Maria Betânia Ramos da Costa, Emanuelle Ramos da Costa) por todo o apoio e confiança depositada.

Ao meu orientador Daniel Guerreiro Diniz pela confiança e oportunidade para o desenvolvimento do trabalho.

Ao estimado professor Cristovam Wanderley Picanço Diniz por todo o conhecimento compartilhado e por todo seu importante trabalho pela ciência.

Ao meu Coorientador Cristovam Guerreiro Diniz por mostrar a todos que trabalhando bastante em prol da ciência, podemos ultrapassar todas as adversidades que se apresentem no caminho.

Aos integrantes do LBN (Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia), que contribuíram de forma decisiva nessa caminhada, em especial, a Patrick Pereira, Ediely Henrique, Cintya Castro, Taiany Nogueira, João Rosa e Anderson Falcão.

Ao órgão do Ministério da Educação, CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pelo financiamento da bolsa.

A todos que de maneira direta e indireta ajudaram a contribuir para o aperfeiçoamento e realização desta dissertação, em particular a Anne Queiroz por todo afeto, apoio e companheirismo nesta reta final.

Aos órgãos e parcerias envolvidas no financiamento, colaboração e execução do projeto Ciência do Mar (Estudo comparativo em diferentes janelas temporais do comportamento migratório de aves marinhas: neurobiologia e genética da migração).

Ao ICMBIO pela concessão da licença de captura e obtenção do material biológico utilizado.

A UFPA, por me permitir realizar esta tarefa e este trabalho por meio do seu curso de pós graduação.

Ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Ao IFPA - Campus Bragança, por fornecer os aparatos necessários para realização desta pesquisa.

Ao LNI (Laboratório de investigação em Neurodegeneração e Infecção), onde pude realizar minha iniciação científica e por também oferecer toda sua estrutura e aparatos para a realização deste projeto e agradeço também a todos seus pesquisadores.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Aves da espécie <i>Arenaria interpres</i> , na figura A, plumagem no início do período de reprodução e na figura B,	
plumagem fora do período de reprodução. Escala = 2,5cm.	 15
<b>Figura 2:</b> Distribuição geográfica de <i>Arenaria interpres</i> : linhas vermelhas as setas mostram a rota migratória da espécie.	 18
<b>Figura 3:</b> Linha do tempo detalhada sobre o esforço do presente trabalho.	 20
<b>Figura 4:</b> Mapa mostrado diversas ilhas costeiras, incluindo a Ilha de Otelina (ponto de coleta).	 21
<b>Figura 5:</b> Nas figura, fotomicrografia da formação hipocampal (A, D e G), imagem representativa do grid (700 x 700µm) e caixas (50 x 50µm) de reconstrução geradas pelo programa Neurolucida, (B, E e H) e nas figuras (C, F e I), delimitação da área de interesse (roxo). Escala 500µm.	
<b>Figure 6.</b> Dessíveis homologios entre es estruturos que	 25
compõem a formação hipocampal de maçaricos e mamíferos. À esquerda na figura A, ilustra-se as estruturas do cérebro de mamíferos e em B homologias hipotéticas do	
cérebro de aves em relação aos mamíferos.	 26
<b>Figura 7:</b> Ilustração demonstrando como funciona a estimativa de Cavalieri, em A, área de interesse com seu devido contorno, em B as áreas quadradas entre as cruzes são medidas no interior do contorno da região de interesse, em C com as devidas áreas preenchidas por marcadores, é possível se ter o valor estimado do volume da formação	
hipocampal. Escala: 500µm.	 28
Figura 8: Ilustração demonstrando como funciona a	

estimativa de Cavalieri, em A, D e G temos as secções primária, medial e posterior respectivamente, em B, E e H as

áreas com seus devidos contornos, em C, F e I, com as devidas áreas preenchidas por marcadores, é possível se ter o valor estimado do volume do telencéfalo. Escala: 500µm.

**Figura 9:** Ilustração demonstrando a estimativa de Cavalieri para o *tectum opticum*, em A, área de interesse, em B a área com seu devido contorno e em C com as devidas áreas preenchidas por marcadores, é possível se ter o valor estimado do volume da formação hipocampal. Escala: 500µm.

**Figura 10:** Fotomicrografia de baixo e alto aumento da formação hipocampal do *Arenaria interpres* a partir de uma secção imunomarcada com anticorpo anti-GFAP para definir os limites da área de interesse e a estratégia de amostragem. Barras de escala A =  $250\mu$ m; B e C =  $500\mu$ m e E =  $25\mu$ m.

**Figura 11:** Gráficos demonstrando as medidas de volume das áreas de interesse e as devidas comparações entre as janelas, observamos que apenas a comparação de volume do telencéfalo foi significativa entre as janelas do período de invernada (p < 0.05).

**Figura 12:** Fotomicrografias demostrando os tipos astrocíticos observados no presente trabalho, onde em A, temos a ilustração do astrócito estrelado, em B podemos observar astrócitos ligados a vasculatura, estes dois tipos representam o alvo de estudo no presente projeto, e em C temos a fotomicrografia de astrócitos radiais. Barra de escala = 25μm.

**Figura 13:** Características morfológicas de astrócitos reconstruídos na formação hipocampal de cinco aves do grupo recém-chegado da espécie *Arenaria interpres*. Em A, está representada a análise discriminante de cluster (Ward's method) com 261 células astrocíticas que indica os dois tipos de células (tipo I e tipo II). B e C – Representação gráfica dos

.....

.....

30

... 37

36

valores médios de complexidade e volume do convex hull respectivamente, juntamente com seu erro padrão correspondente mostrando a diferença significativa entre os astrócitos do tipo I e Tipo II. D – Gráfico demonstrando o resultado da análise discriminante. D – As variáveis que mais contribuíram para o agrupamento foram complexidade e volume do convex hull (p < 0,000000), a análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais dos astrócitos (MMI > 0,55).

Figura 14: Análise hierárquica de cluster de características morfológicas de astrócitos reconstruídos na formação hipocampal de cinco aves do grupo em pré-migração da espécie Arenaria interpres. Em A, o dendrograma indica a formação de dois agrupamentos obtidos a partir da análise de 255 células astrocíticas. Em função da complexidade astrócitos com maior complexidade designamos os morfológica de Tipo I e os com menor complexidade morfológica de tipo II. B e C Representação gráfica dos valores médios de complexidade e volume do convex hull respectivamente. Os erros padrão são destacados pelas caixas coloridas e o desvio padrão pelos bigodes (whiskers). D - Gráfico demonstrando o resultado da análise discriminante. As variáveis que mais contribuíram para a formação dos agrupamentos foram complexidade e volume do convex hull (p < 0,000000 e p < 0,007 respectivamente), a análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais (MMI > 0,55).

**Figura 15:** Gráficos demonstrando a morfometria de astrócitos (Tipo I versus Tipo II) da espécie *Arenaria interpres* reconstruídos tridimensionalmente a partir de animais em diferentes janelas temporais A – D correspondem a representações gráficas de valores médios, erros padrão (caixas coloridas) e desvios padrão (whiskers) de parâmetros multimodais com diferenças significativas entre

39

40

.....

.....

**Figura 16:** Gráficos demonstrando a influência diferencial das janelas temporais sobre a morfometria de astrócitos reconstruídos tridimensionalmente (tipo I e Tipo II) de *Arenaria interpres*. A – D: Representação gráfica de valores médios e erros padrão de parâmetros morfométricos multimodais que apresentaram diferenças estatísticas significantes (asteriscos indicam p < 0,05).

**Figura 17:** Astrócitos reconstruídos em 3 dimensões selecionados para representar a célula média do hipocampo de animais recém-chegados e em pré-migração. Em A e B astrócitos do tipo I dos grupos de animais recém-chegados e em pré-migração respectivamente. Em C e D astrócitos do tipo II das mesmas janelas temporais respectivamente. Barra de escala: 20µm.

.....

42

# SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO		13		
1.2 - Arenaria interpres, uma espécie migrante de longa				
distância		15		
1.3 - Memória e migração		16		
2 - OBJETIVOS		19		
2.1 - Geral		19		
2.2 - Específicos		19		
3 - MATERIAIS E MÉTODOS		19		
3.1- Amostragem e coleta		19		
3.2 - Perfusão e corte		21		
3.3 - Imunohistoquímica		22		
3.3.1 - Imunomarcação para proteína ácida fibrilar glial -				
GFAP		22		
3.4 – Área de interesse		24		
3.4.1 - Volume das áreas de interesse		27		
3.5 - Reconstrução tridimensional				
4 - RESULTADOS		33		
4.1 - Estimativa de volume pelo método de Cavalieri,				
comparação de volume da formação hipocampal e				
tectum opticum.		33		
4.2 - Morfologia dos astrócitos		36		
4.3 As morfologias dos astrócitos do tipo I e II mudam à				
medida que a invernada avança		38		
5 - DISCUSSÃO		44		
5.1 - Diversidade e funções morfológicas dos astrócitos		45		
5.2 - Explicações potenciais de morfologias				
contrastantes de astrócitos na formação hipocampal em				
recém-chegados e indivíduos em pré-migração		47		
5.3 - Limitações metodológicas		47		
6 - CONCLUSÃO		48		
7 - REFERÊNCIAS		50		

Anexo A - Licença para captura e manuseio de animais	
silvestres	 55
Anexo B - Artigo submetido ao Journal of Chemical	
Neuroanatomy	 59

#### RESUMO

Os astrócitos são essenciais para o metabolismo dos neurônios lipídicos em voos migratórios ininterruptos de longa distância, quando a glicose não está disponível como principal fonte de energia. Anteriormente, foi demonstrado em Calidris pusilla que, após um voo transatlântico ininterrupto de cinco dias, os astrócitos encolhem seus ramos e reduzem seu número dentro da formação do hipocampo. Aqui, voltamos nossa atenção para o período de invernada e testamos a hipótese de que, à medida que o inverno avança, as alterações morfológicas dos astrócitos hipocampais após a travessia do Atlântico seriam recuperadas. Para tanto, utilizamos Arenaria interpres, que também atravessa o Oceano Atlântico e chega aos manguezais dos estuários influenciados pelo Rio Amazonas para a invernada. As aves foram capturadas em setembro / outubro (dentro do período de chegada ao litoral de Bragança - Pará, Brasil para o inverno) e em abril / maio (dentro do período de partida para os locais de reprodução) e tiveram seus cérebros processados para astrócitos GFAP seletivos, por marcação imunohistológica. Reconstruções tridimensionais dos astrócitos imunocorados foram realizadas e a classificação morfológica foi feita com base em agrupamentos hierárquicos e análise discriminante das características morfométricas multimodais. Encontramos dois fenótipos morfológicos de astrócitos exibindo complexidades morfológicas distintas após o voo transatlântico ininterrupto de longa distância. Embora em uma extensão diferente, ambos os morfotipos aumentaram suas complexidades à medida que o período de inverno progride em direção à janela de pré-migração. Tomados em conjunto, nossas descobertas demonstram que o período ininterrupto de voo e invernada de longa distância afetou diferencialmente os morfotipos dos dois astrócitos, sugerindo papéis fisiológicos distintos para essas células. Sugerimos que a recuperação morfológica durante o período de invernada possa fazer parte das mudanças adaptativas dos circuitos hipocampais locais de A. interpres, em preparação para a longa jornada de volta aos seus locais de reprodução no hemisfério norte.

**Palavras-chave:** Aves migratórias, reconstrução tridimensional, formação hipocampal, astrócitos GFAP, morfometria, vira-pedras.

### ABSTRACT

Astrocytes are essential for lipid neuronal metabolism in long-distance uninterrupted migratory flights, when glucose is not available as the main source of energy. We previously demonstrated in *Calidris pusilla* that after uninterrupted 5 days transatlantic flight, astrocytes shrink and reduce its number in the hippocampal formation. Here we shifted our attention to the wintering period and tested the hypothesis that as the wintering progresses, hippocampal astrocytes morphological changes following Atlantic crossing, would be recovered. To that end we used Arenaria interpres, which also crosses the Atlantic Ocean and reaches the mangroves of the Amazon River estuary for wintering. Birds were captured in September/October (closer to the arrival in the coast of Bragança -Pará, Brazil for wintering) and in April/May (closer to the departure towards the breeding sites) and had their brains processed for selective GFAP-astrocyte immunolabeling. Three-dimensional reconstructions of the immunostained astrocytes were performed and morphological classification was done based on hierarchical cluster and discriminant analysis of multimodal morphometric features. We found two morphological phenotypes of astrocytes exhibiting distinct morphological complexities after the long-distance non-stop transatlantic flight. Although to a different extent, both morphotypes increased their complexities as wintering period progresses towards the pre-migration window. Taken together, our findings demonstrate that the long-distance non-stop flight and wintering period differentially affected the two astrocytes morphotypes, suggesting distinct physiological roles for these cells. We suggest that morphological recovering during the wintering period, may be part of the adaptive changes of the local hippocampal circuits of A. interpres in preparation for the long journey back to their breeding sites in the north hemisphere.

**Keywords:** Migratory birds, three-dimensional reconstruction, hippocampal formation, GFAP astrocytes, morphometry, ruddy turnstone.

#### 1- INTRODUÇÃO

Os voos migratórios de longa distância requerem metabolicamente reservas lipídicas (JENNI-EIERMANN, 2017; LANDYS; PIERSMA; GUGLIELMO; JUKEMA et al., 2005) e há significativa interação lipídica entre glia e neurônios (BARBER; RABEN, 2019). Os astrócitos são essenciais para esse suporte e são impostas vastas demandas para controlar os níveis de neurotransmissores, regular o transporte de água, controlar íons extracelulares de potássio para influenciar os limiares do disparo das células nervosas, liberar moléculas que promovem a formação e poda sináptica e contribuir para a formação e regulação da barreira hematoencefálica (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006; ALMUTAIRI; GONG; XU; CHANG et al., 2016; CHUNG; ALLEN; EROGLU, 2015; MCCONNELL; KERSCH; WOLTJER; NEUWELT, 2017; WEISS; MILLER; CAZAUBON; COURAUD, 2009). Essa diversidade de papéis fisiológicos está associada a uma variedade de fenótipos com sobreposição variável em áreas cerebrais distintas (JOHN LIN; YU; HATCHER; HUANG et al., 2017).

Como a formação hipocampal parece ser essencial para o aprendizado e a memória das aves (FEENEY; ROBERTS; SHERRY, 2009; 2011; KREBS; SHERRY; HEALY; PERRY et al., 1989; SHERRY; VACCARINO, 1989; SHERRY, 2011) e mamíferos (BAST; DA SILVA; MORRIS, 2005; BENNETT; MCRAE; LEVY; FRICK, 2006; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; ENNACEUR; NEAVE; AGGLETON, 1997; GE; DONG; BAGOT; HOWLAND et al., 2010; MORRIS; GARRUD; RAWLINS; O'KEEFE, 1982; WILLIAMS; LUO; WARD; REDD et al., 2001) e que alterações morfológicas já haviam sido previamente associadas à influências ambientais, (CARVALHO-PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017; DINIZ; DE OLIVEIRA; DE LIMA; FÔRO et al., 2016; DINIZ; FORO; REGO; GLORIA et al., 2010; MENDES; DE ALMEIDA; FELICIO; FADEL et al., 2013; SAMPEDRO-PIQUERO; DE BARTOLO; PETROSINI; ZANCADA-MENENDEZ et al., 2014; VIOLA; RODRIGUES; AMERICO; HANSEL et al., 2009), estudos já foram realizados sobre a influência potencial de voos migratórios de longa distância nos astrócitos da formação hipocampal e confirmaram a hipótese de que os voos longos reduzem a complexidade morfológica dos astrócitos do hipocampo e isso seria detectável pela morfometria (CARVALHO-PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017).

Ao serem comparadas as influências do voo migratório ininterrupto na morfologia e no número dos astrócitos hipocampais de Calidris pusilla com as de outro pássaro migrante de longa distância, Charadrius semipalmatus, que geralmente voa por terra com várias escalas para alimentação e descanso (SICK, 1997). No trabalho citado, foram capturados indivíduos de ambas as espécies na Baía de Fundy (Canadá) e na região costeira de Bragança (Brasil) e processando seus cérebros para a marcação seletiva de astrócitos por GFAP. Demonstraram que, embora em uma extensão diferente, os astrócitos Tipo I e Tipo II são afetados diferencialmente após voos migratórios. Onde as contagens estereológicas demonstraram que, ao contrário de Calidris pusilla, que tem uma diminuição significativa no número de astrócitos, o C. semipalmatus não foi alterado o número de astrócitos. E quando foram avaliadas se variáveis morfométricas dos astrócitos foram influenciadas pelas diferenças filogenéticas entre C. pusilla e C. semipalmatus, usando o contraste de Felsenstein, revelaram que as mudanças independem da filogenia, baseado em árvores filogenéticas geradas por marcadores nucleares e mitocondriais. Essas descobertas sugeriram que diferenças filogenéticas não explicam os resultados e que voos migratórios de longa distância induzem plasticidades contrastantes entre astrócitos Tipo I e Tipo II, sugerindo que esses fenótipos podem desempenhar papeis fisiológicos diferentes. (HENRIQUE ET et al., resultados não publicados).

