



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

DARIO CARVALHO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ASTRÓCITOS DA
FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE MAÇARICOS DA ESPÉCIE
Calidris pusilla DURANTE A MIGRAÇÃO E EM PERÍODO DE
INVERNADA.**

BELÉM-PARÁ

2017

DARIO CARVALHO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ASTRÓCITOS DA
FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE MAÇARICOS DA ESPÉCIE
Calidris pusilla DURANTE A MIGRAÇÃO E EM PERÍODO DE
INVERNADA.**

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

Orientador:

Prof. Dr. Cristovam Wanderley
Picanço Diniz

Co-orientador:

Prof. Dr. Cristovam Guerreiro Diniz

BELÉM-PARÁ 2017

DARIO CARVALHO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ASTRÓCITOS DA
FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE MAÇARICOS DA ESPÉCIE
Calidris pusilla DURANTE A MIGRAÇÃO E EM PERÍODO DE
INVERNADA.**

Apresentado em: 12 de abril de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Orientador

Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz Jr

Banca examinadora (Titular)

Profa. Dra. Roseane Borner

Banca examinadora (Titular)

Prof. Dr. João Bento Torres Neto

Banca examinadora (Suplente)

AGRADECIMENTOS

A minha família (Liete Carvalho Paulo, Dariosvaldo Fabiano Gonçalves Paulo e Thaís Carvalho Paulo) por todo o apoio e confiança depositada.

Ao meu orientador e ícone Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

A Amanda Gama Rosa pela atenção, ajuda e companheirismo nesta jornada.

Aos Laboratórios (Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção; Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia; AFAR – Advanced Facilities for Avian Research, CA da Universidade de Western Ontario) e seus integrantes que contribuíram de forma decisiva nessa caminhada, em especial, ao meu Co-Orientador Cristovam Guerreiro Diniz e sua amada esposa Nara Gyzely de Moraes Magalhães.

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

A todos que de maneira direta e indireta ajudaram a contribuir para o aperfeiçoamento e realização desta dissertação em particular a Marcus Augusto de Oliveira, Camila Mendes de Lima, Daniel Guerreiro Diniz, Patrick Pereira, Ediely Henrique e Mauro Melo.

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).

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

(Theodore Roosevelt, 1858 - 1919)

RESUMO

O maçarico semipalmado *Calidris pusilla* (*C. pusilla*) é uma ave migratória de longa distância, que deixa para trás todos os anos, o seu habitat de reprodução no extremo Norte do Canadá e Alasca, em direção à linha costeira da América do Sul, escapando do inverno. Antes de atravessar o Oceano Atlântico, eles param na Baía de Fundy, na costa atlântica da América do Norte, onde aumentam os triglicérides no tecido adiposo, para atender as vigorosas demandas energéticas do voo sem paradas, de 5,3 mil quilômetros sobre o oceano. Uma vez que a atividade bioenergética e de oxidação-redução dos astrócitos estariam sob intensa demanda para sustentar a atividade neuronal e a sobrevivência durante a migração transatlântica de longa distância, nós hipotetizamos que as alterações morfológicas dos astrócitos seriam facilmente visíveis em indivíduos capturados nos sítios de invernada. Para testar essa hipótese, os astrócitos imunomarcados para a proteína ácida fibrilar glial - GFAP foram seleccionados de secções da formação hipocampal, uma área que foi proposta desempenhar um papel central na integração da informação espacial e multisensorial para a navegação. Nós quantificamos e comparamos as características morfológicas tridimensionais de astrócitos no hipocampo de aves migratórias adultas capturadas na baía de Fundy, no Canadá, com astrócitos do hipocampo de aves capturadas na região costeira de Bragança durante o período de invernada. Para selecionar os astrócitos para reconstruções microscópicas 3D, utilizamos abordagem amostral aleatória e sistemática. Usando a análise hierárquica de cluster e a análise discriminante aplicada às características morfométricas dos astrócitos reconstruídos para classificá-los morfológicamente, encontramos dois fenótipos morfológicos (designados tipos I e II), tanto em indivíduos migrantes quanto em indivíduos em invernada. Embora em proporções muito diferentes, as complexidades morfológicas de ambos os tipos de astrócitos foram reduzidas após o voo sem parada de longa distância. De fato, as aves

capturadas na região costeira de Bragança, durante o período de invernada, apresentaram uma morfologia astrocítica menos complexa do que os indivíduos capturados na baía de Fundy, no Canadá, durante a migração de outono. Como a redução da complexidade foi muito mais intensa no tipo I do que nos astrócitos do tipo II, sugerimos que esses fenótipos morfológicos podem estar associados a diferentes papéis fisiológicos. De fato, em comparação ao tipo I, a maioria dos astrócitos do tipo II não alteraram significativamente a sua morfologia após o voo de longa distância, e a maioria deles, 72,5%, mostraram interações com vasos sanguíneos, enquanto somente 27,5% dos astrócitos do tipo I revelaram tal interação.

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

ABSTRACT

The semipalmated sandpiper *Calidris pusilla* (*C. pusilla*) is a long-distance migrant shorebird that leaves every year, its breeding habitats in the southern tundra in Canada and Alaska, escaping from winter, towards the coastal line in South America. Before they cross the Atlantic Ocean, they stopover Bay of Fundy on the Atlantic coast of North America, where they increase triglycerides in adipose tissue, to attend the vigorous energetic demands of the 5,300-kilometer non-stop flight over the ocean. Because bioenergetic and redox activity of astrocytes would be under intense demand to sustain neuronal activity and survival during long-distance transatlantic migration, we hypothesize that astrocytes morphological changes may become readily visible in the wintering birds. To test this hypothesis, GFAP immunolabeled astrocytes were selected from sections of the hippocampal formation, an area that has been proposed to play a central role in the integration of multisensory spatial information for navigation. We quantified and compared hippocampal three-dimensional morphological features of astrocytes of adult migrating, captured on the Bay of Fundy, Canada, with hippocampal astrocytes from birds captured in the coastal region of Bragança, Brazil, during the wintering period. To select astrocytes for microscopic 3D reconstructions we used a random and systematic unbiased sampling approach. Using hierarchical cluster and discriminant analysis of 3D morphometric features to classify astrocytes, we found two morphological phenotypes (designated types I and II) both in migrating and wintering individuals. Although in remarkable different extent, the morphological complexities of both types of astrocytes were reduced after long-distance non-stop flight. Indeed, birds captured in the coastal region of Bragança, Brazil, during the wintering period, showed less complex astrocytic morphology than individuals captured in the Bay of Fundy, Canada, during fall migration. Because the reduction in complexity was much more

intense in type I than in type II astrocytes, we suggest that these distinct morphological phenotypes may be associated with different physiological roles during migration. Indeed, as compared to type I, most type II astrocytes did not change significantly their morphology after the long-distance flight and many of them (72.5%) revealed unequivocally connection with blood vessels, whereas type I revealed only 27.5%.

Key words: shorebirds, migration, hippocampus, astrocytes morphology, *Calidris pusilla*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Homologias hipotéticas entre as estruturas que compõem a formação hipocampal de maçaricos (Guerreiro-Diniz et al., 2016) e mamíferos.).	11
Figura 2. Organização da Vasculatura Cerebral. Figura modificada de Petzold and Murthy, 2011.	13
Figura 3. Fotomicrografia de baixo aumento da formação hipocampal do <i>C. pusilla</i> a partir de uma secção imunomarcada com anticorpo anti-GFAP para definir os limites da área de interesse e a estratégia de amostragem.	19
Figura 4. Representação esquemática das características morfométricas obtidas a partir de reconstruções tridimensionais.	22
Figura 5. Fotomicrografia da secção cerebral de <i>C. pusilla</i> , para ilustrar um astrócito estrelado da região V do hipocampo.	24
Figura 6. Reconstruções tridimensionais e respectivos dendrogramas de astrócitos.	25
Figura 7. Fenótipos morfológicos de astrócitos na formação hipocampal de aves em migração da espécie <i>C. pusilla</i> . Análise discriminante de clusters (Ward's method) após reconstruções tridimensionais de astrócitos de cinco indivíduos.	27
Figura 8. Fenótipos morfológicos de astrócitos na formação hipocampal de aves em invernada da espécie <i>C. pusilla</i> . Análise discriminante de clusters (Ward's method) após reconstruções tridimensionais de astrócitos de cinco indivíduos.	28
Figura 9. Morfometria de astrócitos reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de <i>C. pusilla</i> capturados na Ilha de Canela, Bragança, Brasil.	29
Figura 10. Morfometria de astrócitos reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de <i>C. pusilla</i> capturados na Baía de Fundy, Canadá.	29
Figura 11. Representações gráficas do número proporcional (%) de astrócitos do tipo I e II em aves em migração (A) e em invernada (B) de <i>C. pusilla</i> e seus respectivos valores de média e erro padrão da complexidade.	30
Figura 12. Morfometria de astrócitos do tipo II reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de <i>C. pusilla</i> capturados na baía de Fundy, no Canadá e Ilha Canelas, Bragança, Brasil.	32
Figura 13. Morfometria de astrócitos do tipo I reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de <i>C. pusilla</i> capturados na baía de Fundy, no Canadá e Ilha de Canela, Bragança, Brasil.	32
Figura 14. Reconstruções tridimensionais de astrócitos do tipo I e tipo II provenientes de indivíduos em migração e invernada.	33
Figura 15. Influências do voo transatlântico sobre a complexidade dos astrócitos da formação hipocampal de <i>C. pusilla</i> , em invernada e em migração.	36
Figura 16. Fenótipos morfológicos de astrócitos na formação hipocampal de aves em invernada de <i>C. pusilla</i> . Análise discriminante de clusters (Ward's method) após reconstruções tridimensionais de astrócitos de cinco indivíduos, com o pequeno agrupamento (19 células) de células com valores extremos.	37

Figura 17. Estrutura anatômica de uma unidade neurovascular (UNV) identificando astrócitos dos tipos I e II). Figura adaptada de (Mcconnell *et al.*, 2017)..... 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Formação de Memória de Longo Prazo e Migração	2
1.2 A espécie <i>Calidris pusilla</i> como Modelo Investigativo de Aves Migratórias de Voo Ininterrupto de Longa Distância	2
1.3 A Formação Hipocampal como Área de Interesse	8
1.4 O Astrócito como Objeto de Interesse	11
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Perfusão e Histologia.....	16
3.2 Imunohistoquímica	17
3.3 Reconstrução tridimensional de astrócitos e morfologia quantitativa.....	18
3.4 Análise e estatística morfométrica	18
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO	34
5.1 A estrutura morfológica dos astrócitos do tipo II parece menos vulnerável aos efeitos do voo transatlântico ininterrupto.	35
5.2 Possíveis implicações do voo non-stop de <i>C. pusilla</i> , sobre o Oceano Atlântico, na fisiologia dos astrócitos do hipocampo.	37
5.3 Limitações e Contribuições do Estudo	41
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS	45
ANEXO 1: Medições morfológicas de reconstruções microscópicas tridimensionais.	50
ANEXO 2: Artigo submetido para publicação.....	51
ANEXO 3: Autorização de Órgão Reguladores do Uso de Animais Silvestres	83

1. INTRODUÇÃO

A presente dissertação é parte de um projeto investigativo maior financiado no âmbito do Programa Ciências do Mar/CAPES dando continuidade a esforços anteriores dedicados a investigar possíveis relações entre estratégias de migração e células gliais da formação hipocampal de pássaros migratórios (Diniz, C. G. *et al.*, 2016). Através dessa iniciativa estabeleceu-se cooperação trilateral envolvendo o Instituto Federal de Educação do Pará (Campus de Bragança), a Universidade Federal do Pará, campus de Belém e a Universidade de Ontario através do AFAR (Advanced Facilities in Avian Research) sendo a presente dissertação parte dessa cooperação.

Estudo recente desenhado no âmbito dessa cooperação envolveu duas espécies de maçaricos com exigências contrastantes na aprendizagem visuoespacial durante a migração, revelando um hipocampo maior e um maior número de células microgliais nas espécies que se baseiam mais intensamente na memorização de pistas visuais durante a migração sobre o continente (*Actitis macularia*) do que em *Calidris pusilla*, com um voo sem paradas, sobre o Oceano Atlântico (Diniz, C. G. *et al.*, 2016).

A presente proposta retoma as questões levantadas anteriormente acerca do papel das células da glia e suas possíveis relações com o processo migratório na espécie *C. pusilla*, voltando-se agora para os astrócitos, uma peça chave na oferta de energia durante o período de jejum associado ao voo transatlântico sem paradas que essa espécie empreende na direção da linha costeira da América do Sul, onde costuma passar o período de invernada.

1.1 *Formação de Memória de Longo Prazo 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 (para revisão ver (Sherry, 2006; Mettke-Hofmann, 2017). O hipocampo parece ser essencial para recordar os marcos e as rotas migratórias da navegação de longa distância nas aves (Mettke-Hofmann, C. e Gwinner, E., 2003; Mouritsen *et al.*, 2016) 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, J. R. *et al.*, 1989; Sherry e Vaccarino, A. L., 1989; Jacobs *et al.*, 1990; Healy *et al.*, 1996; Healy e Krebs, 1996; Garamszegi e Eens, 2004; Lucas *et al.*, 2004; Roth e Pravosudov, 2009; Ladage *et al.*, 2010; Ladage *et al.*, 2011; Diniz, C. G. *et al.*, 2016). Entretanto, a maioria dos estudos sobre a resposta plástica do hipocampo relacionados 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 e Krebs, 1996; Roth *et al.*, 2013).

1.2 *A espécie Calidris pusilla como Modelo Investigativo de Aves Migratórias de Voo Ininterrupto de Longa Distância*

O maçarico-rasteirinho (*Calidris pusilla*) objeto de interesse do presente trabalho é uma espécie de ave pequena, de bico grosso, negro e de ponta alargada, à semelhança de vários congêneres (Sick, 1997). Pertencem à família Scolopacidae com um total de 89 espécies, encontradas em áreas costeiras e alagadas, espalhadas por todo o globo.

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

O *C. pusilla* é um pássaro migratório de longa distância percorrendo às vezes, em voos ininterruptos cerca de 5000 km, em busca de seus sítios preferenciais de invernada (Morrison, 1984).

Orientação espacial e memória são, portanto, habilidades essenciais para lidar com essas demandas da migração à longa distância e os dias de jejum impostos pelo voo ininterrupto, quando a oferta de glicose diminui, uma oportunidade para se estudar os efeitos do metabolismo associado ao voo transatlântico sobre a formação hipocampal, operando em condições metabólicas especiais.

Estudos anteriores indicam um papel crucial do hipocampo na consolidação da memória espacial de aves e mamíferos e.g. (O'keefe e Dostrovsky, 1971; Sherry, 2011). Presume-se que o hipocampo das aves possa conter como nos mamíferos, um 'mapa cognitivo', que fornece uma representação da localização espacial do animal em relação ao ambiente (Sallaz *et al.*, 2000).

Muito poucas espécies migratórias foram objeto detalhado de investigação neurobiológica e muitos aspectos dos mecanismos envolvidos com o processo migratório permanecem obscuros. Essa jornada anual que essas espécies empreendem depende de orientação precisa, reconhecimento de pistas visuo-espaciais e avaliação de distâncias ao

longo da viagem intercontinental, que estão longe de serem compreendidas em suas bases neurobiológicas. Por conta do fato de que Gibbs e colegas (Gibbs *et al.*, 2011), demonstraram que os astrócitos podem ter uma contribuição mais direta para a formação de memória de longo prazo em aves e que a consolidação da memória é modulada pela adenosina endógena (ATP) dos astrócitos do hipocampo, esse trabalho evidencia que os astrócitos desempenham papel relevante na formação e recuperação da informação memorizada em aves.

Em trabalho anterior (Foro, 2015) chama-se atenção para o fato de que a investigação morfológica dos astrócitos ganhou força a partir de estudos recentes demonstrando que quando células progenitoras astrogliais humanas são transplantadas para cérebros de roedores (Han *et al.*, 2013), camundongos com células humanas transplantadas mostraram melhor potenciação de longa duração (LTP) e aprendizagem. Nesses camundongos quiméricos, grandes regiões do SNC, incluindo o hipocampo, consistem de neurônios de camundongos (e oligodendrócitos), cercados por astrócitos e células progenitoras humanas (Windrem *et al.*, 2008). Esses autores testaram tanto os camundongos transplantados quanto animais controles com uma bateria de tarefas de aprendizagem e memória, e descobriram que os camundongos quiméricos mostram melhor desempenho em todos os testes. Essas descobertas sugerem que os astrócitos humanos podem, pelo menos em parte, contribuir de forma significativa para os processos que fazem a cognição humana superiores à cognição do camundongo (Franklin e Bussey, 2013; Zhang e Barres, 2013). Coincidentemente, os astrócitos humanos são maiores e estruturalmente mais complexos do que os astrócitos de camundongos (Oberheim *et al.*, 2006). Em comparação aos camundongos, os astrócitos humanos tinham um soma (corpo celular) com diâmetro de 2,6 milímetros mais longo, 10 vezes mais processos-GFAP-positivos e ondas de cálcio 4 vezes mais rápidas (Oberheim *et al.*, 2009). Não se conhece

ainda os detalhes morfológicos dos astrócitos das aves tronando a presente investigação dedicada à morfologia dos astrócitos do *C. pusilla* inteiramente justificada.

Mais recentemente emergiu o conceito de redes astrogliais para comunicação a longa distância associando os astrócitos às redes de conexão organizadas que permitem a troca de informações reguladas por sinais intra e extracelulares, através de canais que atravessam junções em fenda (do inglês “gap junctions”). Essa comunicação a longa distância entre células da glia modulando a atividade sináptica neuronal e contribuindo diretamente para a plasticidade sináptica adicionou nova dimensão de complexidade a análise das funções cerebrais (Giaume *et al.*, 2010). Como referido anteriormente, os astrócitos participam do controle da excitabilidade neuronal e transmissão sináptica através da liberação de moléculas neuroativas, como glutamato, a D-serina e o ATP (Halassa *et al.*, 2007; Lee e Haydon, 2007) e outros gliotransmissores como a taurina e o TNF- α (Panatier *et al.*, 2006). Além disso, realizam recaptação do glutamato, regulando os níveis do neurotransmissor (Lee e Haydon, 2007). Além disso, os astrócitos também secretam fatores solúveis como trombospondinas e colesterol, que influenciam a formação das espinhas dendríticas e maturação sináptica (Ullian *et al.*, 2004; Christopherson *et al.*, 2005). Importante lembrar do ponto de vista quantitativo que no hipocampo, mais de 50% das sinapses excitatórias são associadas, em graus variados, com processos astrocíticos; um único astrócito pode estar relacionado a aproximadamente 100.000 contatos sinápticos, sugerindo sua participação na dinâmica das sinapses e das redes neuronais (Ventura e Harris, 1999; Bushong *et al.*, 2002).

Em 1991 se descreveu pela primeira vez a influência da potenciação de longo prazo induzida por estimulação repetida e de alta frequência da via perfurante sobre a distribuição espacial dos processos astrocíticos na neurópila da camada molecular do giro denteado que continha as sinapses potenciadas. Foram encontradas mudanças

significativas na ramificação dos processos astrocíticos tanto quanto na sua relação topográfica com os complexos sinápticos (Wenzel *et al.*, 1991). Mais recentemente demonstrou-se a presença em astrócitos da camada molecular do giro dentado de potencial de longa duração semelhante à potenciação de longo prazo neuronal, sucedendo à estimulação de alta frequência da via perfurante (Zhang *et al.*, 2009) confirmando-se que esse processo era dependente da exocitose de glutamato (Jourdain *et al.*, 2007).

De maneira resumida: os astrócitos permitem que os neurônios funcionem fornecendo energia e substratos para a neurotransmissão contribuindo diretamente para a formação e modulação das sinapses através de mecanismo bidirecional de comunicação entre eles (Allen e Barres, 2009).

Por essa razão e por conta do fato de que o astrócito é uma célula chave tanto para a oferta de energia para o metabolismo neural quanto pelo papel que desempenha no processo de consolidação de memória de longo prazo, decidimos investigar o impacto do voo transatlântico sobre a morfologia dos astrócitos da formação hipocampal do *C. pusilla*.

Como o perfil metabólico do voo migratório de longa distância depende da reserva de lipídeos (Landys *et al.*, 2005), estando os astrócitos cerebrais sob intensa atividade metabólica originada da via alternativa proporcionada pelos triglicerídios (Raefsky e Mattson, 2017), hipotetizamos que o voo de longo alcance afetaria a morfo-fisiologia dos astrócitos e isso seria prontamente evidente em sua morfometria. Até o momento, não existem estudos morfológicos tridimensionais (3D) detalhados de astrócitos na formação hipocampal de aves migratórias e nenhum trabalho explorou o impacto dos voos migratórios de longa distância ininterruptos sobre a morfologia dessas células.

Por outro lado foi previamente descrito em pássaros migratórios que acabam de chegar em sítio de parada após um voo extenuante de longa distância, níveis mais

elevados de glicocorticoides do que os animais que já se encontram em período de invernada há mais tempo (Piersma *et al.*, 2000; O'reilly e Wingfield, 2003; Eikenaar *et al.*, 2014). 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-Ciannelli *et al.*, 2002). 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 próinflamatórias e outras moléculas imunomodulatórias pelas células da glia que promovem muito das alterações associadas ao stress agudo ou crônico. Muito dos efeitos crônicos dos glicocorticoides sobre os astrócitos estão ligados à neurotoxicidade do glutamato (Pearson-Leary *et al.*, 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, K. *et al.*, 2014; Kang, W. *et al.*, 2014).

No presente trabalho, investigamos as alterações dos astrócitos do hipocampo de *C. pusilla* comparando a morfologia dessas células em indivíduos capturados antes e após a migração transatlântica em direção a linha costeira da América do Sul. Previu-se que os astrócitos do hipocampo destes maçaricos teriam diferenças morfológicas conspícuas que poderiam estar relacionadas com a intensa demanda metabólica imposta pelo voo transatlântico sem escalas.

1.3 *A Formação Hipocampal como Área de Interesse*

Quando se comparam o desenvolvimento, a topografia e o papel funcional do hipocampo das aves, ao hipocampo dos mamíferos, torna-se cada vez mais evidente que a parte medial do córtex dorsal das aves é homóloga ao hipocampo de mamíferos (Ariens-Kappers *et al.*, 1936; Kallen, 1962; Campbell e Hodos, 1970; Benowitz e Karten, 1976; Nadel, 1978; Amaral, 1993). Essa área está implicada em diversos processos de memória incluindo aqueles de natureza espacial necessários à navegação (Bingman e Yates, 1992; Bingman *et al.*, 1988) e ao armazenamento de alimento (Krebs, J. R. *et al.*, 1989; Sherry e Vaccarino, A. L., 1989).

A parte dorsomedial do cérebro de pássaros a quem se atribui equivalência ao hipocampo dos mamíferos é tradicionalmente dividida em duas grandes áreas, a ventral chamada de hipocampo propriamente dito (Hp) e aquela posicionada dorsal e lateral a essa, denominada de área parahipocampal (APH). A formação hipocampal (FH) das aves (Hp + APH) faz parte do sistema límbico, uma rede de múltiplas conexões dos centros telencefálicos e subtelencefálicos, que é responsável pelo aprendizado associado às emoções e motivação em geral (Atoji e Wild, 2007).

