



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

LUMA CRISTINA FERREIRA GUERREIRO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS IMUNOMARCADOS PARA
PARVALBUMINA NO HIPOCAMPO E NÚCLEO MAGNOCELULAR DO
ISTMO EM *Actitis macularius* NO PERÍODO DE INVERNADA**

Belém - Pará

2020

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

LUMA CRISTINA FERREIRA GUERREIRO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS IMUNOMARCADOS PARA
PARVALBUMINA NO HIPOCAMPO E NÚCLEO MAGNOCELULAR DO
ISTMO EM *Actitis macularius* NO PERÍODO DE INVERNADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular – PNBC, da Universidade Federal do Pará – UFPA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Linha de pesquisa: Neurofisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz

Coorientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Belém - Pará

2020

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

F383a Ferreira Guerreiro, Luma Cristina
 Análise quantitativa de neurônios imunomarcados paraparvalbumina no hipocampo e núcleo magnocefal do istmo em *Actitis macularius* no período de invernada / Luma Cristina FerreiraGuerreiro. — 2020.
 75 f. : il. color.

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

1. *Actitis macularius*. 2. Migração. 3. Parvalbumina. 4. Formação hipocampal. 5. Núcleo magnocefal do istmo. I. Título.

CDD 598.2924

LUMA CRISTINA FERREIRA GUERREIRO

ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS IMUNOMARCADOS PARA PARVALBUMINA NO HIPOCAMPO E NÚCLEO MAGNOCELULAR DO ISTMO EM *Actitis macularius* NO PERÍODO DE INVERNADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular – PNBC, da Universidade Federal do Pará – UFPA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Linha de pesquisa: Neurofisiologia.

Apresentado em: 08 de Fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliador: Prof. Dr. Mauro André Damasceno de Melo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA)

Avaliadora: Prof^a. Dr^a. Nara Gyzely de Moraes Magalhães
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA)

Suplente: Prof. Dr. Cristovam Guerreiro Diniz
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA)

Belém - Pará

2020

Dedico este trabalho aos meus pais: Laismar e Osvaldo, por todo incentivo e ajuda para que ele se tornasse possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador professor Dr. Daniel Guerreiro Diniz por me dar a oportunidade de aprender tanto. Por estar sempre presente dando importante suporte (até de madrugada responde as mensagens), pelas suas correções e incentivos. As suas críticas construtivas, discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo este trabalho. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento como bióloga pesquisadora desde os tempos de ensino médio em que eu vinha toda animada com minha marmitta na mochila para o LNI (local que tem todo meu carinho e respeito) vivenciar diariamente experiências enriquecedoras. Serei eternamente grata por todo o conhecimento comigo compartilhado com tanto cuidado e paciência, por acreditar na minha capacidade e por todo o amadurecimento aqui adquirido graças ao seu olhar atento e até mesmo pelas puxadas de orelha quando foi necessário, independente de onde eu esteja e que idade eu tenha, serei eternamente grata.

Ao meu coorientador Cristovam Wanderley Picanço Diniz, agradeço por tudo, a ele todo o meu respeito, admiração e carinho. Sempre atencioso e com a porta aberta para me ajudar no que for preciso. Uma pessoa que se preocupa com o próximo e está disposta a ajudar sem pensar duas vezes. Muito obrigada por todo o apoio ofertado a mim desde a minha chegada em Belém, eu nunca esquecerei este apoio. Muito obrigada por ser essa pessoa verdadeira e incrível. Cristovam W. P. Diniz para mim é sinônimo de orgulho e admiração, não só como o chefe do LNI, mas como meu tio, como o pai maravilhoso que é, marido exemplar, avô coruja, professor e principalmente como uma pessoa de bom coração.

Sou muito grata pela importante ajuda recebida dos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular e Neuroecologia (LBN) do IFPA de Bragança, estes foram essenciais para que eu pudesse estar realizando este esforço, a base do projeto de aves migratórias está instalada no LBN e essa cooperação é fundamental para o estudo dessas espécies, obrigada de coração principalmente aos amigos Nara, Cristovam, Mauro, Emanuel, Taiany, Cintya, Patrick e Edielly que mesmo a distância eram solícitos em tudo que precisei.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção pelo convívio e cooperação ao longo desse estudo, neste local fiz amizades que serão eternamente

guardadas com carinho em meu coração, em especial a Raissa, Tiago, Daniela, Gabrielly, Sinara, Alinne, Camila, Thaís, Dario, Maitê, Jane, Caio e Leonardo.

A Universidade Federal do Pará, seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade.

Ao IBAMA pela licença de coleta das aves e ao ICMBio pelo importante apoio a pesquisa.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por financiar o projeto que possibilitou a coleta e processamento dos espécimes objeto de estudo.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa a mim concedida para que eu tivesse amparada e realizar esta pesquisa de forma eficaz.

Aos meus pais Laismar e Osvaldo, não tenho nem palavras para agradecer tanta confiança e amor. Meus irmãos Edimar e Osvaldo Neto, por serem meus melhores amigos e estarem de mãos dadas comigo sempre que preciso. Sem vocês eu não seria nem metade do que sou.

A minha avó Maria Lais (*in memoriam*) meu maior exemplo de amor ao próximo, e aos familiares que desde a minha chegada nesta cidade são meus grandes apoiadores e incentivadores, com olhar atento, palavras de amor, cuidado e preocupação com minha qualidade de vida no futuro. Sou muito grata aos tios Cristovam, Ana, João, Leilla, Dilma, Paulo, João Elysio, Rose, Izamar e Alzenir.

Ao Lauro Henrique, que durante esta pesquisa sempre me deu importante apoio e carinho, principalmente nos momentos em que os prazos se aproximavam e eu ficava preocupada em finalizar as missões, muito obrigada pela parceria.

Aos meus compadres Iriberto e Andréia por todo o companheirismo e cuidado, sou muito feliz por ter em minha vida este tesouro de filha que me escolheu como madrinha, Flávia Lethycia, você é um amor de criança que adoça meus dias com tanto carinho.

Agradeço aos grandes amigos que já se tornaram irmãos, Mayara Costa, Lorena Miranda, Luan Gurjão, Wallace Pardal, Murillo Costa, Manoela Farias, Samara Quinderé, Rafael Dias, Romulo Oliveira e Pedro Paulo por tudo o que compartilhamos durante esse e outros ciclos da minha vida, vocês sabem que tem participação importante no que faço, aqui não seria diferente.

Não seria possível realizar este estudo sem o apoio de todos os aqui citados, sou extremamente grata a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

”Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez
tão importante”.

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Já se sabe que os neurônios parvalbuminérgicos (PV) têm seu número modificado em face de estímulos sociais, multissensoriais e cognitivos, tanto em mamíferos quanto em aves. No entanto, nada se sabe sobre sua plasticidade em aves costeiras migratórias de longa distância durante o período de inverno. Aqui investigamos em quatro janelas temporais distintas do período de hibernação, a plasticidade dos neurônios fotovoltáicos de duas áreas cerebrais do maçarico-manchado (*Actitis macularius*), que inclui em sua jornada migratória várias escalas para alimentação e repouso. Utilizamos a PV como marcador de uma subpopulação de neurônios inibitórios e os contamos na formação hipocampal (FH) e no núcleo magnocelular do istmo tectal (IMC). Com base em evidências anteriores de que a FH está envolvida no aprendizado, na memória e na interação social, e o IMC é essencial para o controle dos movimentos de cabeça e pescoço e olhos, testamos a hipótese de que os neurônios da PV aumentariam na FH e permaneceriam inalterados no IMC. Para isso, usamos o fracionador óptico para estimar o número de células. Os cérebros foram processados para imunocoloração PV, seguidos por estimativas do número de neurônios PV nas áreas de interesse. Em comparação com o repouso migratório 1, as estimativas dos neurônios fotovoltáicos mostraram aumento significativo na formação hipocampal do grupo de pré-migração. Sugerimos que a proliferação de neurônios parvalbuminérgicos seja parte das mudanças adaptativas dos circuitos hipocámpais envolvidos no processo migratório de volta aos nichos reprodutivos do hemisfério norte.

Palavras-chave: *Actitis macularius*. Migração. Período de inverno. Parvalbumina. Formação hipocampal. Núcleo magnocelular do Istmo.

ABSTRACT

It is already known that parvalbumin (PV) neurons have their number modified in face of social, multisensory and cognitive stimuli, both in mammals and birds. However, nothing is known about its plasticity in long-distance migratory shorebirds during wintering period. Here we investigated in four distinct temporal windows of the wintering period, the plasticity of PV neurons of two brain areas of the spotted sandpiper (*Actitis macularius*) which includes in its migratory journey multiple stopovers for feeding and resting. We used PV as a marker of a subpopulation of inhibitory neurons and count them in the hippocampal formation (HF) and magnocellular nucleus of tectal isthmus (IMC). Based on previous evidence that HF is involved in learning and memory and social interaction, and IMC is essential for control of head and neck and eyes movements, we tested the hypothesis that PV neurons would increase in HF and remain unchanged in IMC. For this, we used the optical fractionator to estimate cell number. Brains were processed for PV immunostaining, followed by estimates of the number of PV neurons of the areas of interest. As compared with migratory rest 1, PV neurons estimates showed significant increase in the hippocampal formation of premigration group. We suggest that parvalbuminergic neurons proliferation is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits involved with the migratory process back to the reproductive niches in north hemisphere.

Keywords: *Actitis macularius*. Migration. Wintering Period. Parvalbumin. Hippocampal Formation. Magnocellular Nucleus of Isthmus.

SUMÁRIO

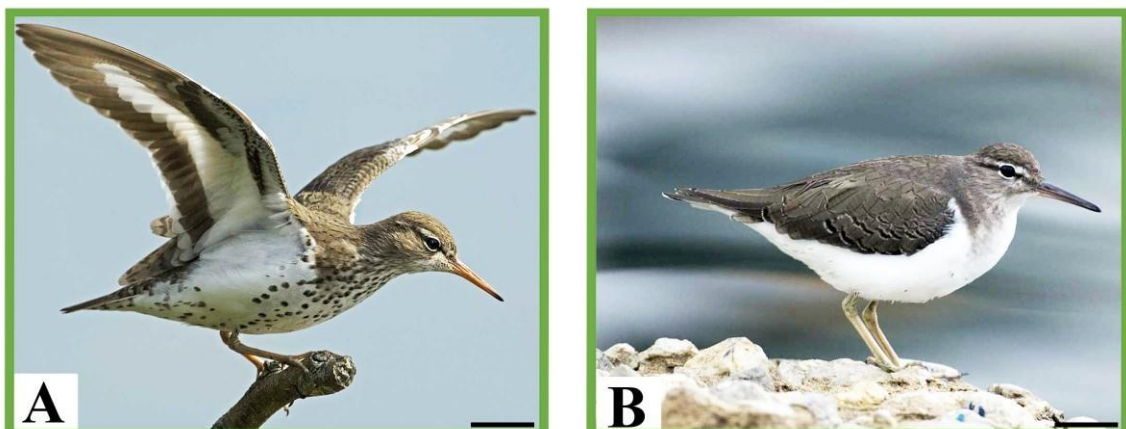
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	A formação hipocampal das aves e a memória espacial em aves	13
1.2	O núcleo magnocelular do ístmo do <i>tectum opticum</i>	14
2.	OBJETIVOS	17
2.1	Geral.	17
2.2	Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Perfusão, corte, coloração e imunohistoquímica	18
3.2	Contagem de células	20
3.3	Análise estatística	26
4.	RESULTADOS	27
4.1	Contagem de neurônios parvalbuminérgicos	27
5	DISCUSSÃO.	30
5.1	Interação social, neurônios parvalbuminérgicos e migração.	30
5.2	Neurônios parvalbuminérgicos, neurogênese hipocampal, aprendizado e memória	31
5.3	Plasticidade limitada, mapas visuais, controle de movimento da cabeça e pescoço e olhos	32
5.4	Limitações metodológicas.	33
5.4.1	Limitações técnicas não estereológicas	33
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA	44
	ANEXO B - LICENÇA DE COLETA	45
	ANEXO C - ARTIGO SUBMETIDO AO BRAIN RESEARCH	46

1. INTRODUÇÃO

Anualmente, várias espécies de pássaros migrantes que partem do hemisfério norte ocupam a península bragantina na região nordeste do Pará. Essa costa, oferece temperaturas amenas e alimentação para muitas aves marinhas migratórias, que ali permanecem durante o período de invernada. As migrações em direção ao hemisfério sul começam em agosto e terminam em novembro, e o retorno ao hemisfério norte começam a partir de fevereiro e se estendem até maio (RODRIGUES, 2006).