Aqui, voltamos nossa atenção para o período de invernada de *Arenaria interpres* nos manguezais do estuário do Rio Amazonas. As florestas de mangue são essenciais para garantir a disponibilidade de alimentos para as aves costeiras e são de grande importância para a retenção de carbono, superando duas vezes a fixação de carbono fornecida pelas florestas em regiões montanhosas (KAUFFMAN; BERNARDINO; FERREIRA; GIOVANNONI et al., 2018). Apesar de sua importância para o inverno das aves costeiras (BULLUCK; AMES; BAYLY; REESE et al., 2019), poucos estudos têm explorado a neuroecologia dessas aves nessa grande região de maré fortemente influenciada pelas chuvas tropicais (BARROS; ALBERNAZ, 2014). Aqui testamos a hipótese de que, à medida que o período de invernada avança, os astrócitos hipocampais sofrem alterações morfológicas recuperando as alterações impostas pela travessia do Atlântico.

## 1.2 - Arenaria interpres, uma espécie migrante de longa distância

Arenaria interpres (figura 1) é uma ave migrante que se reproduz no verão, no círculo polar ártico e faz sua migração outonal fugindo do inverno em direção à América do Sul onde permanece durante a invernada. Essa espécie parece reunir tal como o *Calidris pusilla*, características ideais para o exame das mudanças morfofuncionais associadas à migração de longa distância (AHARON-ROTMAN; BUCHANAN; CLARK; KLAASSEN et al., 2016).

**Figura 1:** Aves da espécie *Arenaria interpres*. Na figura A, plumagem no início do período de reprodução e na figura B, plumagem fora do período de reprodução. Escala = 2,5cm.



Sua alimentação baseia-se a moluscos, insetos, equinodermos, anelídeos, crustáceos e peixes, vivos ou mortos. Sua reprodução ocorre no Ártico, onde nidifica em regiões forradas por material vegetal, pondo de 2 a 4 ovos com um período de incubação de 22 a 24 dias, tanto machos quanto fêmeas participam do processo de nidificação, particularmente os indivíduos mais jovens passam o verão nas áreas de reprodução enquanto os juvenis iniciam a migração cerca de um mês após os indivíduos adultos, estes contendo idade igual ou superior a dois anos de idade (Piersma *et al.*, 1996).

Segundo Linnaeus, 1758, *Arenaria interpres* é um migrante de longa distância, também conhecido como vira-pedras e em inglês Ruddy turnstone, Mede entre 21 e 26 centímetros de comprimento, pesa entre 84 e 190 gramas e costuma habitar em áreas costeiras, próximo de áreas úmidas, a zonas rochosas, praias

arenosas, estuários, manguezais, recifes de corais expostos e sobre camas de conchas.

Enquanto a orientação espacial e memória são as principais habilidades que as demandas da migração à longa distância impõem sobre o hipocampo, os dias de jejum impostos pelo voo ininterrupto, obrigam a utilização da gordura como fonte de energia, abrindo oportunidade única para se estudar os efeitos das mudanças metabólicas associadas ao voo transatlântico. Presume-se que o hipocampo das aves possa conter como nos mamíferos, um 'mapa cognitivo', que fornece uma representação da localização espacial do animal em relação ao ambiente (SALLAZ; KACZMAREK; PONS; BRUNON et al., 2000; SHERRY; VACCARINO, 1989). Da mesma forma presume-se em *Arenaria interpres* que (tal como em *C. pusilla*), o voo migratório ininterrupto e de longa distância, depende da reserva de lipídeos (LANDYS; PIERSMA; GUGLIELMO; JUKEMA et al., 2005), estando os astrócitos cerebrais sob intensa atividade metabólica originada da via alternativa proporcionada pelos triglicerídeos (RAEFSKY; MATTSON, 2017).

#### 1.3- Memória e migração

Muitas aves migratórias regressam ao seu território de reprodução, ano após ano e esta capacidade requer uma memória duradoura, pelo menos durante o período subsequente à época não-reprodutiva (METTKE-HOFMANN, 2017; SHERRY, 2006). O hipocampo parece ser essencial para recordar os marcos e as rotas migratórias da navegação de longa distância nas aves (METTKE-HOFMANN; GWINNER, 2003) e seu envolvimento nessas tarefas pode ser facilmente reconhecido a partir de diferenças neuroanatômicas na formação hipocampal de espécies de aves migratórias e não migratórias (KREBS; SHERRY; HEALY; PERRY et al., 1989). No entanto, a maioria dos estudos sobre a resposta plástica do hipocampo relacionada à formação de memória é focada no número de neurônios e nas mudanças de volume, com uns poucos relatos dedicados ao exame da relação entre as células gliais e o papel do hipocampo na migração (HEALY; KREBS, 1996).

Foi previamente descrito em pássaros migratórios que acabam de chegar em sítio de invernada após um voo extenuante de longa distância, níveis mais elevados de glicocorticoides do que os dos animais que já se encontram em período de invernada há mais tempo (PIERSMA; ROGERS; GONZÁLEZ; ZWARTS et al., 2005). Além disso os níveis de corticosterona também se elevam em função da massa

corporal nos pássaros em invernada na medida que se aproxima o período de reinício do voo (LANDYS; PIERSMA; GUGLIELMO; JUKEMA et al., 2005).

Alterações dos níveis de glicocorticoides podem se expressar funcionalmente em células da glia (astrócitos, oligodendrócitos e micróglia) através de receptores específicos para noradrenalina e glicocorticoides. A ativação desses receptores aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas imunomodulatórias pelas células da glia que promovem muito das alterações associadas ao estresse agudo ou crônico. Muito dos efeitos crônicos dos glicocorticoides sobre os astrócitos estão ligados à neurotoxicidade do glutamato (PEARSON-LEARY; OSBORNE; MCNAY, 2015). O estresse pode igualmente afetar uma variedade de fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) responsável pela regulação da homeostase astrocítica incluindo a alteração da complexidade de sua morfologia (KANG; BALORDI; SU; CHEN et al., 2014).

A rota migratória da *Arenaria interpres* (figura 2) foi reconstruída pela geolocalização de um indivíduo que partiu em 14 de agosto de East Bay, Ilha de Southampton, Nunavut, Canadá. Voou 35 horas (2.400 km) e chegou em 15 de agosto em Boothbay, Maine, onde permaneceu por 20 dias. Em 2 de setembro, partiu de Boothbay e voou cinco dias ininterruptamente para atravessar o Oceano Atlântico, durante 114h (4.700 km), em direção a Caiena, Guiana Francesa, chegando 5 dias depois (7 de setembro). Após 10 dias em Caiena, voou para o Maranhão, Brasil, em 17 de setembro. Após um voo de 36 horas, percorrendo 950 km, chegou ao estado do Maranhão, Brasil, onde permaneceu 263 dias para o invernada.

Deixando o Maranhão para trás em 12 de maio, chegou a Delaware Bay, EUA, em 16 de maio (abrangendo 5.400 km, 86 h de voo), ajudado por bons ventos de cauda. Após 15 dias na baía de Delaware, voou em direção à ilha de Southampton e chegou em 4 de junho (PORTER; SMITH, 2013).



Figura 2: Distribuição geográfica de *Arenaria interpres*: linhas vermelhas as setas mostram a rota migratória da espécie.

Assim, tendo em conta que a rota migratória de *A. interpres* em direção à América do Sul inclui um voo transatlântico de cinco dias e que a costa Bragantina no Norte do Brasil é partilhada por essa espécie com outras aves migratórias de longa distância como *C. pusilla,* que também faz um voo transatlântico ininterrupto, hipotetizamos que os astrócitos dos indivíduos recém-chegados à costa de Bragança apresentariam retração e espessamento de seus ramos semelhante àqueles descritos previamente. (CARVALHO-PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017) enquanto que os dos animais em período de prémigração teriam os astrócitos com características morfológicas mais próximas da condição homeostática, reduzindo os efeitos de retração e espessamento dos ramos. Até o momento, nenhum trabalho explorou o impacto do período de invernada sobre a morfologia dessas células em *A. interpres* sendo essa a principal motivação do presente trabalho.

# 2- OBJETIVOS

## 2.1- Geral:

 Classificar a população de astrócitos e analisar tamanho (ou dimensões) da formação hipocampal em aves migratórias de longa distância ao longo de sua invernada.

## 2.2- Específicos:

- Classificar as populações de astrócitos protoplasmáticos da formação hipocampal de Arenarias interpres em indivíduos recém-chegados da migração outonal e em pré-migração primaveril.
- Estimar e comparar volume da formação hipocampal e do *tectum opticum* de *A. interpres* em indivíduos recém-chegados da migração outonal e em prémigração primaveril.
- Classificar as populações de astrócitos protoplasmáticos da formação hipocampal de Arenarias interpres em indivíduos recém-chegados da migração outonal e em pré-migração primaveril.

## **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

## 3.1- Amostragem e coleta

Duas janelas amostrais foram analisadas. A janela inicial incluiu cinco indivíduos recém-chegados da migração coletados em agosto / setembro (migração de outono) na Ilha Otelina, litoral de Bragança, Pará, Brasil. Na segunda janela temporal, outros cinco animais foram coletados na mesma ilha durante o período de pré-migração (abril / maio), quando as aves estavam se preparando para seu retorno ao Hemisfério Norte (migração primaveril), figura 3.

Figura 3: Linha do tempo detalhada sobre o esforço do presente trabalho.



Usamos redes de neblina de 12 m x 3 m instaladas ao entardecer, na Ilha Otelina (0 ° 45'42,57 "S 46 ° 55'51,86" W). As redes foram inspecionadas para a remoção das aves capturadas a cada dez minutos. Os animais utilizados neste estudo foram coletados sob autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), sob licença para captura e manuseio do número de animais selvagens 44551-3 (anexo 1).

A figura 4 ilustra o litoral de Bragança com localização relativa da Ilha Otelina e outras ilhas, próximo aos manguezais do estuário do Amazonas.



**Figura 4:** Mapa mostrado diversas ilhas costeiras, incluindo a Ilha de Otelina (ponto de coleta).

Fonte: PEREIRA (não publicado).

#### 3.2 – Perfusão e corte

Os animais foram perfundidos transcardialmente com solução salina heparinizada a 0,9% (1 ml / L) por 10 minutos, seguido de paraformaldeído a 4%, pH 7,2 - 7,4 por 10 minutos. O início do fluxo salino foi iniciado após o corte da veia jugular com incisão no lado direito do pescoço, permitindo assim uma melhor permeação do cérebro com solução salina e posteriormente paraformaldeído a 4%.

Após a remoção do cérebro, fatias de 100µm foram obtidas em um vibratome (Leica, VT, 1000s) em intervalos de 1: 6. As secções foram reagidas por imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial - imunomarcador seletivo de astrócitos de GFAP e coloração de Nissl.

#### 3.3 Imunohistoquímica

#### 3.3.1 – Imunomarcação para proteína ácida fibrilar glial – GFAP

Após a perfusão, dissecção e corte, as seções de tecido cerebral foram armazenadas em paraformaldeído a 4% a 4° C. As seções selecionadas foram lavadas com tampão fosfato (PB) a 0,1 M, pH 7,2 - 7,4 e depois incubadas em ácido bórico a 0,2 M, pH 9,0, a 70° C por 1 h. Os locais de ligação não específicos foram bloqueados através da incubação dos cortes em caseína a 10% durante 60 minutos. A incubação das seções no anticorpo primário anti-GFAP (diluição 1: 400, Millipore, código mab 377) para imunocoloração foi realizada por 3 dias a 4 ° C com agitação suave. A peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio a 0,3% dissolvido em solução PB 0,1M, pH 8,0, por 15 minutos. Após a lavagem, as seções foram incubadas por 60 minutos no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector ABC kit elite, Laboratórios Vector, Burlingame, CA, EUA, 1: 200). Os locais de marcação seletiva foram detectados usando 3'3-diaminobenzidina (DAB, Sigma) e reação com β-D-glicose / glicose oxidase (SHU; JU; FAN, 1988). Após a formação do produto da reação, foi gerado um precipitado cinza-azulado nos locais de interação antígenoanticorpo e as reações foram então interrompidas em PB 0,1 M (tabela 1). As seções foram montadas em lâminas de vidro gelatinizadas, secas ao ar e desidratadas, passando por processos que consistem inserir as lâminas com as secções imunomarcadas submersas por 5 minutos em álcool 50%, após este processo, 5 minutos em álcool 70%, 5 minutos em álcool 100% e mais duas vezes no xilol por 10 minutos a cada bateria.

Anti-GFAP					
1ª Fase					
Ácido Bórico 0,2M / pH: 9 / 70º C	1h				
PBST 5%	3x5'				
PBS 0,9%	3x2'				
Caseína 10%	1h				
PBS 0,9%	3x2'				
Anticorpo Primário <sup>1</sup>	72h				
2ª Fase					
PBS 0,9%	3x2'				
Anticorpo Secundário <sup>2</sup>	12h				
3ª Fase					
Peróxido de Hidrogênio 0.3%	15'				
PBS 0,9%	3x2'				
ABC	1h				
PB 0.1 M / pH:7,2 – 7,4	3x2'				
Tampão Acetato (pH: 6)	5'				
GND (Níquel/ DAB)³	4'				
Glucose Oxidase (0.5 mg)	30'				
PB 0.1 M	3x2'				
<sup>1</sup> : Código:019-19741 / Diluição 1:500					
²: Código: B1400 / Diluição 1:200					
<sup>3</sup> : Solução A: 0.25g Níquel + 5ml Tampão acetato					
<sup>3</sup> : Solução B: 0,006g DAB + 5ml dH2O					
<sup>3</sup> : 0,02g β-D-glucose + 0,004g cloreto de amônia					

**Tabela 1:** Etapas da reação de imunohistoquímica com ostempos de imersão e enxague em cada reagente.

#### 3.4- Área de interesse

Quando o desenvolvimento, a topografia e o papel funcional da formação hipocampal das aves são comparadas ao hipocampo de mamíferos, torna-se cada vez mais evidente que a parte medial do córtex dorsomedial das aves é homóloga ao hipocampo de mamíferos (ATOJI; SARKAR; WILD, 2016; KAPPERS; HUBER; CROSBY, 1936). A formação hipocampal está implicada em vários processos de memória, incluindo aqueles relacionados ao reconhecimento espacial e de objetos associados à navegação e armazenamento de alimentos (BINGMAN; YATES, 1992; FEENEY; ROBERTS; SHERRY, 2009; SHERRY, 2011; SHERRY; MACDOUGALL-SHACKLETON, 2015).

A figura 5 mostra fotomicrografias e desenhos bidimensionais de três secções originárias de três níveis rostro-caudais distintos para indicar os limites da formação hipocampal de *A. interpres*.

**Figura 5:** Fotomicrografia da formação hipocampal (A, D e G), imagem representativa do grid (700x700 µm) e caixas (50x50 µm) de reconstrução geradas pelo programa Neurolucida, (B, E e H) e nas figuras (C, F e I), delimitação da área de interesse (roxo). Escala 500 µm.



Tem sido observado por estudos de expressão gênica, que o hipocampo de aves e mamíferos possui a mesma origem embrionária (COBOS; PUELLES; MARTÍNEZ, 2001) e são amplamente homólogos revelando funções altamente conservadas (BELGARD; MONTIEL, 2013). Baseado em conectividade anatômica, estabeleceu-se que a área dorsomedial da formação hipocampal das aves é semelhante ao subiculum e Cornos de Amon (CAs), enquanto a camada em forma de V na porção ventro-medial é similar ao giro denteado dos mamíferos e a camada mais lateral do hipocampo das aves é análogo ao córtex entorrinal (ATOJI; SARKAR; WILD, 2016).

Em trabalho prévio (DINIZ; MAGALHAES; SOUSA; SANTOS FILHO et al., 2016) delimitaram a formação parahipocampal e o hipocampo (setas) propriamente dito na espécie *C. pusilla,* também migrante de longa distância, da seguinte maneira: a área do hipocampo propriamente dito é mais larga em sua porção dorsal na junção com a área parahipocampal e mais estreita em sua porção ventral próxima do septum. A área parahipocampal é a porção mais larga da formação hipocampal ao longo de todo o eixo rostro-caudal. O sulco paraventricular separa o hipocampo propriamente dito da área parahipocampal. Em secções onde o sulco paraventricular não é aparente o limite entre a área hipocampal e a área parahipocampal é a porçãos rostrais os limites arquitetônicos entre a área parahipocampal e o hiperpalio acessório é igualmente pouco claro.

Esse parcelamento está baseado em parcelamento anterior proposto para formação hipocampal das aves pressupondo homologias com a formação hipocampal dos mamíferos (ATOJI; WILD, 2006) (figura 6).

**Figura 6:** Possíveis homologias entre as estruturas que compõem a formação hipocampal de maçaricos e mamíferos. À esquerda na figura A, ilustra-se as estruturas do cérebro de mamiferos e em B homologias hipotéticas do cérebro de aves em relação aos mamíferos.