No que concerne a extensão da área parahipocampal, não há consenso definido, que possa servir de base inequívoca para a definição do limite lateral da área parahipocampal, havendo aqueles que advogam sem adicionar precisão ao parcelamento (Szekely, 1999), que se trata de uma faixa de córtex que separa o hipocampo propriamente dito das estruturas do pálido lateral, com disposição medial ao ventrículo lateral. Assim, a linha de separação entre as áreas dorsolaterais não está claramente definida; a APH parece ser contínua com o hiperestriado acessório (HA) e também contínua em sua porção caudal com o córtex dorsolateral (Szekely, 1999). Em secções coradas com Nissl, a APH e o Hp

são homogêneos e representados como continuações da área cortical adjacente, com uma laminação relativamente distinta em sua parte posterior ventral.

Tem sido confirmado, entretanto, por estudos de expressão genética, que o hipocampo de aves e mamíferos possui a mesma origem embrionária (Puelles, 2001; Medina e Abellán, 2009) e são amplamente homólogos (Belgard *et al.*, 2013), revelando funções altamente conservadas. Atoji e Wild demonstraram, baseado em conectividade anatômica, que a área dorsomedial da formação hipocampal das aves é semelhante ao subiculum e CAs dos mamíferos, enquanto a camada em forma de V na porção ventromedial é similar ao giro denteado dos mamíferos e a camada mais lateral do hipocampo das aves é análogo ao córtex entorrinal (Atoji e Wild, 2006).

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

Além das comparações de ordem morfológica entre a formação hipocampal de aves e mamíferos, é possível encontrar associação funcional entre seus vários sistemas neurais. Em revisões recentes (Crystal, 2010; Allen e Fortin, 2013) há evidências compiladas substantivas de que a estrutura hipocampal em aves e nas diferentes classes

de mamíferos correlacionam-se com a aprendizagem e o processamento de vários tipos de memória, tais como, memória semelhante a episódica, contextual e a espacial.

Em trabalho prévio (Diniz, C. G. *et al.*, 2016) delimitaram a formação parahipocampal e o hipocampo propriamente dito no *C. pusilla*, (espécie de interesse do presente trabalho) 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 rostrocaudal. 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 menos claro tornando arbitrária sua definição. Em secções rostrais os limites arquitetônicos entre a área parahipocampal e o hiperpalio acessório é igualmente pouco claro. A Figura 1 sumaria o parcelamento da formação hipocampal em maçaricos proposta por Guerreiro-Diniz e colaboradores (Diniz, C. G. *et al.*, 2016). Esse parcelamento está baseado em parcelamento anterior proposto para formação hipocampal das aves pressupondo homologias com a formação hipocampal dos mamíferos tal como ilustrado na Fig. 1 (Atoji e Wild, 2006).

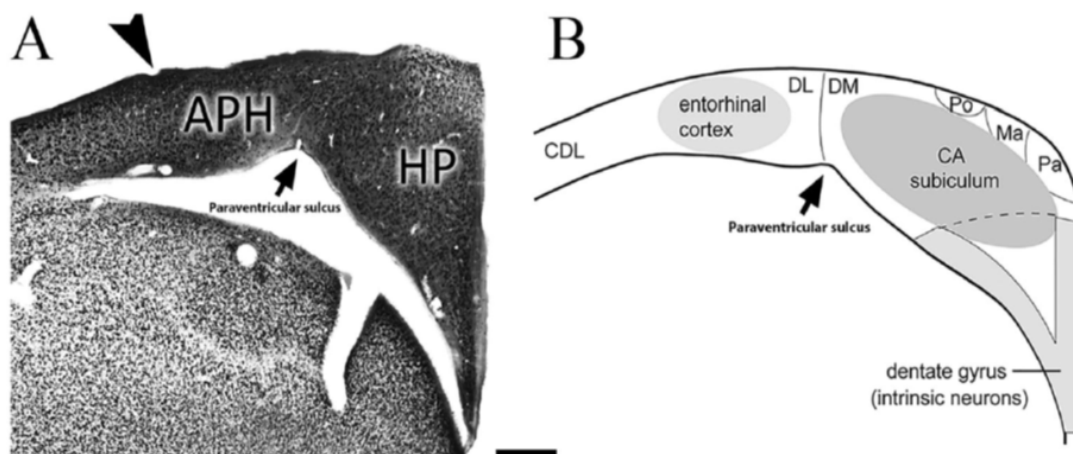


Figura 1. Homologias hipotéticas entre as estruturas que compõem a formação hipocampal de maçaricos (Guerreiro-Diniz et al., 2016) e mamíferos. À esquerda ilustra-se uma secção imunomarcada para NeuN, um marcador seletivo de neurônios maduros. A cabeça de seta indica o limite lateral da área parahipocampal e a seta indica o sulco paraventricular, fronteira lateral do hipocampo. À direita possíveis homologias entre as sub-regiões da formação hipocampal em mamíferos e aves. A região ventral em forma de V (preenchida em cinza-claro) é comparável ao giro dentado dos mamíferos; a área dorsomedial (DM) é comparável ao corno de Amon (CA), e o subiculum e a área dorsolateral são homólogas ao córtex entorrinal. Outras regiões distintas histologicamente incluem a região magnocelular (Ma), a parvocelular (Pa) e a região pobre em elementos celulares (Po). APH – área parahipocampal; Hp – hipocampo. Barra de escala = 500µm.. Fonte: (Diniz, C. G. et al., 2016).

1.4 O Astrócito como Objeto de Interesse

A conectividade estrutural e funcional no sistema nervoso, a atividades sináptica e o processamento de informação requerem transdução de sinais entre diferentes tipos celulares dentro do que se denominou mais recentemente de unidade neurovascular e isso inclui a integridade das funções da barreira hematoencefálica. A barreira hematoencefálica é constituída por células altamente especializadas e isso inclui as células endoteliais microvasculares, astrócitos, micróglias, pericitos e neurônios, que agem em conjunto para restringir a entrada de patógenos, a entrada de células do sistema imune periférico e a entrada de moléculas solúveis no sistema nervoso central (Petzold e Murthy, 2011). Quando em situações anormais algum patógeno consegue cruzar essa

barreira e infectar o SNC, a barreira hematoencefálica pode ser aberta de forma controlada para permitir a migração de leucócitos que combaterão a infecção, removendo células infectadas e fragmentos celulares (Bechmann *et al.*, 2007).

Além disso a vasculatura cerebral para garantir o suprimento adequado de combustível para as células neurais se organiza em unidades neurovasculares que se distribuem canonicamente em todas as regiões do Sistema Nervoso (Mcconnell *et al.*, 2017). De fato, a atividade neural normal depende de um contínuo suprimento de oxigênio e glicose oferecido através do fluxo sanguíneo cerebral. Assim, toda vez que a atividade neural aumenta, há um aumento concomitante do fluxo sanguíneo cerebral. Essa inter-relação pode ser documentada no espaço e no tempo, empregando técnicas de neuroimagem, que medem a hemodinâmica local, indicando a duração e o local das mudanças no fluxo sanguíneo cerebral (Venkat *et al.*, 2016). Esse fenômeno denominado de acoplamento neurovascular ou hiperemia funcional é feito através do astrócito; (ver Figura 2 que ilustra alguns dos aspectos macro e microscópicos da contribuição dos astrócitos para a organização estrutural da unidade neurovascular) (Petzold e Murthy, 2011).

A rede vascular cerebral intraparenquimatosa é quase inteiramente recoberta pelos pés terminais dos astrócitos que funcionam como intermediários entre os neurônios e os vasos sanguíneos (Mathiisen *et al.*, 2010; Mccaslin *et al.*, 2011). No nível ultraestrutural se detectam muitos interneurônios vasoativos que expressam noradrenalina e que fazem sinapse com os astrócitos, em vez de fazerem com neurônios (Hamel, 2006; Rancillac *et al.*, 2006).

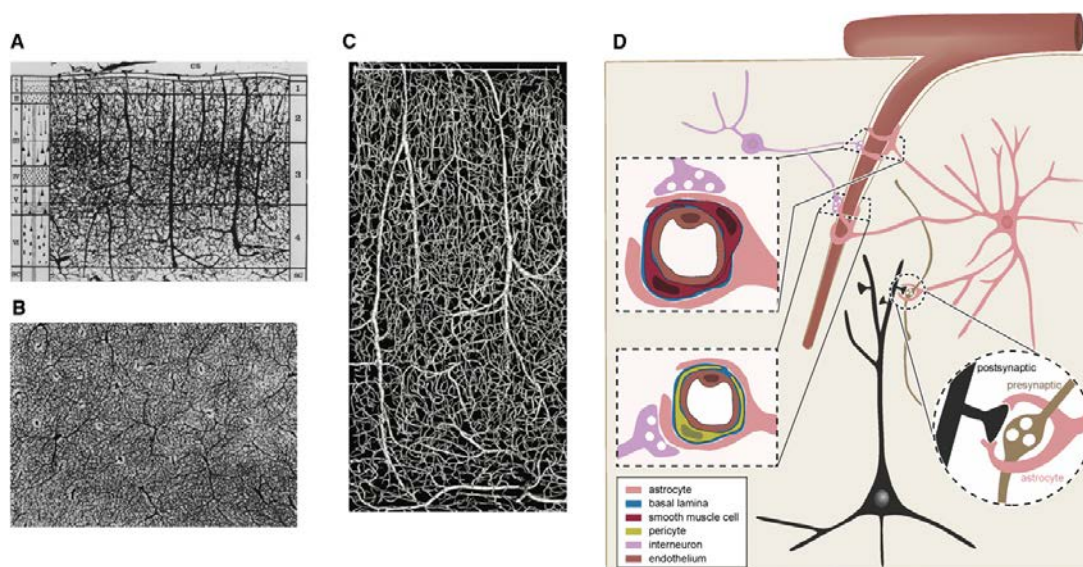


Figura 2. Organização da Vasculatura Cerebral. A – Arquitetura da rede vascular cerebral humana. Note os vasos penetrantes a partir dos quais os capilares emergem para perfusão do parênquima cerebral. As camadas corticais são indicadas à esquerda e numeradas em ordem crescente a partir da superfície pial. B – Secção tangencial ao longo da camada IV do cérebro humano para ilustrar a distribuição espacial relativamente homogênea dos capilares, à exceção da região em torno das artérias. C – Reconstrução tridimensional da rede vascular cortical humana baseada em injeção intravascular e dos vasos com tinta nanquim (escala = 1 μ m). D – Representação esquemática dos vários elementos que compõem a unidade neurovascular. Note que as arteríolas penetrantes e os capilares são completamente cobertos pelos astrócitos. Os interneurônios dirigidos a unidade neurovascular fazem sinapse com os astrócitos. Os astrócitos por sua vez também monitoram a atividade sináptica (sinapse tripartite). Figura modificada de Petzold and Murthy, 2011.

Tomados em conjunto esses dados apontam que, com exceção dos transmissores gasosos, todas as moléculas sinalizadoras dirigidas à vasculatura devem agir primeiro nos astrócitos ou pelo menos passar através deles para então alcançar a musculatura lisa dos vasos.

Por outro lado os astrócitos estão igualmente integrados entre si formando redes astrocíticas, tanto quanto constituem o terceiro elemento das sinapses tripartites contribuindo diretamente para a função sináptica (Papouin *et al.*, 2017). Os processos astrocíticos perissinápticos envolvem contatos sinápticos e controlam a homeostase da fenda sináptica, provendo aos neurônios o glutamato e o GABA, precursores obrigatórios da glutamina, contribuindo para a plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Verkhratsky *et al.*, 2015; Zorec *et al.*, 2015).

Células astrogliais foram implicadas de várias maneiras no metabolismo cerebral, especialmente pelo fato de que elas influenciam a função neuronal particularmente no nível das sinapses (Mckenna *et al.*, 2016; Robinson e Jackson, 2016). Numerosos estudos demonstraram que os astrócitos exercem um papel protetor fundamental contra o estresse oxidativo por causa dos seus efeitos sobre o metabolismo do antioxidante Glutathione (GSH) e a defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bolaños, 2016).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e desempenha um papel importante na plasticidade e neurotoxicidade. A modulação do glutamato extracelular determina suas ações fisiológicas ou excitotóxicas. O principal mecanismo responsável para a manutenção da baixa concentração extracelular de glutamato é realizado por uma família de proteínas transportadoras de glutamato, que utilizam gradientes eletroquímicos através das membranas plasmáticas como forças motrizes para a captação, sendo que no hipocampo (objeto de interesse do presente trabalho) em particular, o receptor é uma proteína de membrana denominada protease ativada receptor 1 (PAR1) expressa nos astrócitos (Sweeney *et al.*, 2017). A PAR1 é ativada proteoliticamente pelas serina-proteases da corrente circulatória. A sua ativação induz rápida reorganização estrutural da matriz extracelular em torno das sinapses glutamatérgicas, o que parece associado à rápida captação do glutamato do espaço extracelular liberado pelas sinapses. Essa recaptção rápida induzida pela PAR1 leva a mudanças na transmissão sináptica excitatória de curto e longo prazos (Sweeney *et al.*, 2017).

Nos astrócitos, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase e a glutamina é liberada pelos astrócitos e captada pelos neurônios para ser novamente convertida em glutamato. Esse sistema é chamado ciclo glutamato-glutamina (Sonnewald e Schousboe, 2016). A interação entre neurônios pré-sinápticos e pós-

sinápticos juntamente com os astrócitos caracteriza a sinapse tripartite (Papouin *et al.*, 2017).

A captação de glutamato é também importante para a manutenção dos níveis de glutathiona (GSH), o maior antioxidante no SNC. A glutathiona é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos, cisteína, glutamato e glicina onde o grupo sulfidríla (SH) da cisteína que serve como doador de prótons, é responsável pelo efeito antioxidante da GSH. Além disso a glutathiona secretada pelos astrócitos serve como substrato para síntese da glutathiona neuronal (Bolaños, 2016).

Assim, a organização da rede astrocítica em dois domínios separados (Halassa *et al.*, 2007), o domínio da sinapse tripartite (Barres, 2008) e o domínio neurovascular (McConnell *et al.*, 2017), torna o astrócito candidato ideal para estabelecer o acoplamento funcional entre atividade neuronal e o fluxo sanguíneo local.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar as mudanças na morfologia dos astrócitos da formação hipocampal do maçarico semipalmado *C. pusilla* durante e após a migração transatlântica para os sítios de invernada.

2.2 Específicos

- Empregar a análise hierárquica de cluster de parâmetros morfométricos de astrócitos reconstruídos em três dimensões para classifica-los morfologicamente.
- Medir as alterações morfológicas dos astrócitos associadas ao voo transatlântico de longa distância comparando a morfologia dos astrócitos de indivíduos capturados na Baía de Fundy (Canadá) e na linha costeira de Bragança (Brasil).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Cinco indivíduos da espécie *C. pusilla* em migração, foram coletados em agosto de 2012 na baía de Fundy, no Canadá (45 ° 50'19,3 "N e 64 ° 31'5,39" W) e outros cinco indivíduos foram capturados no período de invernada, entre novembro e março do mesmo ano na Ilha Canela na zona costeira tropical do norte do Brasil (00°47'09.07 "S e 46°43'11.29" W). Selecionamos esse período de captura na zona costeira do norte do Brasil para reduzir possíveis influências agudas do voo migratório transatlântico de longa distância na formação hipocampal. Os maçaricos semipalmados alcançam a zona litorânea do norte do Brasil em Agosto e em Setembro e começam a migração ao ártico entre Maio e Julho.

Os pássaros foram capturados sob a licença N° 44551-2 do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e a licença de Captura Científica ST2783 do Serviço Canadense de Vida Selvagem. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Institutos Nacionais de Saúde (EUA) e os regulamentos brasileiros para procedimentos científicos em animais, e finalmente com a aprovação do Subcomitê de Usuários de Animais da Universidade de Western Ontario. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados, o estresse e desconforto para os mesmos.

3.1 *Perfusão e Histologia*

Sob anestesia profunda utilizando isoflurano (Canadá), as aves foram perfundidas transcárdialmente com solução salina tamponada com fosfato 0,1 M, seguida de fixadores aldeídicos (paraformaldeído a 4%, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2-7,4). Os cérebros foram dissecados, armazenados em tampão fosfato salina 0.05M (PBS) e cortados com auxílio

de um vibrátomo (Leica VT1000S) no plano coronal, em secções de 80µm de espessura para obter séries anatômicas de seis secções.

3.2 *Imunohistoquímica*

As secções foram imunomarcadas com anticorpo anti-GFAP (Santa Cruz SC-6170) fluando em solução livremente seguido de pré-tratamento antigênico com ácido bórico 0,2 M (pH 9) a 70 ° C durante 60 minutos, lavadas com tampão fosfato a 0,1 M / solução salina / triton (PBST) e lavadas em PBS três vezes durante 2 minutos cada vez. As secções foram então imersas durante 12 horas em soro de cavalo a 5% diluído em PBST e transferidas para o anticorpo primário (anti-GFAP produzido em cabra SC-6170 Santa Cruz Biotechnology) diluído em PBST 0,3% (1: 500), onde permaneceram incubadas durante 12 horas a 4 ° C, com agitação contínua. As secções foram lavadas em PBST 0,3% e então foram incubadas durante a noite no anticorpo secundário (Vector Laboratories, Inc. produzido em cavalo e dirigido contra imunoglobulina de cabra, 1: 400 em PBST 0,3%) seguido de peróxido de hidrogénio durante 15 minutos, lavadas três vezes em PBST a 0,3% por 2 minutos de cada vez, em seguida imerso em solução de complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA; 37,5 µl A, 37,5 µl B em 13,12 ml de 0,3% PBST) durante 60 minutos. Após uma lavagem de 2 minutos em PBS, as secções foram reagidas para visualização da marcação do citoesqueleto dos astrócitos imunomarcados para a proteína glial ácida fibrilar - GFAP utilizando o método de glicose-oxidase-DAB-níquel (Shu *et al.*, 1988). A reação foi interrompida quando os ramos astrocíticos finos foram visualizados ao microscópio. As secções foram enxaguadas 4 x 5 minutos em PBS, montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas em álcool e xileno e cobertas com Enthelan (Merck). Cinco animais completos de cada grupo com imunomarcção para GFAP, foram selecionados para

análise. Escolheu-se o grupo de secções que continham detalhes morfológicos conspícuos de astrócitos para para reconstrução 3D e análise morfométrica. Confirmamos a especificidade da reação imuno-histoquímica ao observar que não havia ocorrência de marcação alguma quando da retirada do anticorpo primário (Saper e Sawchenko, 2003).

3.3 Reconstrução tridimensional de astrócitos e morfologia quantitativa

Para analisar as secções do cérebro, utilizamos um microscópio NIKON Eclipse 80i (Nikon, Japão) equipado com uma placa motorizada (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, EUA). Os astrócitos foram reconstruídos com objetiva Pan Fluoreto de 100X de imersão em óleo, de alta resolução (Nikon, NA 1.3, DF = 0.19 μm). As imagens foram adquiridas com o software Neurolucida e analisadas com o software Neurolucida Explorer (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, EUA). Embora o encolhimento no eixo z não seja um evento linear, corrigimos o encolhimento no eixo z, com base em evidências anteriores de encolhimento de 75% (Carlo e Stevens, 2011). Sem a correção, este encolhimento distorceria significativamente as medições de comprimento ao longo desse eixo. Apenas as células com processos que foram inequivocamente completas foram incluídas para análise 3-D; as células foram descartadas quando os ramos apareceram artificialmente cortados na superfície das secções ou quando incompletamente imunomarcados. Os ramos terminais da marcação seletiva de astrócitos usando anticorpo anti-GFAP eram tipicamente finos.

3.4 Análise e estatística morfométrica

Para realizar a análise, utilizamos 10 indivíduos, cinco de cada grupo. A partir desses grupos, nós reconstruímos digitalmente 499 astrócitos em três dimensões. Os

astrócitos para reconstruções 3-D foram selecionados sem viés, empregando amostragem aleatória e sistemática (Fig. 3).

Com base na descrição anterior (Atoji e Wild, 2006), definimos a formação hipocampal do maçarico como compreendendo o hipocampo propriamente dito e a área para-hipocampal. Para o hipocampo (Hp), os limites lateral e ventral foram definidos pelo ventrículo lateral, os limites dorsal e caudal corresponderam à superfície cerebral, o limite mediano foi definido pela fissura interhemisférica e o limite inferior foi definido por uma mudança acentuada na densidade celular da região "V" do hipocampo mais dorsal próxima à área do septo (Figura 3A). A área para-hipocampal foi localizada dorsal e lateral ao hipocampo, conforme definido medialmente pelo sulco paraventricular (Atoji e Wild, 2006). Para gerar resultados estatisticamente válidos, combinamos amostras sistemáticas e aleatórias (para garantir que todas as regiões de formação hipocampal contribuíssem para a amostra com a mesma probabilidade) e análise estatística multivariada. Assim, amostras sistemáticas e aleatórias foram retiradas de uma série de seções contendo a formação hipocampal, dorsal e ventral. Cada caixa dentro da formação

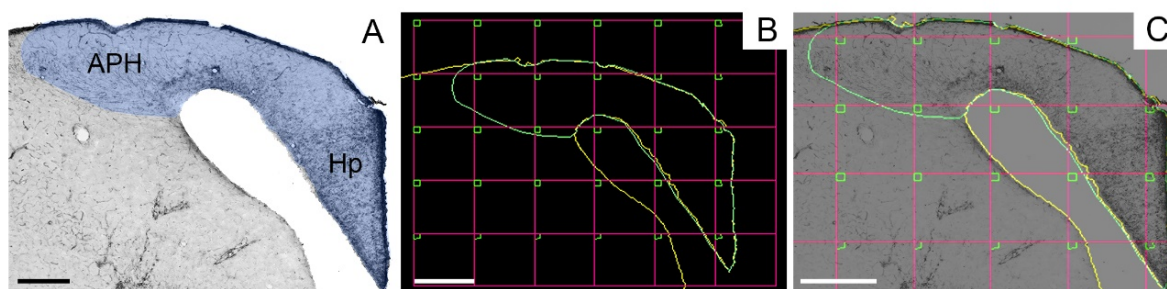


Figura 3. Fotomicrografia de baixo aumento da formação hipocampal do *C. pusilla* a partir de uma seção imunomarcada com anticorpo anti-GFAP para definir os limites da área de interesse e a estratégia de amostragem. A formação hipocampal compreende o hipocampo propriamente dito (Hp) e a área parahipocampal (APH). Observe que os limites da formação hipocampal estão demarcados e correspondem ao contorno da área preenchida em azul. A intensa imunomarcção de GFAP delinea claramente o V hipocampal. A grade (linhas vermelhas retas paralelas aos eixos x e y) estabelece os intervalos entre as caixas quadradas verdes e ilustra a amostragem aleatória e sistemática. O número de caixas em cada seção é proporcional à área coberta pela formação hipocampal. Foi selecionado para reconstrução tridimensional um único astrócito no interior de cada caixa. Barras de escala A = 250 μm ; B e C = 500 μm .

hipocampal esboçada indica um sítio a partir do qual selecionamos um único astrócito para reconstrução 3-D (Fig. 3B e 3C).