A região norte do Brasil abriga os migrantes setentrionais compreendendo cerca de 40 espécies de diferentes famílias, entre elas, o maçarico do peito pintado *Actitis macularius*. Essa espécie pertencente à família Scolopacidae, é uma ave limícola de pequeno porte, aproximadamente 18-20cm de comprimento e pesando 19-64g. Seu habitat de reprodução próximo à água doce localiza-se na maior parte do Canadá, migrando em voo com paradas, para a América do Sul, e raramente para a América Ocidental. Os adultos desta espécie não são gregários e por este motivo são raramente vistos em bando (DINIZ, C. G. *et al.*, 2016). Estas aves partilham as áreas de manguezais para repouso e alimentação em preparação a viagem de retorno aos sítios reprodutivos no hemisfério norte (AZEVEDO JÚNIOR *et al.*, 2001; NÓBREGA *et al.*, 2015). Esses locais têm importância fundamental para conservação dessas espécies, uma vez que, depois de longas migrações, elas necessitam de áreas adequadas para se alimentarem, adquirindo as reservas energéticas necessárias à migração de retorno aos sítios de reprodução e para trocarem as penas (figura 1), (MORRISON AND ROSS, 1989; MYERS *et al.*, 1985).

Figura 1. Aves da espécie *Actitis macularius*; A: Plumagem reprodutiva, B: Plumagem não reprodutiva. Escala 2cm.



Fonte: Adaptado de <https://www.audubon.org/field-guide/bird/spotted-sandpiper>

Para informação geral acerca das aves migratórias neárticas no Brasil ver o documento publicado pela *Conservation International*, destinado a orientar as organizações conservacionistas, quanto aos

lugares no Brasil mais críticos para a preservação das aves migratórias. Para a lista detalhada e a distribuição de espécies de aves neárticas que partilham os recursos das reentrâncias da costa paraense, ver:

https://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/livro_aves_migratorias_nearticas_no_brasil_conservation_international.pdf.

A despeito da importância dos manguezais do estuário do Amazonas para as aves marinhas nessa época do ano, poucos estudos se dedicaram a investigar a neuroecologia de aves marinhas migratórias nessas regiões largamente influenciadas pelas marés (CARVALHO-PAULO et al., 2017; DINIZ et al., 2016b; MAGALHAES et al., 2017; MENDES DE LIMA et al., 2019). Nenhum estudo, entretanto, investigou potenciais alterações no sistema nervoso dessas aves no período de invernada com ênfase em subpopulações neuronais relevantes para o reconhecimento social e formação de memória espacial e de reconhecimento de padrões, essenciais ao processo migratório.

De fato, em estudos anteriores investigamos as mudanças morfológicas hipocâmpais associadas à migração de longa distância (CARVALHO-PAULO et al., 2017; DE MORAIS MAGALHÃES et al., 2017; DINIZ et al., 2016a; MENDES DE LIMA et al., 2019), e demonstramos que o processo migratório afeta a morfologia e o número dos astrócitos, além da neurogênese e do volume do hipocampo, sugerindo que estratégias de migração contrastantes afetam diferencialmente esses elementos. Em trabalho dedicado à caracterização morfológica da formação hipocâmpal do *Actitis macularius* e do *Calidris pusilla* (DINIZ et al., 2016a), espécies com rotas migratórias contrastantes, quantificamos o número de neurônios com marcador seletivo para neurônios (NeuN) e reconstruímos em três dimensões a morfologia da microglia utilizando marcador seletivo para imunomarcção dessa população celular glial (IBA-1).

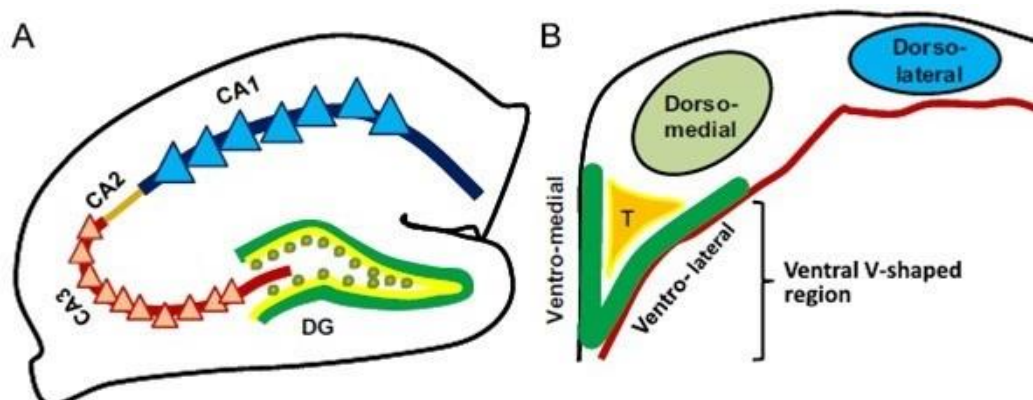
Neste trabalho deslocamos nossa atenção para o período de invernada, concentrando nosso interesse na espécie *Actitis macularius* buscando comparar duas regiões neurais com plasticidades contrastantes, empregando um marcador de subpopulação neuronal parvalbuminérgica que tem seu número modificado diante de estímulos sociais, multissensoriais e cognitivos, tanto em mamíferos (ARIDA et al., 2007; ARIDA et al., 2011; PLACENCIA et al., 2019) quanto em aves (CHAUDHURY et al., 2006; CORNEZ et al., 2017; WADA et al., 2004). De fato, trabalhos prévios demonstraram que a proteína ligante de cálcio (parvalbumina) (CARONI, 2015; GAINNEY E FELDMAN, 2017) é um marcador neuroplástico, que aumenta seu número em função da estimulação multissensorial, em regiões responsáveis pelo aprendizado e pela memória, incluindo o hipocampo (BARKAN et al., 2017) e os núcleos de canto das aves canoras (BRENOWITZ AND LARSON, 2015). Para investigar a resposta neuroplástica diferencial estimamos nas mesmas janelas temporais o número de neurônios

parvalbuminérgicos no núcleo do istmo do *tectum opticum*, uma região que recebe projeções organizadas das camadas suprajacentes do *tectum opticum* e projeta seus axônios de forma altamente divergente de volta para o *tectum* (FAUNES et al., 2013). Nossa expectativa é de que ao compararmos essas duas regiões na mesma janela temporal encontraríamos diferenças significativas nas estimativas de contagem de neurônios parvalbuminérgicos no hipocampo mas não no núcleo magnocefalular do istmo.

1.1 A formação hipocampal das aves e a memória espacial em aves

Ao comparar o hipocampo dos mamíferos com o das aves (figura 2) no que concerne a homologia de seus subcampos, a topografia e o papel funcional, torna-se cada vez mais evidente que a parte medial do córtex dorsal das aves é homóloga ao hipocampo de mamíferos (ATOJI AND WILD, 2006; ATOJI et al., 2016). Assim, a parte do cérebro de pássaros a que se atribui equivalência ao hipocampo dos mamíferos, é a dorsomedial, tradicionalmente dividida em duas grandes áreas, a ventral, chamada de hipocampo (hp) e a dorsal e lateral, denominada área parahipocampal (aph) (ATOJI AND WILD, 2007). Baseando-se em conectividade anatômica, sugeriu-se que a área dorsomedial da formação hipocampal das aves é semelhante ao subiculum e cas dos mamíferos, enquanto que a camada em forma de v na porção ventromedial é semelhante ao giro denteado dos mamíferos e a camada mais lateral do hipocampo das aves é análogo ao córtex entorrinal (ATOJI AND WILD, 2006).

Figura 2. Representação esquemática do hipocampo adulto de mamífero e ave, representando diferentes sub-regiões. (A) Seção coronal do hipocampo de mamífero adultos com subdivisões como (DG) giro denteado, (CA1–3) CA cornos de Amon, (B) seção coronal através do prosencéfalo aviário adulto na região hipocampal.



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

A aprendizagem e a memória espacial assim como a atividade de estocagem de comida estão relacionadas ao hipocampo e têm sido bastante estudadas em pássaros (CLAYTON AND DICKINSON, 1998; COLOMBO AND BROADBENT, 2000b; SHERRY AND HOSHOOLEY, 2010).

Pesquisas iniciais sobre o papel do hipocampo na memória para a localização espacial de onde os pássaros armazenam alimentos mostraram que esses tipos de aves, recuperam o alimento estocado por reterem e acessarem a informação de sua localização (KREBS et al., 1989; SHERRY AND VACCARINO, 1989). Ao lembrarem-se de onde armazenaram os alimentos através das marcas espaciais próximas a estes locais, utilizam-se das relações geométricas entre os sítios e os pontos de referência existentes na área. Além disso, utilizam a bússola solar para obter informações e se orientar no trajeto em direção aos locais de estocagem (WILTSCHKO W., 1989; BALDA R. P., 1991; SARAH J. DUFF., 1998; BROWNLIE LA et al., 1998).

A memória utilizada para lembrar-se dos sítios de armazenamento pode ser de longa duração (HITCHCOCK C. L., 1990; BALDA R. P., 1992), e o comportamento de recuperação indica que a ave recorda qual o tipo de alimento armazenado em um sítio específico (SHERRY, 1984; CLAYTON AND DICKINSON, 1998). Ao final, encontrou-se evidências de que as aves integram a informação espacial, o tipo de alimento e o momento de estocagem da comida e, nesse sentido, sugere-se que reproduzem o que se tem denominado de memória semelhante a episódica em mamíferos (DERE et al., 2005).

Lesões no hipocampo das aves que escondem e recuperam alimentos perturbam essa capacidade (SHERRY AND VACCARINO, 1989) e produzem um déficit seletivo na memória para localização espacial (COLOMBO AND BROADBENT, 2000a; HAMPTON E SHETTLEWORTH, 1996; SHIFLETT et al., 2003). Portanto, o hipocampo é essencial para a recuperação precisa do local onde o alimento foi armazenado, pois sua lesão reduz a precisão da recuperação dos esconderijos, sem afetar a tendência para esconder ou procurá-los (SHERRY AND VACCARINO, 1989). Além disso, em nível taxonômico, a comparação de famílias e subfamílias mostrou que as aves que armazenam alimentos têm, em média, um hipocampo maior do que as aves que não armazenam alimento (KREBS et al., 1989; SHERRY AND VACCARINO, 1989). Dentro das famílias de aves que armazenam alimentos, também há evidências de que as espécies que armazenam mais têm um hipocampo maior do que as espécies que armazenam menos (HEALY E KREBS, 1992; HAMPTON et al., 1995).

1.2 O núcleo magnocefalular do istmo do *tectum opticum*

O *tectum opticum* é uma estrutura laminada com 15 camadas que é responsável pela geração de movimentos oculares e da cabeça orientados para estímulos de interesse (figura 3). Como os estímulos de interesse no ambiente tendem a se mover, não é de surpreender que muitos neurônios tectais respondam a estímulos em movimento (FROST et al., 1988; FROST & NAKAYAMA, 1983; FROST et al., 1990).