**Fonte:** GUPTA, S., et al. 2012. Baseado nas sub-regiões do hipocampo de pombo de ATOJI E WILD, 2006.

#### 3.4.1 Volume das áreas de interesse

Para fazer a estimativa de volume da formação hipocampal, foi utilizado o método de Cavalieri através software Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT, USA), este método consiste na distribuição aleatória de pontos sobre o tecido, onde cada ponto distribuído sobre as secções segue uma distribuição uniforme, e a distância entre os pontos é definida por um grid de amostragem similar ao grid do Fracionador Óptico (figuras 7 e 8).

Também é informado a espessura de corte de cada secção, o programa leva em consideração as medidas de área que são obtidas através dos contornos traçados no software, ou seja, a ligação bidimensional de no mínimo quatro pontos formam quadrantes e em cada um destes a área é calculada. O somatório de todas essas representações e de todas as secções compõem a estimativa final de volume da região de interesse.

É importante destacar que quanto menor o grid mais pontos na área de amostragem e, por conseguinte uma estimativa mais precisa. Para estimativa de medida de erro nós utilizamos o coeficiente de erro de Gundersen, adotando os valores menores que 0,05 como aceitáveis (GARCÍA-FIÑANA; CRUZ-ORIVE; MACKAY; PAKKENBERG et al., 2003). Abaixo a fórmula utilizada na estimativa do volume através do método de Cavalieri no software Stereo Investigator.

$$V = (1/ssf) * a_p t \sum P_i$$
  $a_p = g^2$ 

Onde,

ssf é o intervalo entre as secções,

ap é área do grid

t é a espessura da secção

P é o número de pontos amostrais dentro da área de interesse.

**Figura 7:** Ilustração demonstrando como funciona a estimativa de Cavalieri, em A, área de interesse com seu devido contorno, em B as áreas quadradas entre as cruzes são medidas no interior do contorno da região de interesse, em C com as devidas áreas preenchidas por marcadores, é possível se ter o valor estimado do volume da formação hipocampal. Escala: 500 µm.



**Figura 8:** Ilustração demonstrando como funciona a estimativa de Cavalieri. Em A, D e G temos as secções primária, medial e posterior respectivamente, em B, E e H as áreas com seus devidos contornos, em C, F e I, com as devidas áreas preenchidas por marcadores, onde é possível se ter o valor estimado do volume do telencéfalo. Escala: 500 µm.



O tectum opticum (figura 9) é uma estrutura laminada com 15 camadas que é responsável pela geração de movimentos oculares e da cabeça orientados para estímulos de interesse. Como os estímulos de interesse no ambiente tendem a se mover, não é de surpreender que muitos neurônios tectais respondam a estímulos em movimento (WYLIE; GUTIERREZ-IBANEZ; PAKAN; IWANIUK, 2009). A projeção dos axônios das células ganglionares da retina (RGCs) carreia informação visual oriunda do ambiente em torno, para os núcleos e áreas de processamento visuais.

**Figura 9:** Ilustração demonstrando a estimativa de Cavalieri para o *tectum opticum*, em A, área de interesse, em B a área com seu devido contorno e em C com as devidas áreas preenchidas por marcadores, é possível se ter o valor estimado do volume da formação hipocampal. Escala: 500 µm.



Esses axônios são reunidos no disco óptico e de lá em diante constituem o nervo óptico que se dirige às estações sinápticas da via visual incluindo o *tectum opticum* das aves, homólogo ao colículo superior nos mamíferos. Na maioria dos vertebrados o principal sítio de terminação do nervo óptico, é uma ampla expansão de células no cérebro médio, o *tectum opticum* (KEARY; VOSS; LEHMANN; BISCHOF et al., 2010). Ao conectarem-se com os neurônios do *tectum*, os axônios das RGCs se distribuem de modo ordenado de acordo com o arranjo dos seus corpos celulares na retina: RGCs adjacentes na retina se conectam com células-alvo também adjacentes no tectum. A projeção organizada cria um mapa retinotópico do espaço visual no *tectum* (BERSON; STEIN, 1995).

O *tectum opticum* (colículo superior em mamíferos), é altamente diferenciado, englobando circuitos neurais que medeiam a orientação olho-cabeça em direção a estímulos (MARÍN; DURÁN; MORALES; GONZÁLEZ-CABRERA et al., 2012). As camadas superficiais do *tectum* enviam projeções para as camadas profundas de forma topograficamente organizada incluindo aquelas que atingem os núcleos do istmo parvo e magnocelulares (WANG, 2003).

#### 3.5- Reconstrução tridimensional

Ao realizarmos a reconstrução tridimensional dos astrócitos utilizamos o microscópio óptico (Eclipse 80i, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000 Syste, Ludl Eletronic Products, Hawthome, NY, USA) para conversão digital da informação relativa às coordenadas digitais (X, Y e Z) de cada ponto digitalizado. Esse sistema foi acoplado a um microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (Neurolucida, Microbrightfield, Williston, VT, USA) estocando as coordenadas dos pontos de interesse (ver figura 10). No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas reconstruções, a objetiva de 4,0x foi substituída por outra PLANFLUOR, 100X (NA1.3; DF= 0.2 µl; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais realizadas.

O estudo morfométrico forneceu dados para uma análise quantitativa, e permitiu também a determinação da distribuição dos objetos de interesse reconstruídos (PASCUAL et al., 1998).

**Figura 10**: Fotomicrografia de baixo e alto aumento da formação hipocampal do *A. interpres* a partir de uma secção imunomarcada com anticorpo anti-GFAP para definir os limites da área de interesse e a estratégia de amostragem. Barras de escala A =  $250 \mu m$ ; B e C =  $500 \mu m$ , D =  $25 \mu m$  e E =  $10 \mu m$ .



Foram analisados 20 parâmetros morfométricos para comparação entre as janelas empregando o software Neurolucida 2017. Ao final das reconstruções foram selecionadas as variáveis quantitativas morfométricas com índices de multimodalidade (MMI > 0,55), para análise de cluster (Ward's hierarchical clustering

method), incluindo todos os animais de cada grupo. A multimodalidade foi detectada com base na assimetria e curtose destas amostras para cada variável morfométrica conforme definido anteriormente : MMI = [M32 +1] / [M4 + 3 (n - 1) 2 / (n - 2) n - 3)], onde M3 é assimetria e M4 é curtose e n é o tamanho da amostra (SCHWEITZER; RENEHAN, 1997). Curtose e assimetria descrevem a forma da distribuição de dados e permitem distinguir entre as curvas unimodais, bimodais ou multimodais.

Variáveis multimodais são essenciais para classificar uma população de células empregando a análise hierárquica de cluster (SCHWEITZER; RENEHAN, 1997). O índice multimodal de cada variável foi estimado com base nas medidas de 20 parâmetros morfométricas das árvores dos astrócitos, (Tabela 2).

Realizamos também a escolha da célula representativa que foi feita por análise estatística multivariada envolvendo todas as variáveis morfométricas dos astrócitos reconstruídos a partir da formação hipocampal de recém-chegados e grupos de prémigração.

**Tabela 2:** Ordem de dados morfométricos analisados e extraídos das células reconstruídas em 3Dpelo programa Neurolucida Explorer.

	Análise de Estrutura Ramificada				
Sogmonto	Qualquer porção da estrutura astrocítica ramificada com terminações				
Segmento	que são nós ou terminações sem nós intermediários.				
Segmentos/mm	Número de segmentos / comprimento total dos segmentos expressos				
oegmentos/mm	em milímetros.				
Nº de Árvores	Número de árvores dos astrócitos				
Nº Total de	Referem-se ao número total de segmentos da árvore.				
Segmentos					
Comprimento dos	Comprimento total da linha dos segmentos utilizados para traçar o				
Ramos	ramo de interesse.				
Comprimento Médio	Média = [Comprimento total] / [Número de ramos]				
dos Ramos (µm)					
Comprimento Total	Comprimento total de todos os ramos da árvore.				
dos Ramos (µm)					
	Razão entre o comprimento atual do segmento dividido pela distância				
	entre os pontos finais do segmento. A menor tortuosidade possível é				
Tortuosidade	1. Este é um segmento reto. A tortuosidade aumenta à medida que o				
	segmento assume um caminho mais complexo para atingir seu				
	destino.				
Área de Superfície	Calculado pela modelagem de cada ramo como um tronco (truncado				
Média dos Ramos	cone circular reto) dividido pelo número de ramos.				
(µm²)					

Área de Superfície Total das Árvores (µm²)	Área de superfície 2D da árvore de um astrócitos calculado com base na área definida pelas extremidades de todas as árvores.
Volume dos Ramos (µm³)	Calculado através de modelagem de cada peça de cada segmento como um tronco (cone truncado): V=1/3 * Pi * L((R1*R1) + (R2*R2) + (R1*R2)), onde: L = comprimento do segmento; R1= raio no início do segmento R2 = raio no fim do segmento.
Volume Total dos Ramos	O volume total para todos os ramos da árvore.
Diâmetro da Base dos Ramos Primários (µm)	O diâmetro do círculo contido na base de forma cilíndrica do primeiro ramo a sair do corpo celular.
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 (μm²) 2D, Área de Superfície (μm²) 3D e Volume (μm³)	O Convex Hull mede o tamanho do campo de ramificação, interpretando uma estrutura ramificada como um objeto sólido que controla uma determinada quantidade de espaço físico. A quantidade de espaço físico é definida em termos de volume da área de superfície, área e ou perímetro.
Análise dos Vértices	Descreve a estrutura geral de um objeto ramificado com base em propriedades topológicas e métricas. Ponto de raiz (ou origem): Para neurônios, micróglia ou astrócitos, a origem é o ponto em que a estrutura está ligada ao soma. Principais tipos de vértices: Vd (bifurcação) ou Vt (trifurcação): Pontos nodais (ou ramificados). Vp: vértices terminais (ou pendentes). Va: vértices primários conectandose a 2 vértices pendentes; Vb: vértices secundários que ligam 1 vértice pendente (Vp) a 1 bifurcação (Vd) ou 1 trifurcação (Vt); Vc: vértices terciários que conectam quer 2 bifurcações (Vd), 2 trifurcações (Vt), ou 1 bifurcação (Vd) e 1 trifurcação (Vt). No presente esforço, medimos o número de vértices Va, Vb e Vc.
Complexidade	Complexidade = [Soma das ordens terminais + Número de terminais] × [Comprimento total da ramificação / Número de ramos primários]

# 4 - RESULTADOS

# 4.1 – Estimativa de volume pelo método de Cavalieri, comparação de volume da formação hipocampal e *tectum opticum*

Os dados de volume das áreas de interesse detalharam as diferenças entre grupos ou não diferença entre as regiões de interesse em cada animal. Foram estimados de forma comparada os volumes da formação hipocampal, do telencéfalo e do *tectum opticum*, dos dois grupos para as duas janelas temporais (tabelas 3 - 8).

Estimativa de Cavalieri (Formação Hipocampal) – Pré-migração									
Formação Hipocampal Direita FHD	Área Estimada (mm²) FHD	Volume Estimado (mm³) FHD	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 FHD	Formação Hipocampal Esquerda FHE	Área Estimada (mm²) FHE	Volume Estimado (mm³) FHE	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 FHE		
BCAI09	21.285.000.00	12.771	0.013	BCAI09	18.765.000.00	11.259	0.014		
BCAI10	20.227.500.00	12.1365	0.017	BCAI10	24.097.500.00	14.4585	0.014		
BCAI11	22.477.500.00	13.4865	0.025	BCAI11	28.755.000.00	17.253	0.011		
BCAI12	20.362.500.00	12.2175	0.014	BCAI12	14.310.000.00	8.586	0.013		
Média	21.088.125.00	12.65	0.017	Média	21.481.875.00	12.889	0.013		

Tabela 3: Estimativa de volume da região de interesse (formação hipocampal) do grupo de animais retornado ao Hemisfério Norte. FHD = Formação hipocampal direita e FHE = Formação hipocampal esquerda.

Tabela 4: Estimativa de volume da região de interesse (formação hipocampal) do grupo de animais recémchegados ao Hemisfério Sul. FHD = Formação hipocampal direita e FHE = Formação hipocampal esquerda.

Estimativa de Cavalieri (Formação Hipocampal) – Recém-chegado									
Formação Hipocampal Direita FHD	Área Estimada (mm²) FHD	Volume Estimado (mm³) FHD	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 FHD	Formação Hipocampal Esquerda FHE	Área Estimada (mm²) FHE	Volume Estimado (mm³) FHE	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 FHE		
BCAI01	34.020.000.00	16.3296	0.013	BCAI01	28.609.200.00	13.7324	0.016		
BCAI03	20.282.400.00	9.73555	0.015	BCAI03	17.593.200.00	8.44474	0.018		
BCAI05	22.005.000.00	13.203	0.035	BCAI05	17.595.000.00	8.4456	0.037		
BCAI06	15.885.000.00	9.531	0.018	BCAI06	17.685.000.00	10.611	0.015		
Média	23.048.100.00	12.20	0.020	Média	20.370.600.000	10.308	0.022		

Tabela 5: Estimativa de volume da região de interesse (*Tectum opticum*) do grupo de animais retornando ao Hemisfério Norte. TOD = *Tectum opticum* direito e TOE = *Tectum opticum* esquerdo.

Estimativa de Cavalieri ( <i>Tectum Opticum</i> ) – Pré-migração									
<i>Tectum Opticum</i> Direito TOD	Área Estimada (mm²) TOD	Volume Estimado (mm³) TOD	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TOD	<i>Tectum Opticum</i> Esquerdo TOE	Área Estimada (mm²) TOE	Volume Estimado (mm³) TOE	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TOE		
BCAI09	28.040.000.00	16.82	0.028	BCAI09	46.640.000.00	27.98	0.013		
BCAI10	31.240.000.00	18.74	0.027	BCAI10	31.760.000.00	19.06	0.018		
BCAI11	32.960.000.00	19.78	0.020	BCAI11	20.400.000.00	12.24	0.033		
BCAI12	16.280.000.00	9.77	0.038	BCAI12	38.680.000.00	23.21	0.019		
Média	27.130.000.00	16.28	0.03	Média	34.370.000.00	20.622	0.021		

Estimativa de Cavalieri (Tectum Opticum) - Recém-chegado									
<i>Tectum Opticum</i> Direito TOD	Área Estimada (mm²) TOD	Volume Estimado (mm³) TOD	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TOD	<i>Tectum Opticum</i> Esquerdo TOE	Área Estimada (mm²) TOE	Volume Estimado (mm <sup>3</sup> ) TOE	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TOE		
BCAI05	26.600.000.00	12.77	0.029	BCAI05	47.520.000.00	22.81	0.022		
BCAI01	44.280.000.00	21.25	0.018	BCAI01	42.720.000.00	20.51	0.018		
BCAI03	13.480.000.00	6.47	0.048	BCAI03	20.400.000.00	9.79	0.044		
BCAI02	44.160.000.00	21.20	0.019	BCAI02	3.0560.000.00	14.67	0.031		
Média	32.130.000.00	15.42	0.03	Média	35.300.000.00	16.944	0.029		

Tabela 6: Estimativa de volume da região de interesse (*Tectum opticum*) do grupo de animais recém-chegados ao Hemisfério Sul. TOD = *Tectum opticum* direito e TOE = *Tectum opticum* esquerdo.

Tabela 7: Estimativa de volume da região de interesse (Telencéfalo) do grupo de animais retornando ao Hemisfério Norte. TD = Telencéfalo direito e TE = Telencéfalo esquerdo.

Estimativa de Cavalieri (Telencéfalo) - Pré-migração								
Formação Tel. Direito TD	Área Estimada (mm²) TD	Volume Estimado (mm³) TD	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TD	Formação Tel. Esquerdo TE	Área Estimada (mm²) TE	Volume Estimado (mm³) TE	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TE	
BCAI09	201.750.000.00	121.05	0.014	BCAI09	216.450.000.00	129.87	0.012	
BCAI10	199.800.000.00	119.88	0.010	BCAI10	234.540.000.00	140.724	0.010	
BCAI11	213.570.000.00	128.142	0.013	BCAI11	212.250.000.00	127.35	0.011	
BCAI12	183.060.000.00	109.836	0.012	BCAI12	139.050.000.00	83.43	0.018	
Média	199.545.000.00	119.73	0.01	Média	200.572.500.00	120.344	0.013	

Tabela 8: Estimativa de volume da região de interesse (Telencéfalo) do grupo de animais recém-chegados ao Hemisfério Sul. TELD = Telencéfalo direito e TELE = Telencéfalo esquerdo.