Inicialmente investigamos a presença de características morfológicas compartilhadas pelos astrócitos observados em nossa amostra, dentro de cada grupo experimental. Foram selecionadas todas as variáveis quantitativas morfométricas com índices de multimodalidade (MMI) superiores a 0,55, para análise de cluster (Ward's hierarchical clustering method), que incluiu todos os animais de cada grupo. Estimamos o índice de multimodalidade (MMI) com base na assimetria e curtose de nossa amostra para cada variável morfométrica conforme definido anteriormente em outra parte: $MMI = [M3^2 + 1] / [M4 + 3(n - 1)^2 / (n - 2)(n - 3)]$, onde M3 é assimetria e M4 é curtose e n é o tamanho da amostra (Kolb *et al.*, 1994; Schweitzer e Renehan, 1997). Curtose e assimetria descrevem a forma da distribuição de dados e permitem distinguir entre as curvas unimodais, bimodais, ou multimodais. Conjuntos de dados multimodais são essenciais para classificar uma população de células (Kolb *et al.*, 1994; Schweitzer e Renehan, 1997). O índice multimodal de cada variável foi estimado com base nas medidas de 20 características morfométricas dos ramos de astrócitos, como segue: 1. Comprimento Total dos Ramos (μm); 2. Comprimento Médio dos Ramos (μm); 3. Área de Superfície Média dos Ramos (μm^2); 4. Volume dos Ramos (μm^3); 5. Número Total de segmentos; 6. Segmentos/mm; 7. Tortuosidade; 8. Dimensões Fractal (k-dim); 9. Diâmetro de Base do Ramos Primários (μm); 10. Área de Superfície Total das Árvores (μm^2); 11. Ângulo Planar; 12. Número de árvores; 13. Complexidade; 14. Convex-Hull Volume (μm^3); 15. Convex-Hull Área de Superfície; 16. Convex-Hull Área; 17. Convex-Hull Perímetro; 18. Vertex Va; 19. Vertex Vb; 20. Vertex Vc, (ver Quadro 1 e Figura 4 para mais detalhes).

Quadro 1. Medidas morfológicas microscópicas a partir de reconstruções tridimensionais.

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

Descobrimos que algumas características morfológicas dos astrócitos mostraram um índice de multimodalidade superior a 0,55 e este valor indica que a distribuição é pelo menos bimodal e pode ser multimodal. Esses parâmetros morfométricos com essas características foram selecionados para a análise de agrupamento como descrito anteriormente. Utilizamos o método de Ward com variáveis padronizadas, e um diagrama de árvore (dendrograma) para ilustrar a classificação gerada pela análise de cluster.

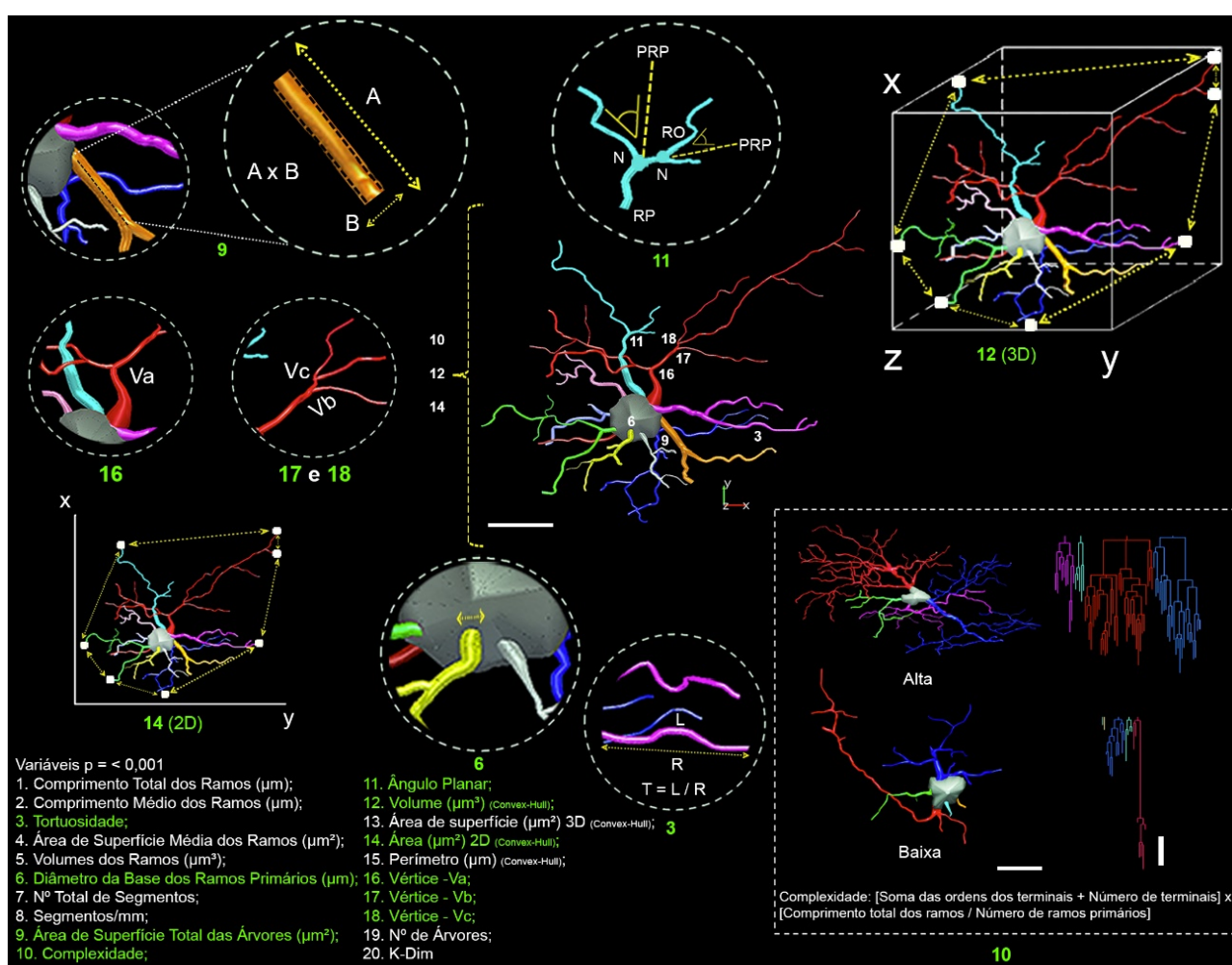


Figura 4. Representação esquemática das características morfométricas obtidas a partir de reconstruções tridimensionais. Vinte variáveis morfométricas (1 - 20) revelaram diferenças significativas entre as comparações dentro (tipo I vs tipo II) ou entre os grupos experimentais (aves em migração versus em invernada). As variáveis destacadas em cor verde correspondem às representações gráficas numeradas. Barras de escala = 10 μm .

Com o intuito de identificar quais as variáveis que mais contribuíam para a formação dos agrupamentos, os dados gerados pela análise hierárquica de agrupamentos foram submetidos a análise discriminante passo a passo, empregando o software Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK). O objetivo desse procedimento é determinar se os grupos diferem quanto à média de uma variável e, em seguida, usar essa variável para prever a associação ao grupo. No presente estudo, utilizamos este software para realizar comparações entre matrizes de variâncias totais e co-variâncias. Estas matrizes foram comparadas utilizando-se de testes F multivariados, para determinar se havia diferenças significativas entre grupos (sobre todas as variáveis). Na análise de função discriminante step-forward, o programa constrói um modelo de discriminação passo a passo. Neste modelo, em cada etapa, todas as variáveis são revisadas e avaliadas para determinar qual variável contribui mais para a discriminação entre grupos. Aplicamos este procedimento para determinar as variáveis morfométricas que proporcionaram a melhor separação entre as classes de astroglias sugeridas pela análise de cluster. Além disso, calculamos a média aritmética e o desvio padrão para as variáveis escolhidas como os melhores preditores para os grupos astrogliais. Análises estatísticas paramétricas com testes t foram aplicadas para comparar grupos de astrócitos dentro de cada grupo experimental e para detectar possíveis diferenças morfológicas entre as médias das características morfométricas de nossa amostra de astrócitos da formação hipocampal de cada grupo experimental. Todos os astrócitos da formação hipocampal foram medidos várias vezes, e software dedicado (NeuroLucida explore, MicroBright Field Inc.) foi utilizado para processar os dados obtidos com NeuroLucida. Nós aplicamos estes procedimentos em nossa amostra de astrócitos para procurar potenciais classes morfológicas gliais dentro de cada grupo experimental.

4. RESULTADOS

A Figura 5 ilustra um astrócito estrelado imunomarcado para GFAP a partir do hipocampo de *C. pusilla*, sob diferentes ampliações, para ilustrar os seus detalhes morfológicos. Sob objetiva de 100X e óleo de imersão, todos os detalhes morfológicos dos astrócitos empregados nas reconstruções microscópicas 3D foram digitalizados e armazenados como coordenadas X, Y e Z.

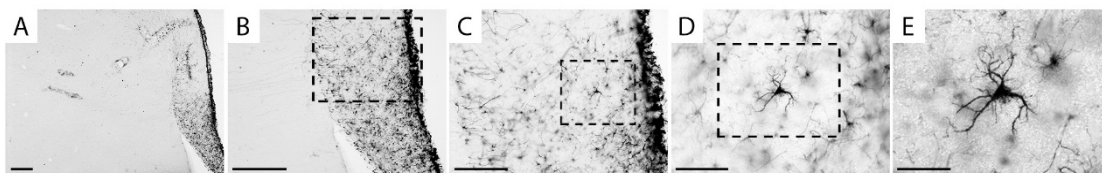


Figura 5. Fotomicrografia da secção cerebral de *C. pusilla* capturado na linha costeira de Bragança, Pará, Brasil, para ilustrar um astrócito estrelado a partir da matéria cinzenta da região V do hipocampo. Barras de escala: A = 250 μm , B = 250 μm , C = 120 μm , D = 60 μm e E = 25 μm .

Usando este procedimento, encontramos duas outras morfologias distintas imunoreagidas para GFAP na formação hipocampal de *C. pusilla* que correspondem a glia radial e astrócitos associados a vasos sanguíneos (Figura 6).

A Figura 6 ilustra reconstruções tridimensionais de três morfologias diferentes de astrócitos que podem estar associadas à funções fisiológicas distintas: astrócito radial associado com neurogênese e migração neuronal, astrócito vascular associado à barreira hematoencefálica dentro da unidade neurovascular e astrócito estrelado ligado à rede de astrócitos, à sinapse tripartite com menor conexão aos vasos sanguíneos.

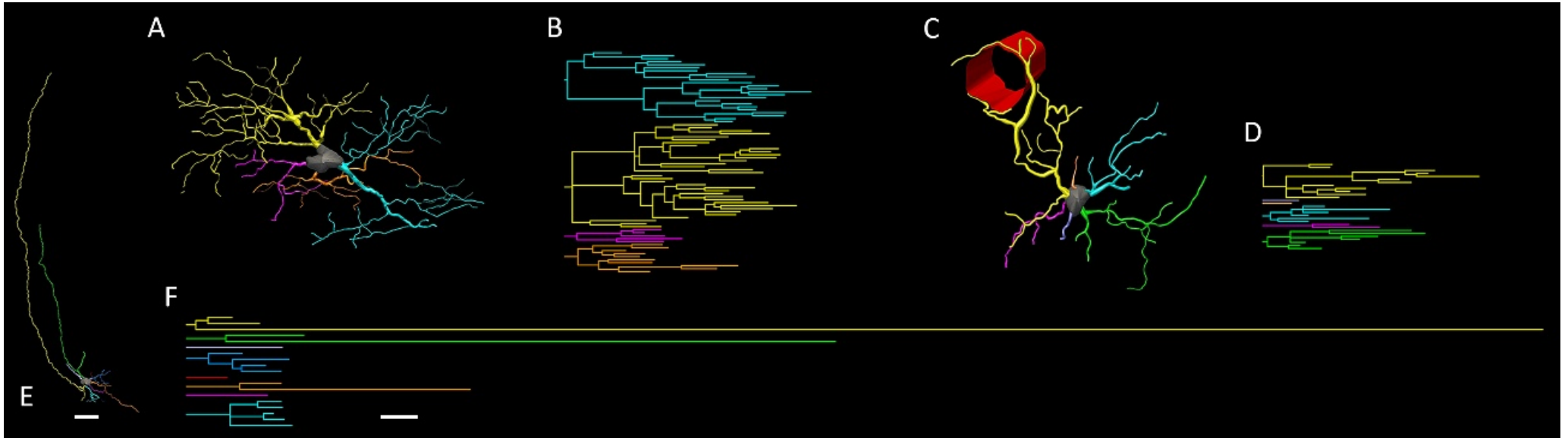


Figura 6. Reconstruções tridimensionais e respectivos dendrogramas de astrócitos estrelados (A e B), vasculares (C e D) e radiais (E e F). Os astrócitos radiais não foram incluídos em nossas amostras. Os dendrogramas foram construídos e analisados com o Neuroexplorer (MicroBrightField). Ramos originados do mesmo tronco parental (ramo primário) são mostrados com a mesma cor. Barras de escala = 10 μm .

Nossa amostra da região parahipocampal de *C. pusilla* submetida à reconstrução tridimensional não incluiu astrócitos radiais. Com base em características morfológicas tridimensionais bimodais ou multimodais ($MMI > 0,55$), buscou-se famílias morfológicas de astrócitos utilizando análise de cluster hierárquico. Independente da origem da amostra (Baía de Fundy - Canadá ou Bragança - Brasil), os resultados mostraram duas famílias de astrócitos designados tipo I e tipo II (Figuras 7 e 8) que exibiram notáveis diferenças em suas complexidades morfológicas. Descrevemos como tipo I os astrócitos que exibiram processos com valores significativamente maiores de complexidade em relação ao tipo II. Em comparação com o tipo II, os astrócitos do tipo I também apresentaram árvores com maior número de ramos, maior densidade dos segmentos/mm, maiores volumes das ramificações, ângulos de ramificação, área de superfície das árvores e maior comprimento total dos ramos. Os astrócitos de tipo I foram morfológicamente mais complexos do que os do tipo II tanto em aves em migração quanto em aves em invernada.

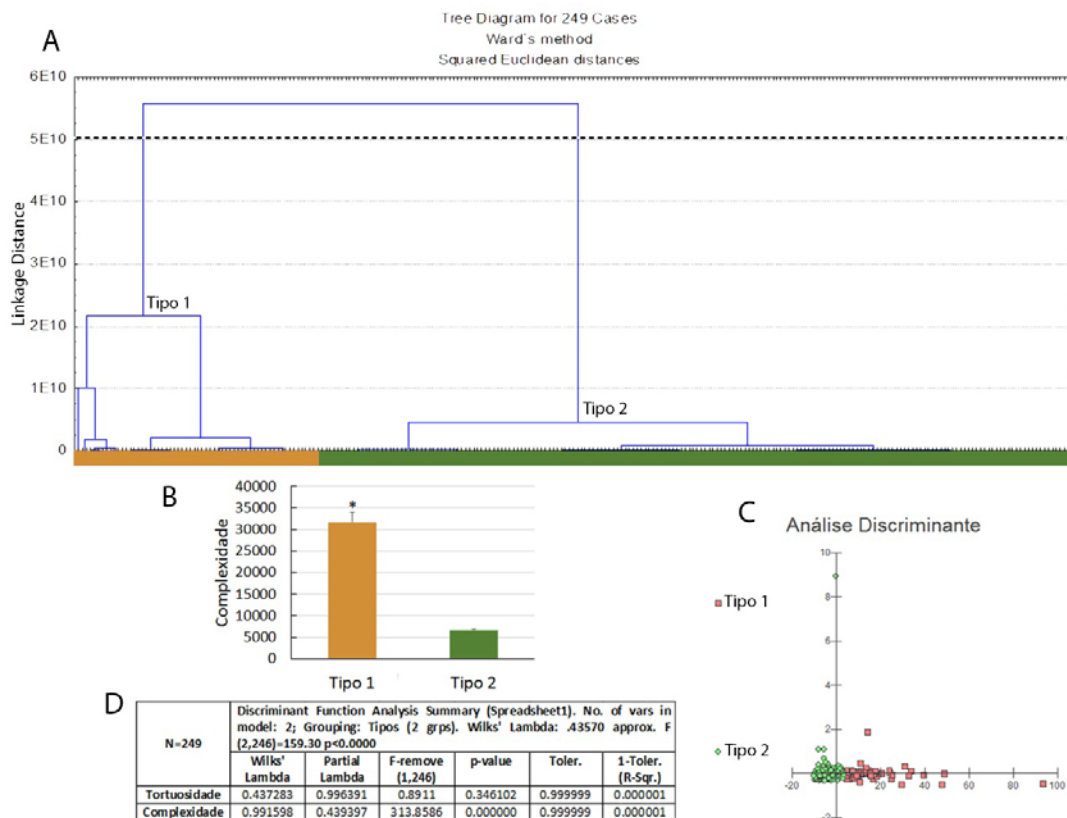


Figura 7. Fenótipos morfológicos de astrócitos na formação hipocampal de aves em migração da espécie *C. pusilla*. Análise discriminante de clusters (Ward's method) após reconstruções tridimensionais de astrócitos de cinco indivíduos. A- Dendrograma de 249 astrócitos indicou dois principais fenótipos morfológicos (tipo I e tipo II). B - Representação gráfica do valor médio da complexidade e correspondentes erros padrão para ilustrar diferença significativa entre os astrócitos de tipo I e tipo II. C- Representação gráfica da análise discriminante. A variável que mais contribuiu para a formação dos agrupamentos foi a complexidade ($p < 0,000000$). O tipo I (quadrados vermelhos) apresentou dispersões X-Y mais elevadas do que os astrócitos do tipo II (círculos verdes). Os astrócitos foram reconstruídos das regiões rostral e caudal da formação hipocampal; A análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais ou pelo menos bimodais dos astrócitos ($MMI > 0,55$).

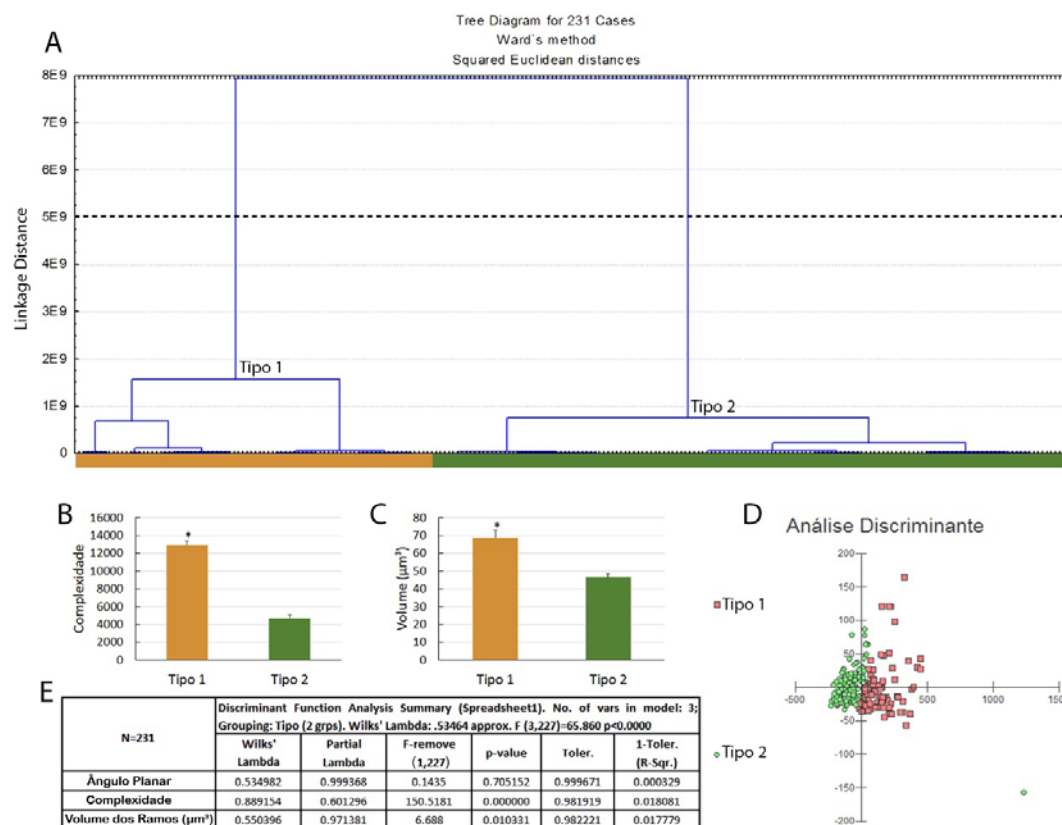


Figura 8. Fenótipos morfológicos de astrócitos na formação hipocampal de aves em invernada da espécie *C. pusilla*. Análise discriminante de clusters (Ward's method) após reconstruções tridimensionais de astrócitos de cinco indivíduos. A- Dendrograma de 231 astrócitos indicou dois principais fenótipos morfológicos (tipo I e tipo II). B e C - Representações gráficas de complexidade e valores médios de volume dos ramos e erros padrão correspondentes para ilustrar diferenças significativas entre os astrócitos do tipo I e do tipo II. D- Representação gráfica da análise discriminante. A variável que mais contribuiu para a formação de cluster foi a complexidade ($p < 0,000000$). O tipo I (quadrados vermelhos) apresentou dispersões X-Y mais elevadas do que os astrócitos do tipo II (círculos verdes). Os astrócitos foram reconstruídos das regiões rostral e caudal da formação hipocampal; A análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais ou pelo menos bimodais dos astrócitos ($MMI > 0,55$).

Os astrócitos dos tipos I e II revelaram diferenças significativas em muitos outros parâmetros morfológicos quando se compararam astrócitos de indivíduos em migração com aqueles de indivíduos em invernada (Figura 9). De fato, as árvores dos astrócitos do tipo I apresentaram valores significativamente maiores de comprimento total, volumes de ramos e superfícies, número de segmentos, número de vértices, e valores médios de

volume, área, superfície e perímetros do convex-hull. Além disso, os astrócitos do tipo I dos maçaricos em invernada foram, em média, mais tortuosos e apresentaram valores de ângulos planares superiores aos do tipo II. Resultados de testes estatísticos detalhados

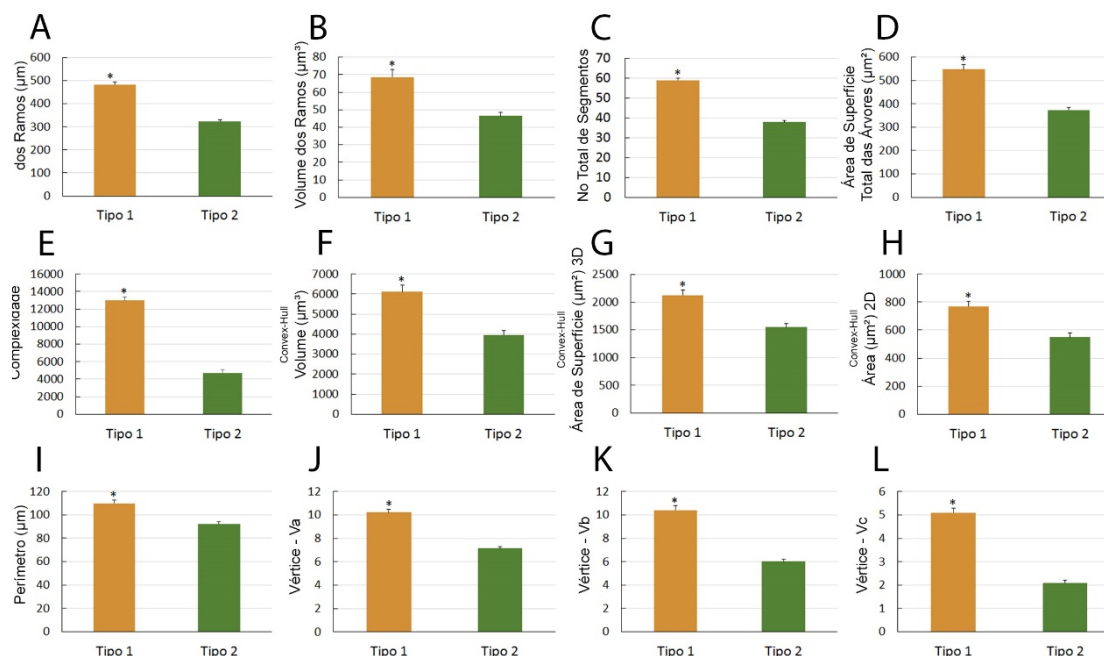


Figura 1543. Morfometria de astrócitos reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de *C. pusilla* capturados na Ilha de Canela, Bragança, Brasil. A - L Representações gráficas de valores médios e erros padrão de 12 parâmetros morfológicos dos astrócitos dos Tipos I e II. As diferenças significativas entre comparações apropriadas são indicadas por um asterisco.