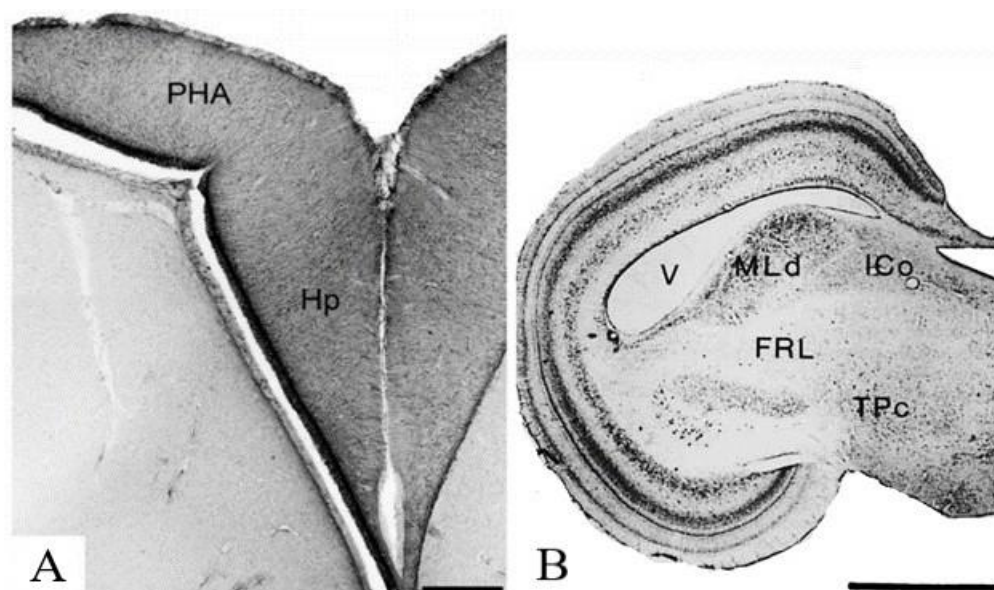
A projeção dos axônios das células ganglionares da retina (RGCS) carrega informação visual oriunda do ambiente em torno, para os núcleos e áreas de processamento visuais. Esses axônios são reunidos no disco óptico e de lá em diante constituem o nervo óptico que se dirige às estações sinápticas da via visual incluindo o *tectum opticum* das aves, homólogo ao colículo superior nos mamíferos.

Na maioria dos vertebrados o principal sítio de terminação do nervo óptico, é uma ampla expansão de células no cérebro médio, o *tectum opticum* (KEARY et al., 2010). Ao conectarem-se com os neurônios do tectum, os axônios das rgcs se distribuem de modo ordenado de acordo com o arranjo dos seus corpos celulares na retina: rgcs adjacentes na retina se conectam com células-alvo também adjacentes no tectum. A projeção organizada cria um mapa retinotópico do espaço visual no *tectum* (BERSON AND STEIN, 1995).

O *tectum opticum* (colículo superior em mamíferos) é altamente diferenciado, englobando intrincados circuitos neurais que medeiam a orientação olho-cabeça em direção a estímulos (BISCHOF AND WATANABE, 1997; NGUYEN et al., 2004; KNUDSEN, 2007; WYLIE et al., 2009; MARÍN et al., 2012).

As camadas superficiais do *tectum* enviam projeções para as camadas profundas de forma topograficamente organizada incluindo aquelas que atingem os núcleos do istmo parvo e magnocelulares (YAN AND WANG, 1986).

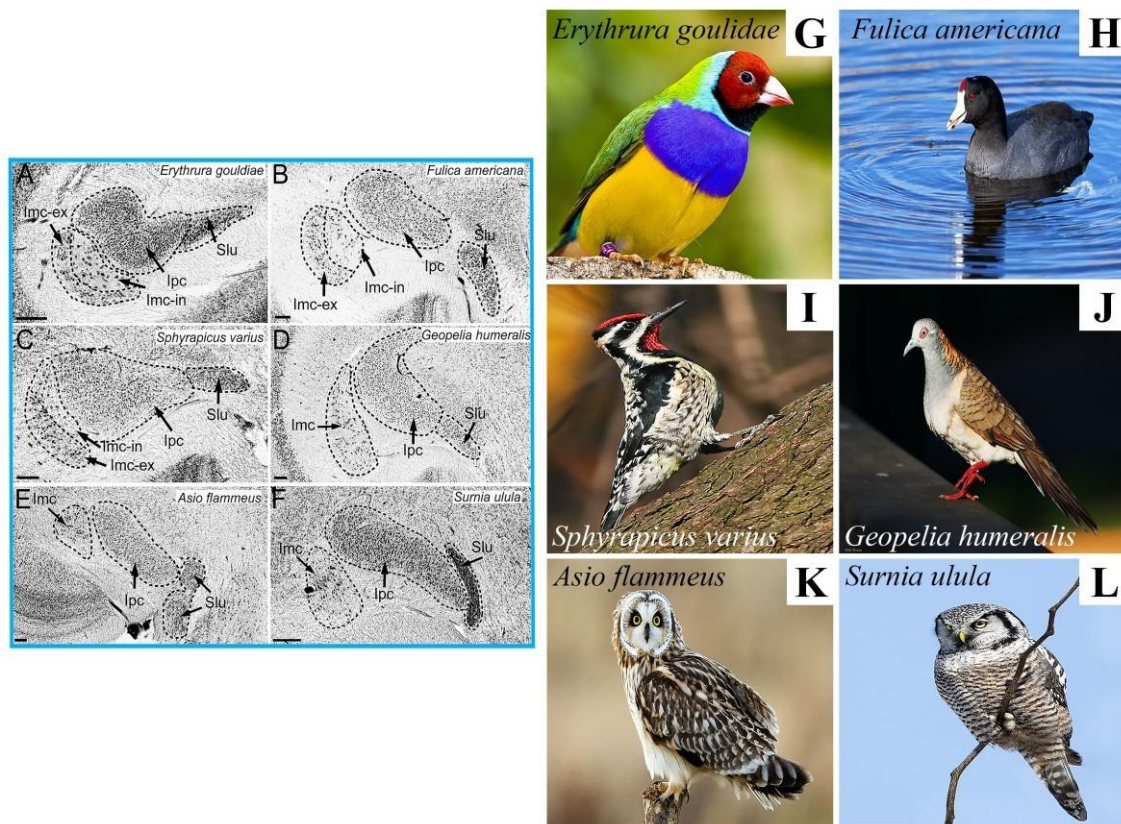
Figura 3. Fotomicrografias da formação hipocampal (A) e do *tectum opticum* (B) de ave, em secção coronal



Fonte: Adaptado de REINER, A. & KARTEN, H. J., 1982 e Oliveira, M., 2018.

O núcleo magnocelular do istmo tectal (IMC) por sua vez, nas aves charadriiformes, revela uma estrutura com citoarquitetonia uniforme (sem sublâminas), o que o distingue do imc dos passeriformes que exibe dupla laminação com hodologia e funções distintas (FAUNES et al., 2013), diferença essa presente em várias ordens (figura 4). O IMC num caso e noutro parece estar envolvido com a atenção espacial, um elemento funcional essencial da via tectofugal.

Figura 4. Nas letras A, B, C, D, E e F são fotomicrografias mostrando a localização e as bordas dos três núcleos ismatais, as porções magnocelulares e parvocelulares do núcleo istmo (IMC, IPC) e do núcleo semilunar (SLU) em seis espécies de aves (*Erythrura gouldiae*, *Fulica americana*, *Sphyrapicus varius*, *Geopelia humeralis*, *Asio flammeus* e *Sumia ulula*). A direita, fotos dos representantes de cada espécie (G-L).



Fonte: Adaptado de (GUTIÉRREZ-IBÁÑEZ, C et al., 2014).

Por conta do fato de que esses neurônios do istmo tectal estão topograficamente organizados e precisam preservar-se assim para exercer suas funções, não espera-se que no imc, durante o processo migratório, a plasticidade seja alterada. Exige-se pois que os mapas visuotópicos que representam o campo visual e que permitem a localização espacial dos objetos que se movem, e para os quais a atenção

deve ser dirigida ao longo do processo migratório, permaneçam inalterados após a sua construção, que é em grande parte definida geneticamente (HUBERMAN et al., 2008; KARTEN, 2015).

De fato os mapas retinotópicos do colículo superior (homólogo ao teto ótico), núcleo geniculado lateral e córtex visual primário dos mamíferos se desenvolvem antes que os fotorreceptores da retina possam converter energia luminosa em sinal elétrico (HUBERMAN et al., 2008), confirmando que a circuitaria básica dessas estruturas é definida a partir de informações contidas nos genes. Assim a manutenção da retinotopia definida originalmente pelas células ganglionares da retina é preservada em todos os níveis da via visual (NEVIN et al., 2010). A transformação dos inputs sensoriais em respostas motoras ou endócrinas requer processamento neural especializado e topograficamente organizado que é frequentemente distribuído através das várias áreas de projeção visuais estando incluída entre aquelas as respostas do núcleo magnocelular do istmo tectal, que é constituído em sua maioria de neurônios gabaérgicos e parvalbuminérgicos grandes (TÖMBÖL AND NÉMETH, 1998; TÖMBÖL et al., 2006).

No presente trabalho, quantificamos a população de neurônios imunomarcados para parvalbumina presente no hipocampo e no núcleo magnocelular do istmo (imc) do *tectum opticum* da espécie *Actitis macularius*, em diferentes janelas temporais do período de invernada. Se nossa hipótese estiver correta é esperado que na fh de aves migratórias, a quantidade de neurônios imunomarcados para parvalbumina se altere, enquanto que no imc do *tectum* óptico essas mudanças não ocorram. Esses resultados seriam sugestivos de diferenças significativas na plasticidade neural das duas áreas (FH e IMC) no encéfalo dessa espécie revelando mudança e estabilidade de seus circuitos respectivamente, durante o período de invernada.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Estudar a neuroplasticidade diferencial da formação hipocampal e do núcleo magnocelular do istmo tectal da espécie *Actitis macularius* durante o período de invernada.

2.2 Específicos:

- Estimar o número total de neurônios parvalbuminérgicos da formação hipocampal.
- Estimar o número total de neurônios parvalbuminérgicos do núcleo magnocelular do istmo tectal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As aves foram capturadas em diferentes janelas do período de invernada (tabela 1) sob aprovação do comitê de ética pelo CEUA/UFPA n.º1840281116 e licença n.º44551-5 do instituto brasileiro do meio ambiente (IBAMA), instituição do governo federal brasileiro que regula o uso de

animais selvagens em pesquisas, em diferentes períodos, na ilha Otelina ($0^{\circ}45'42.57''$ S $46^{\circ}55'51.86''$ W) na zona costeira tropical do norte do Brasil. Durante a coleta, ao entardecer, são abertas redes de neblina 12m x 2,5m. As redes são vistoriadas a cada dez minutos para a retirada das aves capturadas (figura 5).

Tabela 1. Dados de coleta de aves da espécie *Actitis macularius* nas quatro janelas temporais no período de invernada (recém-chegados, repouso migratório 1, repouso migratório 2 e pré-migração).

Coletas	Meses	Nº de animais	Fases da Lua	Data	Tempo de Permanência
Recém-chegados	Agosto/Setembro/Outubro	5	Crescente côncavo	08/09/2018	\cong 60.000 chegam do hemisfério norte, exaustos e com baixo teor de gordura
Repouso Migratório 1	Novembro/Dezembro/Janeiro	5	Crescente côncavo	16/12/2017	\cong 40.000 permanecem em invernada até a chegada do verão no hemisfério norte, o restante continua para o sul.
Repouso Migratório 2	Fevereiro/Março/Abril	5	Nova	17/03/2018	A população aumenta para \cong 60.000 antes da partida em direção norte, para descansar e ganhar peso.
Pré-Migração	Maio/Junho/Julho	5	Minguante côncavo	17/05/2018	Pré-Migração para o norte ártico

Figura 5. Modelo de rede de neblina, onde se encontra um Uirapuru-laranja, para captura dos *Actitis macularius* na ilha Otelina ($0^{\circ}45'42.57''$ S $46^{\circ}55'51.86''$ W) na zona costeira tropical do norte do Brasil.