Cavalieri Estimator (Telencéfalo) - Recém-chegado								
Formação Tel. Direito TD	Área Estimada (mm²) TD	Volume Estimado (mm³) TD	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TD	Formação Tel. Esquerdo TE	Área Estimada (mm²) TE	Volume Estimado (mm³) TE	Coeficiente de erro (Gundersen), m=1 TE	
BCAI01	190.260.000.00	91.3248	0.012	BCAI01	195.930.000.00	94.0464	0.012	
BCAI03	220.770.000.00	105.97	0.012	BCAI03	191.790.000.00	92.0592	0.011	
BCAI05	152.010.000.00	91.206	0.023	BCAI05	144.450.000.00	69.336	0.031	
BCAI06	190.260.000.00	114.156	0.015	BCAI06	176.670.000.00	106.002	0.010	
Média	188.325.000.00	100.66	0.02	Média	177.210.000.00	90.361	0.016	
A diferença entre os valores de volume do telencéfalo entre os dois grupos se mostrou significativa, após a aplicação do teste (teste t para duas amostras independentes / teste bicaudal) o resultado estatístico observado foi (p = 0,01 e t = -2,96), mostrando que, no grupo de pré-migração, o volume do telencéfalo é expressivamente maior do que no grupo de animais recém-chegados. já nas outras análises estatísticas envolvendo a formação hipocampal (p = 0,27 e t = -1,12) e o *tectum opticum* (p = 0,45 e t = -0,76), não houve diferenças significativas quando aplicado o mesmo teste descrito anteriormente. também foi realizado o cálculo de razão da formação hipocampal/telencéfalo (p = 0,32 e t = -1,03) não obtendo também diferenças significativas de volume entre os grupos, (figura 11).

**Figura 11**: Gráficos demonstrando as medidas de volume das áreas de interesse (A - D) e as devidas comparações entre as janelas, observamos que apenas a comparação de volume do telencéfalo foi significativa entre as janelas do período de invernada (p < 0,05).



# 4.2 – Morfologia dos astrócitos.

Após a imunocoloração da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), nas seções de formação hipocampal de *A. interpres* foram encontrados três morfotipos principais de

astrócitos, confirmando descrições anteriores em C. pusilla (CARVALHO-PAULO; MAGALHAES; MIRANDA; DINIZ et al., 2018). A figura 12 mostra fotomicrografias de astrócitos estrelados, vasculares e radiais da formação hipocampal de A. interpres.

Figura 12: Fotomicrografias demonstrando os tipos astrocíticos observados no presente trabalho, onde em A, temos a ilustração do astrócito estrelado, em B podemos observar astrócitos ligados a vasculatura, estes dois tipos representam o alvo de estudo no presente projeto, e em C temos a fotomicrografia de astrócitos radiais. Barra de escala= 25 µm.



Vascular

Radial

Não incluímos análise quantitativa de astrócitos radiais. Astrócitos vasculares estão sempre associados a vasos sanguíneos, enquanto astrócitos estrelados não. Como descrito anteriormente em outras espécies (PARNAVELAS; NADARAJAH, 2001; RAKIC, 1972), astrócitos radiais em A. interpres também mostraram corpos celulares ovóides nas paredes do ventrículo com ramos bipolares assimétricos, incluindo projeções mais longas para o parênguima e extremidades mais curtas na direção oposta. Astrócitos estrelados têm sido descritos como astrócitos protoplásmicos em contato próximo com os compartimentos pré e pós-sinápticos e sua diversidade morfológica varia em função da região e das camadas do cérebro (ZHOU et al., 2010). Astrócitos individuais foram selecionados usando uma abordagem sistemática de amostragem aleatória, e o número de elementos selecionados para reconstrução foi bastante grande, o que sugere que não há viés de amostragem a priori.

Com base nas características morfológicas multimodais 3D (MMI > 0,55), buscamos famílias morfológicas de astrócitos usando análise hierárquica de agrupamentos. Independentemente da janela de tempo da amostra, os resultados mostraram dois morfotipos designados Tipo I e Tipo II com base na complexidade morfológica, confirmando dados anteriores em C. pusilla (CARVALHO-PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017).

# 4.3 As morfologias dos astrócitos do Tipo I e II mudam à medida que a invernada avança.

A partir da análise hierárquica de agrupamentos seguida pela análise discriminante, duas famílias morfológicas de astrócitos foram detectadas na formação hipocampal de *A. interpres* (figura 13 e figura 14). Nos dois grupos, as características morfométricas que mais contribuíram para a formação de aglomerados foram complexidade morfológica e volume do convex hull. Essas células foram designadas Tipo I e Tipo II com base na maior complexidade morfológica encontrada no primeiro grupo e menor no último. Representações gráficas (B e C) da complexidade morfológica e dos valores médios do Convex hull, e os correspondentes erros e desvios padrão, ilustram as diferenças significativas entre os astrócitos Tipo I e Tipo II. Observe que as representações gráficas da análise discriminante (figuras 2D e 3D) revelaram maior dispersão dos neurônios do Tipo I.

**Figura 13:** Características morfológicas de astrócitos reconstruídos na formação hipocampal de cinco aves do grupo recém-chegado da espécie *Arenaria interpres*. Em A, está representada a análise discriminante de cluster (Ward's method) com 261 células astrocíticas que indica os dois tipos de células (Tipo I e Tipo II). B e C – Representação gráfica dos valores médios de complexidade e volume do convex hull respectivamente, juntamente com seu erro padrão correspondente mostrando a diferença significativa entre os astrócitos do Tipo I e Tipo II. D – Gráfico demonstrando o resultado da análise discriminante. D – As variáveis que mais contribuíram para o agrupamento foram complexidade e volume do convex hull (p < 0,000000), a análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais dos astrócitos (MMI> 0,55).



**Figura 14:** Análise hierárquica de cluster de características morfológicas de astrócitos reconstruídos na formação hipocampal de cinco aves do grupo em pré-migração da espécie *Arenaria interpres*. Em A, o dendrograma indica a formação de dois agrupamentos obtidos a partir da análise de 255 células astrocíticas. Em função da complexidade designamos os astrócitos com maior complexidade morfológica de Tipo I e os com menor complexidade morfológica de Tipo II. B e C Representação gráfica dos valores médios de complexidade e volume do convex hull respectivamente. Os erros padrão são destacados pelas caixas coloridas e o desvio padrão pelos bigodes (whiskers). D – Gráfico demonstrando o resultado da análise discriminante. As variáveis que mais contribuíram para a formação dos agrupamentos foram complexidade e volume do convex hull (p < 0,000000 e p< 0,007 respectivamente), a análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais (MMI> 0,55).



A figura 15 ilustra diferenças estatisticamente significativas das características morfométricas multimodais, incluindo tortuosidade, complexidade morfológica e volume do Convex hull entre os astrócitos Tipo I e Tipo II da formação hipocampal de *A. interpres*, dentro de cada janela. Curiosamente, a tortuosidade foi maior no Tipo I nos recém-chegados e menor no grupo de pré-migração. Representações gráficas de valores médios e seu desvio padrão correspondente e erros padrão são representados

**Figura 15:** Gráficos demonstrando a morfometria de astrócitos (Tipo I versus Tipo II) da espécie Arenaria interpres reconstruídos tridimensionalmente a partir de animais em diferentes janelas temporais A – C correspondem a representações gráficas de valores médios, erros padrão (caixas coloridas) e desvios padrão (Whiskers) de parâmetros multimodais com diferenças significativas entre os tipos de astrócitos. (\*) indicam diferenças significantes (p< 0,05).



Astrócitos Tipo I da formação hipocampal de *A. interpres* apresentaram valores médios mais altos de complexidade morfológica, tortuosidade e volume do Convex hull do que os astrócitos Tipo II em recém-chegados do que em aves de pré-migração. (figura 15). Os astrócitos recém-chegados apresentaram valores médios mais altos para complexidade, comprimento total dos ramos e volume do Convex hull, do que os astrócitos de aves pré-migração.

A figura 16 mostra diferenças estatisticamente significativas das características morfométricas multimodais dos astrócitos da formação hipocampal para ilustrar as influências das janelas temporais (recém-chegados versus grupo pré-migração). Diferenças significativas entre janelas foram encontradas: Volume dos Ramos, Complexidade e Volume do Convex hull, tanto nos astrócitos Tipo I quanto no Tipo II, com maiores valores para os recém-chegados. Por outro lado, os valores médios da tortuosidade foram maiores nos astrócitos Tipo II da formação hipocampal do grupo

de pré-migração.

**Figura 16:** Gráficos demonstrando a influência diferencial das janelas temporais sobre a morfometria de astrócitos reconstruídos tridimensionalmente (Tipo I e Tipo II) de *Arenaria interpres*. A – D: Representação gráfica de valores médios e erros padrão de parâmetros morfométricos multimodais que apresentaram diferenças estatísticas significantes (asteriscos indicam p< 0,05).



Como as proporções de células reconstruídas são bastante grandes (516 no total; 261 em recém-chegados e 255 em aves de inverno pré-migração, aproximadamente 50 células por indivíduo), elas refletem a distribuição quantitativa de astrócitos Tipo I e Tipo II na formação hipocampal de *Arenaria interpres*. Devido à estratégia de amostragem aleatória e sistemática, a seleção de astrócitos do

hipocampo foi feita sem viés e que o número total de células reconstruídas de cada tipo era representativo de sua distribuição na formação do hipocampo. De fato, a maior variação entre recém-chegados e indivíduos da pré-migração relacionada à complexidade morfológica dos astrócitos Tipo I e Tipo II foi cerca de 6 vezes e duas vezes maior, respectivamente. Além disso, os astrócitos do Tipo I reduziram a tortuosidade enquanto o Tipo II a aumentou, à medida que o período de invernada progredia.

Essas alterações também se refletiram nas reconstruções 3D de células representativas retiradas de astrócitos estrelados do hipocampo em cada grupo (recém-chegados e grupos de pré-migração). A figura 17 destaca as principais diferenças morfológicas entre os astrócitos estrelados do Tipo I e do Tipo II em *A. interpres*. As alterações morfológicas dos astrócitos do Tipo I no grupo de pré-migração pareciam ser maiores do que as do Tipo II. Os astrócitos do Tipo II foram mais frequentes do que os astrócitos do Tipo I, representando cerca de 70% do total de astrócitos reconstruídos nos recém-chegados e nas aves de pré-migração.

**Figura 17:** Astrócitos reconstruídos em 3 dimensões selecionados para representar a célula média do hipocampo de animais recém-chegados e em pré-migração. Em A e B astrócitos do Tipo I dos grupos de animais recém-chegados e em pré-migração respectivamente. Em C e D astrócitos do Tipo II das mesmas janelas temporais respectivamente. Barra de escala 20 µm.



# 5 – DISCUSSÃO

Para testar a hipótese de que astrócitos da formação hipocampal de *A. interpres*, alterados por cinco dias de voo transatlântico ininterrupto, seriam recuperados após o período de invernada, comparamos a morfologia dos astrócitos de aves recém-chegadas (capturadas em agosto / setembro) com a de indivíduos no final do período de invernada (capturados em abril / maio), quando as aves terminam sua preparação para a longa jornada de volta aos locais de reprodução no Hemisfério Norte. Descobrimos que a complexidade morfológica dos astrócitos do grupo de prémigração era maior que a dos recém-chegados e sugerimos que eles estariam mais próximos da morfologia do astrócito saudável. hipotetizamos que indivíduos de *A. interpres*, capturados no período pré-migração em abril / maio (próximo à migração primaveril), estavam completamente recuperados para a interação com os neurônios e utilização de reservas lipídicas, o que foi alcançado durante o período de invernada (JENNI-EIERMANN, 2017; LANDYS; PIERSMA; GUGLIELMO; JUKEMA et al., 2005).

Especulamos que os astrócitos recuperados estão mais próximos da condição homeostática e isso permite usar lipídios como principal fonte de energia de maneira mais eficiente, sustentando a oxidação de ácidos graxos e fornecendo metabólitos como corpos cetônicos para os neurônios, durante o período de jejum e níveis baixos de glicose associada aos voos migratórios de longa distância (BARBER; RABEN, 2019; IOANNOU; JACKSON; SHEU; CHANG et al., 2019).

# 5.1 - Diversidade e funções morfológicas dos astrócitos

O hipocampo das aves tem sido indicado como um centro de integração de estímulos visuoespaciais e somatossensoriais usados no processo migratório de longa distância (MOURITSEN; HEYERS; GÜNTÜRKÜN, 2016) e os astrócitos do hipocampo são protagonistas ativos dessas tarefas (DESCALZI; GAO; STEINMAN; SUZUKI et al., 2019), regulando íons extracelulares, neurotransmissores e metabólitos para disparo neuronal e influenciando a atividade sináptica local e distante através das junções em gap da rede de astrócitos (SCHIERA; DI LIEGRO; DI LIEGRO, 2019). Devido à diversidade de funções dos astrócitos, é razoável suspeitar de um certo grau de especialização morfológica e funcional, conforme confirmado anteriormente por estudos fisiológicos e anatômicos, RNA-seq, marcador proteômico e celular (CHAI; DIAZ-CASTRO; SHIGETOMI; MONTE et al., 2017).

Coerentemente com a diversidade morfológica e a função mencionada anteriormente, as rotas migratórias contrastantes afetaram diferencialmente a morfologia dos astrócitos hipocampais de *C. pusilla* e *C. semipalmatus*. (CARVALHO-

PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017) e *C. semipalmatus* (HENRIQUE et al., resultados não publicados).

O voo transatlântico ininterrupto de 5 dias de *C. pusilla* foi associado a uma redução significativa do número de astrócitos do hipocampo e ao encolhimento de seus ramos, reduzindo significativamente sua complexidade morfológica, enquanto as alterações nos astrócitos do hipocampo de *C. semipalmatus* foram limitadas à redução de sua complexidade morfológica. Como essas alterações morfológicas não foram influenciadas por diferenças filogenéticas, sugerimos que esses efeitos diferenciais na morfologia e números dos astrócitos estavam associados aos padrões migratórios contrastantes das duas espécies (CARVALHO-PAULO; MAGALHAES; MIRANDA; DINIZ et al., 2018).

Como em *C. pusilla* e *C. semipalmatus*, encontramos em *A. interpres* dois grupos principais de astrócitos, designados Tipo I e Tipo II. As duas janelas temporais do período de invernada revelaram morfologias distintas de astrócitos imunomarcados para GFAP, com aumento significativo da complexidade morfológica e volume do Convex hull no grupo de pré-migração. Também descobrimos que, exceto pela tortuosidade, que reverteu os valores médios no grupo de pré-migração nos astrócitos do Tipo II, o período de invernada aumentou significativamente, muitos outros valores médios de outras características morfológicas. Sugerimos que esses efeitos possam estar associados ao longo descanso migratório com ingestão adequada de nutrientes em preparação para a migração primaveril.

É importante destacar que o GFAP é essencial para a manutenção da estrutura e forma dos astrócitos e é o principal componente do citoesqueleto da maioria dos astrócitos maduros. Além disso, a plasticidade morfológica do GFAP permite mudanças rápidas nos estados de montagem e polimerização em resposta a desafios ambientais (LI; LIU; LIU; LIU et al., 2019). Como descobrimos um aumento da complexidade morfológica dos astrócitos GFAP perto da migração primaveril, sugerimos que a expressão do gene que controla a expressão de GFAP possa estar regulada para baixo nas aves capturadas no outono (agosto e setembro) e aumentada nos indivíduos capturados na primavera (Abril e Maio). No entanto, resta investigar os mecanismos subjacentes que desencadeiam a expressão gênica dessas alterações nos astrócitos imunomarcados para GFAP durante o período de invernada.

# 5.2 - Explicações potenciais para as morfologias contrastantes de astrócitos na formação hipocampal em recém-chegados e indivíduos em pré-migração

Um único trabalho descreveu previamente alterações morfológicas dos astrócitos em aves costeiras após voos de longa distância sem escalas (CARVALHO-PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017). Aqui, comparamos a morfologia tridimensional de astrócitos em recém-chegados e indivíduos em pré-migração durante o período de invernada. Os ramos dos dois tipos de astrócitos tomados em conjunto nossos dados permitem especular que haja uma via e extensão diferente nos recém-chegados e essas mudanças foram recuperadas no grupo de pré-migração, mantendo os efeitos diferenciais. É, portanto, importante discutir por que esses efeitos distintos sobre o Tipo I e o Tipo II foram observados. Como mencionado anteriormente em C. pusilla (CARVALHO-PAULO; DE MORAIS MAGALHÃES; DE ALMEIDA MIRANDA; DINIZ et al., 2017), se mais astrócitos do Tipo II estiverem realmente mais envolvidos na unidade neurovascular do que os astrócitos do Tipo I, a integridade dos astrócitos do Tipo II provavelmente será essencial para a integridade da Barreira Hematoencefálica (BBB), e sua morfologia deve ser conservada mesmo em condições adversas. A BBB determina a polaridade do fluxo sanguíneo das arteríolas em resposta às demandas bioenergéticas (GORDON; CHOI; RUNGTA; ELLIS-DAVIES et al., 2008). C. pusilla e A. interpres devem jejuar por 5 dias durante o longo voo (BROWN, 2014; PORTER; SMITH, 2013) e, quando a glicose é reduzida, o cérebro aumenta o metabolismo de cetona. (ACHANTA; RAE, 2017). Sugerimos que possa haver uma via alternativa nos astrócitos do Tipo II, usando corpos cetônicos, em associação com o período de jejum imposto no longo voo. Tomados em conjunto, nossos dados permitem especular que haja uma via metabólica diferencial nos astrócitos Tipo I e Tipo II em funções de papeis funcionais diferentes. Por outro lado, as vias de glicose podem ser prontamente ativadas quando a área de invernada é alcançada e os pepetídeos são reativados.