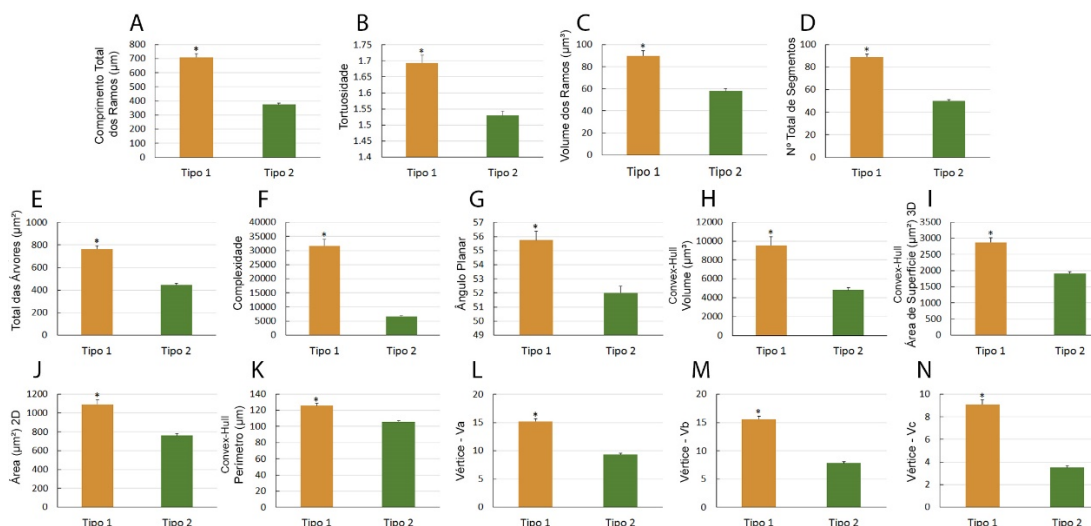


Figura 2567. Morfometria de astrócitos reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de *C. pusilla* capturados na Baía de Fundy, Canadá. A - N, representações gráficas de valores médios e erros padrão de 14 parâmetros morfológicos dos astrócitos Tipos I e II. As diferenças significativas entre comparações apropriadas são indicadas por um asterisco.

para comparações entre variáveis morfométricas de astrócitos de secções hipocampais de aves em migração e em invernada, consulte a Tabela S1 (Anexo 1).

Similarmente os astrócitos dos indivíduos em migração revelaram diferenças significativas nos valores médios de 14 variáveis morfométricas de astrócitos reconstruídos e classificados como pertencendo aos tipos I e II revelando a mesma tendência apresentada pelos astrócitos dos indivíduos em invernada. Ou seja astrócitos do tipo I são mais ramificados, tem maior comprimento total, são mais tortuosos, apresentam maior volume e número de ramos, tem ângulos planares maiores e maior convex hull perímetro, área, superfície da área e volume do que os astrócitos do tipo II (Fig. 10).

Embora em diferentes proporções, os astrócitos dos tipos I e II da formação hipocampal de aves em migração, apresentaram maior complexidade morfológica do que os astrócitos correspondentes do tipo I e II de aves em invernada (Figura 11). De fato, os astrócitos tipo I de aves em migração são, em média, 2,4 vezes mais complexos do que os astrócitos tipo I do grupo em invernada, enquanto os astrócitos do tipo II do grupo em

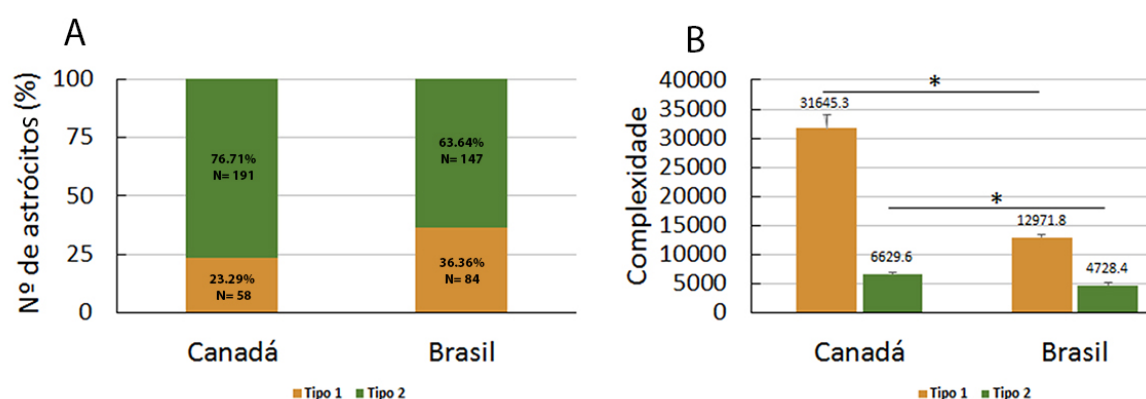


Figura 3591. Representações gráficas do número proporcional (%) de astrócitos do tipo I e II em aves em migração e em invernada de *C. pusilla* (A) e seus respectivos valores de média e erro padrão da complexidade (B). Note que, em comparação com o tipo I, os astrócitos de tipo 2 são menos complexos, parecem ser menos afetados pelo voo de longa distância e representam uma maior proporção de toda a população, tanto em indivíduos em migração como em aves em invernada

invernada foram apenas 1,4 vezes menos complexas do que o grupo correspondente de astrócitos das aves em migração.

Curiosamente, a proporção de astrócitos de tipo II como percentagem do número total de astrócitos reconstruídos antes (aves em migração) e após o voo de longa distância (aves em invernada), reduziu de 76,7% para 63,6%, mas o número de astrócitos de tipo I aumentou de 23,3% em aves em migração para 36,4% em aves em invernada.

É de salientar o efeito diferencial do voo transatlântico de longa distância sem escalas na complexidade dos astrócitos dos tipos I e II. De fato, a complexidade dos astrócitos de tipo I parece ser muito mais afetada pela jornada transatlântica do que a complexidade dos astrócitos de tipo II e este efeito visível sobre a complexidade, também pode ser detectado em muitas outras características morfológicas (ver Figuras 12 e 13).

As Figuras 12 e 13 exibem representações gráficas do mesmo grupo de animais, agora combinadas para permitir o reconhecimento das diferenças entre famílias morfológicas equivalentes de astrócitos em aves em migração e em invernada. Observe que após o voo de longa distância, os dois tipos de astrócitos I e II encolhem. De fato, as aves em invernada mostram astrócitos com ramos mais curtos, menores valores de áreas e volumes, menor número de vértices e complexidades menores. Uma exceção a esta regra é que, em comparação com as aves em migração, as aves em invernada apresentaram valores médios mais elevados de comprimento de ramo dos astrócitos de tipo II (Figura 13B).

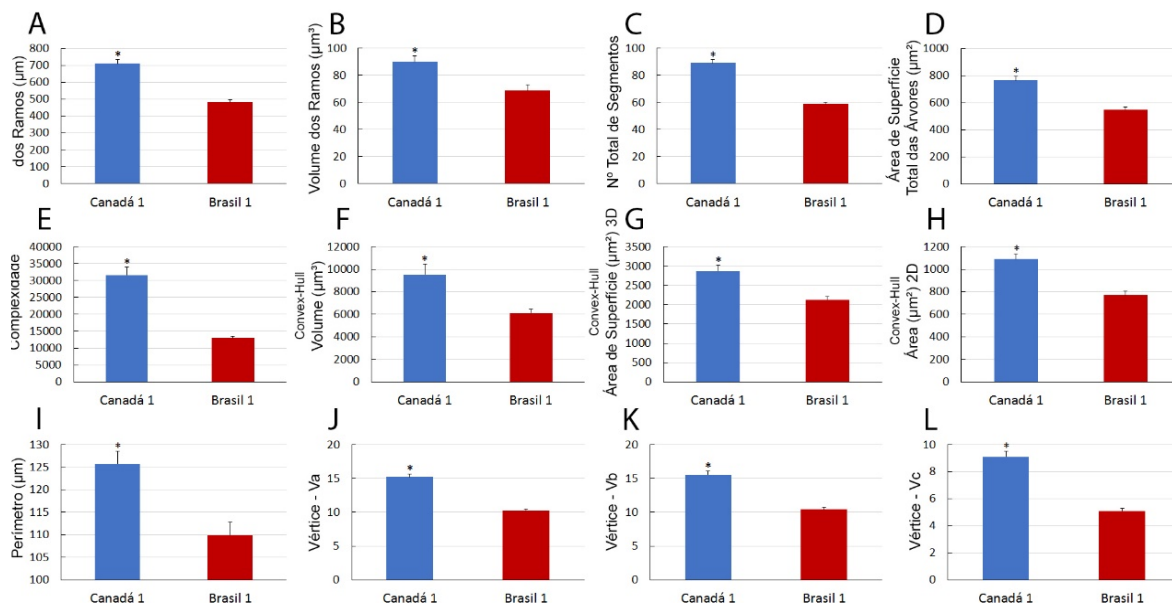


Figura 5639. Morfometria de astrócitos do tipo I reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de *C. pusilla* capturados na Baía de Fundy, no Canadá e Ilha de Canela, Bragança, Brasil. A - L Representações gráficas de valores médios e padrões de erro de 12 parâmetros morfológicos dos astrócitos Tipos I e II. As diferenças significativas entre comparações apropriadas são indicadas por um asterisco.

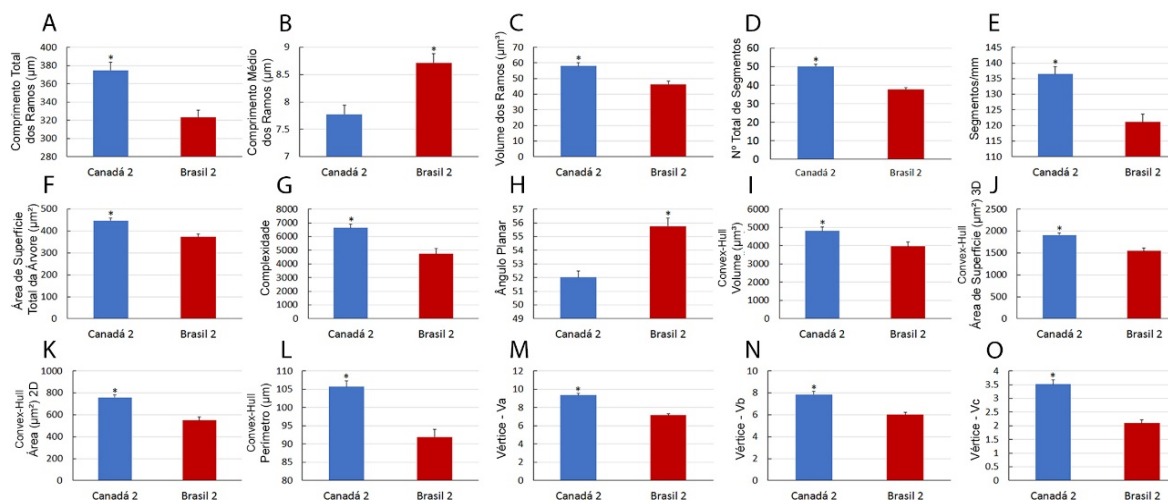


Figura 4615. Morfometria de astrócitos do tipo II reconstruídos tridimensionalmente a partir da formação hipocampal de 5 indivíduos de *C. pusilla* capturados na Baía de Fundy, no Canadá e Ilha de Canela, Bragança, Brasil. A - O. Representações gráficas de valores médios e padrões de erro de 15 parâmetros morfológicos dos astrócitos Tipos I e II. As diferenças significativas entre comparações apropriadas são indicadas por um asterisco.

A Figura 14 exibe reconstruções microscópicas 3D para ilustrar o impacto do voo transatlântico sobre as morfologias dos astrócitos. Células reconstruídas em 3D foram

selecionadas para mostrar características morfométricas mais próximas dos valores médios dos astrócitos dos tipos I e II de aves em migração e em invernada. Torna-se evidente a partir das reconstruções em 3D e dos dendrogramas correspondentes que, em geral, todos os astrócitos antes do voo transatlântico são, em média, muito mais ramificados do que aqueles reconstruídos após o voo migratório de longa distância. Também é evidente que os efeitos do voo de longa distância na morfologia dos astrócitos tipo I são muito mais intensos do que nos do tipo II.

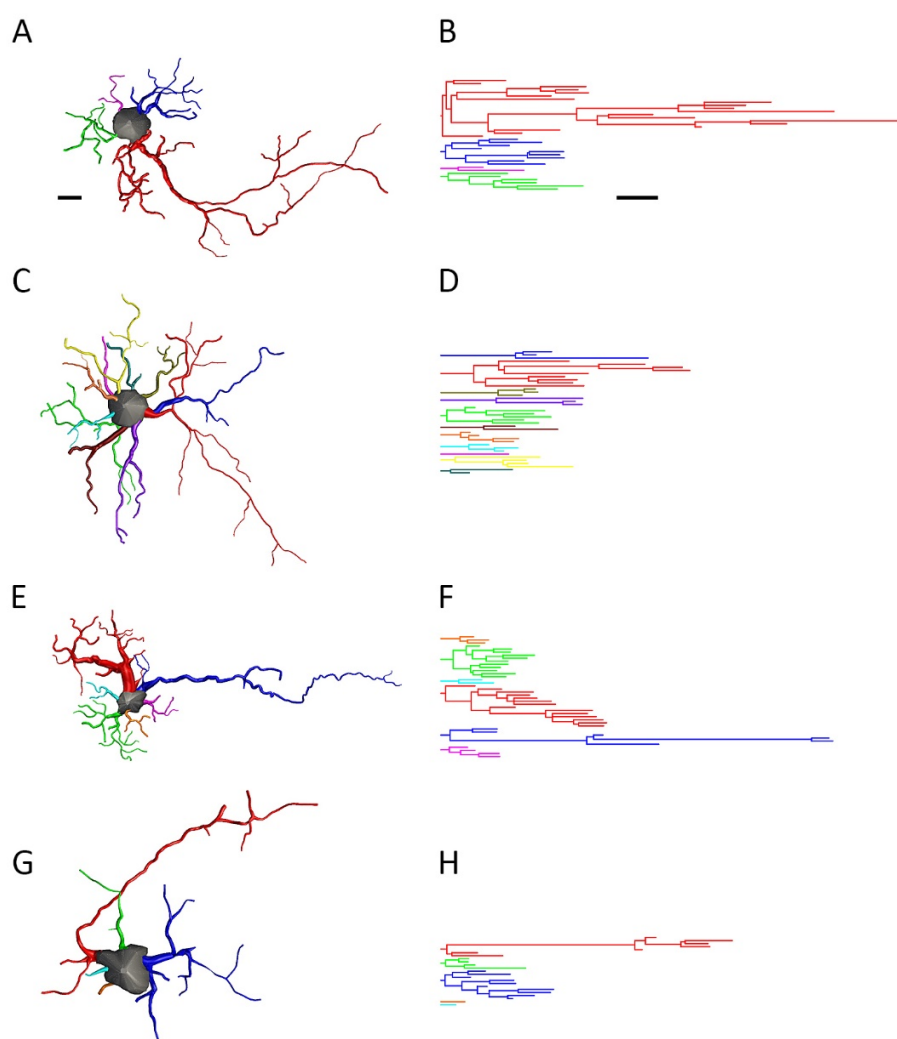


Figura 6663. Reconstruções tridimensionais e respectivos dendrogramas de astrócitos da formação hipocampal do tipo I (A e B) e tipo II (C e D) de animais em período de migração e do tipo I (E e F) e tipo II (G e H) de indivíduos em período de invernada. Os dendrogramas foram construídos e analisados com o Neuroexplorer (MicroBrightField). Ramos originados do mesmo tronco parental (ramo primário) são mostrados com a mesma cor. Quando comparado aos dos indivíduos em migração, os astrócitos dos indivíduos em invernada mostram retração significativa de seus ramos. Barras de escala = 10 μm .

5. DISCUSSÃO

O hipocampo das aves parece ser essencial para a integração de informações espaciais multisensoriais para a navegação e os astrócitos parecem em situação adequada para contribuir para essa tarefa, respondendo às demandas da atividade sináptica e do metabolismo neuronal. Neste trabalho medimos o impacto do voo transatlântico ininterrupto da espécie *C. pusilla*, sobre a morfologia detalhada dos astrócitos, comparando parâmetros morfométricos médios obtidos a partir de reconstruções tridimensionais da formação hipocampal de aves em migração com aqueles de aves em invernada. Com base na análise hierárquica de cluster utilizando parâmetros morfométricos classificamos os astrócitos em dois grupos designados tipo I e tipo II, e descobrimos que a complexidade foi a característica morfométrica que mais contribuiu para a formação dos agrupamentos.

Além disso, em comparação com o tipo I, tornou-se aparente que os astrócitos de tipo II foram menos afetados pelo voo transatlântico, sugerindo que eles podem ter papéis fisiológicos e suscetibilidade distintas a influências de voos ininterruptos de longa distância. Como a maioria dos astrócitos do tipo II mostraram maior proximidade com vasos sanguíneos cerebrais (72,5%) do que o tipo I (27,5%), sugerimos que os astrócitos do tipo II podem contribuir em maior proporção para a unidade neurovascular e, como tal, podem ter níveis mais elevados de proteção bioenergética e atividade redox para sustentar a atividade e a sobrevivência neuronal durante o voo transatlântico sem parada.

5.1 A estrutura morfológica dos astrócitos do tipo II parece menos vulnerável aos efeitos do voo transatlântico ininterrupto.

Como a análise hierárquica de cluster aplicada às características morfológicas dos astrócitos da formação hipocampal, antes e depois do voo de longa distância, revelou similarmente dois fenótipos morfológicos diferentes, sugerimos que os fenótipos morfológicos menos complexos encontrados após o voo de longa distância poderiam representar fenótipos alterados da mesma família original encontrada em indivíduos capturados na Baía de Fundy. Para verificar essa sugestão, estimamos quantos astrócitos reconstruídos de indivíduos capturados no Brasil exibiram inequivocamente conexão com vasos sanguíneos e identificamos a qual classe morfológica de astrócitos pertenciam. Descobrimos correspondentemente que a maioria dos astrócitos do tipo II de indivíduos capturados no período de invernada estavam conectados a vasos sanguíneos e preservados em maior proporção em sua morfologia original do que os astrócitos do tipo I. Além disso, para investigar se todos os astrócitos do tipo I tiveram sua complexidade reduzida depois que os indivíduos atravessaram o Oceano Atlântico, decidimos aplicar a análise hierárquica de cluster a toda a amostra de astrócitos reconstruídos de indivíduos capturados no Brasil, incluindo agora outliers previamente removidos. Encontrou-se uma pequena população de astrócitos (menos de 8%, $N = 19$) nos indivíduos capturados no Brasil, mostrando, em média, complexidades morfológicas como aquelas dos astrócitos de tipo I de indivíduos capturados antes do voo transatlântico (Figura 15).

Sugerimos que estes astrócitos tipo III que constituem cerca de 8% do total, encontrados em aves em período de invernada, apresentando uma complexidade similar à encontrada nos astrócitos de tipo I de aves em migração, são de fato astrócitos de tipo I que foram menos afetados pelo voo de longa duração. (Ver astrócitos do tipo III na Figura 15). De modo semelhante, os volumes de ramificação médios dos astrócitos do tipo III da

formação hipocampal de aves em invernada, mostraram volumes bastante semelhantes ao volume dos ramos do astrócitos do tipo I de aves em migração (Tabela 1, Figura 16).

Tabela 1. Valores absolutos e percentuais de astrócitos com interação dos vasos sanguíneos na formação hipocampal de *C. pusilla*.

	Aves em Migração		Aves em Invernada	
	Total N= 105		Total N= 77	
	N	%	N	%
Tipo 1	21	20	27	35
Tipo 2	84	80	41	53
Tipo 3	-	-	9	12

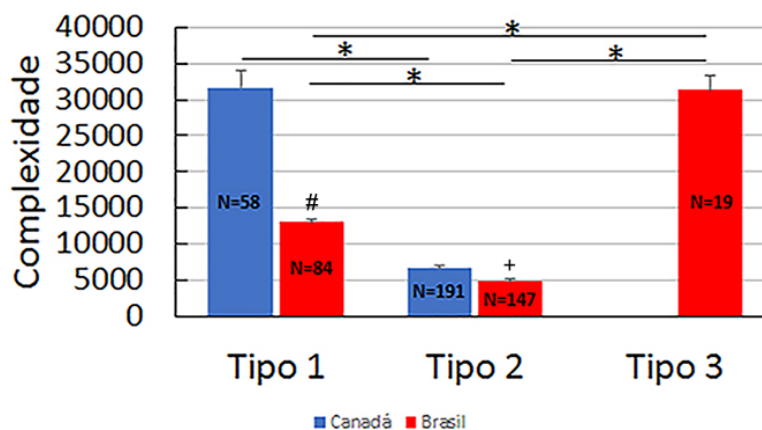


Figura 7687. Influências do voo transatlântico sobre a complexidade dos astrócitos da formação hipocampal de *C. pusilla*. Note que os astrócitos do tipo III de aves em invernada e os astrócitos do tipo I de aves em migração apresentam complexidades morfológicas semelhantes. (*) Indica diferenças significativas dentro de cada grupo morfológico. (# Ou +) indicam diferenças significativas entre os astrócitos do hipocampo das aves em invernada e em migração.