Fonte: <https://guiabirdingbrasil.com.br/polemica-na-ilha-grande-rj-biologa-corta-rede-de-neblina-e-solta-aves/>

3.1 Perfusão, corte, coloração e imunohistoquímica

Os animais foram perfundidos por via transcardíaca com solução salina 0,9% heparinizada (1ml/l) por 10 minutos, seguida de paraformaldeído 4% ph 7.2-7.4 por 10 minutos. O início do fluxo de solução salina é iniciado após o corte da veia jugular com incisão no lado direito do pescoço permitindo assim que o cérebro seja melhor permeado pelas soluções salina e paraformaldeído 4%. Após a retirada do encéfalo, com as regiões encefálicas de interesse, fatias de 100 μ m foram obtidas em um vibrátomo (LEICA, vt, 1000s) em intervalo 1:4.

Após a realização da perfusão, dissecação, e corte, as seções do tecido cerebral foram armazenadas em paraformaldeído 4% a 4 $^{\circ}$ c. As seções selecionadas foram lavadas com PB 0,1 m ph 7.2-7.4 antes da incubação em ácido bórico 0.2m ph 9,0 a 70 $^{\circ}$ c como descrito na tabela 2. Os sítios de ligação não específicos serão bloqueados pela incubação dos cortes em caseína a 10% durante 60 minutos. A incubação das seções no anticorpo primário parvalbumina (diluição 1:200, fabricante Millipore, código mab 1572) para a imunomarcação, ocorreu durante três dias a 4 $^{\circ}$ c com agitação suave. A peroxidase endógena foi inativada através de incubação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% dissolvido em PBS, durante 15 minutos. Após lavagem os cortes foram incubados durante 60 minutos no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector ABC kit elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

A atividade da enzima peroxidase foi detectada usando reação 3'3-diaminobenzidine (dab, sigma) e β -d-glucose/glucose-oxidase. Depois que o produto da reação foi formado gerou-se um precipitado azul-acinzentado nos locais de interação antígeno- anticorpo e as reações então foram interrompidas em tris ou PB 0,1 m. Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e desidratados em séries de etanol (70%, 80%, 90%, 100%, e 100%) seguido de xilol I e II.

Tabela 2. Passos da reação de imunohistoquímica (parvalbumina) com os tempos de imersão e enxague em cada reagente.

SOLUÇÃO	TEMPO DE IMERSÃO
Ácido bórico Ph 9 (70°C)	1 hora
PBST 5%	3x5 minutos
PBS 0.9%	3x2 minutos
Caseína 10%	1 hora
PBS 0.9%	3x2 minutos
Anticorpo primário (1:200) em PBS 0.9% (MAB-1572)	72 horas
PBS 0.9%	3x2 minutos
Anticorpo Secundário (1:500) em PBS 0.9% (BA-1400)	12 horas
Peróxido de hidrogênio 0,3% (fazer na hora)	15 minutos
PBS 0.9%	3x2 minutos
ABC (PBS) 1gota de A + 1 gota de B em 10ml de PBS	1 hora
GND (Niquel/DAB)	4 minutos
Glucose Oxidase	Até 30 minutos
PB (0,1M)	3x2 minutos

3.2 Contagem de células

Ao realizarmos a contagem de células (figura 6) utilizamos o microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000 System, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para conversão digital da informação relativa às coordenadas digitais (x, y e z) de cada ponto digitalizado. Esse sistema é acoplado a um microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (neurolucida, microbrightfield, williston, vt, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas contagens, a objetiva de 4,0x foi

substituída por outra planfluor, 100x (na1.3; df=0.2µm; Nikon, Japan) utilizada para as contagens a serem realizadas. (DINIZ, C. G. et al., 2016).

A correlação da estratégia de migração com a estimativa de células na região do núcleo magnocelular do ístmo tectal e da formação hipocampal foi mensurada através do método do fracionador óptico, método sem viés que permite fazemos a estimativa total de células do núcleo magnocelular do *tectum* óptico e da formação hipocampal (figuras 7 e 8), onde multiplica-se o número de neurônios dentro do bloco de contagem pelos valores da probabilidade da amostra, e estes valores dependerão das seguintes variáveis: 1) secções investigadas comparadas com o número total de secções dentro da região de interesse “section sampling fraction”; 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem “área sampling fraction” e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção “thickness sampling fraction” (HOWARD E REED, 2004). A fórmula da estimativa utilizada para a realização da contagem de células é:

$$N = \Sigma Q \cdot 1/ssf \cdot 1/asf \cdot 1/tsf$$

Nas tabelas 3 e 4 encontra-se a metodologia de contagem. Usamos uma padronização da altura e de largura para a caixas de contagem e para o grid. Além de definirmos a altura do dissector em 12, e uma zona de guarda de 2.

Figura 6. Abordagem do fracionador óptico para contagem de células. A - B Núcleo do istmo magnoelular (IMC). C - D Formação hipocampal (HF). As caixas de contagem exibem regiões de rejeição (linhas vermelhas) e aceitação (linhas verdes) (B e D). As áreas sombreadas em rosa indicam a área de interesse (A) = IMC, (C) HF. Barras de escala: A = 250 μ m; B = 130 μ m; C = 250 μ m e D = 180 μ m.

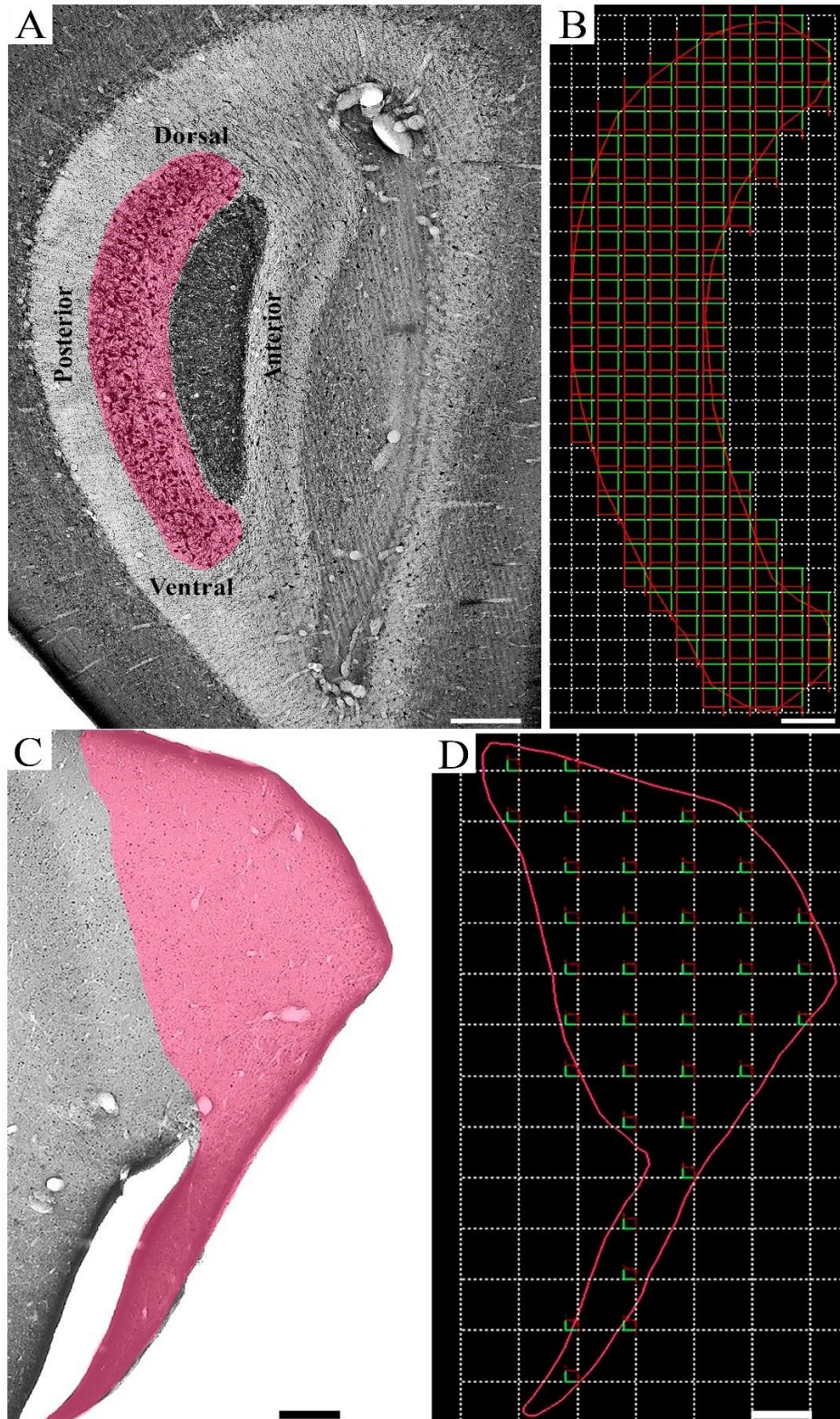


Tabela 3. Parâmetros estereológicos para contagem de neurônios marcados com Parvalbumina no IMC de *Actitis macularius*.

Animais	Espessura (µm)	Total de Secções	Total de Caixas Contadas	Total de Marcadores	Caixa (µm)	Grid (µm)	Altura do dissector	Intervalo entre secções
Recém-chegados								
01	56.3	6	424	2401	50x50	65x65	12	1 : 4
02	56.2	6	429	2775	50x50	65x65	12	1 : 4
03	57.8	6	505	2977	50x50	65x65	12	1 : 4
04	58.1	6	391	2342	50x50	65x65	12	1 : 4
05	57.1	6	428	2993	50x50	65x65	12	1 : 4
Média	57.1	6	435	2698				
Erro Padrão	0.38	0	18.76	138.88				
Repouso Migratório 1								
01	57.4	6	416	2757	50x50	65x65	12	1 : 4
02	56.9	6	513	2870	50x50	65x65	12	1 : 4
03	59.2	6	477	2564	50x50	65x65	12	1 : 4
04	56.8	6	432	3093	50x50	65x65	12	1 : 4
05	58.0	6	438	2969	50x50	65x65	12	1 : 4
Média	57.7	6	455	2851				
Erro Padrão	0.44	0	17.58	90.56				
Repouso Migratório 2								
01	58.5	6	396	2752	50x50	65x65	12	1 : 4
02	58.4	6	477	2744	50x50	65x65	12	1 : 4
03	57.0	6	450	2720	50x50	65x65	12	1 : 4
04	58.8	6	371	2730	50x50	65x65	12	1 : 4
05	57.2	6	505	2768	50x50	65x65	12	1 : 4
Média	57.9	6	440	2743				
Erro Padrão	0.37	0	24.89	8.38				
Pré-migração								
01	57.6	6	480	3037	50x50	65x65	12	1 : 4
02	57.2	6	478	2790	50x50	65x65	12	1 : 4
03	56.9	6	545	2993	50x50	65x65	12	1 : 4
04	56.8	6	459	2899	50x50	65x65	12	1 : 4
05	57.6	6	469	3072	50x50	65x65	12	1 : 4
Média	57.2	6	486	2958				
Erro Padrão	0.16	0	15.16	51.07				

Figura 7. A – P são fotomicrografias de pequeno e grande aumento mostrando a localização das porções do núcleo magnocelular do ístmo tectal em quatro aves da espécie *Actitis macularius* através da imunomarcação com parvalbumina. Cada ave de um período. Q – Corte parassagital indicando os eixos do encéfalo. Barras de escalas: A; B; E; F; I; J; M; N = 250 μ m. C; G; K; O = 125 μ m. D; H; L; P = 25 μ m. Q = 1500 μ m.