# 5.3 - Limitações metodológicas

Diferentes imunomarcadores seletivos de astrócitos demonstraram que a marcação imunológica anti-GFAP, a anti-S-100ß ou a anti-glutamina sintetase gera

informações complementares em diferentes áreas e camadas (RODRÍGUEZ; YEH; TERZIEVA; OLABARRIA et al., 2014). Assim, as reconstruções 3D dos astrócitos imunomarcados para GFAP podem descrever apenas parte da história morfológica completa dos astrócitos.

O enriquecimento ambiental estimula a neurogênese e a glicogênese (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999) e aumenta a rede de astrócitos GFAP (Williamson et al., 2012). Esses astrócitos sob influência do enriquecimento ambiental exibem ramos mais longos e maior número de pontos de ramificação (VAN PRAAG; 1999), KEMPERMANN; GAGE. sugerindo que, embora а marcação imunohistoquímica para GFAP esteja longe de representar a morfologia real dos astrócitos, ela detalha todas as alterações no componente principal do citoesqueleto das células, essencial para a estrutura e forma destas (LI; LIU; LIU; LIU et al., 2019). No presente trabalho, usamos a marcação imunológica por GFAP, limitando a extensão de nossas observações ao citoesqueleto dos astrócitos.

As reconstruções microscópicas em 3D são frequentemente afetadas pelo encolhimento não uniforme no eixo z das secções (HOSSEINI-SHARIFABAD; NYENGAARD, 2007). A retração no eixo Z reduz a aproximadamente 25% da espessura original, após a desidratação e o clareamento do tecido (CARLO; STEVENS, 2011). Adotando uma redução de 75% da espessura ao longo do eixo z, usamos esse valor percentual para implementar correções em todas as reconstruções de astrócitos e, como a área do tecido não mudou ao longo dos eixos X-Y após a desidratação histológica e a limpeza, nenhuma correção foi aplicada a essas dimensões.

# 6 – CONCLUSÃO

No presente esforço, concentramos nossa atenção no período de invernada da ave migratória de longa distância *Arenaria interpres* e, conforme o período de invernada avança, detectamos mudanças diferenciais nas morfologias dos astrócitos da formação hipocampal. Essa subpopulação glial tem seu número e morfologia modificada diante de estímulos multissensoriais e cognitivos, tanto em mamíferos quanto em aves. Para procurar famílias morfológicas distintas e investigar respostas morfológicas diferenciais, comparamos 20 características morfométricas dos astrócitos reconstruídos em 3D, usando análise hierárquica de agrupamentos de

variáveis multimodais. Embora em extensão diferente, em comparação com os recémchegados, encontramos um aumento significativo da complexidade morfológica e do volume do Convex hull dos astrócitos Tipo I e Tipo II no grupo pré-migração. Sugerimos que os astrócitos Tipo I e Tipo II possam ter papéis fisiológicos distintos e que os valores médios diferencialmente aumentados das características morfométricas no período pré-migratório sejam parte das mudanças adaptativas dos circuitos do hipocampo para enfrentar a viagem de longa distância de volta aos nichos reprodutivos no Hemisfério Norte.

# REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2006.

ACHANTA, L. B.; RAE, C. D. β-Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. **Neurochem Res**, 42, n. 1, p. 35-49, Jan 2017.

AHARON-ROTMAN, Y.; BUCHANAN, K.; CLARK, N.; KLAASSEN, M. *et al.* Why fly the extra mile? Using stress biomarkers to assess wintering habitat quality in migratory shorebirds. **Oecologia**, 182, n. 2, p. 385-395, 2016.

ALMUTAIRI, M. M.; GONG, C.; XU, Y. G.; CHANG, Y. *et al.* Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. **Cell Mol Life Sci**, 73, n. 1, p. 57-77, Jan 2016.

ATOJI, Y.; SARKAR, S.; WILD, J. M. Proposed homology of the dorsomedial subdivision and V-shaped layer of the avian hippocampus to Ammon's horn and dentate gyrus, respectively. **Hippocampus**, 26, n. 12, p. 1608-1617, 12 2016.

ATOJI, Y.; WILD, J. M. J. R. i. t. N. Anatomy of the avian hippocampal formation. 17, n. 1-2, p. 3-16, 2006.

BARBER, C. N.; RABEN, D. M. Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. **Front Cell Neurosci**, 13, p. 212, 2019.

BARROS, D. F.; ALBERNAZ, A. L. Possible impacts of climate change on wetlands and its biota in the Brazilian Amazon. **Braz J Biol**, 74, n. 4, p. 810-820, Nov 2014.

BAST, T.; DA SILVA, B. M.; MORRIS, R. G. Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. **J Neurosci**, 25, n. 25, p. 5845-5856, Jun 22 2005.

BELGARD, T. G.; MONTIEL, J. F. Things Change–How Comparative Transcriptomics Suggests the Pallium has Evolved at Multiple Levels of Organization. **Brain, behavior and evolution**, 82, n. 3, 2013.

BENNETT, J. C.; MCRAE, P. A.; LEVY, L. J.; FRICK, K. M. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. **Neurobiol Learn Mem**, 85, n. 2, p. 139-152, Mar 2006.

BERSON, D.; STEIN, J. J. V. n. Retinotopic organization of the superior colliculus in relation to the retinal distribution of afferent ganglion cells. 12, n. 4, p. 671-686, 1995.

BINGMAN, V.; YATES, G. Hippocampal lesions impair navigational learning in experienced homing pigeons. **Behavioral neuroscience**, 106, n. 1, p. 229, 1992.

BROWN, S. The Remarkable Odyssey of a Semipalmated Sandpiper. **Shorebird Science**, July 9th, 2014.

BULLUCK, L.; AMES, E.; BAYLY, N.; REESE, J. *et al.* Habitat-dependent occupancy and movement in a migrant songbird highlights the importance of mangroves and forested lagoons in Panama and Colombia. **Ecol Evol**, 9, n. 19, p. 11064-11077, Oct 2019.

CARLO, C. N.; STEVENS, C. F. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **J Comp Neurol**, 519, n. 14, p. 2803-2810, Oct 2011.

CARVALHO-PAULO, D.; DE MORAIS MAGALHÃES, N. G.; DE ALMEIDA MIRANDA, D.; DINIZ, D. G. *et al.* Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper. **Front Neuroanat**, 11, p. 126, 2017.

CARVALHO-PAULO, D.; MAGALHAES, N. G. D.; MIRANDA, D. D.; DINIZ, D. G. *et al.* Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper Calidris pusilla. **Frontiers in Neuroanatomy**, 11, Jan 2018.

CHAI, H.; DIAZ-CASTRO, B.; SHIGETOMI, E.; MONTE, E. *et al.* Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. **Neuron**, 95, n. 3, p. 531-549.e539, Aug 2017.

CHUNG, W. S.; ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, n. 9, p. a020370, Feb 2015.

COBOS, I.; PUELLES, L.; MARTÍNEZ, S. The avian telencephalic subpallium originates inhibitory neurons that invade tangentially the pallium (dorsal ventricular ridge and cortical areas). **Developmental biology**, 239, n. 1, p. 30-45, 2001.

DESCALZI, G.; GAO, V.; STEINMAN, M. Q.; SUZUKI, A. *et al.* Lactate from astrocytes fuels learning-induced mRNA translation in excitatory and inhibitory neurons. **Commun Biol**, 2, n. 1, p. 247, Jul 2019.

DINIZ, C.; MAGALHAES, N.; SOUSA, A.; SANTOS FILHO, C. *et al.* Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. 49, n. 1, 2016.

DINIZ, D. G.; DE OLIVEIRA, M. A.; DE LIMA, C. M.; FÔRO, C. A. *et al.* Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes. **Behav Brain Funct**, 12, n. 1, p. 28, Oct 2016.

DINIZ, D. G.; FORO, C. A. R.; REGO, C. M. D.; GLORIA, D. A. *et al.* Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **European Journal of Neuroscience**, 32, n. 3, p. 509-519, 2010 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1988.

ENNACEUR, A.; NEAVE, N.; AGGLETON, J. P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. **Exp Brain Res**, 113, n. 3, p. 509-519, Mar 1997.

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

FEENEY, M. C.; ROBERTS, W. A.; SHERRY, D. F. Mechanisms of what-where-when memory in black-capped chickadees (Poecile atricapillus): do chickadees remember "when"? **J Comp Psychol**, 125, n. 3, p. 308-316, Aug 2011.

GARCÍA-FIÑANA, M.; CRUZ-ORIVE, L. M.; MACKAY, C. E.; PAKKENBERG, B. *et al.* Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. 18, n. 2, p. 505-516, 2003.

GE, Y.; DONG, Z.; BAGOT, R. C.; HOWLAND, J. G. *et al.* Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 38, p. 16697-16702, Sep 21 2010.

GORDON, G. R.; CHOI, H. B.; RUNGTA, R. L.; ELLIS-DAVIES, G. C. *et al.* Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. **Nature**, 456, n. 7223, p. 745-749, Dec 2008.

HEALY, S. D.; KREBS, J. R. Food storing and the hippocampus in Paridae. **Brain**, **Behavior and Evolution**, 47, n. 4, p. 195-199, 1996.

HOSSEINI-SHARIFABAD, M.; NYENGAARD, J. R. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **J Neurosci Methods**, 162, n. 1-2, p. 206-214, May 15 2007.

IOANNOU, M. S.; JACKSON, J.; SHEU, S. H.; CHANG, C. L. *et al.* Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. **Cell**, 177, n. 6, p. 1522-1535.e1514, May 2019.

JENNI-EIERMANN, S. Energy metabolism during endurance flight and the post-flight recovery phase. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, 203, n. 6-7, p. 431-438, Jul 2017.

JOHN LIN, C. C.; YU, K.; HATCHER, A.; HUANG, T. W. *et al.* Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. **Nat Neurosci**, 20, n. 3, p. 396-405, Mar 2017.

KANG, W.; BALORDI, F.; SU, N.; CHEN, L. *et al.* Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 29, p. E2987-2995, Jul 2014.

KAPPERS, C. A.; HUBER, G. C.; CROSBY, E. C. The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates including man. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, 84, n. 6, p. 709-711, 1936.

KAUFFMAN, J. B.; BERNARDINO, A. F.; FERREIRA, T. O.; GIOVANNONI, L. R. *et al.* Carbon stocks of mangroves and salt marshes of the Amazon region, Brazil. **Biol Lett**, 14, n. 9, 09 2018.

KEARY, N.; VOSS, J.; LEHMANN, K.; BISCHOF, H.-J. *et al.* Optical imaging of retinotopic maps in a small songbird, the zebra finch. 5, n. 8, p. e11912, 2010.

KREBS, J. R.; SHERRY, D. F.; HEALY, S. D.; PERRY, V. H. *et al.* Hippocampal specialization of food-storing birds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 86, n. 4, p. 1388-1392, 1989.

LANDYS, M. M.; PIERSMA, T.; GUGLIELMO, C. G.; JUKEMA, J. *et al.* Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. **Proc Biol Sci**, 272, n. 1560, p. 295-302, Feb 2005.

LI, D.; LIU, X.; LIU, T.; LIU, H. *et al.* Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. **Glia**, Oct 2019.

MARÍN, G. J.; DURÁN, E.; MORALES, C.; GONZÁLEZ-CABRERA, C. *et al.* Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. 32, n. 3, p. 1110-1122, 2012.

MCCONNELL, H. L.; KERSCH, C. N.; WOLTJER, R. L.; NEUWELT, E. A. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. **J Biol Chem**, 292, n. 3, p. 762-770, Jan 2017.

MENDES, F.; DE ALMEIDA, M. N. F.; FELICIO, A. P. G.; FADEL, A. C. *et al.* Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. **Bmc Neuroscience**, 14, Jun 2013.

METTKE-HOFMANN, C. Avian movements in a modern world: cognitive challenges. **Anim Cogn**, 20, n. 1, p. 77-86, Jan 2017.

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

MORRIS, R. G.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297, n. 5868, p. 681-683, Jun 24 1982.

MOURITSEN, H.; HEYERS, D.; GÜNTÜRKÜN, O. The Neural Basis of Long-Distance Navigation in Birds. **Annu Rev Physiol**, 78, p. 133-154, Feb 2016.

PARNAVELAS, J. G.; NADARAJAH, B. Radial glial cells. are they really glia? **Neuron**, 31, n. 6, p. 881-884, Sep 2001.

PEARSON-LEARY, J.; OSBORNE, D. M.; MCNAY, E. C. Role of Glia in Stress-Induced Enhancement and Impairment of Memory. **Front Integr Neurosci**, 9, p. 63, 2015.

PIERSMA, T.; ROGERS, D. I.; GONZÁLEZ, P. M.; ZWARTS, L. *et al.* Fuel storage rates before northward flights in Red Knots worldwide. **Birds of Two Worlds: the ecology and evolution of migration**, p. 262-273, 2005.

PORTER, R.; SMITH, P. Techniques to improve the accuracy of location estimation using light level geolocation to track shorebirds. **Wader Study Group Bulletin**, 120, n. 3, p. 148, 2013.

RAEFSKY, S. M.; MATTSON, M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. **Free Radic Biol Med**, 102, p. 203-216, Jan 2017.

RAKIC, P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. **J Comp Neurol**, 145, n. 1, p. 61-83, May 1972.

RODRÍGUEZ, J. J.; YEH, C. Y.; TERZIEVA, S.; OLABARRIA, M. *et al.* Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. **Neurobiol Aging**, 35, n. 1, p. 15-23, Jan 2014.

SALLAZ, L.; KACZMAREK, D.; PONS, V.; BRUNON, J. *et al.* Chondrosarcoma of the infratemporal fossa with intracranial extension. Case report and review of the literature. **Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale**, 101, n. 3, p. 138-141, 2000.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; DE BARTOLO, P.; PETROSINI, L.; ZANCADA-MENENDEZ, C. *et al.* Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. **Neurobiol Learn Mem**, 114, p. 16-25, Oct 2014.

SCHIERA, G.; DI LIEGRO, C. M.; DI LIEGRO, I. Cell-to-Cell Communication in Learning and Memory: From Neuro- and Glio-Transmission to Information Exchange Mediated by Extracellular Vesicles. **Int J Mol Sci**, 21, n. 1, Dec 2019.

SCHWEITZER, L.; RENEHAN, W. J. B. R. P. The use of cluster analysis for cell typing. 1, n. 1, p. 100-108, 1997.

SHERRY; VACCARINO. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. **Behav Neurosci**, 1989.

SHERRY, D. F. Neuroecology. Annu Rev Psychol, 57, p. 167-197, 2006.

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

SHERRY, D. F.; MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A. Seasonal change in the avian hippocampus. **Front Neuroendocrinol**, 37, p. 158-167, Apr 2015.

SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett**, 85, p. 169-171, 1988.

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

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, 2, n. 3, p. 266-270, Mar 1999.

VIOLA, G. G.; RODRIGUES, L.; AMERICO, J. C.; HANSEL, G. *et al.* Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. **Brain Res**, Apr 15 2009.

WANG, S.-R. J. B. R. R. The nucleus isthmi and dual modulation of the receptive field of tectal neurons in non-mammals. 41, n. 1, p. 13-25, 2003.

WEISS, N.; MILLER, F.; CAZAUBON, S.; COURAUD, P. O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta**, 1788, n. 4, p. 842-857, Apr 2009.

WILLIAMS, B. M.; LUO, Y.; WARD, C.; REDD, K. *et al.* Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiol Behav**, 73, n. 4, p. 649-658, Jul 2001.

WYLIE, D. R.; GUTIERREZ-IBANEZ, C.; PAKAN, J. M.; IWANIUK, A. N. J. C. J. o. E. P. R. c. d. p. e. The optic tectum of birds: mapping our way to understanding visual processing. 63, n. 4, p. 328, 2009.

# (ANEXO A - Licença para captura e manuseio de animais silvestres).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

## Número: 44551-5 Data da Emissão: 05/01/2018 11:54 Data para Revalidação\*: 04/02/2019

\* 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

	CPF: 518.352.742-34
Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões I	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

	о С		
#	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 supieitas a autorização do Ministério de ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO 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 n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, 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 minima de 15 dias (ednaldo.silva@icmbio.gov.br / (91) 98403-0251); (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	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.