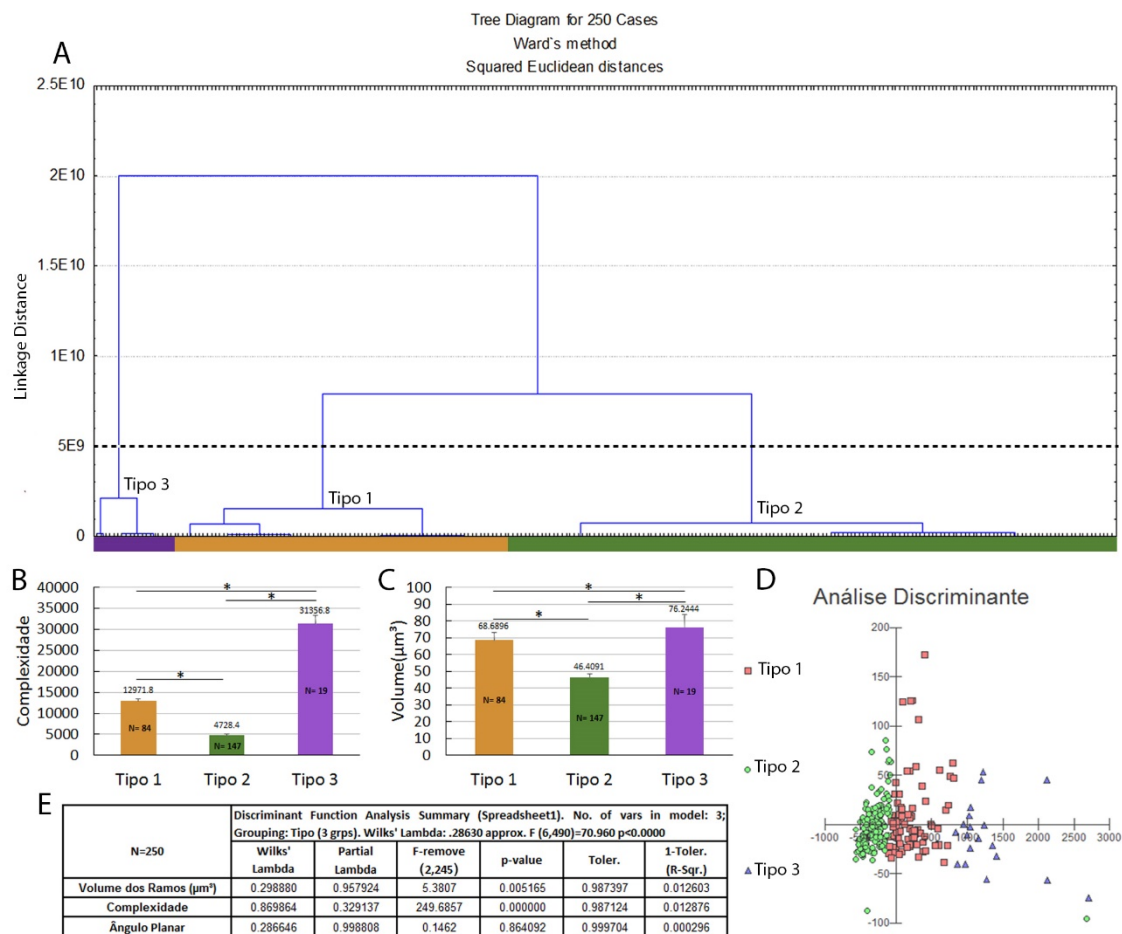


Figura 8711. Fenótipos morfológicos de astrócitos na formação hipocampal de aves em invernada de *C. pusilla*. Análise discriminante de clusters (Ward's method) após reconstruções tridimensionais de astrócitos de cinco indivíduos. A- Dendrograma de 250 astrócitos indicou três principais fenótipos morfológicos (tipo I, tipo II e tipo III). B e C - Representações gráficas de complexidade e valores médios de volume dos ramos com respectivos erros padrão para ilustrar diferenças significativas entre os fenótipos morfológicos de astrócitos de indivíduos capturados antes (Aves em Migração) e após (Aves em Invernada) o voo transatlântico de longa distância. D- Representações gráficas da análise discriminante. A variável que mais contribuiu para a formação de cluster foi a complexidade ($p < 0,000000$). O tipo III (triângulos roxos) apresentou dispersão ao longo do eixo X mais elevada do que os dos tipos I e II, o tipo I (quadrados vermelhos) apresentou dispersão X-Y mai elevada do que os astrócitos do tipo II (círculos verdes). O tipo III por sua vez apresentou dispersão no eixo Y menor do que o tipo I. Os astrócitos foram reconstruídos das regiões rostral e caudal da formação hipocampal; a análise de agrupamento baseou-se em características morfométricas multimodais ou pelo menos bimodais ($MMI > 0,55$). Note que o pequeno agrupamento (19 células) dos astrócitos do tipo III estava ausente quando os outliers foram retirados da amostra.

5.2 Possíveis implicações do voo non-stop de *C. pusilla*, sobre o Oceano Atlântico, na fisiologia dos astrócitos do hipocampo.

Dado que os astrócitos do tipo II interagem com os vasos sanguíneos em maior proporção do que o tipo I, tanto nas aves em migração como nas aves em invernada, e

porque esta interação pode ser uma indicação de que a sua contribuição para a unidade neurovascular pode ser mais frequente (72,5%) que a do tipo I (27,5%), levantamos a hipótese de que o astrocito do tipo II poderia estar envolvido na barreira hematoencefálica. Ver os astrócitos dos tipos I e II na Figura 17 que ilustra a unidade neurovascular. A barreira hematoencefálica inclui células endoteliais microvasculares (dos capilares sanguíneos cerebrais), astrócitos, neurônios e pericitos que juntos contribuem para formar a unidade neurovascular (Figura 17, adaptada de (Mcconnell *et al.*, 2017)).

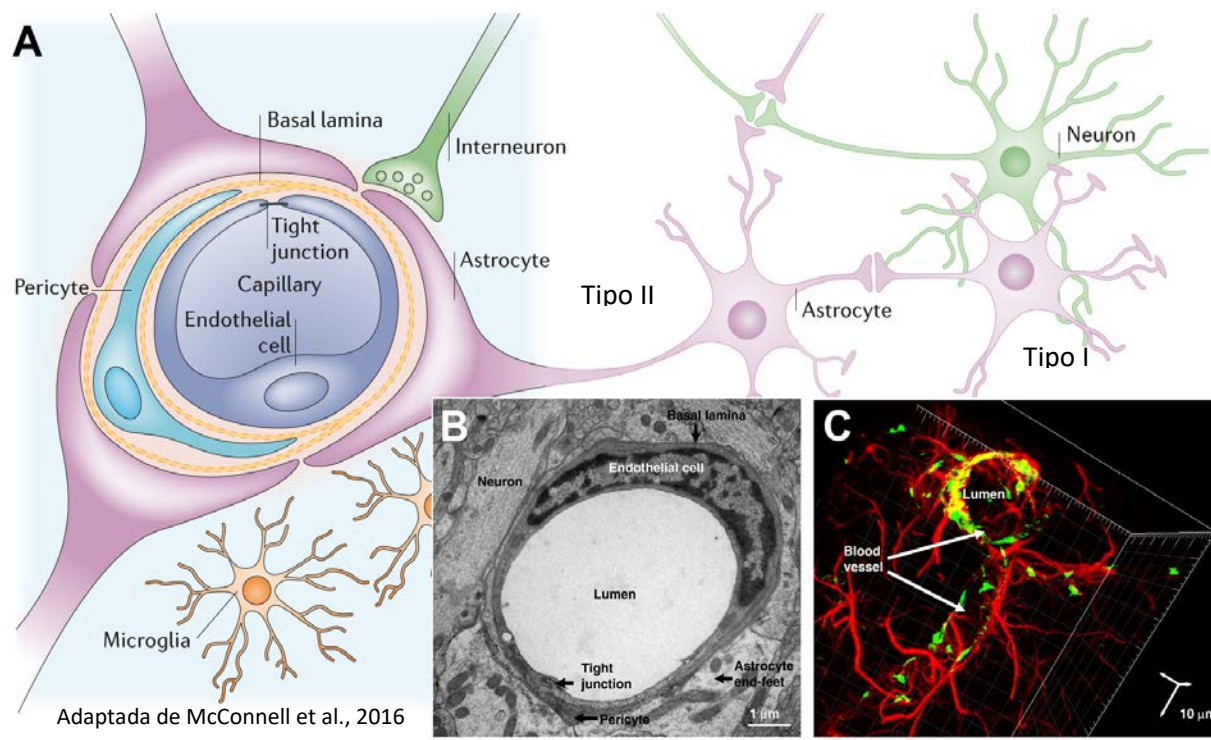


Figura 9223. Estrutura anatômica de uma unidade neurovascular (UNV) identificando astrócitos dos tipos I e II. Os astrócitos do tipo II contribuem para a formação da barreira hematoencefálica enquanto que os astrócitos do tipo I que não contribuem para a formação da barreira, estendem processos que se comunicam com outros astrócitos formando redes que propagam sinais a longa distância, tanto quanto se comunicam com outros neurônios e sinapses. Durante a neurotransmissão ocorre ativação de receptores de glutamato em astrócitos e neurônios e em seguida ocorre captação de glutamato pelos astrócitos, um processo ativo dependente de glicólise para a qual os astrócitos expressam todas as enzimas necessárias. O lactato derivado da via glicolítica astrocítica é usado pelos neurônios como fonte de energia. **A)** Representação esquemática de secção cruzada capilar para ilustrar características importantes de uma unidade neurovascular isolada incluindo células endoteliais (Endothelial cell) nos capilares cerebrais; junções cerradas (Tight junction) entre células endoteliais, restringindo a difusão entre a luz do vaso e a lâmina basal (difusão paracelular); lâmina basal/membrana basal (basal lamina/basal membrane) contínua em torno da célula endotelial. Pericito (Pericyte) envolto pela matriz situada entre as células endoteliais e o pé terminal (Astrocyte) do astrócitos; os astrócitos são posicionados mais centralmente no parênquima cerebral (a uma certa distância do vaso). Esses astrócitos estendem processos que se comunicam com neurônios locais (Neuron) e sinapses, tanto quanto estendem pés terminais que envolvem vasos. Assim os astrócitos estão localizados de forma a atender às demandas vasculares e neuronais. Micróglias residentes com seus longos processos monitoram o microambiente e podem responder rapidamente a alterações induzidas nas vizinhanças ou na própria UNV. Interneurônios de circuitos local inervam os vasos cerebrais e podem induzir mudanças no tônus vascular, a partir de sinais aferentes que os modulam. **B)** Micrografia eletrônica de transmissão de uma secção cruzada de um capilar do cérebro de rato ilustrando a luz do vaso (Lumen), junção cerrada (Tight junction), célula endotelial (Endothelial cell), pericito (Pericyte), pé terminal de um astrócito (Astrocyte end-feet), lâmina basal e um fragmento de um neurônio (Neuron). **C)** Reconstrução tridimensional de imagens de imunofluorescência de uma unidade neurovascular obtidas com microscópio confocal ilustrando células endoteliais (em verde) sendo envolvidas por ramos de astrócito imunorreativo para GFAP (vermelho); a parede do vaso é indicada pelas setas (Blood vessel). Figura adaptada de (McConnell *et al.*, 2017).

Se os astrócitos do tipo II estiverem efetivamente envolvidos na unidade neurovascular em proporções mais elevadas do que os astrócitos do tipo I, seria de esperar que a sua integridade fosse um elemento essencial para manter intacta a barreira hematoencefálica (BBB). Na verdade, esta barreira física e metabólica entre o sangue e o cérebro faz parte do controle da polaridade do fluxo sanguíneo pelos astrócitos sobre as arteríolas, em resposta à demanda bioenergética (Gordon *et al.*, 2008). Para garantir a sua integridade, sugerimos que os astrócitos de tipo II podem aumentar os níveis de atividade redox através de vias metabólicas alternativas para manter a BBB e controlar o fluxo sanguíneo, sustentando os requisitos basais para a atividade neuronal e sobrevivência, durante o voo transatlântico sem paradas. Durante 2 a 3 dias de jejum associado voo transatlântico longo, quando a glicose é insuficiente, espera-se que o cérebro, aumente o metabolismo de corpos cetônicos e isso pode impor demanda intensa aos astrócitos para absorver, sintetizar e liberar ácidos graxos. Esta é uma fonte alternativa de energia que pode ser liberada como β -hidroxibutirato (β OHB), um corpo cetônico fornecido a outras células cerebrais como um combustível, e isso inclui o próprio astrócito, neurônios e oligodendrócitos (Achanta e Rae, 2017). De fato, demonstrou-se que sob concentração sanguínea mais elevada (como poderia ser esperado durante o período de jejum associado ao voo transatlântico), o β OHB pode suprir todas as necessidades basais e cerca de metade de toda a energia necessária para a atividade neuronal (Chowdhury *et al.*, 2014). Como o β OHB reduz as espécies reativas de oxigênio associadas à bioenergética mitocondrial, sugerimos que o astrócito neurovascular de tipo II poderia ser um forte candidato através do qual a via alternativa dos corpos cetônicos é altamente expressa em associação com o período de jejum imposto pelo voo longo sobre o Oceano Atlântico. No entanto, uma vez que esta via alternativa não suporta a atividade sináptica (Arakawa *et al.*, 1991) sugerimos que a energia necessária à atividade sináptica poderia ser provida pelo menos em parte

através da atividade dos astrócitos de tipo I. De fato, durante a neurotransmissão, o glutamato da fenda sináptica ativa seus receptores nos neurônios e nos astrócitos, antes da recaptação por astrócitos e este é um mecanismo que envolve custo de energia. Embora o mecanismo detalhado usado pelos astrócitos para a captação de glutamato seja atualmente controverso, tem sido demonstrado que os astrócitos armazenam glicogênio, particularmente em áreas de alta atividade sináptica e lactato derivado de glicogênio, podendo sustentar a atividade neuronal especialmente durante a hipoglicemia (Bolaños, 2016). Tomando esses achados em conjunto, especulamos que estas vias metabólicas distintas de astrócitos serão ativadas diferencialmente em astrócitos tipo I e tipo II, induzindo diferentes níveis de estresse oxidativo. De forma interessante mais de 50% dos astrócitos do tipo III (9 em 19) do grupo de indivíduos em invernada, com complexidade semelhante à dos astrócitos tipo I do grupo em migração, estavam inequivocamente conectados aos vasos sanguíneos (Tabela 2).

5.3 Limitações e Contribuições do Estudo

Infelizmente o presente trabalho enfrenta limitações severas no que concerne a informações prévias acerca da fisiologia e morfologia dos astrócitos das aves marinhas migratórias o que impede maiores especulações acerca da contribuição relativa dessas células para a função sináptica durante a migração. De fato, literalmente nada é conhecido acerca da morfologia e fisiologia dos astrócitos e sua contribuição para a migração em pássaros o que torna este ensaio uma referência importante para esse domínio.

Nenhum relato descreveu alterações astrogliais em aves costeiras após voos sem parada de longa distância e nenhuma reconstrução tridimensional de astrócitos foi feita empregando abordagem amostral aleatória e sistemática para quantificar tais alterações.

Neste trabalho comparamos as morfologias 3D dos astrócitos de aves em migração e em invernada, usando análise hierárquica de cluster para classificar as células e descobrimos dois diferentes fenótipos morfológicos, que foram diferencialmente afetados pelo voo transatlântico de longa distância sem paradas. Ambos os fenótipos encolheram os ramos ainda que em diferentes proporções. Devido a estes impactos diferenciais sobre os astrócitos da formação hipocampal de aves em migração e em invernada, sugerimos papéis fisiológicos distintos para estas células. Embora a evidência no presente relatório seja indireta e este estudo seja explicitamente correlacional, ele fornece a oportunidade de formular hipóteses sobre as relações entre as alterações morfológicas dos astrócitos e a migração de longa distância em aves costeiras. Na verdade, uma variedade de outros estudos demonstram que o modelo forma-função é pelo menos um bom ponto de partida para investigar possíveis influências de fatores multivariados que afetam a morfologia e a função celular. Estimula novas pesquisas dedicadas a investigar os mecanismos subjacentes das alterações morfológicas e antecipa possíveis implicações fisiológicas das mudanças morfológicas.

As reconstruções microscópicas 3D podem ser influenciadas por fatores mecânicos associados ao corte em vibrátomo e ao procedimento de desidratação, o que pode induzir uma retração não uniforme no eixo z das secções (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007). Assim, as estimativas das modificações nas dimensões x/y durante o processamento do tecido não podem ser extrapoladas linearmente para a dimensão z. Essas dificuldades metodológicas impõem limitações que devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados do presente estudo. No entanto, uma indicação confiável de encolhimento severo no eixo z é o encurvamento de ramos, sugerindo que os processos individuais não encolheram na mesma taxa que a fatia em que estavam localizados. Estes efeitos tendem a ser de maior amplitude na superfície da

secção, diminuindo em profundidade ao longo do eixo z. Este padrão, no entanto, não foi observado em astrócitos que foram reconstruídos neste estudo. Além disso, tomamos nossas amostras da região média do eixo z, onde o impacto dessas mudanças deve ser menor. Mais recentemente, tem sido demonstrado que no eixo z (perpendicular à superfície de corte), as secções, após a desidratação, encolhem cerca de 75% da espessura original do corte (Carlo e Stevens, 2011). Com base nessas descobertas, todas as reconstruções de astrócitos do presente trabalho foram corrigidas para o encolhimento do eixo z. Não foram aplicadas correções aos eixos X / Y, uma vez que se espera que estas dimensões não se alterem após a desidratação.

Outra limitação é que não foram realizados procedimentos estereológicos para estimar o número total de cada tipo de astrócito. No entanto, como os critérios utilizados para selecionar os astrócitos da formação hipocampal de *C. pusilla*, para reconstruções tridimensionais, foram sistematicamente cegos e randomizados, e o número de elementos selecionados para reconstrução foi bastante grande (499 no total, 250 de indivíduos em invernada e 249 de aves em migração), é razoável supor a priori, que não foi induzido nenhum viés amostral.

6. CONCLUSÕES

Era objetivo do presente trabalho caracterizar as mudanças na morfologia dos astrócitos da formação hipocampal do maçarico semipalmado *C. pusilla* durante e após a migração transatlântica para os sítios de invernada. Empregando técnica amostral aleatória e sistemática, sem viés, para selecionar os astrócitos da formação hipocampal para reconstrução tridimensional, assim como estatística multivariada para classificar as células morfologicamente e encontramos dois fenótipos morfológicos designados tipo I e tipo II. Da análise comparativa das variáveis morfométricas usada na classificação

morfológica, e dos testes estatísticos aplicados para detecção de diferenças na morfologia dos astrócitos dos indivíduos em fase de migração e em invernada, descobrimos que em comparação aos astrócitos do tipo II, os do tipo I tem sua morfologia mais vulnerável ao voo transatlântico. A identificação da forte relação dos astrócitos tipo II com vasos sanguíneos (72,5%) em comparação com a menor ocorrência encontrada nos astrócitos tipo I (27,5%) nos fez sugerir que participação dos astrócitos do tipo II na unidade neurovascular é maior do que aquela do tipo I e que isso pode cerca-lo de proteção antioxidante adicional explicando pelo menos em parte, sua maior preservação.

7. REFERÊNCIAS

- Achanta, L. B. & C. D. Rae (2017) β -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. *Neurochem Res*, 42, 35-49.
- Allen, T. A. & N. J. Fortin (2013) The evolution of episodic memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 Suppl 2, 10379-86.
- Amaral, D. G. (1993) Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr Opin Neurobiol*, 3, 225-9.
- Arakawa, T., T. Goto & Y. Okada (1991) Effect of ketone body (D-3-hydroxybutyrate) on neural activity and energy metabolism in hippocampal slices of the adult guinea pig. *Neurosci Lett*, 130, 53-6.
- Ariens-Kappers, Huber & Crosby (1936) The comparative anatomy of the nervous system of the vertebrates, including man. *New York: Macmillan*.
- Atoji, Y. & J. M. Wild (2006) Anatomy of the avian hippocampal formation. *Rev Neurosci*, 17, 3-15.
- . 2007. Limbic system in birds: morphological basis. In *Integration of Comparative Neuroanatomy and Cognition*, eds. S. Wantanabe & M. A. Hofman, 97-123. Tokyo: Keio University Press.
- Barres, B. A. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60, 430-40.
- Bechmann, I., I. Galea & V. H. Perry (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, 28, 5-11.
- Belgard, T. G., J. F. Montiel, W. Z. Wang, F. García-Moreno, E. H. Margulies, C. P. Ponting & Z. Molnár (2013) Adult pallium transcriptomes surprise in not reflecting predicted homologies across diverse chicken and mouse pallial sectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 13150-5.
- Benowitz, L. I. & H. J. Karten (1976) The tractus infundibuli and other afferents to the parahippocampal region of the pigeon. *Brain Res*, 102, 174-80.
- Bingman, Ioale P, Casini G & B. P. (1988) Hippocampal ablated homing pigeons show a persistent impairment in the time taken to return home. *J Comp Physiol*.
- Bingman & G. Yates (1992) Hippocampal lesions impair navigational learning in experienced homing pigeons. *Behav Neurosci*, 106, 229-32.
- Bolaños, J. P. (2016) Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem*, 139 Suppl 2, 115-125.
- Campbell, C. B. & W. Hodos (1970) The concept of homology and the evolution of the nervous system. *Brain Behav Evol*, 3, 353-67.
- Canfield, S. G., M. J. Stebbins, B. S. Morales, S. W. Asai, G. D. Vatine, C. N. Svendsen, S. P. Palecek & E. V. Shusta (2016) An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Neurochem*.
- Carlo, C. N. & C. F. Stevens (2011) Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. *J Comp Neurol*, 519, 2803-10.
- Chowdhury, G. M., L. Jiang, D. L. Rothman & K. L. Behar (2014) The contribution of ketone bodies to basal and activity-dependent neuronal oxidation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34, 1233-42.
- Crystal, J. D. (2010) Episodic-like memory in animals. *Behav Brain Res*, 215, 235-43.
- Diniz, C., N. Magalhães, A. Sousa, C. Santos Filho, D. Diniz, C. Lima, M. Oliveira, D. Paulo, P. Pereira & D. Sherry (2016a) Microglia and neurons in the hippocampus

- of migratory sandpipers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49.
- Diniz, C. G., N. G. Magalhães, A. A. Sousa, C. Santos Filho, D. G. Diniz, C. M. Lima, M. A. Oliveira, D. C. Paulo, P. D. Pereira, D. F. Sherry & C. W. Picanço-Diniz (2016b) Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Braz J Med Biol Res*, 49, e5005.
- Eikenaar, C., T. Klinner & M. Stöwe (2014) Corticosterone predicts nocturnal restlessness in a long-distance migrant. *Hormones and Behavior*, 66, 324-329.
- Franklin, R.J. & Bussey, T.J. (2013) Do your glial cells make you clever? *Cell Stem Cell*, 12, 265-266.
- Garamszegi, L. Z. & M. Eens (2004) The evolution of hippocampus volume and brain size in relation to food hoarding in birds. *Ecology Letters*, 7, 1216-1224.
- Gibbs, M. E., M. Shleper, T. Mustafa, G. Burnstock & D. N. Bowser (2011) ATP derived from astrocytes modulates memory in the chick. *Neuron Glia Biol*, 7, 177-86.
- Glaser, E. M. & P. D. Wilson (1998) The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. *Journal of Microscopy*, 192, 163-171.
- Glaser, J. R. & E. M. Glaser (2000) Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem Neuroanat*, 20, 115-26.
- Gordon, G. R., H. B. Choi, R. L. Rungta, G. C. Ellis-Davies & B. A. MacVicar (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, 456, 745-9.
- Halassa, M. M., T. Fellin, H. Takano, J. H. Dong & P. G. Haydon (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, 27, 6473-7.
- Hamel, E. (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol (1985)*, 100, 1059-64.
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., Silva, A.J., Takano, T., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (2013) Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, 12, 342-353.
- Healy, S. D., E. Gwinner & J. R. Krebs (1996) Hippocampal volume in migratory and non-migratory warblers: effects of age and experience. *Behav Brain Res*, 81, 61-8.
- Healy, S. D. & J. R. Krebs (1996) Food storing and the hippocampus in Paridae. *Brain, Behavior and Evolution*, 47, 195-199.
- Hoffmann, K. P., F. Bremmer, A. Thiele & C. Distler (2002) Directional asymmetry of neurons in cortical areas MT and MST projecting to the NOT-DTN in macaques. *Journal of Neurophysiology*, 87, 2113-2123.
- Hosseini-Sharifabad, M. & J. R. Nyengaard (2007) Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Methods*, 162, 206-14.
- Jacobs, L. F., S. Gaulin, D. F. Sherry & G. E. Hoffman (1990) Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 6349-6352.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V. & Volterra, A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature neuroscience*, 10, 331-339.
- Kallen, B. (1962) II. Embryogenesis of brain nuclei in the chick telencephalon. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch*, 36, 62-82.