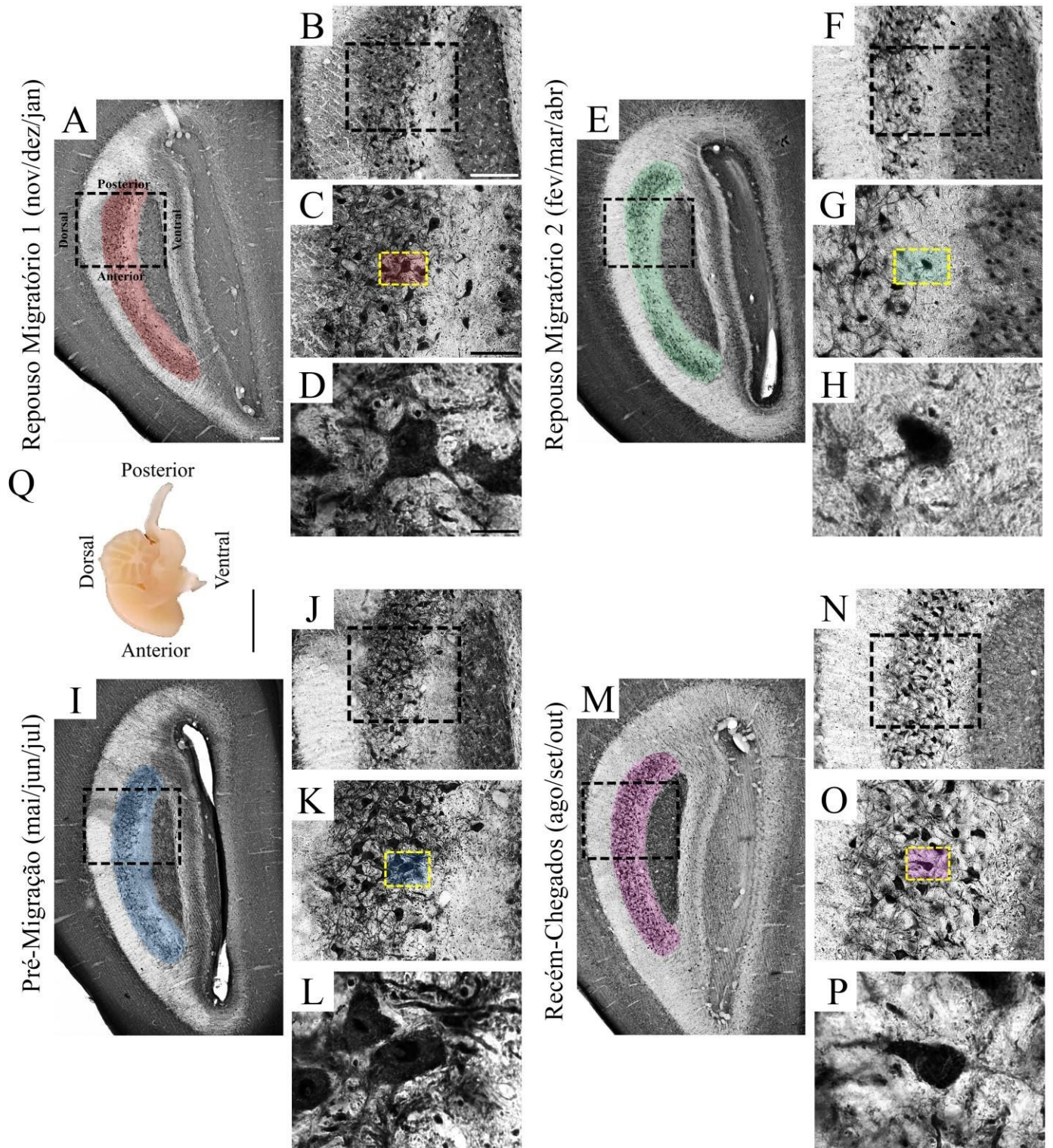
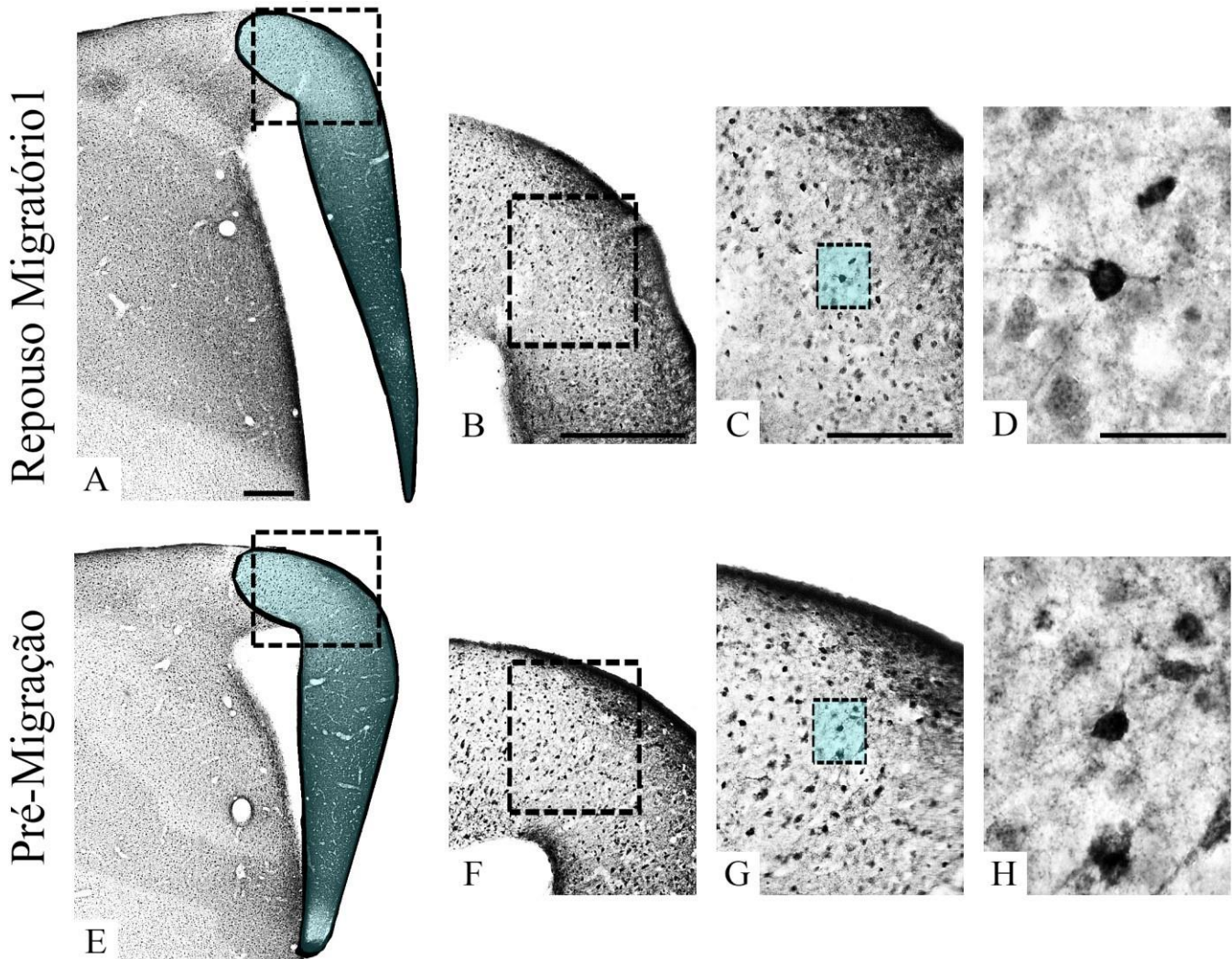


Table 4. Parâmetros estereológicos para contagem de neurônios marcados com Parvalbumina na FH de *Actitis macularius*.

Animais	Espessura (µm)	Total de Secções	Total de Caixas Contadas	Total de Marcadores	Caixa (µm)	Grid (µm)	Altura do dissector	Intervalo entre secções
Repouso Migratório 1								
01	40.2	8	410	17.405	50x50	180x180	12	1 : 4
02	43.0	8	432	18.281	50x50	180x180	12	1 : 4
03	35.8	9	465	20.125	50x50	180x180	12	1 : 4
04	43.7	7	431	22.473	50x50	180x180	12	1 : 4
05	45.6	7	394	15.614	50x50	180x180	12	1 : 4
Média	41.7	8	426	18.780				
Erro Padrão	1.70	0.3	9.8	0.9593				
Pré-migração								
01	45.4	7	414	22.332	50x50	180x180	12	1 : 4
02	42.2	8	366	25.369	50x50	180x180	12	1 : 4
03	45.1	7	336	26.522	50x50	180x180	12	1 : 4
04	43.2	6	298	24.709	50x50	180x180	12	1 : 4
05	42.5	8	413	26.881	50x50	180x180	12	1 : 4
Média	43.7	7	365	25.163				
Erro Padrão	0.70	0.4	22.4	0.8081				

Figura 8. A – H são fotomicrografias de pequeno e grande aumento mostrando a localização das porções da formação hipocampal em duas aves da espécie *Actitis macularius* através da imunomarcação com parvalbumina. Cada ave de um período. Escalas: A; B; C; = 250 μ m e D = 25 μ m.



3.3 Análise estatística

Os diferentes grupos foram comparados através da aplicação do teste de análise de variância (ANOVA) um critério, com níveis de confiança estabelecidos em 95 ou 99% ($p < 0.05$ ou $p < 0.01$). Para comparações realizadas apenas entre 2 grupos experimentais, foi utilizado a análise paramétrica, adotando-se o teste t, duas amostras independentes bi-caudal, com intervalo de confiança estabelecido em 95% ou 99% ($p < 0.05$ ou $p < 0.01$). Lembrando que para realizar os testes, primeiro foram identificados os valores extremos para mais ou para menos, através da normalidade, para que eles fossem excluídos ou substituídos.

4. RESULTADOS

4.1 Contagem de neurônios parvalbuminérgicos

Apresentamos em tabelas os dados da contagem celular na Estereologia com a estimativa do número total de células, espessura média e o erro de Scheaffer de cada animal do estudo. Na tabela 5 encontra-se o grupo de repouso migratório 1 sendo comparado com o grupo de pré-migração, onde a contagem foi realizada na FH. Na tabela 6, há os quatro grupos analisados no período de invernada, no IMC.

Tabela 5. Estimativa do número total de neurônios marcados com parvalbumina na formação hipocampal com seu coeficiente de erro (CE) para *Actitis macularius* nas janelas de pré-migração e repouso migratório 1.

Animais	Total de células	Espessura (µm)	CE Scheaffer	Animais	Total de células	Espessura (µm)	CE Scheaffer
Pré-migração				Repouso migratório 1			
01	22.332	45.4	0.039	01	17.405	40.2	0.048
02	25.369	42.2	0.044	02	18.281	43.0	0.041
03	26.522	45.1	0.044	03	20.125	35.8	0.038
04	24.709	43.2	0.049	04	22.473	43.7	0.036
05	26.881	42.5	0.036	05	15.614	45.6	0.050
Média	25.162	43.7	0.042	Média	18.779	41.6	0.043
DP	1.807			DP	2.627		
CV	0.0718146411			CV	0.139890303		
CV ²	0.00515734268			CV ²	0.0195692969		
CE ²	0.001764			CE ²	0.001849		
CE ² /CV ²	0.342036609			CE ² /CV ²	0.0944847436		
CV ² - CE ²	0.00339334268			CV ² - CE ²	0.0177202969		
CBV ² (%)	66			CBV ² (%)	91		

CV = Coeficiente de variação; CE = Erro de Scheaffer; CBV² = Coeficiente Biológico de Variação; DP = Desvio Padrão.