#### Equipe

_	-44160						
#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade		
1	Nara Gyzely de Morais Magalhães	Pesquisadora	802.988.772-87	4252689 SEGUP-PA	Brasileira		
2	Cristovam Wanderley Picanço Diniz	Pesquisador	019.498.962-34	5525405 SEGUP-PA	Brasileira		

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: 18379631



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: 44551-5
 Data da Emissão: 05/01/2018 11:54
 Data para Revalidação\*: 04/02/2019

 \* 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	
Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contrastan	tes, Respostas Adaptativas e
Mecanismos Neurais Subjacentes.	
Nome da Instituição : Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará	CNPJ: 09.021.003/0001-86

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
6	Daniel Guerreiro Diniz	Pesquisador	755.230.432-49	3783494 SSP-PA	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Тіро
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	Charadrius collaris, Arenaria interpres, Charadrius wilsonia, Charadrius semipalmatus, Calidris pusilla, Actitis macularia
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Arenaria interpres, Calidris pusilla, Actitis macularia, Charadrius collaris, Charadrius wilsonia, Charadrius semipalmatus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Calidris pusilla (*Qtde: 2), Charadrius collaris (*Qtde: 5), Charadrius wilsonia (*Qtde: 2), Charadrius semipalmatus (*Qtde: 5), Actitis macularia (*Qtde: 5), Arenaria interpres (*Qtde: 5)
4	Observação e gravação de imagem ou som de taxon em UC federal	Charadrius semipalmatus, Calidris pusilla, Actitis macularia, Charadrius wilsonia, Charadrius collaris, Arenaria interpres

\* 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: 18379631



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: 44551-5
 Data da Emissão: 05/01/2018 11:54
 Data para Revalidação\*: 04/02/2019

 \* 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	2-34
Título do Projeto: NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contr	astantes, 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: 18379631



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: 44551-5
 Data da Emissão: 05/01/2018 11:54
 Data para Revalidação\*: 04/02/2019

 \* 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

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

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 18379631



Página 4/4

# (ANEXO B - Artigo submetida ao Journal of Chemical Neuroanatomy).

# **Manuscript Details**

Manuscript number	CHENEU_2020_20
Title	Ruddy turnstone ( <i>Arenaria interpres</i> ) recovers hippocampal astrocytes morphology in the wintering period at the mangroves of Amazon River estuary
Article type	Research Paper

## Abstract

Astrocytes are essential for lipid neuronal metabolism in long-distance uninterrupted migratory flights, when glucose is not available as the main source of energy. We previously demonstrated in Calidris pusilla that after uninterrupted 5 days transatlantic flight, astrocytes shrink and reduce its number in the hippocampal formation. Here we shifted our attention to the wintering period and tested the hypothesis that as the wintering progresses, hippocampal astrocytes morphological changes following Atlantic crossing, would be recovered. To that end we used Arenaria interpres, which also crosses the Atlantic Ocean and reaches the mangroves of the Amazon River estuary for wintering. Birds were captured in September/October (closer to the arrival in the coast of Bragança, Para, Brazil for wintering) and in April/May (closer to the departure towards the breeding sites) and had their brains processed for selective GFAPastrocyte immunolabeling. Three-dimensional reconstructions of the immunostained astrocytes were performed and morphological classification was done based on hierarchical cluster and discriminant analysis of multimodal morphometric features. We found two morphological phenotypes of astrocytes in the newcomers which differentially increased its morphological complexities as wintering period progresses towards the pre-migration window. Taken together, our findings demonstrate that the long-distance non-stop flight and wintering period differentially affected the two astrocytes morphotypes, suggesting distinct physiological roles for these cells. We suggest that morphological recovering during the wintering period, may be part of the adaptive changes of the local hippocampal circuits of A. interpres in preparation for the long journey back to their breeding sites in the north hemisphere.

### Keywords

Migratory birds, Wintering period, Hippocampal formation, GFAP astrocytes, Morphometry, Arenaria interpres

Corresponding Author	CRISTOVAM PICANÇO-DINIZ
Order of Authors	Emanuel Ramos da Costa, Ediely Pereira Henrique, Anderson de Jesus Falcão da Silva, Patrick Pereira, João Batista da Silva Rosa, Cintya Castro de Abreu, Luma Cristina Ferreira Guerreiro, Taiany Nogueira Fernandes, Nara Gyzely de Morais Magalhães, Cristovam Guerreiro Diniz, CRISTOVAM PICANÇO-DINIZ, Daniel Guerreiro Diniz
Suggested reviewers	Daniel Anthony, Vivaldo Moura Neto, David Sherry, Victor Perry, Colm Cunningham

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

- Cover letter COSTA, E. R. et al., 2020.docx [Cover Letter]
- Highlights COSTA, E. R. et al., 2020.docx [Highlights]
- Text COSTA, E. R. et al., 2020.docx [Manuscript File]
- Figure 1 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 2 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 3 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 4 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 5 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 6 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 7 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 8 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Figure 9 COSTA, E. R. et al., 2020.tif [Figure]
- Table 1 COSTA, E. R. et al. 2020.docx [Figure]

Declaration of conflicts of interest - COSTA, E. R. et al., 2020.docx [Conflict of Interest]

Ethical Statement - COSTA, E. R. et al., 2020.docx [Ethical Statement]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

# **Research Data Related to this Submission**

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given: Data will be made available on request

To: Professor Dr. Harry Steinbusch, Editor-in-Chief of Journal of Chemical Neuroanatomy, Maastricht University Department of Neuroscience, Universiteitssingel 50, Box 38, 6229 ER,

Maastricht, Netherlands.

From: Professor Cristovam W. Picanço Diniz, Head of the Laboratory of Investigations in

Chronic Neurodegeneration and Infection, at the University Hospital João de Barros Barreto, Belém, Brazil.

Belém (PA), Brazil, 06/02/2020

## Dear Professor,

Metabolically, long-distance migratory flights require lipid reserves (Jenni-Eiermann, 2017;Landys et al., 2005) and there is significant lipid metabolic crosstalk between glia and neurons (Barber and Raben, 2019). We previously demonstrated in C. pusilla that after uninterrupted 5 days Transatlantic flight astrocytes shrink and reduce its number in the hippocampal formation. Here we tested the hypothesis that as the wintering period progresses, hippocampal astrocytes morphological changes following Atlantic crossing, would be recovered. To that end we used Arenaria interpres, which also crosses the Atlantic Ocean and reaches the mangroves of the Amazon River estuary for wintering. Birds were captured in September/October (closer to the arrival in the coast of Bragança, - Pará, Brazil for wintering) and in April/May (closer to the departure towards the breeding sites) and had their brains processed for selective GFAPastrocyte immunolabeling. Using hierarchical cluster analysis to classify cells morphologically we distinguished two morphological families of astrocytes in the newcomerswhich differentially increased its morphological complexities as wintering period progresses towards the premigration window. Taken together, our findings demonstrate that the long-distance non-stop flight and wintering period differentially affected the two astrocytes morphotypes, suggesting distinct physiological roles for these cells. We suggest that morphological recovering during the wintering period, may be part of the adaptive changes of the local hippocampal circuits of A. interpres in preparation for the long journey back to their breeding sites in the north hemisphere.

We declare that this paper has not been submitted to another journal, we believe that the Journal of Chemical Neuroanatomy is a well-placed and largely appreciated journal, that may provide good visibility to our data. Yours sincerely,

Cristovam W. Picanço Diniz

References

Barber, C.N., Raben, D.M., 2019. Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. Front Cell Neurosci. 13, 212.

Jenni-Eiermann, S., 2017. Energy metabolism during endurance flight and the post-flight recovery phase. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 203, 431-438.

Landys, M.M., Piersma, T., Guglielmo, C.G., Jukema, J., Ramenofsky, M., Wingfield, J.C., 2005. Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. Proc Biol Sci. 272, 295-302.

Highlights

- Arenaria interpres wintering period recovers hippocampal astrocytes morphology.
- Newcomers show smaller astrocytes morphological complexity than premigration birds.
- Type I and Type II astrocytes are differentially affected by Atlantic crossing. 

  We suggest different physiological roles for these hippocampal astrocytes.

Ruddy turnstone (*Arenaria interpres*) recovers hippocampal astrocytes morphology in the wintering period at the mangroves of Amazon River estuary

Emanuel Ramos da Costa<sup>1</sup>, Ediely Pereira Henrique<sup>2</sup>, João Batista da Silva<sup>2</sup>, Patrick Douglas Corrêa Pereira<sup>2</sup>, Cintya Castro de Abreu<sup>2</sup>, Taiany Nogueira Fernandes<sup>2</sup>, Nara Gyzely Morais Magalhães<sup>2</sup>, Anderson de Jesus Falcão da Silva<sup>2</sup>, Luma Cristina Ferreira Guerreiro<sup>1</sup>, Cristovam Guerreiro Diniz<sup>2</sup>, (\*)Cristovam Wanderley Picanço Diniz<sup>1</sup>, Daniel Guerreiro Diniz<sup>1,3</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Rua dos Mundurucus, 4487, Guamá, CEP: 66.073-005, Belém, Pará, Brasil.

<sup>(2)</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia, Rua da Escola Agrícola S/N, Vila Sinhá, CEP: 68.600-000 Bragança, Pará, Brasil.

<sup>(3)</sup>Instituto Evandro Chagas, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Avenida Almirante Barroso, 492, Marco, CEP: 66.093-020, Belém, Pará, Brasil.

<sup>(\*)</sup>Corresponding Author: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros

Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Rua dos Mundurucus, nº4487, CEP: 66.073-005, Guamá, Belém, Pará, Brasil. Tel: +55 091

99196-1616, E-mail: <u>cwpdiniz@gmail.com</u> ABSTRACT

Astrocytes are essential for lipid neuronal metabolism in long-distance uninterrupted migratory flights, when glucose is not available as the main source of energy. We previously demonstrated in *Calidris pusilla* that after uninterrupted 5 days transatlantic flight, astrocytes shrink and reduce its number in the

hippocampal formation. Here we shifted our attention to the wintering period and tested the hypothesis that as the wintering progresses, hippocampal astrocytes morphological changes following Atlantic crossing, would be recovered. To that end we used Arenaria interpres, which also crosses the Atlantic Ocean and reaches the mangroves of the Amazon River estuary for wintering. Birds were captured in September/October (closer to the arrival in the coast of Bragança, Para, Brazil for wintering) and in April/May (closer to the departure towards the breeding sites) and had their brains processed for selective GFAP-astrocyte immunolabeling. Three-dimensional reconstructions of the immunostained astrocytes were performed and morphological classification was done based on hierarchical cluster and discriminant analysis of multimodal morphometric features. We found two morphological phenotypes of astrocytes in the newcomers which differentially increased its morphological complexities as wintering period progresses towards the pre-migration window. Taken together, our findings demonstrate that the long-distance non-stop flight and wintering period differentially affected the two astrocytes morphotypes, suggesting distinct physiological roles for these cells. We suggest that morphological recovering during the wintering period, may be part of the adaptive changes of the local hippocampal circuits of A. interpres in preparation for the long journey back to their breeding sites in the north hemisphere.

Keywords: Migratory birds, wintering period, hippocampal formation, GFAP astrocytes, morphometry, *Arenaria interpres*.

1. Introduction

Metabolically, long-distance migratory flights require lipid reserves (JenniEiermann, 2017; Landys *et al.*, 2005) and there is significant lipid metabolic crosstalk between glia and neurons (Barber and Raben, 2019). Astrocytes are essential for this metabolic support and a vast metabolic demands are placed on them to control neurotransmitters levels, regulate water transport, control extracellular potassium ions to influence thresholds for nerve-cell firing, releases molecules for synapses formation and pruning (Landhuis, 2018) and contributes to formation and regulation of blood-brainbarrier (Abbott *et al.*, 2006; Almutairi *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2015; McConnell *et al.*, 2017; Weiss *et al.*, 2009). This

diversity of physiological roles is associated to a variety of morphofunctional phenotypes with variable overlapping in distinct brain areas (John Lin *et al.*, 2017).

Because the hippocampal formation seems to be essential for learning and memory in birds (Feeney *et al.*, 2009, 2011; Krebs *et al.*, 1989; Sherry and Vaccarino, 1989; Sherry, 2011) and mammals (Bast *et al.*, 2005; Bennett *et al.*, 2006; Ennaceur and Delacour, 1988; Ennaceur *et al.*, 1997; Ge *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 2001) and that astrocytes morphological changes had previously been associated with environmental influences (Carvalho-Paulo *et al.*, 2017; Diniz *et al.*, 2016; Diniz *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2013; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014; Viola *et al.*, 2009), we decided in a previous report to search for potential influence of long-distance migratory flights on hippocampal astrocytes and confirmed the hypothesis that long flights reduce morphological complexity of hippocampal astrocytes, and this would be detectable by morphometry (Carvalho-Paulo *et al.*, 2017).

We also compared the influences of Transatlantic uninterrupted migratory flight on hippocampal astrocytes morphology and numbers of C. pusilla with those of another long-distance migrating bird, Charadrius semipalmatus, that mostly fly overland with multiple stopovers for feeding and rest (Sick, 1997). To that end we captured individuals from both species in the Bay of Fundy (Canada) and in the coastal region of Bragança (Brazil) and processed their brains for selective GFAP immunolabeling of astrocytes. We demonstrated that although to a different extent both Type I and Type II astrocytes were differentially affected after migratory flights. Stereological counts demonstrated that, in contrast to C. pusilla, where we found a significant decrease in the number of astrocytes, C. semipalmatus did not change the number of astrocytes. We also evaluated whether astrocyte morphometric variables were influenced by phylogenetic differences between C. pusilla and C. semipalmatus, using the phylogenetically independent contrast, based on phylogenetic trees generated by nuclear and mitochondrial markers. Our findings suggested that phylogenetic differences do not explain the results and that contrasting long-distance migratory flights shape plasticity of Type I and Type II astrocytes in different ways and suggested that these findings may imply distinct physiological roles for these cells (Henrique et al., unpublished results).

Here we shifted our attention to the wintering period of *Arenaria interpres* at the mangroves of the estuary of Amazon River. The mangrove forests are essential for ensuring food availability for shorebirds, and are of major importance for carbon sequestration, twice surpassing the carbon fixation provided by highland forests (Kauffman *et al.*, 2018). Despite its importance for shorebirds wintering (Bulluck *et al.*, 2019), no previous study has explored the neuroecology of these birds in this large tidal region strongly influenced by tropical rainfall (Barros and Albernaz, 2014). Here we tested the hypothesis that as the wintering period progresses, hippocampal astrocytes deleterious morphological changes following Atlantic crossing, would be recovered.

The Arenaria interpres migratory route was reconstructed by geolocation of an individual departing in August 14th from East Bay, Southampton Island, Nunavut, Canada. Flew 35 hours (2,400km) and arrived in August 15th on Boothbay, Maine where it remained by 20 days. In September 2nd, it left Boothbay and flew five-days uninterruptedly to cross the Atlantic Ocean, during 114h (4,700 km) towards Cayenne, French Guiana, arriving 5 days later, (September 7th). After 10 days in Cayenne, it flew towards Maranhão State, Brazil in September 17th. After 36-hour flight, traveling

950 km, it reached the Maranhão State, Brazil where it stayed 263 days for wintering.

Leaving Maranhão behind in May, 12th, arrived in Delaware Bay, USA in May 16th, (covering 5,400Km, 86 h flight) helped by good tailwinds (Porter and Smith, 2013).

After 15 days in Delaware Bay, it flew towards Southampton Island and arrived in June 4<sup>th</sup> (Porter and Smith, 2013).

Thus, because *A. interpres* migratory route towards South America coastline includes a five-days non-stop transatlantic flight and that Bragança coastline in the northeast of Pará State, Brazil, is shared by this species with other long-distance migratory birds such as the *C. pusilla*, we predicted that the astrocytes of newcomers birds, captured in September/October (inside the autumnal migration period) on the coast of Bragança, would show shrunken astrocyte's branches and smaller morphological complexities, and that as the

wintering period progresses morphological complexity will increase and the shrinkage of astrocytes branches will be repaired.

To our knowledge so far, not a single report has explored the impact of the wintering period on the morphology of astrocytes of the hippocampal formation of any species, and this is the main motivation of the present work.

## 2 - Materials and methods

## 2.1- Sampling and collection

Two sample windows were analyzed. The first-time window included five newly arrived individuals collected in August/September (autumn migration) in the Isle Otelina, coastline of Bragança, Pará, Brazil. In the second time window, five other animals were collected in the same island during premigration period (April/May) when birds were preparing for their return to the Northern Hemisphere (spring migration).

Using 12m X 3m haze nets installed at dusk, on Isle Otelina (0 ° 45'42.57 "S 46 ° 55'51.86" W). Nets were inspected for the removal of the captured birds every ten minutes. The animals used in this study were collected under authorization of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) under license for capture and handling of wild animals' number 44551-3.

Figure 1 illustrates Bragança coastline with relative location of Isle Otelina and other isles, close to the mangroves of the Amazon estuary.

## 2.2 - Perfusion and sectioning

The animals were perfused transcardially with heparinized 0.9% saline solution (1ml / L) for 10 minutes, followed by 4% paraformaldehyde pH 7.2-7.4 for 10 minutes. The beginning of saline flow was initiated after the jugular vein cut with incision in the right side of the neck thus allowing the brain to be better permeated by saline and paraformaldehyde 4%.

After craniotomy the brain was cut in the coronal plane. After the brain removal,  $100 \mu m\,$ 

slices were obtained in a vibratome (Leica, VT, 1000s) at a 1: 6 intervals. Serial sections were reacted by immunohistochemistry for glial fibrillar acid protein - GFAP astrocyte selective immunomarker and Nissl staining.