- Kang, K., S. W. Lee, J. E. Han, J. W. Choi & M. R. Song (2014a) The complex morphology of reactive astrocytes controlled by fibroblast growth factor signaling. *Glia*, 62, 1328-44.
- Kang, W., F. Balordi, N. Su, L. Chen, G. Fishell & J. M. Hébert (2014b) Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E2987-95.
- Kolb, H., E. Fernandez, J. Schouten, P. Ahnelt, K. A. Linberg & S. K. Fisher (1994) Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J Comp Neurol*, 343, 370-86.
- Krebs, J. R., D. F. Sherry, S. D. Healy, V. H. Perry & A. L. Vaccarino (1989a) Hippocampal specialization of food-storing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 1388-1392.
- (1989b) Hippocampal specialization of food-storing birds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 1388-92.
- LaDage, L. D., T. C. Roth, R. A. Fox & V. V. Pravosudov (2010) Ecologically relevant spatial memory use modulates hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277, 1071-1079.
- LaDage, L. D., T. C. Roth & V. V. Pravosudov (2011) Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behaviour in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* ssp.). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278, 138-143.
- Landys, M. M., T. Piersma, C. G. Guglielmo, J. Jukema, M. Ramenofsky & J. C. Wingfield (2005) Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. *Proc Biol Sci*, 272, 295-302.
- Landys-Ciannelli, M. M., M. Ramenofsky, T. Piersma, J. Jukema, J. C. Wingfield & C. R. Group (2002) Baseline and stress-induced plasma corticosterone during long-distance migration in the bar-tailed godwit, *Limosa lapponica*. *Physiol Biochem Zool*, 75, 101-10.
- Lucas, J. R., A. Brodin, S. R. de Kort & N. S. Clayton (2004) Does hippocampal size correlate with the degree of caching specialization? *Proceedings of the Royal Society London B*, 271, 2423-2429.
- Mathiisen, T. M., K. P. Lehre, N. C. Danbolt & O. P. Ottersen (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58, 1094-103.
- McCaslin, A. F., B. R. Chen, A. J. Radosevich, B. Cauli & E. M. Hillman (2011) In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31, 795-806.
- McConnell, H. L., C. N. Kersch, R. L. Woltjer & E. A. Neuwelt (2017) The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *J Biol Chem*, 292, 762-770.
- McKenna, M. C., M. H. Stridh, L. F. McNair, U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen & A. Schousboe (2016) Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. *J Neurosci Res*, 94, 1561-1571.
- Medina, L. & A. Abellán (2009) Development and evolution of the pallium. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 698-711.
- Mettke-Hofmann, C. (2017) Avian movements in a modern world: cognitive challenges. *Anim Cogn*, 20, 77-86.
- Mettke-Hofmann, C. & E. Gwinner. 2003a. Long-term memory for a life on the move. 5863-5866.
- (2003b) Long-term memory for a life on the move. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5863-6.

- Morrison, R. 1984. Migration systems of some New World shorebirds. In *Shorebirds: migration and foraging behaviour.*, eds. J. Burger & B. Olla, 125-202. New York, New York, USA: Plenum Press.
- Mouritsen, H., D. Heyers & O. Güntürkün (2016) The Neural Basis of Long-Distance Navigation in Birds. *Annu Rev Physiol*, 78, 133-54.
- Nadel, J. O. K. L. (1978) The Hippocampus as a Cognitive Map *Oxford University Press*.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, 29, 3276-3287.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S. & Nedergaard, M. (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, 29, 547-553
- O'Keefe, J. & J. Dostrovsky (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34, 171-5.
- O'Reilly, K. M. & J. C. Wingfield (2003) Seasonal, age, and sex differences in weight, fat reserves, and plasma corticosterone in Western sandpipers. *Condor*, 105, 13-26.
- Papouin, T., J. Dunphy, M. Tolman, J. C. Foley & P. G. Haydon (2017) Astrocytic control of synaptic function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372.
- Pearson-Leary, J., D. M. Osborne & E. C. McNay (2015) Role of Glia in Stress-Induced Enhancement and Impairment of Memory. *Front Integr Neurosci*, 9, 63.
- Petzold, G. C. & V. N. Murthy (2011) Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron*, 71, 782-97.
- Piersma, T., J. Reneerkens & M. Ramenofsky (2000) Baseline corticosterone peaks in shorebirds with maximal energy stores for migration: a general preparatory mechanism for rapid behavioral and metabolic transitions? *General and comparative endocrinology*, 120, 118-126.
- Piersma, T., D. I. Rogers, P. M. González, L. Zwarts, L. J. Nilas, I. de Lima Serrano do Nascimento, C. Minton & A. Baker (2005) Fuel storage rates before northward flights in Red Knots worldwide. *Birds of Two Worlds: the ecology and evolution of migration*, 262-273.
- Puelles, L. (2001) Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 1583-98.
- Raefsky, S. M. & M. P. Mattson (2017) Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. *Free Radic Biol Med*, 102, 203-216.
- Rancillac, A., J. Rossier, M. Guille, X. K. Tong, H. Geoffroy, C. Amatore, S. Arbault, E. Hamel & B. Cauli (2006) Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J Neurosci*, 26, 6997-7006.
- Robinson, M. B. & J. G. Jackson (2016) Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int*, 98, 56-71.
- Rodríguez, J. J., C. Y. Yeh, S. Terzieva, M. Olabarria, M. Kulijewicz-Nawrot & A. Verkhratsky (2014) Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging*, 35, 15-23.
- Roth, T. C., 2nd, D. M. Chevalier, L. D. LaDage & V. V. Pravosudov (2013) Variation in hippocampal glial cell numbers in food-caching birds from different climates. *Dev Neurobiol*, 73, 480-5.
- Roth, T. C. & V. V. Pravosudov (2009) Hippocampal volumes and neuron numbers increase along a gradient of environmental harshness: a large-scale comparison. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276, 401-405.

- Sallaz, L., D. Kaczmarek, V. Pons, J. Brunon & P. Seguin (2000) [Chondrosarcoma of the infratemporal fossa with intracranial extension. Case report and review of the literature]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 101, 138-41.
- Saper, C. B. & P. E. Sawchenko (2003) Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 465, 161-3.
- Schwassmann, H. O. (1990) Aspects of retinotectal topography - tectal magnification of specialized retinal areas and a possible center for binocular input. *Journal of Experimental Zoology*, 117-120.
- Schweitzer, L. & W. E. Rehen (1997) The use of cluster analysis for cell typing. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1, 100-8.
- Sherry & A. L. Vaccarino (1989a) Hippocampus and Memory for Food Caches in Black-Capped Chickadees. *Behavioral Neuroscience*, 103, 308-318.
- Sherry, D. F. (2006) Neuroecology. *Annu Rev Psychol*, 57, 167-97.
- (2011) The hippocampus of food-storing birds. *Brain, Behavior and Evolution*, 78, 133-135.
- Sherry, D. F. & A. L. Vaccarino (1989b) Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behavioral Neuroscience*, 103, 308-318.
- Shu, S., G. Ju & L. Fan (1988) The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience letters*, 85, 169-171.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Sonnefeld, U. & A. Schousboe (2016) Introduction to the Glutamate-Glutamine Cycle. *Adv Neurobiol*, 13, 1-7.
- Sweeney, A. M., K. E. Fleming, J. P. McCauley, M. F. Rodriguez, E. T. Martin, A. A. Sousa, R. D. Leapman & A. Scimemi (2017) PAR1 activation induces rapid changes in glutamate uptake and astrocyte morphology. *Sci Rep*, 7, 43606.
- Szekely, A. D. (1999) The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. *Behav Brain Res*, 98, 219-25.
- Venkat, P., M. Chopp & J. Chen (2016) New insights into coupling and uncoupling of cerebral blood flow and metabolism in the brain. *Croat Med J*, 57, 223-8.
- Verkhatsky, A., M. Nedergaard & L. Hertz (2015) Why are astrocytes important? *Neurochem Res*, 40, 389-401.
- Weiss, N., F. Miller, S. Cazaubon & P. O. Couraud (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 842-57.
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Guo, M., Tian, G.F., Washco, V., Stanwood, N., Rasband, M., Roy, N.S., Nedergaard, M., Havton, L.A., Wang, S. & Goldman, S.A. (2008) Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell*, 2, 553-565.
- Zorec, R., A. Horvat, N. Vardjan & A. Verkhatsky (2015) Memory Formation Shaped by Astroglia. *Front Integr Neurosci*, 9, 56.

ANEXO 1: Medições morfológicas de reconstruções microscópicas tridimensionais.

	Aves em migração tipo 1 vs tipo 2		Aves em invernada tipo 1 vs tipo 2		Em migração tipo 1 vs. em invernada tipo 1		Em migração tipo 2 vs em invernada tipo 2	
	t / Z(U)	p	t / Z(U)	p	t / Z(U)	p	t / Z(U)	p
Comprimento Total dos Ramos (μm)	Z(U) 10.208	< 0.0001	Z(U) 9.4986	< 0.0001	Z(U) 7.258	< 0.0001	Z(U) 3.6801	0.0002
Comprimento Médio dos Ramos (μm)	t 0.9489	> 0.05	t -1.4847	> 0.05	Z(U) 14.111	> 0.05	t -3.9553	0.0001
Tortuosidade	Z(U) 5.4308	< 0.0001	t -0.1826	> 0.05	Z(U) 0.278	> 0.05	Z(U) 8.2747	< 0.0001
Área de Superfície Média dos Ramos (μm^2)	t -0.8604	> 0.05	Z(U) 1.8502	> 0.05	Z(U) 12.326	> 0.05	t -2.0154	0.046
Volume dos Ramos (μm^3)	t 6.834	< 0.0001	Z(U) 5.180	> 0.05	t 3.311	0.0012	Z(U) 3.991	< 0.0001
Diâmetro da Base dos Ramos Primários (μm)	t -3.608	0.0004	t -1.864	> 0.05	t -2.911	0.0042	t -1.629	< 0.0001
Nº Total de Segmentos	t 15.7542	< 0.0001	t 14.8622	< 0.0001	Z(U) 87.237	< 0.0001	Z(U) 7.5028	< 0.0001
Segmentos/mm	t -1.538	> 0.05	t 1.103	> 0.05	t 0.649	> 0.05	t 4.272	< 0.0001
Nº de Árvores	Z(U) 2.804	0.005	t -2.1143	0.0365	t 14.777	> 0.05	Z(U) 4.1466	< 0.0001
Área de Superfície Total das Árvores (μm^2)	Z(U) 8.7447	< 0.0001	Z(U) 7.2698	< 0.0001	t 63.096	< 0.0001	Z(U) 4.1247	< 0.0001
Complexidade	Z(U) 11.5298	< 0.0001	t 13.6678	< 0.0001	Z(U) 93.836	< 0.0001	t 3.9988	< 0.0001
Ângulo Planar	Z(U) 4.6877	< 0.0001	Z(U) 0.3326	> 0.05	t -0.203	> 0.05	t -4.969	< 0.0001
Convex-Hull Volume (μm^3)	Z(U) 7.273	< 0.0001	t 5.4634	< 0.0001	Z(U) 44.698	< 0.0001	t 2.6592	0.0088
Convex-Hull Área de Superfície (μm^2) 3D	Z(U) 6.8692	< 0.0001	t 5.1218	< 0.0001	Z(U) 50.217	< 0.0001	t 4.0886	< 0.0001
Convex-Hull Área (μm^2) 2D	t 6.7008	< 0.0001	t 4.5554	< 0.0001	t 54.998	< 0.0001	t 5.5785	< 0.0001
Convex-Hull Perímetro (μm)	t 5.9732	< 0.0001	t 5.1506	< 0.0001	t 37.493	0.0003	t 5.2994	< 0.0001
Va	t 12.4592	< 0.0001	t 10.9437	< 0.0001	Z(U) 79.393	< 0.0001	Z(U) 7.0329	< 0.0001
Vb	t 13.4239	< 0.0001	Z(U) 8.8027	< 0.0001	t 80.935	< 0.0001	Z(U) 4.4341	< 0.0001
Vc	Z(U) 9.8916	< 0.0001	Z(U) 10.1832	< 0.0001	Z(U) 74.787	< 0.0001	Z(U) 5.7422	< 0.0001
k-Dim	t 12.284	< 0.0001	t 8.9477	< 0.0001	t 63.324	< 0.0001	Z(U) 0.983	> 0.05

ANEXO 2: Artigo submetido para publicação

TITLE: Hippocampal Astrocytes of Semipalmated Sandpiper *C. pusilla*, shrink after Trans-Atlantic Long-Distance Migration.

AUTHORS: Dario Carvalho Paulo, Nara Gyzely de Moraes Magalhães⁽¹⁾, Daniel Guerreiro Diniz⁽¹⁾, Ediely Pereira Henrique⁽²⁾, Isis Ananda Matos Moraes⁽²⁾, Patrick Douglas Corrêa Pereira⁽²⁾, Mauro André Damasceno de Melo⁽²⁾, Camila Mendes de Lima⁽¹⁾, Marcus Augusto de Oliveira⁽¹⁾, ^(*)Cristovam Guerreiro Diniz⁽²⁾, David Francis Sherry⁽³⁾, Cristovam Wanderley Picanço Diniz⁽¹⁾

Institutional affiliations:

⁽¹⁾Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, Pará, Brasil.

⁽²⁾Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Bragança, Laboratório de Biologia Molecular e Ambiental, Bragança, Pará, Brasil.

⁽³⁾University of Western Ontario, Department of Psychology Advanced Facility for Avian Research, London, Ontario, Canada.

Number of Text Pages: 23

Number of Tables: 3

Number of Figures: 14

Number of Words: 4672

Running Title: Astrocytes morphology and migration in *C. pusilla*.

***Correspondence to:** Prof. Cristovam Guerreiro Diniz, cristovam.diniz@gmail.com

ABSTRACT

The semipalmated sandpiper *Calidris pusilla* (*C. pusilla*) is a long-distance migrant shorebird that leaves every year, its breeding habitats in the southern tundra in Canada and Alaska, escaping from winter, towards the coastal line in South America. Before they cross the Atlantic Ocean, they stopover Bay of Fundy on the Atlantic coast of North America, where they increase triglycerides in adipose tissue, to attend the vigorous energetic demands of the 5,300-kilometer non-stop flight over the ocean. Because bioenergetic and redox activity of astrocytes would be under intense demand to sustain neuronal activity and survival during long-distance transatlantic migration, we hypothesize that astrocytes morphological changes may become readily visible in the wintering birds. To test this hypothesis, GFAP immunolabeled astrocytes were selected from sections of the hippocampal formation, an area that has been proposed to play a central role in the integration of multisensory spatial information for navigation. We quantified and compared hippocampal formation three-dimensional morphological features of astrocytes of adult migrating, captured on the Bay of Fundy, Canada ($n = 249$), with hippocampal astrocytes from birds captured in the coastal region of Bragança, Brazil, during the wintering period ($n = 250$). To select astrocytes for microscopic 3D reconstructions we used a random and systematic unbiased sampling approach. Hierarchical cluster and discriminant analysis of 3D morphometric features was used to classify astrocytes. We found two morphological phenotypes (designated types I and II) both in migrating and wintering individuals. Although in remarkable different extent, the morphological complexities of both types of astrocytes were reduced after long-distance non-stop flight. Wintering birds astrocytes, showed lower morphological complexity than those of migrating birds, during fall migration. Because the reduction in complexity was much more intense in type I than in type II astrocytes, we suggest that these distinct morphological phenotypes may be associated with different physiological roles during migration. Indeed, as compared to type I, most type II astrocytes did not change significantly their morphology after the long-distance flight and 72.5% of them showed unequivocally interaction with blood vessels whereas only 27.5% of type I revealed this connection.

Key words: shorebirds, migration, hippocampus, astrocytes morphology, *Calidris pusilla*

1. INTRODUCTION

Many migratory birds return to their breeding territory, year after year, and this ability requires a long-lasting memory, for at least the subsequent period to the nonbreeding season (for reviews, see (Sherry, 2006; Mettke-Hofmann, 2017). The hippocampus seems to be essential for recalling landmarks and migratory routes of long-distance navigation in birds (see (Mettke-Hofmann, Claudia e Gwinner, Eberhard, 2003; Mouritsen *et al.*, 2016) and its involvement in those tasks may be readily recognized from neuroanatomical differences in the hippocampal formation of migratory and non-migratory bird species (Krebs, John R *et al.*, 1989; Sherry, D. F. e Vaccarino, A. L., 1989; Jacobs *et al.*, 1990; Healy e Krebs, 1996; Garamszegi e Eens, 2004; Lucas *et al.*, 2004; Roth e Pravosudov, 2009; Ladage *et al.*, 2010; Ladage *et al.*, 2011; Diniz, C. *et al.*, 2016). However, most studies on hippocampal plastic response related to memory formation, focused on neuronal numbers and volume changes, with a few reports dedicated to exam the relationship between glial cells and the hippocampal role in migration (Healy *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 2013). More recent study on two sandpiper species with contrasting demands on visuospatial learning during migration, also revealed a larger hippocampus and a larger number of microglia cells in the species relying more intensely on remembering visual cues during overland migration (*Actitis macularia*) than in *Calidris pusilla* with a long-distance non-stop flight over the Atlantic Ocean (Diniz, C. G. *et al.*, 2016). In addition to those indirect evidences, Gibbs and colleagues (Gibbs *et al.*, 2011), demonstrated that glial cells may have more direct contribution to long-term memory formation. Indeed, they demonstrated that memory consolidation in chick is modulated

by hippocampal endogenous adenosine (ATP) from astrocytes, reallocating astrocytes as important protagonists in the game of memory formation and recollection in birds.

Because the metabolic profile of long-distance migratory flight relies on lipids reserve (Landys *et al.*, 2005) and in the brain, astrocytes are under intense related metabolic activity, we hypothesized that long-flight will affect morpho-physiology of astrocytes and this will be readily evident on its morphometry. To our knowledge so far, there is no detailed three-dimensional (3D) morphological studies of astrocytes in the hippocampal formation of migratory birds and no work explored the impact of uninterrupted long-distance migratory flights on hippocampal formation astrocytes. In the present work, we investigated the changes of astrocytes of *C. pusilla* hippocampal formation comparing the morphology of these cells in individuals captured before, and after the transatlantic migratory flight towards the line coast of South America. We predicted that the astrocytes from hippocampus of this sandpiper would have conspicuous morphological differences that might be related to the intense metabolic demand imposed by the non-stop long-distance flight.

2. METHODS

Five migrating *C. pusilla* were collected in August 2012 at the Bay of Fundy, Canada (45°50'19.3" N and 64°31'5.39"W) and other five individuals were captured in the wintering period, between November and March on Canela Island, in the tropical coastal zone of northern Brazil (00°47'09.07" S and 46°43'11.29" W). We selected this period for capture in the coastal zone of northern Brazil to reduce possible acute influences of transatlantic long-distance migratory flight on hippocampal formation. Semipalmated sandpipers reach the coastal zone of northern Brazil in August and September and begin migration to the arctic between May and July.

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

2.1 Perfusion and Histology

Under deep anesthesia using isoflurane, birds were perfused transcardially with phosphate buffered saline 0.1M followed by aldehyde fixatives (4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2-7.4). Brains were dissected, post-fixed in 4% paraformaldehyde, stored in phosphate buffered 0.05M saline 0.9% (PBS) and cut by Vibratome (Leica VT1000S) in the coronal plane into 60µm thick sections to obtain six anatomical serial sections. Free-floating sections were immunolabeled with anti-GFAP antibody (Santa Cruz SC-6170), and mounted on glass slides coated with an aqueous solution of gelatin (10%) and chromium potassium sulfate (0.5%). Sections were air-dried at room temperature, dehydrated and cleared in alcohol and xylene series.

2.2 Immunohistochemistry

Free-floating sections were submitted to antigenic retrieval pre-treatment with 0.2 M boric acid (pH 9) at 70°C for 60 min, washed in 1% phosphate buffer/saline/triton (PBST) and washed in PBS three times for 2 min each time. Sections were then immersed for 12 hrs in 5% normal horse diluted in PBST serum and transferred to the primary antibody (SC-6170 Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBST 0.3% (1:500) and incubated for 12h at 4°C with gentle and continuous agitation. Washed sections (PBST 1%) were then incubated overnight in the secondary antibody (Vector Laboratories, Inc.

horse anti-goat, 1:400 in PBST 0.3%) followed by 0.3% hydrogen peroxide for 15 min, washed three times in PBST for 2 min each time, then immersed in avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 37.5 μ l A, 37.5 μ l B in 13.12ml of 0.3% PBST) for 60 min. After a 2 min wash in PBS, sections were reacted to visualize GFAP immunolabeled astrocytes using the glucose-oxidase-DAB-nickel method (Shu *et al.*, 1988). The reaction was interrupted after fine astrocytic branches were detected under the microscope. Sections were rinsed 4 \times 5 min in 0.1 M PBS, mounted on gelatinized slides, dehydrated in alcohol and xylene series, and coverslipped with Enthelan (Merck). Five animals from each group with complete GFAP immunohistochemistry slide collections that contained conspicuous morphological details of astrocytes were used for 3-D reconstruction and morphometric analysis. We confirmed the specificity of the immunohistochemical pattern by omitting the primary antibody (Saper e Sawchenko, 2003). This negative control resulted in the absence of immunolabeling in all structures.

2.3 Three-dimensional astrocyte reconstruction and quantitative morphology

To analyze brain sections, we used a NIKON Eclipse 80i microscope (Nikon, Japan) equipped with a motorized stage (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Astrocytes were reconstructed, with a high-resolution, 100 \times oil immersion, plan fluoride objective (Nikon, NA 1.3, DF = 0.19 μ m). Images were acquired with Neurolucida and analyzed with Neurolucida explorer software (Neurolucida 11.03 (MBF Bioscience, Williston, VT USA). Although shrinkage in the z-axis is not a linear event, we corrected the shrinkage in the z-axis, based on previous evidence of 75% shrinkage (Carlo and Stevens, 2011). Without correction, this shrinkage would significantly distort the length measurements along this axis. Only cells with processes that were unequivocally complete were included for 3-D analysis; cells were discarded

when branches appeared artificially cut or not fully immunolabeled. Terminal branches were typically thin.