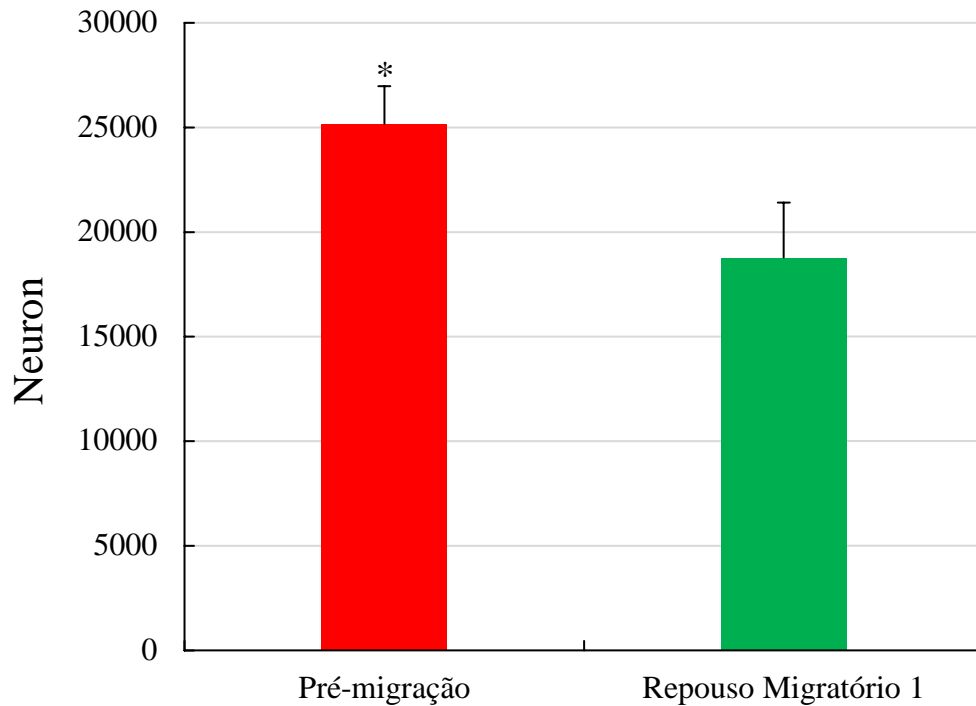
Tabela 6. Estimativa do número total de neurônios marcados com parvalbumina no IMC com seu coeficiente de erro (CE) para *Actitis macularius* em quatro janelas de invernada.

Animais	Total de Células	Espessura (µm)	CE Scheaffer	Animais	Total de células	Espessura (µm)	CE Scheaffer
Recém-chegados				Repouso Migratório 1			
01	75906.65	56.3	0.033	01	89558.08	57.4	0.027
02	88014.84	56.2	0.031	02	91256.18	56.9	0.033
03	96814.56	57.8	0.028	03	84616.27	59.2	0.026
04	76307.64	58.1	0.029	04	98889.91	56.8	0.027
05	96471.66	57.1	0.029	05	97205.89	58.0	0.031
Média	86.703	57.1	0.030	Média	92.305	57.7	0.029
DP	10.296			DP	5.812		
CV	1.19			CV	6.30		
CV ²	1.42			CV ²	39.69		
CE ²	0.001			CE ²	0.001		
CE ² /CV ²	7.042			CE ² /CV ²	5.520		
CV ² - CE ²	1.419			CV ² - CE ²	39.689		
CBV ² (%)	99.93			CBV ² (%)	99.99		
Repouso Migratório 2				Pré-migração			
01	90563.60	58.5	0.032	01	98558.81	57.6	0.028
02	90186.81	58.4	0.026	02	89976.37	57.2	0.030
03	87111.20	57.0	0.028	03	96283.66	56.9	0.026
04	90502.30	58.8	0.029	04	93577.60	56.8	0.060
05	89140.69	57.2	0.027	05	100075.09	57.6	0.029
Média	89.500	57.9	0.028	Média	95.694	57.2	0.029
DP	1.452			DP	4.028		
CV	1.62			CV	4.21		
CV ²	2.62			CV ²	17.72		
CE ²	0.001			CE ²	0.001		
CE ² /CV ²	3.8168			CE ² /CV ²	5.6433		
CV ² - CE ²	2.619			CV ² - CE ²	17.719		
CBV ² (%)	99.97			CBV ² (%)	99.99		

CV = Coeficiente de variação; CE = Erro de Scheaffer; CVB² = Coeficiente Biológico de Variação; DP = Desvio Padrão.

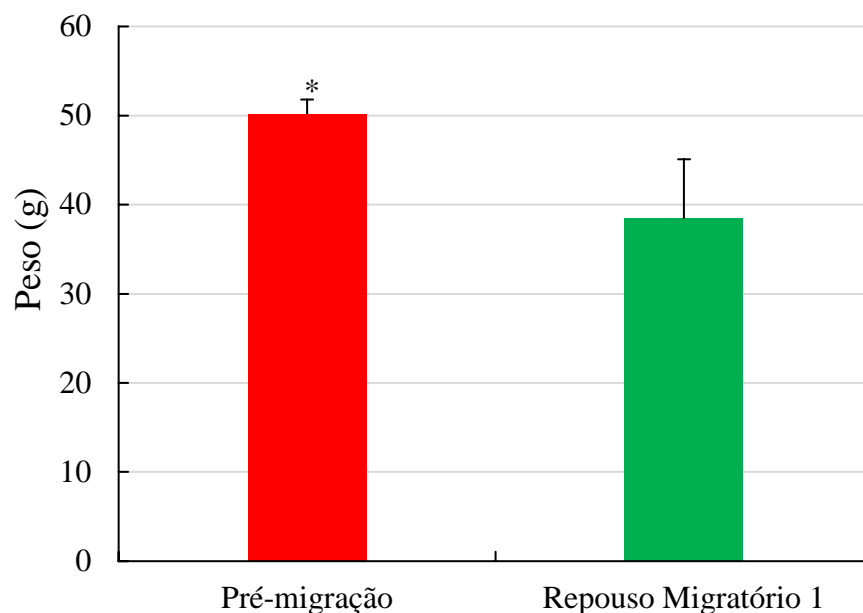
Na quantificação do número de neurônios e na estimativa do volume do IMC não houve diferença significativa entre os grupos. Já na FH (figura 9), os resultados demonstraram influência significativa da migração. Onde os animais de Pré-migração apresentaram aumento significativo do número de células em comparação com os animais de repouso migratório 1 (p = 0.002).

Figura 9. Representação gráfica dos resultados da contagem estereológica dos neurônios marcados com parvalbumina da formação hipocampal de 5 indivíduos de *A. macularius*, capturados em pré-migração e repouso migratório 1 do período de invernada.



Realizamos também a análise de peso dos animais e verificamos que durante o período de invernada, conforme estas aves repousam e se preparam para voltar ao hemisfério norte o peso delas vai aumentando (figura 10), pois ao comparar animais de repouso migratório 1 (38.5 ± 6.6) com animais de pré-migração (50.2 ± 1.6) obtivemos um p bitateral com o valor expressivo de 0.04 através do teste t para duas amostras independentes.

Figura 10. Representação gráfica dos resultados do peso de 5 indivíduos de *A. macularius*, capturados em pré-migração e repouso migratório 1 do período de invernada.



5. DISCUSSÃO

Com base em evidências anteriores de que a FH está envolvida no aprendizado e na memória (BARKAN et al., 2017) e na interação social (RYTOVA et al., 2019), e que o IMC é essencial para o controle dos movimentos da cabeça, pescoço e olhos (FAUNES et al. ., 2013), testamos a hipótese de que os neurônios parvalbuminérgicos aumentariam na FH e permaneceriam inalterados no IMC durante o período de invernada de *A. macularius*. Não encontramos diferença significativa no número total de neurônios parvalbuminérgicos entre diferentes janelas de tempo no IMC, enquanto as estimativas dos neurônios parvalbuminérgicos mostraram aumento significativo na formação hipocampal no grupo de pré-migração. Sugerimos que a proliferação de neurônios parvalbuminérgicos na FH faça parte das mudanças adaptativas dos circuitos do hipocampo envolvidos com aprendizado e memória e interação social necessárias ao processo migratório de volta aos nichos reprodutivos no hemisfério norte.

5.1 Interação social, neurônios parvalbuminérgicos e migração

O hipocampo ventral do mamífero parece ser essencial para o processamento de informações emocionais e isso inclui interação social e a parvalbumina (PEREZ et al., 2019). Além disso, déficits nos neurônios parvalbuminérgicos no hipocampo ventral têm sido associados à evitação social ao longo de uma função aberrante do sistema de dopamina (BOLEY et al., 2014). Se esses achados também são válidos para a formação hipocampal de *A. macularius*, é provável que um aumento nos neurônios fotovoltáicos possa aumentar a atividade inibitória, facilitando a interação social.

Foi descrito anteriormente que as relações sociais entre aves do mesmo grupo podem facilitar o comportamento coletivo a seguir regras de interação semelhantes para formar bandos e organizar vôos coletivos durante a migração. De fato, dentro dos bandos, os pássaros pareados interagem menos do que os pássaros não pareados e batiam as asas mais lentamente, o que poderia resultar em economia de energia. Em contraste, bandos com aves mais emparelhadas reduzem a eficiência na transferência de informações através do rebanho (LING et al., 2019). Como o relacionamento social, o aprendizado e a memória são

influenciados pelos neurônios PV no hipocampo, é uma tentação especular que o aumento significativo dos neurônios marcados com parvalbumina na formação hipocampal do grupo de pré-migração possa ser importante para estabelecer relacionamentos sociais entre os membros do grupo. Importante destacar que *A. macularius* migra isoladamente ou em pequenos grupos (REED et al., 2013), que no último caso, a interação social pode aumentar a eficiência na transferência de informações através do bando.

5.2 Neurônios parvalbuminérgicos, neurogênese hipocampal, aprendizado e memória

Os neurônios PV são importantes para a aprendizagem e a memória, que incluem o reconhecimento da paisagem ao longo da jornada e estímulos visoespaciais locais em pequena escala para reconhecer as escalas associadas ao processo migratório (BINGMAN E MACDOUGALL-SHACKLETON, 2017). Como descobrimos um aumento de seu número na formação hipocampal, sugerimos que o aumento dos neurônios fotovoltáicos pode ser pelo menos parte da resposta adaptativa do circuito local do hipocampo associado a essas tarefas. Em concordância, relatórios anteriores demonstraram que o número de PV é modificado em face de estímulos somatomotores, visoespaciais e cognitivos, tanto em mamíferos (ARIDA et al., 2007; CARONI, 2015a; CARONI, 2015b; DONATO et al., 2015; GAINNEY E FELDMAN, 2017; MURUETA-GOYENA et al., 2018; PLACENCIA et al., 2019) quanto em aves (CHAUDHURY et al., 2006; CORNEZ et al., 2017; WADA et al., 2004). Também foi demonstrado que a proteína de ligação ao cálcio (parvalbumina) é um marcador neuroplástico nas regiões cerebrais das aves de aprendizado e memória, que aumenta seu número como resultado da estimulação multissensorial, incluindo o hipocampo (BARKAN et al., 2017) e o núcleo de canto das aves.(BRENOWITZ E LARSON, 2015; ZENGIN-TOKTAS E WOOLLEY, 2017).

Além disso, a neurogênese também aumenta na formação hipocampal de outras duas espécies de aves costeiras com vôos migratórios contrastantes (*Calidris pusilla* e *Charadrius semipalmatus*) durante o período de invernada no litoral de Bragança, quando os astrócitos radiais já aumentavam sua área convexa-casco em correlação linear com um aumento no número total de novos neurônios (marcado com DCX imunológico) (MENDES DE LIMA et al., 2019). É importante dizer que foi encontrada maior neurogênese em *Charadrius*

semipalmatus, a espécie que mais se baseia em informações visoespaciais para completar sua jornada migratória (MENDES DE LIMA et al., 2019). Como a rota migratória de *A. macularius* é mais próxima da de *C. semipalmatus*, com múltiplas escalas para alimentação e repouso, especulamos que a neurogênese na formação hipocampal de *C. semipalmatus* pode também atingir o pico na janela de tempo de pré-migração, como ocorreu em *A. macularius* e, inversamente, os recém-chegados a *A. macularius* mostrariam alterações aumentadas de astrócitos radiais após o processo migratório.