# 2.3 - Immunohistochemistry

# 2.3.1 - Immunostaining for glial fibrillar acid protein - GFAP

After perfusion, dissection, and sectioning, brain tissue sections were stored in \$4%\$

paraformaldehyde at 4 °C. The selected sections were washed with 0.1 m phosphate buffer pH 7.2 - 7.4 and then incubated in 0.2 m boric acid pH 9.0 at 70 ° c for 1h. Non-specific binding sites were blocked by incubating the cuts in 10% casein for 60 minutes. Incubation of the sections in the primary anti-GFAP antibody (1: 400 dilution, Millipore, mab code 377) for immunostaining was performed for 3 days at 4 °C with gentle shaking. Endogenous peroxidase was inactivated with 0.3% hydrogen peroxide dissolved in 0.05M tris saline, pH 8.0, for 15 minutes. After washing, sections were incubated for 60 minutes in the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector ABC kit elite, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA, 1: 200). Selective labeling sites were detected using 3'3-diaminobenzidine (DAB, Sigma) and  $\beta$ -D-glucose / glucose oxidase reaction (Shu *et al.*, 1988). After the reaction product is formed a blue-gray precipitate is generated at the antigen-antibody interaction sites and the reactions are then stopped in 0.1 M tris saline (Table 1). The sections are mounted on gelatinized glass slides, air dried and dehydrated in ethanol and xylene series.

## 2.4 - Area of interest

When the development, topography, and functional role of the hippocampal formation of birds are compared to the hippocampus of mammals, it becomes increasingly apparent that the medial part of the dorsomedial cortex of birds is homologous to the mammalian hippocampus (Atoji *et al.*, 2016; Kappers *et al.*, 1936). The hippocampal formation is implicated in various memory processes including those related to spatial and object recognition associated with navigation and food storage

(Bingman and Yates, 1992; Feeney *et al.*, 2009; Sherry, 2011; Sherry and MacDougallShackleton, 2015).

Figure 2 shows phtomicrographs and two-dimensional drawings of three sections taken from three distinct rostro-caudal levels to indicate changes in the boundaries of the hippocampal formation of *A. interpres*. Figure 2 also illustrates distribution of boxes into a grid for systematic and random selection of astrocytes for three-dimensional reconstructions. Figure 3 illustrates the object of interest and its location on the hippocampal V area in low-, medium and high-power magnifications, and its correspondent 3D reconstruction. Note that only conspicuous well-defined GFAP astrocytes arbors were included in our samples.

## 2.5- Three-dimensional reconstruction

To perform three-dimensional reconstruction of astrocytes we used the optical microscope (Eclipse 80i, Nikon) with motorized stage and analog-digital converters (mac6000 system, Ludl electronic products, Hawthome, NY, USA). This system was coupled to a microprocessor that controlled the motorized stage movements with the aid of a specialized program (Neurolucida, MicroBrightField, Williston, VT, USA) to store the coordinates of the points of interest. Figure 3 are low-, medium- and high-power photomicrographs and a threedimensional reconstruction of an astrocyte to illustrate the object of interest and its relative location. In order to avoid ambiguity in the identification of objects of interest and ensure greater accuracy in reconstructions, the 4.0x objective was replaced by a Plan fluoride high-power objective 100x (NA 1.3; df =  $0.2 \mu m$ ; Nikon, Japan).

Twenty morphometric features were analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField) software. At the end of the reconstructions, the morphometric variables with appropriated multimodality indexes (MMI> 0.55) were selected for cluster analysis (Ward's method), including all animals of each group. Multimodality was detected based on the asymmetry and kurtosis of the estimated samples for each of the morphometric variables as follows:

MMI = [M32 + 1] / [M4 + 3 (n - 1) 2 / (n - 2) n - 3 )],

where M3 is asymmetry and M4 is kurtosis and n is the sample size (Schweitzer and Renehan, 1997). Combined kurtosis and asymmetry in the equation distinguish between unimodal, bimodal or multimodal distributions.
Multimodal variables are essential when using hierarchical cluster analysis to classify cells (Schweitzer and Renehan, 1997). The multimodal index was estimated based on measurements of 20 morphometric parameters of astrocyte trees (see Table 1 for definitions of morphometric variables).

Insert Table 1 around here

3. Results

## **3.1 Morphology of Astrocytes**

Following immunostaining for glial fibrillar acid protein (GFAP), in the hippocampal formation sections of *A. interpres* three main astrocytes morphotypes were found, confirming previous descriptions in *C. pusilla* (Carvalho-Paulo *et al.*, 2018). Figure 4 shows photomicrographs of stellate, vascular and radial astrocytes of the hippocampal formation of *A. interpres*.

Insert Figure 4 around here

We did not include quantitative analysis of radial astrocytes in the present report. Vascular astrocytes are always associated with blood vessels whereas stellate astrocytes are not. As previously described in other species (Parnavelas and Nadarajah, 2001; Rakic, 1972), radial astrocytes in *A. interpres* also showed ovoid cell bodies in the ventricle walls with asymmetric bipolar branches, including longer projections to the parenchyma and shorter ends in the opposite direction. Stellate astrocytes have been described as protoplasmic astrocytes in close contact with pre- and postsynaptic compartments and its morphological diversity varies as a function of brain region and layers (Zhou et al., 2019). Individual astrocytes were selected using a systematic random sampling approach, and the number of elements selected for reconstruction was rather large, which suggests no *a priori* sampling bias.

Based on multimodal 3D morphological features (MMI > 0.55), we searched for morphological families of astrocytes using hierarchical cluster analysis. Independent of the time window of the sample the results showed two

morphotypes designated type I and Type II based on morphological complexity, confirming previous data in *C. pusilla* (Carvalho-Paulo *et al.*, 2017).

# 3.2 Astrocytes Type I and Type II morphologies change as wintering progresses.

From the hierarchical cluster analysis followed by discriminant analysis, two morphological families of astrocytes were detected in the hippocampal formation of *A. interpres* (Figure 5 and Figure 6). In both groups the morphometric features that most contributed to clusters formation were morphological complexity and convex hull volume. These cells were designated Type I and Type II based on the highest morphological complexity found in the first group and lowest in the latter. Graphic representations (B and C) of morphological complexity and convex hull mean values, and corresponding standard errors and deviations, illustrate the significant differences between Type I and Type II astrocytes. Notice that discriminant analysis graphic representations (Figures 2D and 3D) revealed higher dispersion of Type I neurons.

Insert Figures 5 and 6 around here

Figure 7 illustrates statistically significant differences of multimodal morphometric features including tortuosity, morphological complexity and convex hull volume between Type I and Type II astrocytes of the hippocampal formation of *A. interpres*, at the same time windows. Interestingly tortuosity was greater in Type I in newcomers and smaller in premigration group. Graphic representations of mean values and their correspondent standard deviation and standard errors are depicted.

Figure 8 show statistically significant differences of multimodal morphometric features of astrocytes of the hippocampal formation to illustrate time windows influences (newcomers *vs* pre-migration groups). Significant differences between time windows were found Branch Volume, Complexity and Convex Hull Volume, both in Type I and Type II astrocytes with greater values for newcomers. Contrastingly, tortuosity mean values were greater in Type II astrocytes of the hippocampal formation of premigration group.

Type I astrocytes of hippocampal formation of *A. interpres* showed higher mean values of morphological complexity, tortuosity and convex hull volume than Type II astrocytes in both newcomers and premigration birds. (Figure 7). Newcomers astrocytes showed higher mean values for complexity, total branch length, and convex hull volume, than astrocytes from premigration birds (Figure 8).

Because the proportions of reconstructed cells were rather large (516 in total; 261 in newcomers and 255 in premigration wintering birds, approximately 50 astrocytes cells per individual), they reflect the quantitative distribution of Type I and Type II astrocytes in the hippocampal formation of Arenaria interpres. Due to the random and systematic sampling strategy, we assumed that the selection of hippocampal astrocytes was unbiased and that the total number of reconstructed cells of each type was representative of its distribution in the hippocampal formation. Thus, we estimated the proportion of variation between time windows for each morphometric feature of Type I and Type II astrocytes and showed that Type II astrocytes were less influenced by the wintering period than were Type I cells suggesting differential plasticity and perhaps distinct physiological roles for these two types of astrocytes. In fact, the greatest variation between newcomers and premigration individuals related to morphological complexity of Type I and Type II astrocytes were about 6 times and twice as much respectively. In addition, type I astrocytes reduced tortuosity while type II increased it, as wintering period progressed.

These changes are also reflected in the 3D reconstructions of representative cells taken from hippocampal stellate astrocytes in each group (newcomers and premigration groups). Figure 9 highlights the main morphological differences between Type I and Type II stellate astrocytes in *A. interpres*. Type I astrocyte morphological changes in the premigration group seemed to be greater than those of Type II. The choice of the representative cell was made by multivariate statistical analysis involving all morphometric variables of the reconstructed astrocytes from the hippocampal formation of newcomers and pre-migration groups.

Type II astrocytes were more frequent than Type I astrocytes, representing around 70% of the total reconstructed astrocytes in both newcomers and premigration birds.

#### 4. Discussion

To test the hypothesis that astrocytes of the hippocampal formation of A. interpres, altered by uninterrupted 5 days Transatlantic flight would be recovered after the wintering period, we compared the morphology of astrocytes of newly arrived birds (captured in August / September) with that of individuals at the end of wintering season (captured in April / May), when birds finish its preparation for the long journey back to the breeding sites in the Northern Hemisphere. We found that the astrocytes morphological complexity of premigration group was greater than that of newcomers and suggested that they would be closer to the healthy astrocyte's morphology. We assumed that A. interpres individuals, captured in the pre-migration period in April/May (closer to the spring migration), were full recovered for lipid metabolic crosstalk and utilization of lipid reserves and this had been achieved during the wintering period (Jenni-Eiermann, 2017; Landys et al., 2005). We speculated that recovered astrocytes are closer to the homeostatic condition and this will allow to use lipids as a main source of energy more efficiently, sustaining fatty acid oxidation and providing metabolites such as ketone bodies for neurons, during the fasting period and short glucose associated with the long distance migratory flights (Barber and Raben, 2019; Ioannou et al., 2019).

# 4.1 Astrocytes morphological diversity and functions

The bird's hippocampus has been indicated as a center for integrating visuospatial and somatosensory stimuli used in the long-distance migratory process (Mouritsen *et al.*, 2016) and hippocampal astrocytes are active protagonists of these tasks (Descalzi *et al.*, 2019), regulating extracellular ions, neurotransmitters and metabolites for neuronal firing and influencing local and distant synaptic activity through the gap junctions of astrocytes network (Schiera *et al.*, 2019). Because of the diversity of astrocytes functions it is reasonable to suspect a certain degree of morphological and functional specialization as confirmed previously by physiological and anatomical studies, RNA-seq, proteomic and cell marker (Chai *et al.*, 2017).

Coherently with morphological diversity and function previously referred, contrasting migratory routes affected differentially hippocampal morphological

astrocytes of *C. pusilla* (Carvalho-Paulo *et al.*, 2017) and *C. semipalmatus* (Henrique et al., unpublished results). The Transatlantic uninterrupted 5 days flight of *C. pusilla* was associated with significant reduction of hippocampal astrocytes number and shrinkage of their arbors, reducing significantly its morphological complexity, whereas *C. semipalmatus* hippocampal astrocytes changes, were limited to reduction of its morphological complexity. Because these morphological changes were not influenced by phylogenetic differences, we suggested that these differential effects on astrocyte morphology and numbers were associated with the contrasting migratory patterns of the two species (Henrique *et al.*, unpublishes results).

As in *C. pusilla* and *C. semipalmatus*, we found in *A. interpres* two main groups of astrocytes, designated type I and type II. The two temporal windows of the wintering period revealed distinct GFAP-astrocytes morphologies with significant increase in the morphological complexity and convex hull volume in the premigration group. We also found that except for tortuosity, that reversed the mean values at premigration group in Type II astrocytes, the wintering period increased significantly, many other mean values of other morphological features. We suggest these effects might be associated with the long migratory rest with adequate ingesta of nutrients provided by the Amazon River mangroves in preparation for spring migration.

Important to highlight that GFAP, is essential for the maintenance of structure and shape of astrocytes and it is the major component of cytoskeleton and the scaffold of most mature astrocytes. In addition morphological plasticity of GFAP allows quick changes in assembling and polymerizing states in response to environmental challenges (Li *et al.*, 2019). Because we found an increase of morphological complexity of GFAPastrocytes close to spring migration, we suggest that GFAP gene expression might be down regulated in the wintering birds captured in the autumn (August/September) and upregulated in the individuals captured in the spring (April/May). It remains however, to be investigated the underneath mechanisms to trigger these GFAP-astrocytes changes gene expression during the wintering period.

# 4.2. Potential explanations of contrasting astrocytes morphologies in the hippocampal formation in newcomers and premigration individuals

A single report described previously astrocytes morphological changes in shorebirds after long-distance non-stop flights (Carvalho-Paulo et al., 2017). Here we compared the 3-D morphology of astrocytes in newcomers and premigration individuals during the wintering period. The branches of the two types of astrocytes seemed to be shrunk to different extents in the newcomers and these changes were recovered in the premigration group keeping the differential effects. It is, therefore, important to discuss why these distinct effects on Type I and Type II were observed. As previously mentioned in C. pusilla (Carvalho-Paulo et al., 2017), if more Type II astrocytes are indeed, more involved in the neurovascular unit than Type I astrocytes, then the integrity of Type II astrocytes are likely be essential to the integrity of the BBB, and their morphology should be conserved even in adverse conditions. The BBB determine the polarity of astrocyte control of blood flow over arterioles in response to bioenergetic demands (Gordon et al., 2008). Both C. pusilla and A. interpres must fast for 5 days during the long flight (Brown, 2014; Porter and Smith, 2013), and when glucose is reduced, the brain increases ketone body metabolism. (Achanta and Rae, 2017). We suggest that there may be an alternative pathway in Type II astrocytes using ketone bodies in association with the imposed fasting period of the long flight. Taken together, these findings support the idea that these distinct astrocyte metabolic pathways in the newcomers are differentially activated in Type I versus Type II astrocytes. In contrast, glucose metabolic pathways can be readily activated as wintering area is reached, and homeostatic metabolic pathways are reactivated.

## 4.3 Methodological limitations

Different astrocytes selective immunomarkers demonstrated that anti-GFAP immunolabeling, anti-S-100ß or anti-glutamine synthetase generates complementary information in different areas and layers (Rodríguez *et al.*, 2014). Thus, GFAP 3Dreconstructions may describe only part of full morphological history of astrocytes.

The environmental enrichment stimulates neurogenesis and gliogenesis (van Praag *et al.*, 1999) and increases the GFAP astrocytes network (van Praag *et al.*, 1999). These astrocytes under influence of environmental enrichment exhibit longer branches and higher number of branching points (Sampedro-Piquero *et al.*, 2014; Viola *et al.*, 2009) suggesting that although GFAP immunolabeling is far from represent the real astrocytes morphology, it provides in detail all changes in the main component of cytoskeleton and scaffold of astrocytes which is essential for the astrocytes structure and shape (Li *et al.*, 2019). In the present report we used GFAP immunolabeling, limiting the extent of our observations.

To minimize possible sources of variations on our observations, all samples were obtained with the same tissue processing protocols (perfusion, immunoreaction, dehydration, counterstaining, and clearing) and all data were collected and analyzed with the same unbiased methodology. We also confirmed the results by having different investigators reconstructing the same cells, using the same monoclonal anti-GFAP antibody as a selective marker for astrocytes. Thus, it is expected that non-biological sources were reduced to acceptable levels in the present report (Mouton *et al.*, 2002; Slomianka & West, 2005).

Microscopic, 3-D reconstructions is frequently affected by non-uniform shrinkage in the z-axis of sections (Hosseini-Sharifabad and Nyengaard, 2007). Shrinkage in Zaxis is approximately 25% of the cut thickness after dehydration and clearing (Carlo and Stevens, 2011). Assuming 75% shrinkage of thickness along the z-axis we used this percentage value to implement corrections on all astrocyte reconstructions, and because the tissue area did not change along X-Y axes after histological dehydration and clearing, no corrections were applied to these dimensions.

#### 5 Conclusions

In the present report we focused our attention on the wintering period of longdistance migratory bird ruddy turnstone (*Arenaria interpres*) and found as wintering progresses, differential changes in astrocyte morphologies happens in the hippocampal formation. This glial subpopulation has its hippocampal number and morphology modified in the face of multisensory and cognitive stimuli, both in mammals and in birds. To search for distinct morphological families and investigate differential morphological responses of the morphologically classified astrocytes, we compared 20 morphometrical features of 3D reconstructed astrocytes, using hierarchical cluster analysis of multimodal variables. Although to different extent, as compared with newcomers, we found significant increase of the morphological complexity and convex hull volume of both Type I and Type II astrocytes in the pre-migration group. We suggest that Type I and Type II astrocytes might have distinct physiological roles and that the differentially increased mean values of morphometric features in the premigratory period, is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits to face the long-distance journey back to the reproductive niches in north hemisphere.

**Acknowledgment**: The institutions, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia for the collaboration to carry out this work.

#### References

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci 7, 41-53.

Achanta, L.B., Rae, C.D., 2017. β-Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. Neurochem Res 42, 35-49.