2.4 Morphometric analysis and statistics

To accomplish these analysis, we used 10 individuals, five from each group. From these groups, we digitally reconstructed 499 astrocytes in three-dimensions. Astrocytes for 3-D reconstructions were selected in an unbiased, randomized, and systematic way (Glaser e Wilson, 1998; Glaser e Glaser, 2000) (Fig. 1).

Based on previous description (Atoji e Wild, 2006), we defined the sandpiper hippocampal formation as comprising the hippocampus proper and the parahippocampal area. For the hippocampus (Hp), the lateral and ventral limits were defined by the lateral ventricle, the dorsal and caudal limits corresponded to the cerebral surface, the medial limit was defined by the interhemispheric fissure, and the inferior limit was defined by a marked change in cell density in the dorsal-most hippocampal “V” region near the septal area (Fig. 1A). The parahippocampal area was located dorsal and lateral to the hippocampus, as defined medially by the paraventricular sulcus (Atoji e Wild, 2006). To generate unbiased and statistically valid results, we combined random systematic sampling (to guarantee that all regions of hippocampal formation would contribute to the sample with the same probability) with multivariate statistical analysis. Thus, systematic and random samples were taken from a series of sections containing dorsal and ventral hippocampal formation. Each box inside the outlined hippocampal formation indicates a site from which we selected a single astrocyte for 3-D reconstruction (Fig. 1B and 1C).

We first investigated the presence of morphological features shared by the astrocytes observed in our sample, inside each experimental group. We selected all morphometric quantitative variables with multimodality indices (MMI) higher than 0.55, to an initial cluster analysis (Ward’s hierarchical clustering method), which included all

animals from each group. We estimate the MMI based on skewness and kurtosis of our sample for each morphometric variable as previously defined elsewhere: $MMI = [M3^2 + 1] / [M4 + 3(n - 1)^2 / (n - 2)(n - 3)]$, where M3 is skewness and M4 is kurtosis and n is sample size (Kolb *et al.*, 1994; Schweitzer e Renehan, 1997). Kurtosis and skewness describe the shape of the data distribution and enable to distinguish between unimodal, bimodal or multimodal curves. Multimodal data sets are essential for separating a population of cells into cell types (Kolb *et al.*, 1994; Schweitzer e Renehan, 1997). The multimodal index of each variable was estimate based on the measurements of 20 morphometric features of astrocytes branches, as follows: 1. Total Branch Length (μm); 2. Mean Branch Length (μm) 3. Mean Branch Surface Area (μm^2); 4. Branch Volume (μm^3); 5. Total Number of Segments 6. Segments/mm; 7. Tortuosity; 8. Fractal Dimensions (k-dim); 9. Base Diameter of the Primary Branch (μm); 10. Total Tree Surface Area (μm^2); 11. Planar Angle; 12. Number of Trees; 13. Complexity; 14. Convex Hull Volume (μm^3); 15. Convex Hull Surface Area (μm^2) 3D; 16. Convex Hull Area (μm^2) 2D; 17. Convex Hull Perimeter (μm); 18. Vertex Va; 19. Vertex Vb; 20. Vertex Vc, (see Table 1 and Fig. 2 for details).

We found that a few astrocytes morphological features showed a multimodality index greater than 0.55 and this index value indicates that the distribution is at least bimodal and may be multimodal, and these features were selected for cluster analysis as previously described (Kolb *et al.*, 1994; Schweitzer e Renehan, 1997). We used the Ward's method with standardized variables, and a tree diagram (dendrogram) to illustrate the classification generated by cluster analysis.

The classification of astrocytes suggested by cluster analysis was assessed using a forward stepwise discriminant function analysis performed with Statistica 12.0 (Statsoft, Tulsa, OK). Discriminant function analysis was used to determine which variables

discriminate between two or more naturally occurring groups. The purpose of this procedure is to determine whether the groups differ about the mean of a variable, and then to use that variable to predict group membership. In the present study, we used this software to perform comparisons between matrices of total variances and co-variances. These matrices were compared using multivariate F tests to determine whether there were any significant between-group differences (about all variables). In the step-forward discriminant function analysis, the program builds a model of discrimination step-by-step. In this model, at each step, all variables are reviewed and evaluated to determine which variable contributes most to the discrimination between groups. We applied this procedure to determine morphometric variables that provided the best separation between the astroglial classes suggested by the cluster analysis. In addition, we calculated the arithmetic mean and standard deviation for the variables chosen as the best predictors for the astroglial groups. Parametric statistical analyses with *t*-tests were applied to compare groups of astrocytes inside each group and to detect possible morphological differences between averages of morphometrical features of our sample of astrocytes from the hippocampal formation of migrating and wintering groups. All astrocytes from the hippocampal formation were measured multiple times, and dedicated software (Neurolucida Explorer 11.03, MBF Bioscience, Williston, VT USA) was used to process data obtained with Neurolucida. We applied these procedures to our sample of astrocytes to search for potential astroglial morphological classes inside of each experimental group.

3. RESULTS

Fig. 3 shows under different magnifications an immunolabeled GFAP stellate astrocyte from the hippocampus of *C. pusilla*, to illustrate its morphological details.

Under 100X oil immersion objective, all morphological astrocytes details which allows 3D microscopic reconstructions were digitized and stored as X, Y and Z coordinates.

Using this procedure, we found two others distinct morphologies immunoreacted for GFAP in *C. pusilla* hippocampal formation and those correspond to radial glia and blood vessel associated astrocytes (Fig. 4).

Fig. 4 illustrates three-dimensional reconstructions of three different astrocytes morphologies of astrocytes which may be associated with distinct physiological roles: radial astrocyte associated with neurogenesis and neuronal migration, vascular astrocyte associated with blood brain barrier inside the neurovascular unit, and stellate astrocyte connected to the astrocytes network and less connected with blood vessels.

Our sample from parahippocampal region of *C. pusilla* submitted to three-dimensional reconstruction did not include radial astrocytes. Based on bimodal or multimodal three-dimensional morphological features ($MMI > 0.55$), we searched for morphological families of astrocytes using hierarchical cluster analysis. Independent of the origin of the sample (Bay of Fundy – Canada, or Bragança – Brazil) the results showed two families of astrocytes designated Type I and Type II (Figs 5 and 6) which exhibited remarkable differences on their morphological complexities. We designated as type I the astrocyte which exhibited processes with significantly higher values of complexity and number of branches as compared to type II. As compared to type II, type I astrocyte also showed arbors with higher number of nodes, a higher density of segments/mm, larger branch volumes, branch angles and tree surface area and longer total branch length. Type I astrocytes were morphologically more complex than type II in both migrating and wintering birds.

Type I and II astrocytes revealed significant differences in many other morphological parameters both in migrating (Fig. 7) and in wintering birds (Fig. 8). Indeed, arbors of type I astrocytes show significant higher values of total length, branch volumes and surfaces, number of segments, vertices and convex-hull volumes, area, surface and perimeters. In addition, wintering birds type I astrocytes are on average more tortuous, and show higher planar angles values than type II. Detailed statistical test results for comparisons between morphometric variables of astrocytes from hippocampal sections of migrating and wintering birds please see Table S1.

Although in different extent, both type I and type II astrocytes from the hippocampal formation of migrating birds showed higher morphological complexity than the correspondent type I and type II astrocytes of wintering birds (Fig. 9). Indeed, type I astrocytes of migrating birds are on average, 2.4 times more complex than type I astrocytes of wintering group, whereas type II astrocytes from wintering group were only 1.4 times less complex than the correspondent group of migrating birds.

Interestingly, the proportion of type II astrocytes as percentage of the total number of reconstructed astrocytes before (migrating birds) and after the long-flight (wintering birds), reduced from 76.7% to 63.6%, but the number of type I astrocytes increased from 23.3% in migrating birds to 36.4% in wintering birds.

Of note is the differential effect of the transatlantic long-distance non-stop flight on type I and type II astrocytes complexity. Indeed, the complexity of type I astrocytes seem to be much more affected by the transatlantic journey than the complexity of type II astrocytes and this conspicuous effect on complexity can also be detected in many other morphological features (see Figs 10 and 11).

Figs 10 and 11 exhibit graphic representations of the same group of animals, now combined to allow recognition of the differences between equivalent morphological families of astrocytes in migrating and wintering birds. Note that, after long-distance flight, both types I and II astrocytes shrink. Indeed, wintering birds show astrocytes with shorter branches, small areas and volumes, less vertices and lower complexities. An exception to this rule is that, as compared with migrating birds, wintering birds showed higher mean values of type II astrocytes branch length (Fig. 11B).

Fig. 12 are microscopic 3D reconstructions to illustrate the impact of the transatlantic flight on astrocytes morphologies. Three-dimensional reconstructed cells were selected to show morphometric features closer to the mean values of type I and type II astrocytes of migrating and wintering birds. It becomes apparent from 3D reconstructions and correspondent dendrograms that in general, all astrocytes before long-distance non-stop flight are, on average, much more ramified than those reconstructed after migratory flight. It is also evident that the effects of long-distance flight on type I astrocyte morphology is much more intense than in type II.

4. DISCUSSION

The avian hippocampus seems to be essential for the integration of multisensory spatial information for navigation, and astrocytes may contribute to this task, responding to synaptic activity and to neuronal metabolism. Here we measured the impact of *C. pusilla* non-stop flight, over the Atlantic Ocean, on astrocytes detailed morphology, by comparing three-dimensional reconstructions of astrocytes from hippocampal formations of migrating and wintering birds. Based on hierarchical cluster analysis of morphological features, we categorized astrocytes into two groups designated type I and type II and

discovered that complexity was the morphometric feature that most contribute to clusters formation. In addition, as compared with type I, it became apparent that type II astrocytes were less affected than type I by the transatlantic flight, suggesting they may have distinct physiological roles and susceptibilities to long-flight influences. Because most type II astrocytes showed closer vicinity with cerebral blood vessels than type I, we suggest that type II astrocytes may contribute in higher proportion to neurovascular unit, and as such, they may have higher levels of protective bioenergetics and redox activity to sustain neuronal activity and survival during the transatlantic non-stop flight.

4.1 Type II astrocytes morphology seem to be less affected by the non-stop transatlantic long-flight

Because hierarchical cluster analysis applied to morphological features of hippocampal formation astrocytes, before and after the long-distance flight, similarly revealed two different morphological phenotypes, we suggested that the less complex morphological phenotypes found after the long-flight, could represent altered phenotypes of the same original families found in individuals captured on Bay of Fundy. To check this suggestion, we estimated how many reconstructed astrocytes from individuals captured in Brazil exhibited unequivocally blood vessels connection and identified to which astrocyte morphological class they belong. We found correspondently that most type II astrocytes from individuals captured after long-flight were connected to blood vessels and preserved in higher proportion their original morphology than type I astrocytes. In addition, to further investigate whether all type I astrocytes had their complexity reduced after individuals crossed the Atlantic Ocean, we decided to apply hierarchical cluster analysis to the whole sample of reconstructed astrocytes from individuals captured in Brazil, now including outliers previously removed. We found a small population of astrocytes (less than 8%, $N = 19$) in the individuals captured in Brazil,

showing on average, morphological complexities like those of type I astrocytes from individuals captured before the transatlantic flight (Fig. 13).

We suggested this 8% type III astrocytes from wintering birds, showing similar complexity of that found on type I astrocytes of migrating birds, are in fact type I astrocytes which were less affected by the long-flight, preserving their original morphologies (see also type III cluster on Fig. 14). Similarly, the mean branch volumes of type III astrocytes from the hippocampal formation of wintering birds were quite like type I branch volumes of migrating birds (Table 2, Fig. 13).

4.2 Possible implications of *C. pusilla* non-stop flight, over the Atlantic Ocean, on hippocampal astrocytes physiology.

Because astrocytes of type II do interact with blood vessels in higher proportion (72.5%) than type I (27.5%), both in migrating and wintering birds, and because this interaction may be an indication of their relative contribution to the neurovascular unit, we raised the hypothesis that type II could be more involved in the blood brain barrier than type I astrocytes. The blood brain barrier includes brain microvascular endothelial cells, astrocytes, neurons and pericytes to form the neurovascular unit (Weiss *et al.*, 2009; Canfield *et al.*, 2016; McConnell *et al.*, 2017)

If type II astrocytes are indeed involved in the neurovascular unit in higher proportion than type I astrocytes, we would expect to find its integrity an essential element to keep intact the blood brain barrier (BBB) and therefore their morphology should be conserved even in adverse situations. This physical and metabolic barrier between the blood and the brain, is part of the polarity control of the blood flow by astrocytes over arterioles, in response to the bioenergetic demand (Gordon *et al.*, 2008). To guarantee its integrity we suggest that type II astrocytes may increase the levels of redox activity

through alternative metabolic pathways to maintain BBB and control blood flow and to sustain basal requirements for neuronal activity and survival during the transatlantic non-stop flight. During 2 to 3 days fasting-associated long transatlantic flight, when glucose is in short supply, it is expected that brain, increase metabolism of ketone bodies and this may impose intense demand on astrocytes to uptake, synthesize and release fatty acids. This is an alternative source of energy that can be released as β Hydroxybutyrate, a ketone body supplied to other brain cells as a fuel, and this includes the astrocyte itself, neurons and oligodendrocytes (Achanta e Rae, 2017). Indeed, it has been demonstrated that under higher blood concentration (as it could be expected during the fasting period associated with the transatlantic flight), β OHB can supply all basal requirements and around half of all necessary energy for neuronal activity (Chowdhury *et al.*, 2014). Because β OHB reduces reactive oxygen species associated with mitochondrial bioenergetic, we suggest that the neurovascular type II astrocyte, could be a strong candidate through which ketonic bodies alternative pathway is highly expressed in association with the imposed fasting period of the long-flight. However, because this alternative pathway does not support synaptic activity (Arakawa *et al.*, 1991) we suggest synaptic activity would be dependent on type I astrocytes activity. Indeed, during neurotransmission, synaptic cleft glutamate activates its receptors in neurons and in astrocytes, before reuptake by astrocytes and this is an energy cost mechanism. Although the detailed mechanism used by astrocytes for glutamate uptake is currently controversial, it has been demonstrated that astrocytes store glycogen, particularly in areas of high synaptic activity and glycogen-derived lactate can sustain neuronal activity specially during hypoglycemia (Bolaños, 2016). Taking these findings together, we speculate that these distinct astrocytes metabolic pathways will be differentially activated on type I and type II astrocytes, inducing different levels of oxidative stress. Interestingly more than 50% of

type III astrocytes (9 in 19) from wintering group showing similar complexity to that of type I astrocytes of migrating group, were unequivocally connected to blood vessels (Table 2) and these cells seem to preserve their original morphology after long-distance flight.

4.3 Study Achievements and Limitations

No reports described astroglial changes in shorebirds after long-distance non-stop flights, and 3D reconstructions of astrocytes and stereological unbiased sampling approach never had been used before to quantify such changes. Here we compared astrocytes 3D morphologies of migrating and wintering birds using hierarchical cluster analysis to classify cells and discovered two different morphological phenotypes, which were differentially affected by the long-distance non-stop transatlantic flight. These phenotypes differentially shrunk their branches after the long-flight and correspondently connect blood vessels in different proportions. Because of these differential long-distance flight impacts on type I and type II astrocytes in migrating and wintering bird's we suggested distinct physiological roles for these cells. Although the evidence for this, is indirect and this study is explicitly correlational, it provides the opportunity to formulate hypotheses about the relationships between astrocytes morphological changes and long-distance migration in shorebirds. Indeed, a variety of other studies demonstrate that the form-function model is at least a good starting point to investigate possible influences of multivariate factors affecting cell morphology and function . It stimulates new research dedicated to investigate the subjacent mechanisms of the morphological changes and explore to what physiological implications the morphological changes are related with.

However, based on morphological analysis of 3 selective astroglial markers (anti-GFAP, anti-glutamine synthetase, and anti-S-100 β) an emerging view that “astrocytes”

constitute a heterogeneous population even within a given region became apparent (Rodríguez *et al.*, 2014). Thus, the present report limited to GFAP-immunolabeled astrocytes may show only part of the potential morphological and numerical changes of astrocytes of *C. pusilla* hippocampal formation, under influence of long-distance non-stop migratory flight.

Mechanical factors associated with the vibratome sectioning and the dehydration procedure may affect microscopic 3D reconstructions, and this can induce non-uniform shrinkage in the z-axis of the sections (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007). Because shrinkage measurements after dehydration in X/Y axis is minimal when compared with those of Z-axis, x/y associated morphological changes cannot be linearly extrapolated to the z dimension. However, a reliable indication of severe shrinkage in the z-axis is the curling of branches, indicating that individual processes did not shrink at the same rate as the slice in which they were located. This effect seems to be of higher amplitude at the surface, decreasing in depth along the z-axis. To minimize this differential shrinkage effect, we took our samples from the middle region of the z-axis, where the impact of these changes is expected to be minor. More recently it has been demonstrated that in the z-axis (perpendicular to the cutting surface), sections shrink by approximately 75% of the cut thickness after dehydration and clearing (Carlo e Stevens, 2011). Based on those findings, all astrocytes reconstructions of the present report were corrected for z-axis shrinkage of 75% of the original value. Since we expected that X-Y dimensions would not change significantly after histological dehydration and clearing, no corrections were applied to these dimensions.

Because the selection of individual astrocytes was systematically blind and randomized, and the number of elements selected for reconstruction was rather large (499 in total, 250 in wintering and 249 in migrating birds), we expect no *a priori* sampling

bias. Thus, it is reasonable to propose that the proportions of reconstructed cells may reflect the quantitative distribution of type I and type II astrocytes in the whole hippocampal formation of *C. pusilla*.

REFERENCES

ACHANTA, L. B.; RAE, C. D. β -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. **Neurochem Res**, v. 42, n. 1, p. 35-49, Jan 2017. ISSN 1573-6903. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826689>>.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 675-7, Feb 5 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19194443>.

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

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

ARAKAWA, T.; GOTO, T.; OKADA, Y. Effect of ketone body (D-3-hydroxybutyrate) on neural activity and energy metabolism in hippocampal slices of the adult guinea pig. **Neurosci Lett**, v. 130, n. 1, p. 53-6, Sep 1991. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1749516>>.

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

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

_____. Limbic system in birds: morphological basis. In: WANTANABE, S. e HOFMAN, M. A. (Ed.). **Integration of Comparative Neuroanatomy and Cognition**. Tokyo: Keio University Press, 2007. p.97-123.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-40, Nov 2008. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995817> >.

BECHMANN, I.; GALEA, I.; PERRY, V. H. What is the blood-brain barrier (not)? **Trends Immunol**, v. 28, n. 1, p. 5-11, Jan 2007. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140851> >.

BELGARD, T. G. et al. Adult pallium transcriptomes surprise in not reflecting predicted homologies across diverse chicken and mouse pallial sectors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 32, p. 13150-5, Aug 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23878249> >.

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

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

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

BOLAÑOS, J. P. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. **J Neurochem**, v. 139 Suppl 2, p. 115-125, Oct 2016. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968531> >.

BUSHONG, E. A. et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 183-92, Jan 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756501> >.

CAMPBELL, C. B.; HODOS, W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. **Brain Behav Evol**, v. 3, n. 5, p. 353-67, 1970. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5522599 >.

CANFIELD, S. G. et al. An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. **J Neurochem**, Dec 2016. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935037> >.

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

CHOWDHURY, G. M. et al. The contribution of ketone bodies to basal and activity-dependent neuronal oxidation in vivo. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 34, n. 7, p. 1233-42, Jul 2014. ISSN 1559-7016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780902> >.

CHRISTOPHERSON, K. S. et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, v. 120, n. 3, p. 421-33, Feb 11 2005. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15707899 >.

CRYSTAL, J. D. Episodic-like memory in animals. **Behav Brain Res**, v. 215, n. 2, p. 235-43, Dec 2010. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211205> >.

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

DINIZ, C. G. et al. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 1, p. e5005, Jan 2016. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26577847> >.

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

FRANKLIN, R. J.; BUSSEY, T. J. Do your glial cells make you clever? **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 265-6, Mar 2013. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472865> >.

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

GIAUME, C. et al. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 87-99, Feb 2010. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20087359 >.

GIBBS, M. E. et al. ATP derived from astrocytes modulates memory in the chick. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 2-4, p. 177-86, May 2011. ISSN 1741-0533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22874656> >.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **Journal of Microscopy**, v. 192, p. 163
171, 1998.

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

GORDON, G. R. et al. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. **Nature**, v. 456, n. 7223, p. 745-9, Dec 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971930> >.

HALASSA, M. M. et al. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. **J Neurosci**, v. 27, n. 24, p. 6473-7, Jun 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17567808> >.

HAMEL, E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 3, p. 1059-64, Mar 2006. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467392> >.

HAN, X. et al. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 342-53, Mar 2013. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472873> >.

HEALY, S. D.; GWINNER, E.; KREBS, J. R. Hippocampal volume in migratory and non-migratory warblers: effects of age and experience. **Behav Brain Res**, v. 81, n. 1-2, p. 61-8, Nov 1996. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8950002> >.

HEALY, S. D.; KREBS, J. R. Food storing and the hippocampus in Paridae. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 47, n. 4, p. 195-199, 1996. ISSN 1421-9743.

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

HOSSEINI-SHARIFABAD, M.; NYENGAARD, J. R. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 206-14, May 15 2007. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368561> >.

JACOBS, L. F. et al. Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 16, p. 6349-6352, 1990. ISSN 0027-8424.

JOURDAIN, P. et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 3, p. 331-9, Mar 2007. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17310248 >.

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

KANG, K. et al. The complex morphology of reactive astrocytes controlled by fibroblast growth factor signaling. **Glia**, v. 62, n. 8, p. 1328-44, Aug 2014. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796693> >.

KANG, W. et al. Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 29, p. E2987-95, Jul 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002516> >.

KOLB, H. et al. Are there three types of horizontal cell in the human retina? **J Comp Neurol**, v. 343, n. 3, p. 370-86, May 1994. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027448> >.

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

_____. Hippocampal specialization of food-storing birds. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 4, p. 1388-92, Feb 1989. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2919184 >.

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

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

LANDYS, M. M. et al. Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. **Proc Biol Sci**, v. 272, n. 1560, p. 295-302, Feb 2005. ISSN 0962-8452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705555> >.

LANDYS-CIANNELLI, M. M. et al. Baseline and stress-induced plasma corticosterone during long-distance migration in the bar-tailed godwit, *Limosa lapponica*. **Physiol Biochem Zool**, v. 75, n. 1, p. 101-10, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 1522-2152. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880983> >.

LEE, S. Y.; HAYDON, P. G. **Astrocytic glutamate targets NMDA receptors**. **J Physiol**, v. 581, n. Pt 3, p. 887-8, Jun 15 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17495036 >.

LUCAS, J. R. et al. Does hippocampal size correlate with the degree of caching specialization? **Proceedings of the Royal Society London B**, v. 271, p. 2423-2429, 2004.