Em nossos estudos anteriores sobre as influências das rotas migratórias contrastantes nos astrócitos do hipocampo de *C. pusilla* (CARVALHO-PAULO et al., 2017) e *C. semipalmatus* (resultados não publicados), descobrimos que o vôo transatlântico ininterrupto de *C. pusilla* por 4 a 5 dias estava associado a uma redução significativa do número de astrócitos e ao encolhimento de seus mandris, reduzindo significativamente sua complexidade morfológica, enquanto as alterações nos astrócitos do hipocampo de *C. semipalmatus* se limitavam à redução de sua complexidade morfológica. Como essas alterações morfológicas não foram influenciadas por diferenças filogenéticas (HENRIQUE et al., resultados não publicados), sugerimos que esses efeitos distintos na morfologia e números dos astrócitos estavam associados aos padrões migratórios contrastantes das duas espécies. Embora *A. macularius* seja uma espécie diferente, sua rota migratória é mais próxima da *C. semipalmatus*, sugerindo que eles possivelmente teriam seus números de astrócitos inalterados nos recém-chegados, e que possíveis alterações morfológicas deletérias detectadas nos recém-chegados seriam menos intensas e recuperado no momento da pré-migração.

Assim, é razoável especular que, durante o período de invernada, todas as mudanças fisiológicas necessárias para a migração para os locais de reprodução no hemisfério norte sejam realizadas antes do verão boreal, e isso inclui células da glia e recuperação neuronal.

5.3 Plasticidade limitada, mapas visuais, controle de movimento da cabeça e pescoço e olhos

Diferente da formação hipocampal, os núcleos do istmo magnocelular permaneceram inalterados. De fato, o número de neurônios parvalbuminérgicos no núcleo do istmo do *tectum opticum*, uma região que recebe projeções organizadas das camadas subjacentes do *tectum*

opticum (FAUNES et al., 2013) permaneceu no grupo de pré-migração, como ocorreu nos recém-chegados. Como esses neurônios do istmo tectal são organizados topograficamente, eles precisam ser preservados para desempenhar suas funções. Assim, é esperada plasticidade neuronal não significativa durante o processo migratório. Mapas visuotópicos que representam o campo visual no *tectum* e suas projeções para comandar os neurônios do IMC, permitindo a localização espacial de objetos em movimento para os quais a atenção deve ser direcionada durante todo o processo migratório, portanto, devem permanecer inalterados. Após sua construção, que é amplamente definida geneticamente (HUBERMAN et al., 2008; KARTEN, 2015), os circuitos precisam ser mantidos com pouca plasticidade.

5.4 Limitações metodológicas

Para quantificar o número de neurônios fotovoltáicos na formação hipocampal e no IMC, aplicamos o fracionador óptico, um método preciso de quantificação que combina propriedades de um disector e fracionador ópticos que foi usado em uma variedade de estudos para determinar o número de células em múltiplas regiões cerebrais. O fracionador óptico não é afetado por alterações histológicas ou encolhimento, uma questão importante ao realizar análises comparativas entre grupos experimentais (GLASER E GLASER, 2000; WEST et al., 1991; WEST, 2002).

A principal variabilidade na presente análise foi biológica, com a razão $CE2 / CV2 < 0,05$, onde CE é o coeficiente de erro estimado (coeficiente de Scheaffer) e CV é o coeficiente de variação, ou seja, a razão entre CE2 e a variação observada do O grupo CV2 deve ser menor que 0,05 (SLOMIANKA e WEST, 2005). Para minimizar possíveis fontes de variação, todos os dados foram coletados e analisados com a mesma metodologia imparcial e todas as amostras foram obtidas utilizando os mesmos protocolos de processamento de tecidos. Assim, esperávamos reduzir fontes não biológicas de erros para níveis aceitáveis.

5.4.1 Limitações técnicas não estereológicas

A análise estereológica pode revelar resultados contraditórios de diferenças nos métodos de estimação, diferentes linhagens animais, variações nos procedimentos

histológicos, diferentes protocolos estereológicos e ambiguidades na definição dos objetos e áreas de interesse. Para reduzir essas possíveis fontes de erro, todas as amostras foram obtidas com os mesmos protocolos de processamento de tecidos (perfusão, imunorreação, desidratação, contra-coloração e limpeza) e todos os dados foram coletados e analisados com o mesmo método estereológico, software e hardware.

Para detectar possíveis variações nos critérios de identificação dos objetos de interesse, fomos submetidos a procedimentos de verificação dos resultados, fazendo com que diferentes investigadores contassem as mesmas regiões usando o mesmo anticorpo monoclonal de PV como marcador seletivo para neurônios inibitórios. Como resultado, possíveis variações associadas a fontes não biológicas foram reduzidas a níveis aceitáveis (MOUTON et al., 2002; SLOMIANKA E WEST, 2005).

6. CONCLUSÃO

No presente relatório, concentramos nossa atenção no período de invernada do maçarico-pintado (*Actitis macularius*) e estudamos as mudanças progressivas na plasticidade cerebral em duas regiões do sistema nervoso central, empregando um marcador de subpopulação neuronal parvalbuminérgica. Essa subpopulação neuroplástica tem seu número de hipocampo modificado em face de estímulos sociais, multissensoriais e cognitivos, tanto em mamíferos quanto em aves. Para procurar resposta neuroplástica diferencial, também estimamos, ao mesmo tempo, janelas, o número de neurônios parvalbuminérgicos no núcleo do istmo do *tectum opticum*, uma região que recebe projeções organizadas das camadas subjacentes do *tectum opticum* e projeta seus axônios altamente divergentemente de volta ao tectum.

Como esses neurônios do istmo tectal são organizados topograficamente e, portanto, precisam ser preservados para desempenhar suas funções, não se espera que a plasticidade mude durante o processo migratório. Em comparação com os recém-chegados, encontramos aumento significativo do número total de células de parvalbumina na formação hipocampal do grupo pré-migração, mas não houve alterações significativas no núcleo magnocelular do istmo. Sugerimos que a proliferação de neurônios parvalbuminérgicos no período pré-migratório faça parte das mudanças adaptativas dos circuitos do hipocampo para enfrentar a longa viagem de volta aos nichos reprodutivos do hemisfério norte.

REFERÊNCIAS

- ALISON BROWNLIE., ADRIANA DONOVAN., STEPHEN J. PRATT., BARRY H. PAW., ANDREW C., OATES., CARLO BRUGNARA., H. EWA WITKOWSKA., SHIGERU SASSA & LEONARD I. ZON., 1998. Positional cloning of the zebrafish sauterne gene: A model for congenital sidero blastic anaemia. *Nature genetics*. vol. 20.
- ARIDA, R.M., SCORZA, C.A., SCORZA, F.A., GOMES DA SILVA, S., DA GRAÇA NAFFAH- MAZZACORATTI, M., CAVALHEIRO, E.A., 2007. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31, pp. 814-22.
- ARIDA, R.M., SCORZA, F.A., GOMES DA SILVA, S., CYSNEIROS, R.M., CAVALHEIRO, E.A., 2011. Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. *Am J Phys Med Rehabil*. 90, pp. 452-65.
- ATOJI, Y., SARKAR, S., WILD, J.M., 2016. Proposed homology of the dorsomedial subdivision and V-shaped layer of the avian hippocampus to Ammon's horn and dentate gyrus, respectively. *Hippocampus*. 26, pp.1608-1617.
- ATOJI, Y., WILD, J.M., 2006. Anatomy of the avian hippocampal formation. *Rev Neurosci*.17, pp. 3-15.
- ATOJI, Y., WILD, J.M., 2007. Limbic system in birds: morphological basis. In *Integration of Comparative Neuroanatomy and Cognition*. Vol., S. Wantanabe, M.A. Hofman, ed.^eds. Keio University Press, Tokyo, pp. 97-123.
- AZEVEDO JÚNIOR, S.M., DIAS, M.M., DE LARRAZÁBAL, M.E., JÚNIOR, W.R.T., LYRA-NEVES, R.M., FERNANDES, C.J.G., 2001. Recapturas e recuperações de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil.
- BALDA, R. P. & KAMIL, A. C., 1992 Long-term spatial memory in Clark's nutcrackers, *Nucifraga columbiana*. *Anim. Behav*. 44, pp. 761–769.
- BALDA, R. P., WILTSCSKO, W., 1991. Caching and recovery inscrub jays: Transfer of sun-compass directions from shaded to sunny areas. *Condor* 93, 1020–1023.
- BARKAN, S., YOM-TOV, Y., BARNEA, A., 2017. Exploring the Relationship between Brain Plasticity, Migratory Lifestyle, and Social Structure in Birds. *Front Neurosci*. 11, pp. 139.
- BARROS, D.F., ALBERNAZ, A.L., 2014. Possible impacts of climate change on wetlands and its biota in the Brazilian Amazon. *Braz J Biol*. 74, 810-20.

- BERSON, D.M., STEIN, J.J., 1995. Retinotopic organization of the superior colliculus in relation to the retinal distribution of afferent ganglion cells. *Vis Neurosci.* 12, pp. 671-86.
- BINGMAN, V.P., MACDOUGALL-SHACKLETON, S.A., 2017. The avian hippocampus and the hypothetical maps used by navigating migratory birds (with some reflection on compasses and migratory restlessness). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 203, 465-474.
- BIOSCIENCE, M. Stereo Investigator 10 Users Guide. MBF Bioscience., 2011. ISBN9780978647148. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=DiD5ygAACAAJ>>.
- BISCHOF, H.-J. AND WATANABE, S., 1997. On the structure and function of the tectofugal visual pathway in laterally eyed birds. *Eur. J. Morphol.* 35, pp. 246-254
- BOLEY, A.M., PEREZ, S.M., LODGE, D.J., 2014. A fundamental role for hippocampal parvalbumin in the dopamine hyperfunction associated with schizophrenia. *Schizophr Res.* 157, 238-43.
- BRENOWITZ, E.A., LARSON, T.A., 2015. Neurogenesis in the adult avian song-control system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7.
- BULLUCK, L., AMES, E., BAYLY, N., REESE, J., VIVERETTE, C., WRIGHT, J., CAGUAZANGO, A., TONRA, C., 2019. Habitat-dependent occupancy and movement in a migrant songbird highlights the importance of mangroves and forested lagoons in Panama and Colombia. *Ecol Evol.* 9, 11064-11077.
- CARONI, P., 2015. Regulation of Parvalbumin Basket cell plasticity in rule learning. *Biochem Biophys Res Commun.* 460, pp. 100-3.
- CARONI, P., 2015b. Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. *Curr Opin Neurobiol.* 35, 66-73.
- CARVALHO-PAULO, D., DE MORAIS MAGALHÃES, N.G., DE ALMEIDA MIRANDA, D., DINIZ, D.G., HENRIQUE, E.P., MORAES, I.A.M., PEREIRA, P.D.C., DE MELO, M.A.D., DE LIMA, C.M., DE OLIVEIRA, M.A., GUERREIRO-DINIZ, C., SHERRY, D.F., DINIZ, C.W.P., 2017. Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper. *Front Neuroanat.* pp. 11, 126.
- CHAUDHURY, S., NAG, T.C., WADHWA, S., 2006. Prenatal acoustic stimulation influences neuronal size and the expression of calcium-binding proteins (calbindin D-28K and parvalbumin) in chick hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 32, pp. 117-26.