Almutairi, M.M., Gong, C., Xu, Y.G., Chang, Y., Shi, H., 2016. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. Cell Mol Life Sci 73, 57-77.

Atoji, Y., Sarkar, S., Wild, J.M., 2016. Proposed homology of the dorsomedial subdivision and V-shaped layer of the avian hippocampus to Ammon's horn and dentate gyrus, respectively. Hippocampus 26, 1608-1617.

Barber, C.N., Raben, D.M., 2019. Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. Front Cell Neurosci 13, 212.

Barros, D.F., Albernaz, A.L., 2014. Possible impacts of climate change on wetlands and its biota in the Brazilian Amazon. Braz J Biol 74, 810-820.

Bast, T., da Silva, B.M., Morris, R.G., 2005. Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. J Neurosci 25, 5845-5856.

Bennett, J.C., McRae, P.A., Levy, L.J., Frick, K.M., 2006. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. Neurobiol Learn Mem 85, 139-152.

Bingman, V., Yates, G., 1992. Hippocampal lesions impair navigational learning in experienced homing pigeons. Behavioral neuroscience 106, 229.

Brown, S., 2014. The Remarkable Odyssey of a Semipalmated Sandpiper, Shorebird Science. Manomet Soaring Solutions Grounded Science, Canada.

Bulluck, L., Ames, E., Bayly, N., Reese, J., Viverette, C., Wright, J., Caguazango, A., Tonra, C., 2019. Habitat-dependent occupancy and movement in a migrant songbird highlights the importance of mangroves and forested lagoons in Panama and Colombia. Ecol Evol 9, 11064-11077.

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

Carvalho-Paulo, D., de Morais Magalhães, N.G., de Almeida Miranda, D., Diniz, D.G.,

Henrique, E.P., Moraes, I.A.M., Pereira, P.D.C., de Melo, M.A.D., de Lima, C.M., de

Oliveira, M.A., Guerreiro-Diniz, C., Sherry, D.F., Diniz, C.W.P., 2017. Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper. Front Neuroanat 11, 126.

Carvalho-Paulo, D., Magalhaes, N.G.D., Miranda, D.D., Diniz, D.G., Henrique, E.P.,

Moraes, I.A.M., Pereira, P.D.C., de Melo, M.A.D., de Lima, C.M., de Oliveira, M.A.,

Guerreiro-Diniz, C., Sherry, D.F., Diniz, C.W.P., 2018. Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper Calidris pusilla. Frontiers in Neuroanatomy 11.

Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Octeau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., Coppola, G., Khakh, B.S., 2017. Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. Neuron 95, 531-549.e539.

Chung, W.S., Allen, N.J., Eroglu, C., 2015. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a020370.

Descalzi, G., Gao, V., Steinman, M.Q., Suzuki, A., Alberini, C.M., 2019. Lactate from astrocytes fuels learning-induced mRNA translation in excitatory and inhibitory neurons. Commun Biol 2, 247.

Diniz, D.G., de Oliveira, M.A., de Lima, C.M., Fôro, C.A., Sosthenes, M.C., BentoTorres, J., da Costa Vasconcelos, P.F., Anthony, D.C., Diniz, C.W., 2016. Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAPimmunolabeled astrocytes. Behav Brain Funct 12, 28.

Diniz, D.G., Foro, C.A.R., Rego, C.M.D., Gloria, D.A., de Oliveira, F.R.R., Paes, J.M.P., de Sousa, A.A., Tokuhashi, T.P., Trindade, L.S., Turiel, M.C.P., Vasconcelos, E.G.R., Torres, J.B., Cunnigham, C., Perry, V.H., da Costa Vasconcelos, P.F., Diniz, C.W.P., 2010. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes.

European Journal of Neuroscience 32, 509-519. Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behav Brain Res 31, 47-59.

Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J.P., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. Exp Brain Res 113, 509519.

Feeney, M.C., Roberts, W.A., Sherry, D.F., 2009. Memory for what, where, and when in the black-capped chickadee (Poecile atricapillus). Anim Cogn 12, 767-777.

Feeney, M.C., Roberts, W.A., Sherry, D.F., 2011. Mechanisms of what-wherewhen memory in black-capped chickadees (Poecile atricapillus): do chickadees remember "when"? J Comp Psychol 125, 308-316.

Ge, Y., Dong, Z., Bagot, R.C., Howland, J.G., Phillips, A.G., Wong, T.P., Wang, Y.T., 2010. Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 16697-16702.

Gordon, G.R., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C., MacVicar, B.A., 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. Nature 456, 745-749.

Hosseini-Sharifabad, M., Nyengaard, J.R., 2007. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. J Neurosci Methods 162, 206-214.

Ioannou, M.S., Jackson, J., Sheu, S.H., Chang, C.L., Weigel, A.V., Liu, H., Pasolli,

H.A., Xu, C.S., Pang, S., Matthies, D., Hess, H.F., Lippincott-Schwartz, J., Liu, Z., 2019. Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. Cell 177, 1522-1535.e1514.

Jenni-Eiermann, S., 2017. Energy metabolism during endurance flight and the postflight recovery phase. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 203, 431-438.

John Lin, C.C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.W., Lee, H.K., Carlson, J., Weston, M.C., Chen, F., Zhang, Y., Zhu, W., Mohila, C.A., Ahmed, N., Patel, A.J., Arenkiel,

B.R., Noebels, J.L., Creighton, C.J., Deneen, B., 2017. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. Nat Neurosci 20, 396-405.

Kappers, C.A., Huber, G.C., Crosby, E.C., 1936. The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates including man. The Journal of Nervous and Mental Disease 84, 709-711.

Kauffman, J.B., Bernardino, A.F., Ferreira, T.O., Giovannoni, L.R., de O Gomes, L.E., Romero, D.J., Jimenez, L.C.Z., Ruiz, F., 2018. Carbon stocks of mangroves and salt marshes of the Amazon region, Brazil. Biol Lett 14.

Krebs, J.R., Sherry, D.F., Healy, S.D., Perry, V.H., Vaccarino, A.L., 1989. Hippocampal specialization of food-storing birds. Proceedings of the National Academy of Sciences 86, 1388-1392.

Landhuis, E., 2018. Tapping into the brain's star power. Nature 563, 141-143.

Landys, M.M., Piersma, T., Guglielmo, C.G., Jukema, J., Ramenofsky, M., Wingfield, J.C., 2005. Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. Proc Biol Sci 272, 295-302.

Li, D., Liu, X., Liu, T., Liu, H., Tong, L., Jia, S., Wang, Y.F., 2019. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. Glia.

McConnell, H.L., Kersch, C.N., Woltjer, R.L., Neuwelt, E.A., 2017. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. J Biol Chem 292, 762-770. Mendes, F., de Almeida, M.N.F., Felicio, A.P.G., Fadel, A.C., Silva, D.D., Borralho,

T.G., da Silva, R.P., Bento-Torres, J., Vasconcelos, P.F.D., Perry, V.H., Ramos, E., Picanco-Diniz, C.W., Sosthenes, M.C.K., 2013. Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. Bmc Neuroscience 14.

Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297, 681-683.

Mouritsen, H., Heyers, D., Güntürkün, O., 2016. The Neural Basis of Long-Distance Navigation in Birds. Annu Rev Physiol 78, 133-154.

Parnavelas, J.G., Nadarajah, B., 2001. Radial glial cells. are they really glia? Neuron 31, 881-884.

Porter, R., Smith, P., 2013. Techniques to improve the accuracy of location estimation using light level geolocation to track shorebirds. Wader Study Group Bulletin 120, 148. Rakic, P., 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol 145, 61-83.

Rodríguez, J.J., Yeh, C.Y., Terzieva, S., Olabarria, M., Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., 2014. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. Neurobiol Aging 35, 15-23.

Sampedro-Piquero, P., De Bartolo, P., Petrosini, L., Zancada-Menendez, C., Arias, J.L., Begega, A., 2014. Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. Neurobiol Learn Mem 114, 16-25.

Schiera, G., Di Liegro, C.M., Di Liegro, I., 2019. Cell-to-Cell Communication in Learning and Memory: From Neuro- and Glio-Transmission to Information Exchange Mediated by Extracellular Vesicles. Int J Mol Sci 21.

Schweitzer, L., Renehan, W.E., 1997. The use of cluster analysis for cell typing. Brain Res Brain Res Protoc 1, 100-108.

Sherry, Vaccarino, 1989. Hippocampus and memory for food caches in blackcapped chickadees. Behav Neurosci.

Sherry, D.F., 2011. The hippocampus of food-storing birds. Brain, Behavior and Evolution 78, 133-135.

Sherry, D.F., MacDougall-Shackleton, S.A., 2015. Seasonal change in the avian hippocampus. Front Neuroendocrinol 37, 158-167.

Shu, S., Ju, G., Fan, L., 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. Neurosci Lett 85, 169-171.

Sick, H., 1997. Migração de aves na América do Sul continental, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, p. 86p.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci 2, 266-270.

Viola, G.G., Rodrigues, L., Americo, J.C., Hansel, G., Vargas, R.S., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Goncalves, C.A., Xavier, L.L., Achaval, M., Souza, D.O., Amaral, O.B., 2009. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. Brain Res. Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P.O., 2009. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. Biochim Biophys Acta 1788, 842-857. Williams, B.M., Luo, Y., Ward, C., Redd, K., Gibson, R., Kuczaj, S.A., McCoy, J.G., 2001. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. Physiol Behav 73, 649-658.

# **Figure Legends**

Figure 1. Map of Bragança coastline showing several islands, including Otelina Island where all bird captures were done. Adapted from Pereira *et al.*, (unpublished results).

Figure 2. Boundaries of the hippocampal formation. (A, D and G) photomicrographs of hippocampal sections immunolabeled for GFAP, taken from three distinct rostro-caudal levels to illustrate the boundaries of the hippocampal formation; (B, E and H) Grid (700x700  $\mu$ m) and boxes (50x50  $\mu$ m) for sampling astrocytes selection for 3D reconstructions; (C, F and I) colored shaded areas to illustrate rostro-caudal changes of the hipocampal formation. Scale bar: 500  $\mu$ m.

Figure 3. Low (A), medium (B and C), and high-power (D) photomicrographs from a brain section of individuals of *A. interpres*, captured on the coast of Bragança, Pará, Brazil, to show the object of interest: stellate GFAP-astrocyte from the grey matter of the hippocampal V region. 3D reconstructed astrocyte is also illustrated (E). Scale bars: A = 250  $\mu$ m, B and C = 500  $\mu$ m, D and E = 25  $\mu$ m.

Figure 4. Photomicrographs showing three main astrocytes morphotypes. A) stellate astrocytes; B) Vascular astrocytes; C) Radial astrocytes. Scale bar = 25  $\mu$ m.

Figure 5. The morphological phenotypes of astrocytes in the hippocampal formation of *A. interpres* newcomers. Cluster discriminant analysis (Ward's method) was performed after three-dimensional reconstruction of astrocytes from 5 birds. (A) Dendrogram groupings of 261 astrocytes identified two main morphological phenotypes, Type I and Type II. (B and C) Graphic representations of morphological complexity and convex hull mean values, and corresponding standard errors and deviations illustrate the significant differences between Type I and Type II astrocytes. (D) Graphic representation of discriminant analysis. Note higher dispersion of red dots corresponding to Type I astrocytes. (E) Discriminant statistical analysis results. Both morphometric features significantly contributed to cluster formation was (p < 0.000000). Type I astrocytes (orange dots) showed higher x-y dispersion than Type II astrocytes (dark brown dots). Astrocytes were

reconstructed from both the rostral and caudal regions of the hippocampal formation; cluster analysis was based on multimodal or at least bi-modal morphometric features of the astrocytes (MMI > 0.55).

Figure 6. The morphological phenotypes of astrocytes in the hippocampal formation of A. interpres pre-migration group. Cluster discriminant analysis (Ward's method) was performed after three-dimensional reconstruction of astrocytes from 5 birds. (A) Dendrogram groupings of 255 astrocytes identified two main morphological phenotypes, Type I and Type II. (B and C) Graphic representations of morphological complexity and convex hull mean values, and corresponding standard errors and deviations illustrate the significant differences between Type I and Type II astrocytes. (D) Graphic representation of discriminant analysis. Note higher dispersion of red dots corresponding to Type I astrocytes. (E) Discriminant statistical analysis results. Morphological complexity was the morphometric feature that most significantly contributed to cluster formation (p < p0.000000). Type I astrocytes (orange dots) showed higher x-y dispersion than Type II astrocytes (dark brown dots). Astrocytes were reconstructed from both the rostral and caudal regions of the hippocampal formation; cluster analysis was based on multimodal or at least bi-modal morphometric features of the astrocytes (MMI > 0.55).

Figure 7. Graphical representations showing statistically significant differences between the morphometric parameters of hippocampal astrocytes Type I and Type II of the hippocampal formation of *Arenaria interpres*, reconstructed three-dimensionally from newly arrived and pre-migration animals. A - C correspond to graphical representations of mean values, standard errors (colored boxes) and standard deviations (whiskers) of multimodal parameters with significant differences between astrocyte types. (\*) indicate significant differences (p <0.05).

Figure 8. Graphical representations demonstrating the differential influence of temporal windows (newcomers and premigration) on the morphometry of threedimensionally reconstructed astrocytes (Type I and Type II) of *Arenaria interpres* hippocampal formation. A - D: mean values, standard errors (colored boxes) and standard deviations (whiskers). (\*) indicates significant differences (p <0.05). Figure 9. 3D reconstructions and corresponding dendrograms of Type I and Type II hippocampal astrocytes from the hippocampal formation of *A. interpres* newcomers and premigration birds. Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in the same color. The 3D drawings were taken from hippocampal astrocytes with morphometric features closest to that of the representative "average" cell of each group. 3D cells used to illustrate the average astrocyte types were selected from the distance matrix used to obtain the sum of the distances of each cell relative to all others. The cell that best represents a group had the smallest sum of distances. Scale bars: 20  $\mu$ m.









Stellate

Vascular

Radial









Mean Mean: SE Mean: SD % p<0.05 Newly Arrived Pre Migratory



Branched Structure Analysis		
Segment	Any portion of the branched astrocytic structure with endings that are nodes or endings without intermediate nodes.	
Segments/mm	Number of segments / total length of segments expressed in millimeters.	
No. of Trees	Number of trees in astrocytes	
Total Number of Segments	Refers to the total number of tree segments.	
Branches Length	Total line length of the segments used to trace the branch of interest.	
Average Length of Branches (µm)	Average = [Total Length] / [Number of Branches]	
Total Length of Branches (µm)	Total length of all tree branches.	
Tortuosity	[Actual segment length] / [Distance between segment endpoints]. The smallest value is 1; This represents a straight segment. Tortuosity allows us to compare segments of different lengths in terms of the complexity of the paths they take.	
Surface Area Branches Average (µm²)	Calculated by modeling each branch as a trunk (truncated straight circular cone) divided by the number of branches.	
Surface Area Total Trees (µm²)	2D surface area of an astrocyte tree calculated based on the area defined by the ends of all trees.	
Branch Volume (µm³)	Calculated by modeling each piece of each branch as a trunk.	
Total Branch Volume	The total volume for all branches of the tree.	
Primary Branches Base Diameter (µm)	Base diameter of 1st segment.	
Planar Angle	Calculated based on segment endpoints. Refers to the change of direction of a segment relative to the previous segment.	
Dimensão fractal	The "K-dim" of fractal analysis describes how the structure of interest fills space. Significant statistical differences in K-dim suggest morphological dissimilarities.	
Convex Hull - Perimeter (μm), Area (μm²) 2D, Area of 3D surface (μm²) and Volume (μm³)	Convex hull measures the size of the branching field by interpreting a branched structure as a solid object controlling a given amount of physical space. The amount of physical space is defined in terms of convex-hull volume, surface area, area, and or perimeter.	

	Describes the overall structure of a branched object based on topological and metric properties. Root Point (or Origin): For neurons, microglia, or
	astrocytes, the origin is the point at which the structure is bound to the soma.
Vertex Analysis	Main types of vertices: Vd (fork) or Vt (trifurcation): Nodal (or branched) points. Vp: terminal (or pending) vertices. Va: primary vertices connecting
	to 2 pending vertices; Vb: Secondary vertices linking 1 pendant vertex (Vp) to 1 bifurcation (Vd) or 1 trifurcation (Vt); Vc: tertiary vertices that connect
	either 2 fork (Vd), 2 trifurcations (Vt), or 1 fork (Vd) and 1 trifurcation (Vt).
	In this report, we measure the number of vertices Va, Vb and Vc.

	Complexity = [Sum of Terminal Orders + Number of Terminals] ×
Complexity	[Total
	Branch Length / Number of Primary Branches]

# **DECLARATION OF CONFLICTS OF INTEREST**

I declare that there are no conflicts of interest between the authors of the paper entitled: "Ruddy turnstone (*Arenaria interpres*) recovers hippocampal astrocytes morphology in the wintering period at the mangroves of Amazon River estuary."

Belém (PA), Brazil, February 6, 2020.

Cristovam Wanderley Picanço Diniz Author accountable for submission

# **Ethical Statement**

I declare all applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Belém (PA), Brazil, February 7, 2020.

Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Author accountable for submission