MATHIISEN, T. M. et al. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1094-103, Jul 2010. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20468051> >.

MCCASLIN, A. F. et al. In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 3, p. 795-806, Mar 2011. ISSN 1559-7016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139630> >.

MCCONNELL, H. L. et al. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. **J Biol Chem**, v. 292, n. 3, p. 762-770, Jan 2017. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920202> >.

MCKENNA, M. C. et al. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. **J Neurosci Res**, v. 94, n. 12, p. 1561-1571, Dec 2016. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27629247> >.

MEDINA, L.; ABELLÁN, A. Development and evolution of the pallium. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 6, p. 698-711, Aug 2009. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393324> >.

METTKE-HOFMANN, C. Avian movements in a modern world: cognitive challenges. **Anim Cogn**, v. 20, n. 1, p. 77-86, Jan 2017. ISSN 1435-9456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27287625> >.

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

_____. **Long-term memory for a life on the move.** 100: 5863-5866 p. 2003.

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

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

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

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

O'REILLY, K. M.; WINGFIELD, J. C. Seasonal, age, and sex differences in weight, fat reserves, and plasma corticosterone in Western sandpipers. **Condor**, v. 105, p. 13-26, 2003.

OBERHEIM, N. A. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **J Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 3276-87, Mar 11 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279265> >.

_____. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 547-53, Oct 2006. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938356> >.

PANATIER, A. et al. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 775-84, May 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713567> >.

PAPOUIN, T. et al. Astrocytic control of synaptic function. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 372, n. 1715, Mar 2017. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28093548> >.

PEARSON-LEARY, J.; OSBORNE, D. M.; MCNAY, E. C. Role of Glia in Stress-Induced Enhancement and Impairment of Memory. **Front Integr Neurosci**, v. 9, p. 63, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26793072> >.

PETZOLD, G. C.; MURTHY, V. N. Role of astrocytes in neurovascular coupling. **Neuron**, v. 71, n. 5, p. 782-97, Sep 2011. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903073> >.

PIERSMA, T.; RENEERKENS, J.; RAMENOFKY, M. Baseline corticosterone peaks in shorebirds with maximal energy stores for migration: a general preparatory mechanism for rapid behavioral and metabolic transitions? **General and comparative endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 118-126, 2000. ISSN 0016-6480.

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

PUELLES, L. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, n. 1414, p. 1583-98, Oct 2001. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11604125> >.

RAEFSKY, S. M.; MATTSON, M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. **Free Radic Biol Med**, v. 102, p. 203-216, Jan 2017. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27908782> >.

RANCILLAC, A. et al. Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. **J Neurosci**, v. 26, n. 26, p. 6997-7006, Jun 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807329> >.

ROBINSON, M. B.; JACKSON, J. G. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. **Neurochem Int**, v. 98, p. 56-71, Sep 2016. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013346> >.

RODRÍGUEZ, J. J. et al. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 1, p. 15-23, Jan 2014. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969179> >.

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

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

SALLAZ, L. et al. [Chondrosarcoma of the infratemporal fossa with intracranial extension. Case report and review of the literature]. **Rev Stomatol Chir Maxillofac**, v. 101, n. 3, p. 138-41, Jun 2000. ISSN 0035-1768 (Print)

0035-1768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981298> >.

SAPER, C. B.; SAWCHENKO, P. E. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. **J Comp Neurol**, v. 465, n. 2, p. 161-3, Oct 13 2003. ISSN 0021-9967 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12949777 >.

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

SCHWEITZER, L.; RENEHAN, W. E. The use of cluster analysis for cell typing. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 1, n. 1, p. 100-8, Feb 1997. ISSN 1385-299X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9385054> >.

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

SHERRY, D. F. Neuroecology. **Annu Rev Psychol**, v. 57, p. 167-97, 2006. ISSN 0066-4308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16318593> >.

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

SHERRY, D. F.; VACCARINO, A. L. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, p. 308-318, 1989.

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

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SONNEWALD, U.; SCHOUSBOE, A. Introduction to the Glutamate-Glutamine Cycle. **Adv Neurobiol**, v. 13, p. 1-7, 2016. ISSN 2190-5215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27885624> >.

SWEENEY, A. M. et al. PAR1 activation induces rapid changes in glutamate uptake and astrocyte morphology. **Sci Rep**, v. 7, p. 43606, Mar 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28256580> >.

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

ULLIAN, E. M.; CHRISTOPHERSON, K. S.; BARRES, B. A. Role for glia in synaptogenesis. **Glia**, v. 47, n. 3, p. 209-16, Aug 15 2004. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15252809 >.

VENKAT, P.; CHOPP, M.; CHEN, J. New insights into coupling and uncoupling of cerebral blood flow and metabolism in the brain. **Croat Med J**, v. 57, n. 3, p. 223-8, Jun 2016. ISSN 1332-8166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27374823> >.

VENTURA, R.; HARRIS, K. M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. **J Neurosci**, v. 19, n. 16, p. 6897-906, Aug 15 1999. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436047> >.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M.; HERTZ, L. Why are astrocytes important? **Neurochem Res**, v. 40, n. 2, p. 389-401, Feb 2015. ISSN 1573-6903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113122> >.

WEISS, N. et al. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 4, p. 842-57, Apr 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061857> >.

WENZEL, J. et al. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. **Brain Res**, v. 560, n. 1-2, p. 122-31, Sep 27 1991. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1760721> >.

WINDREM, M. S. et al. Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 6, p. 553-65, Jun 2008. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522848> >.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; CHEN, C. Long-term potentiation at hippocampal perforant path-dentate astrocyte synapses. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 383, n. 3, p. 326-30, Jun 5 2009. ISSN 1090-2104 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19358832 >.

ZHANG, Y.; BARRES, B. A. A smarter mouse with human astrocytes. **Bioessays**, Jul 30 2013. ISSN 1521-1878 (Electronic)

0265-9247 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897758> >.

ZOREC, R. et al. Memory Formation Shaped by Astroglia. **Front Integr Neurosci**, v. 9, p. 56, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635551> >.

LEGENDS

Figure 1. Low-power photomicrograph of *C. pusilla* hippocampal formation from a section immunolabeled with anti-GFAP antibody to define the limits of the area of interest and sampling strategy. The hippocampal formation comprises the hippocampus proper (Hp) and the parahippocampal area. Note the boundaries of the hippocampal formation (blue) are demarcated. Intense GFAP immunostaining clearly delineates the hippocampal V. The grid (straight pink lines parallel to the x- and y-axes) establishes the intervals between the green square boxes and illustrates the random and systematic sampling approach. The number of boxes in each section is proportional to the area covered by the hippocampal formation. A single astrocyte located inside every box was selected for three-dimensional reconstruction. Scale bars A = 250 μ m; B and C = 500 μ m.

Figure 2. Schematic representation of morphometric features obtained from three-dimensional reconstructions. Twenty morphometric variables (1 – 20) revealed significant differences between comparisons inside (type I vs type II) or between the experimental groups (correspondent types of astrocytes in migrating vs wintering birds). Variables highlighted in green color correspond to the numbered graphic representations. Scale bars = 10 μ m.

Figure 3. Photomicrography from brain section of *C. pusilla* individual captured on the coastal line of Bragança, Pará, Brazil, to illustrate a stellate astrocyte from the grey matter of the hippocampal V region. Scale bars: A = 250 μ m , B = 250 μ m, C = 120 μ m, D = 60 μ m, and E = 25 μ m.

Figure 4. Three-dimensional reconstructions and respective dendrograms of stellate (A and B), vascular (C and D) and radial (E and F) astrocytes. Radial astrocytes were not included in our samples.

Figure 5. Morphological phenotypes of astrocytes in the hippocampal formation of *C. pusilla* migrating birds. Cluster discriminant analysis (Ward's method) after three-dimensional reconstructions of astrocytes from five individuals. A- Dendrogram groupings of 249 astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). B and C- Graphic representations of complexity and tortuosity mean values and correspondent standard errors to illustrate significant differences between type I and type II astrocytes. D- Graphic representations of the discriminant analysis. The variable that contributed most to cluster formation was complexity ($p < 0.000000$). Type I (red dots)

showed higher X-Y dispersions than Type II (green dots) astrocytes. Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the hippocampal formation; cluster analysis was based on multimodal or at least bi-modal morphometric features of astrocytes ($MMI > 0.55$).

Figure 6. Morphological phenotypes of astrocytes in the hippocampal formation of *C. pusilla* wintering birds. Cluster discriminant analysis (Ward's method) after three-dimensional reconstructions of astrocytes from five individuals. A- Dendrogram groupings of 231 astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). B and C – Graphic representations of complexity and branch volume mean values and correspondent standard errors to illustrate significant differences between type I and type II astrocytes. D- Graphic representations of the discriminant analysis. The variable that contributed most to cluster formation was complexity ($p < 0.000000$). Type I (red dots) showed higher X-Y dispersions than Type II (green dots) astrocytes. Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the hippocampal formation; cluster analysis was based on multimodal or at least bi-modal morphometric features of astrocytes ($MMI > 0.55$).

Figure 7. Morphometry of astrocytes three-dimensionally reconstructed from hippocampal formation of 5 *C. pusilla* individuals captured on Canela Island, Bragança, Brazil. A - L Graphic representations of mean and standard error values of 12 morphological parameters of astrocytes Types I and II. Significant differences between appropriate comparisons are indicated by asterisk.

Figure 8. Morphometry of astrocytes three-dimensionally reconstructed from hippocampal formation of 5 *C. pusilla* individuals captured on Bay of Fundy, Canada. A - N correspond to graphic representations of mean and standard error values correspondent to 14 morphological parameters of astrocytes Types I and II. Significant differences between appropriate comparisons are indicated by asterisk.

Figure 9. Graphic representations of the proportional number (%) of type I and type II astrocytes in *C. pusilla* migrating (A) and wintering (B) birds and their respective complexity mean and standard error values. Note that as compared to type I, type 2 astrocytes are less complex, seems to be less affected by the long-distance flight and represent a higher proportion of the whole population both in migrating and in wintering birds.

Figure 10. Morphometry of type I astrocytes three-dimensionally reconstructed from hippocampal formation of 5 *C. pusilla* individuals, captured on Bay of Fundy, Canada and Canela Island, Bragança, Brazil. A - L Graphic representations of mean and standard error values of 12 morphological parameters of astrocytes Types I and II. Note that after the transatlantic flight astrocytes shrink their total length, and branch volume, reduce the

number of segments and branch surface, become less complex, reduces convex-hull volume, surface, area and perimeter and decrease their number of vertices (a, b and c), Significant differences between appropriate comparisons are indicated by asterisk.

Figure 11. Morphometry of type II astrocytes three-dimensionally reconstructed from hippocampal formation of 5 *C. pusilla* individuals, captured on Bay of Fundy (Canada), and Canela Island, Bragança, (Brazil). A - O Graphic representations of mean and standard error values of 15 morphological parameters of astrocytes Types I and II. Apart from mean values of branch length and planar angle that tend to increase after the long-flight, all other features tend to reduce their mean values. Significant differences between appropriate comparisons are indicated by asterisk.

Figure 12. Three-dimensional reconstructions of astrocytes from type I and type II from migrating (A-D) and type I and type II astrocytes from wintering (E-H) birds.

Figure 13. Influences of long flight through the Atlantic Ocean on complexity of hippocampal formation astrocytes of *C. pusilla*. Note that type III astrocytes from wintering birds and type I astrocytes from migrating birds show similar morphological complexities. (*) indicates significant differences inside each morphological group. (# or +) indicate significant differences between hippocampal astrocytes of wintering and migrating birds.

Figure 14. Morphological phenotypes of astrocytes in the hippocampal formation of *C. pusilla* wintering birds. Cluster discriminant analysis (Ward's method) after three-dimensional reconstructions of astrocytes from five individuals. A- Dendrogram groupings of 250 astrocytes indicated three main morphological phenotypes (type I, type II and type III). B and C – Graphic representations of complexity and branch volume mean values and correspondent standard errors to illustrate significant morphological differences between astrocytes morphological phenotypes of individuals captured before (Canada) and after (Brazil) long-distance transatlantic flight. D- Graphic representations of the discriminant analysis. The variable that contributed most to cluster formation was complexity ($p < 0.000000$). Type I (red dots) showed higher X-Y dispersions than Type II (green dots) astrocytes. Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the hippocampal formation; cluster analysis was based on multimodal or at least bi-modal morphometric features of astrocytes ($MMI > 0.55$). Note that the small cluster (19 cells) of type III astrocytes did not appear before (when outliers were removed from the sample).

Table 1. Morphological measurements of microscopic three-dimensional reconstructions.

<i>Branched Structure Analysis</i>	
Segment	Any portion of astrocytes branched structure with endings that are either nodes or terminations with no intermediate nodes.
Segments/mm	Number of segments/total length of the segments expressed in millimeters.
N° of Trees	Number of trees in the astrocytes
Total N° of Segments	Refer to the total number of segments in the tree.
Single Branch Length	Total length of the line segments used to trace the branch of interest.
Mean Branch Length (μm)	Mean = [Total Length] / [Number of branches]
Total Branch Length (μm)	Total length for all branches in the tree.
Tortuosity	= [Actual length of the segment]/[Distance between the endpoints of the segment]. The smallest value is 1; this represents a straight segment. Tortuosity allows segments of different lengths to be compared in terms of the complexity of the paths they take.
Mean Branch Surface Area (μm ²)	Computed by modeling each branch as a frustum (truncated right circular cone) divided by the number of branches.
Total Tree Surface Area (μm ²)	2D surface area of an astrocyte arbor computed based on the area defined by the endpoints of all trees.
Branch Volume (μm ³)	Computed by modeling each piece of each branch as a frustum.
Total Branch Volume	Total volume for all branches in the tree.
Base Diameter of Primary Branch (μm)	Diameter at the start of the 1 st segment.
Planar Angle	Computed based on the endpoints of the segments. It refers to the change in direction of a segment relative to the previous segment.
Fractal Dimension K-Dim	the “k-dim” of the fractal analysis, describes how the structure of interest fills space. Significant statistical differences in K-dim suggest morphological dissimilarities.
Convex Hull - Perimeter (μm), Area (μm ²) 2D, Surface Area (μm ²) 3D or Volume (μm ³)	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.
Vertex Analysis	Describes the overall structure of a branched object based on topological and metrical properties. Root (or origin) point: For neurons, microglia or astrocytes, the origin is the point at which the structure is attached to the soma. Main types of vertices: V _d (bifurcation) or V _t (trifurcation): Nodal (or branching) points. V _p : Terminal (or pendant) vertices. V _a : primary vertices connecting 2 pendant vertices; V _b : secondary vertices connecting 1 pendant vertex (V _p) to 1 bifurcation (V _d) or 1 trifurcation (V _t); V _c : tertiary vertices connecting either 2 bifurcations (V _d), 2 trifurcations (V _t), or 1 bifurcation (V _d) and 1 trifurcation (V _t). In the present report, we measured the number of vertices V _a , V _b and V _c .
Complexity	Complexity = [Sum of the terminal orders + Number of terminals] × [Total branch length / Number of primary branches]

Table 2. Absolute and percentage values of astrocytes with blood vessels interaction in the hippocampal formation of *C. pusilla*.

	Migrating birds		Wintering birds	
	Total N = 105		Total N = 77	
	N	%	N	%
Type I	21	20	27	35
Type II	84	80	41	53
Type 3	-	-	9	12

Table S1. Statistical tests comparisons between morphometric variables of hippocampal formation astrocytes 3D reconstructions from migrating and wintering birds.

	Migrating birds type 1 vs type 2		Wintering birds type 1 vs type 2		Migrating type 1 vs Wintering type 1		Migrating type 2 vs Wintering type 2	
	t / Z(U)	p	t / Z(U)	p	t / Z(U)	p	t / Z(U)	p
Total Branch Length (μm)	Z(U) 10.208	< 0.0001	Z(U) 9.4986	< 0.0001	Z(U) 7.258	< 0.0001	Z(U) 3.6801	0.0002
Mean Branch Length (μm)	t 0.9489	> 0.05	t -1.4847	> 0.05	Z(U) 14.111	> 0.05	t -3.9553	0.0001
Tortuosity	Z(U) 5.4308	< 0.0001	t -0.1826	> 0.05	Z(U) 0.278	> 0.05	Z(U) 8.2747	< 0.0001
Mean Branch Surface Area (μm^2)	t -0.8604	> 0.05	Z(U) 1.8502	> 0.05	Z(U) 12.326	> 0.05	t -2.0154	0.046
Branch Volume (μm^3)	t 6.834	< 0.0001	Z(U) 5.180	> 0.05	t 3.311	0.0012	Z(U) 3.991	< 0.0001
Base Diameter of Primary Branch (μm)	t -3.608	0.0004	t -1.864	> 0.05	t -2.911	0.0042	t -1.629	< 0.0001
Total N° of Segments	t 15.7542	< 0.0001	t 14.862	< 0.0001	Z(U) 87.237	< 0.0001	Z(U) 7.5028	< 0.0001
Segments/mm	t -1.538	> 0.05	t 1.103	> 0.05	t 0.649	> 0.05	t 4.272	< 0.0001
N° of Trees	Z(U) 2.804	0.005	t -2.1143	0.0365	t 14.777	> 0.05	Z(U) 4.1466	< 0.0001
Total Tree Surface Area (μm^2)	Z(U) 8.7447	< 0.0001	Z(U) 7.2698	< 0.0001	t 63.096	< 0.0001	Z(U) 4.1247	< 0.0001
Complexity	Z(U) 11.5298	< 0.0001	t 13.667	< 0.0001	Z(U) 93.836	< 0.0001	t 3.9988	< 0.0001
Planar Angle	Z(U) 4.6877	< 0.0001	Z(U) 0.3326	> 0.05	t -0.203	> 0.05	t -4.969	< 0.0001
Convex-Hull Volume (μm^3)	Z(U) 7.273	< 0.0001	t 5.4634	< 0.0001	Z(U) 44.698	< 0.0001	t 2.6592	0.0088
Convex-Hull Surface Area (μm^2) 3D	Z(U) 6.8692	< 0.0001	t 5.1218	< 0.0001	Z(U) 50.217	< 0.0001	t 4.0886	< 0.0001
Convex-Hull Area (μm^2) 2D	t 6.7008	< 0.0001	t 4.5554	< 0.0001	t 54.998	< 0.0001	t 5.5785	< 0.0001
Convex-Hull Perimeter (μm)	t 5.9732	< 0.0001	t 5.1506	< 0.0001	t 37.493	0.0003	t 5.2994	< 0.0001
Vertex - Va	t 12.4592	< 0.0001	t 10.943	< 0.0001	Z(U) 79.393	< 0.0001	Z(U) 7.0329	< 0.0001
Vertex - Vb	t 13.4239	< 0.0001	Z(U) 8.8027	< 0.0001	t 80.935	< 0.0001	Z(U) 4.4341	< 0.0001
Vertex - Vc	Z(U) 9.8916	< 0.0001	Z(U) 10.183	< 0.0001	Z(U) 74.787	< 0.0001	Z(U) 5.7422	< 0.0001
K-Dim	t 12.284	< 0.0001	t 8.9477	< 0.0001	t 63.324	< 0.0001	Z(U) 0.983	> 0.05

ANEXO 3: Autorizações de Órgãos Reguladores do Uso de Animais Silvestres.

Licença Ambiental para Captura e Sacrifício dos Animais



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

Cronograma de atividades

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

Observações e ressalvas

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

Outras ressalvas

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

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

Código de autenticação: 28969837



Página 1/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

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

Equipe

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

Locais onde as atividades de campo serão executadas

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

Atividades X Táxons

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

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

Material e métodos

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

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 28969837



Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

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

Dados do titular

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

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 28969837



Página 3/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica




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




Dados do titular

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

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Licença para Importação de Cérebros

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09670 - CEP 70618-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 20/06/2016 3) Válido Até/Valid Until: 20/12/2016											
4) Licença nº/Permit nº: 16BR020816/DF		6) Selo nº/Stamp nº: ***** 7) Selo/Stamp *****		8) Controle/Check 1: H4DWY4RWX5YIHJ 9) Autoridade Adm. Emite/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature											
5) Licença de/Permit for Importação/Import		10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URUTÁ 001 BRAGANCA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) David Francis Sherry 69 Lonedale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA											
12) País Importador/Country of Import Brasil - BR		13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Canada - CA		14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Científico/Fins científicos...											
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations		16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/AI Belém Data Provável/Probable Date: 15/08/2016													
		ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.													
17) Item 20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		21) Anexo/Origem Appendix/Source		18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark											
19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date		17) I 21) 18) CEREBRO/BRAIN 19) -- 10,00 UN -- 20) 1. Calidris pusilla 21) NC W 22) cerebro/brain 23) - - Maçarico-rasteirinho 10,00 UN - 24) - - Sempalmated-sandpiper													
----- Fim dos Itens/Items End -----															
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement															
Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
_____ ASSINATURA/SIGNATURE															
<small> 1 Verificar/Verify: http://ibama.gov.br/cites/verificar E-mail: cites.sede@ibama.gov.br 1ª Via - Original - Importador Exportador - Brasil / Importer Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador Importador - Estrangeiro / Exporter Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA </small>															

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09670 - CEP 70818-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 20/06/2016 3) Válido Até/Valid Until: 20/12/2016																																	
4) Licença nº/Permit nº: 16BR020816/DF		6) Selo nº/Stamp nº: ***** 7) Selo/Stamp *****		8) Controle/Check #: H4DWY4RWWXSYIHJ 9) Autoridade Adm. Emite/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature																																	
5) Licença de/Permit for Importação/Import		10) Importador/Importer CRISTOVAM GUERREIRO DINIZ PASS. URUTÁ 001 BRAGANCA - 68600000 fone: 9191777092 - cristovam.diniz@gmail.com Brasil - BR		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) David Francis Shery 69 Lonsdale Drive London Ontario - N6G 1T4 fone: - Canada - CA																																	
12) País Importador/Country of Import Brasil - BR		13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Canada - CA		14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Scientific/Fins científicos...																																	
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations.		16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/AI Belém Data Provável/Probable Date: 15/08/2016																																			
17) Item 20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		21) Anexo/Origem Appendix/Source		18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark																																	
19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date		ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.																																			
17) 20) 1. Calidris pusilla Maçarico-rasteirinho Semipalmated sandpiper		21) NC W		18) CEREBRO/BRAIN 22) cerebro/brain 10,00 UN -																																	
19) - - 10,00 UN - - 23) - - 24) - -		Fim dos Itens/Items End																																			
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement <table border="1"> <thead> <tr> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> <th>Item</th> <th>Qtd./Qty.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="16" style="height: 50px;"> <div style="text-align: center;"> ASSINATURA/SIGNATURE </div> </td> </tr> </tbody> </table>						Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	<div style="text-align: center;"> ASSINATURA/SIGNATURE </div>															
Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.																						
<div style="text-align: center;"> ASSINATURA/SIGNATURE </div>																																					
1 Verificar/Verify: http://ibama.gov.br/cites/verificar E-mail: cites.sede@ibama.gov.br 1ª Via - Original - Importador Exportador - Brasil Importer Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador Importador - Estrangeiro Exporter Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA																																					

Instruções e explicações

(Os números das instruções correspondem aos do formulário)

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

Instructions and Explanations

(The listing numbers are equivalent to the forms)

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