- CLAYTON, N.S., DICKINSON, A., 1998. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*. 395, pp. 272-4.
- COLOMBO, M., BROADBENT, N., 2000a. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? *Neurosci Biobehav Rev*. 24, pp. 465-84.
- COLOMBO, M., BROADBENT, N., 2000b. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 24, pp. 465-484.
- CORNEZ, G., MADISON, F.N., VAN DER LINDEN, A., CORNIL, C., YODER, K.M., BALL, G.F., BALTHAZART, J., 2017. Perineuronal nets and vocal plasticity in songbirds: A proposed mechanism to explain the difference between closed-ended and open-ended learning. *Dev Neurobiol*. 77, pp. 975-994.
- DE MORAIS MAGALHÃES, N.G., GUERREIRO DINIZ, C., GUERREIRO DINIZ, D., PEREIRA HENRIQUE, E., CORRÊA PEREIRA, P.D., MATOS MORAES, I.A., DAMASCENO DE MELO, M.A., SHERRY, D.F., WANDERLEY PICANÇO DINIZ, C., 2017. Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*). *PLoS One*. 12, e0179134.
- DERE, E., HUSTON, J.P., DE SOUZA SILVA, M.A., 2005. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Res Brain Res Protoc*. 16, pp. 10-9.
- DINIZ, C.G., MAGALHÃES, N.G., SOUSA, A.A., SANTOS FILHO, C., DINIZ, D.G., LIMA, C.M., OLIVEIRA, M.A., PAULO, D.C., PEREIRA, P.D., SHERRY, D.F., PICANÇO-DINIZ, C.W., 2016b. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Braz J Med Biol Res*. 49, e5005.
- DINIZ, C.G., MAGALHAES, N.G.M., SOUSA, A.A., SANTOS, C., DINIZ, D.G., LIMA, C.M., OLIVEIRA, M.A., PAULO, D.C., PEREIRA, P.D.C., SHERRY, D.F., PICANÇO-DINIZ, C.W., 2016a. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 49.
- DONATO, F., CHOWDHURY, A., LAHR, M., CARONI, P., 2015. Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning. *Neuron*. 85, 770-86.
- FAUNES, M., FERNÁNDEZ, S., GUTIÉRREZ-IBÁÑEZ, C., IWANIUK, A.N., WYLIE, D.R., MPODOZIS, J., KARTEN, H.J., MARÍN, G., 2013. Laminar segregation of GABAergic neurons in the avian nucleus isthmi pars magnocellularis: a retrograde tracer

- and comparative study. *J Comp Neurol.* 521, pp. 1727-42.
- FROST, B.J. & NAKAYAMA, K., 1983. Single visual neurons code opposing motion independent of direction. *Science* 220, Vol. 220 DOI: 10.1126/science. 6836313 *Jo. Science* (New York, N.Y). pp. 744-745.
- FROST, R. O., MARTEN, P., LAHART, C., & ROSENBLATE, R., 1990. The dimensions of perfectionism. *REVNEURO.2006.17.1-2.3 Cognitive Therapy and Research*,14, pp. 449–468.
- FROST, T. M., D. L. DEANGELIS, S. M. BARTELL, D. J. HALL, AND S. H. HURLBERT. 1988. Scale in the design and interpretation of aquatic community research. S. R. Carpenter, ed. *Complex Interactions in Lake Communities*. Springer-Verlag, New York. Pp. 229-260.
- GAINNEY, M.A., FELDMAN, D.E., 2017. Multiple shared mechanisms for homeostatic plasticity in rodent somatosensory and visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372.
- GLASER, J.R., GLASER, E.M., 2000. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem Neuroanat.* 20, 115-26.
- GUNDERSEN, H., JENSEN, E., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147, 229–263.
- GUNDERSEN, H.J., JENSEN, E.B., KIEU, K., NIELSEN, J., 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. *J Microsc.* 193, 199-211.
- GUPTA, S., MAURYA, R., SAXENA, M., & SEN, J., 2012. Defining Structural Homology Between The Mammalian And Avian Hippocampus Through Conserved Gene Expression Patterns Observed In The Chick Em Bryo. *Developmental Biology*, 366(2), pp. 125–141.
- GUTIÉRREZ-IBÁÑEZ, C., IWANIUK, A. N., MOORE, B. A., FERNÁNDEZ-JURICIC, E., CORFIELD, J. R., KRILOW, J. M., ... WYLIE, D. R. (2014). Mosaic and Concerted Evolution in the Visual System of Birds. *PLoS ONE*, 9(3), e90102.
- HAMPTON, R. R., & SHETTLEWORTH, S. J., 1996. Hippocampus and memory in a food-storing and in a nonstoring bird species. *Behavioral Neuroscience*, 110(5), pp. 946–964.
- HAMPTON, R. R., SHERRY, D. F., SHETTLEWORTH, S. J., KHURGEL, M. & IVY, G., 1995. Hippocampal volume and food-storing behaviour are related in parids. *Brain Behav. Evol.* 45, pp. 54–61.
- HEALY, S. D. & KREBS, J. R., 1992. Food storing and the hippocampus in corvids: amount

- and volume are correlated. *Proc. R. Soc. B* 248, pp. 241–245.
- HITCHCOCK, C. L., SHERRY, D. F., 1990. Long-term memory for cache sites in the black-capped chickadee. *Animal Behaviour*, 40, pp. 701-712.
- HOWARD, C.; REED, M., 2005. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*.
- HOWARD, V.; REED, M., 2004. *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. Garland Science.
- HUBERMAN, A.D., FELLER, M.B., CHAPMAN, B., 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci.* 31, pp. 479-509.
- KARTEN, H.J., 2015. Vertebrate brains and evolutionary connectomics: on the origins of the mammalian 'neocortex'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370.
- KAUFFMAN, J.B., BERNARDINO, A.F., FERREIRA, T.O., GIOVANNONI, L.R., DE O GOMES, L.E., ROMERO, D.J., JIMENEZ, L.C.Z., RUIZ, F., 2018. Carbon stocks of mangroves and salt marshes of the Amazon region, Brazil. *Biol Lett.* 14.
- KEARY, N., VOSS, J., LEHMANN, K., BISCHOF, H.J., LÖWEL, S., 2010. Optical imaging of retinotopic maps in a small songbird, the zebra finch. *PLoS One.* 5, e11912.
- KNUDSEN, E.I., 2007. Fundamental components of attention. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 57-78.
- KREBS, J.R., SHERRY, D.F., HEALY, S.D., PERRY, V.H., VACCARINO, A.L., 1989. Hippocampal specialization of food-storing birds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, pp.1388-92.
- LING, H., MCLVOR, G.E., VAN DER VAART, K., VAUGHAN, R.T., THORNTON, A., OUELLETTE, N.T., 2019. Costs and benefits of social relationships in the collective motion of bird flocks. *Nat Ecol Evol.* 3, 943-948.
- MAGALHAES, N.G.D., DINIZ, C.G., DINIZ, D.G., HENRIQUE, E.P., PEREIRA, P.D.C., MORAES, I.A.M., DE MELO, M.A.D., SHERRY, D.F., DINIZ, C.W.P., 2017. Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*). *Plos One.* 12.
- MARIN, G. J., DURAN, E., MORALES, C., GONZALEZ-CABRERA, C., SENTIS, E., MPODOZIS, J., ET AL., 2012. Attentional capture? Synchronized feedback signals from the isthmi boost retinal signals to higher visual areas. *J. Neurosci.* 32, pp. 1110–1122.
- MENDES DE LIMA, C., DOUGLAS CORRÊA PEREIRA, P., PEREIRA HENRIQUE, E., AUGUSTO DE OLIVEIRA, M., CARVALHO PAULO, D., SILVA DE SIQUEIRA, L., GUERREIRO DINIZ, D., ALMEIDA MIRANDA, D., ANDRÉ DAMASCENO DE

- MELO, M., GYZELY DE MORAIS MAGALHÃES, N., FRANCIS SHERRY, D., WANDERLEY PICANÇO DINIZ, C., GUERREIRO DINIZ, C., 2019. Differential Change in Hippocampal Radial Astrocytes and Neurogenesis in Shorebirds With Contrasting Migratory Routes. *Front Neuroanat.* 13, 82.
- MORRISON, R., ROSS, R.K., 1989. Atlas of Nearctic shorebirds on the coast of South America. Vol. 2, Canadian Wildlife Service Ottawa (Canada).
- MOUTON, P.R., LONG, J.M., LEI, D.L., HOWARD, V., JUCKER, M., CALHOUN, M.E., INGRAM, D.K., 2002. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res.* 956, 30-5.
- MURUETA-GOYENA, A., ORTUZAR, N., GARGIULO, P., LAFUENTE, J.V., BENGOTXEA, H., 2018. Short- Term Exposure to Enriched Environment in Adult Rats Restores MK-801-Induced Cognitive Deficits and GABAergic Interneuron Immunoreactivity Loss. *Mol Neurobiol.* 55, 26-41.
- MYERS, J., MARON, J.L., SALLABERRY, M., 1985. Going to extremes: Why do Sanderlings migrate to the Neotropics? *Ornithological Monographs.* pp. 520-535.
- NEVIN, L.M., Robles, E., Baier, H., Scott, E.K., 2010. Focusing on optic *tectum* circuitry through the lens of genetics. *BMC Biol.* 8, 126.
- NGUYEN A.P. et al., 2004. A dissociation of motion and spatial-pattern vision in the avian telencephalon: implications for the evolution of "visual streams". *J Neurosci* 24. pp. 4962-4970.
- NÓBREGA, P.F., AGUIAR, J.A., FIGUEIRA, J.E., 2015. First records of *Charadrius semipalmatus*, Bonaparte 1825 (Charadriidae) and *Gelochelidon nilotica* Gmelin 1789 (Sternidae) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Braz J Biol.* 75, pp. 451-4.
- OLIVEIRA, M., 2018. Em direção à costa brasileira fugindo do inverno: rotas migratórias contrastantes e plasticidade diferencial dos astrócitos hipocâmpais 10.13140/RG.2.2.30832.71688.
- PEREIRA, P. D. C. Neuroecologia de aves da família charadriidae: estudos arquitetônicos, estereológicos e filogenéticos., 2017. Disponível em: <
<http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/9442>>.
- PEREZ, S.M., BOLEY, A., LODGE, D.J., 2019. Region specific knockdown of Parvalbumin or Somatostatin produces neuronal and behavioral deficits consistent with those observed in schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 9, 264.
- PLACENCIA, E.V.D., SERRA, F.T., HENRIQUE, J.S., ARIDA, R.M., GOMES DA SILVA,

- S., 2019. Hippocampal distribution of parvalbumin neurons in female and male rats submitted to the same volume and intensity of aerobic exercise. *Neurosci Lett.* 690, pp. 162-166.
- POLÊMICA NA ILHA GRANDE RJ – BIÓLOGA CORTA REDE DE NEBLINA E SOLTA AVES. **Guia Birding Brasil**, Rio de Janeiro, 18 de jun. de 2018. Disponível em: <<https://guiabirdingbrasil.com.br/polemica-na-ilha-grande-rj-biologa-corta-rede-de-neblina-e-solta-aves/>>. Acesso em: 08 de jan. de 2020.
- QUEENSLAND GOVERNMENT. Aves Marinhas. Disponível em: <https://environment.des.qld.gov.au/wildlife/threatened-species/shorebirds/>. Acesso em 08 de jan. de 2020.
- REED, J., ORING, L., GRAY, E., 2013. Spotted Sandpiper (*Actitis macularius*), version 2.0. In The Birds of North America. In The Birds of North America. Vol., A. Poole, ed.^eds. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.
- REINER, A., & KARTEN, H. J. (1982). Laminar distribution of the cells of origin of the descending tectofugal pathways in the pigeon (*Columba livia*). *The Journal of Comparative Neurology*, 204(2), 165–187. doi:10.1002/cne.902040206
- RODRIGUES, A.A.F., 2006. Aves da Reserva Biológica do Lago Piratuba e Entorno, Amapá, Brasil. Inventário biológico das Áreas do Sucuriçu e Região do lagos, Amapá: Relatório Final PROBIO. Macapá: Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. pp. 188-195.
- RYTOVA, V., GANELLA, D.E., HAWKES, D., BATHGATE, R.A.D., MA, S., GUNDLACH, A.L., 2019. Chronic activation of the relaxin-3 receptor on GABA neurons in rat ventral hippocampus promotes anxiety and social avoidance. *Hippocampus*. 29, 905-920.
- SARAH J. DUFF., LESLEY A. BROWNLIE., DAVID F. SHERRY., AND MARK SANGSTER., 1998. Sun Compass and Landmark Orientation by Black-Capped Chickadees (*Parus atricapillus*). *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* Vol. 24, Mo. 3, pp.243-253.(*Parus atricapillus*)
- SERRANO, I., 2010. Distribuição e conservação de aves migratórias neárticas da ordem charadriiformes (famílias charadriidae e scolopacidae) no brasil. In Department of Zoology. Vol. Doutorado, ed.^eds. Universidade Federal do Pará Museu paraense Emílio Goeldi. Programa de pós-graduação em zoologia curso de doutorado em zoologia, Belém (PA) - Brazil, pp. 174.
- SHERRY, D. F. & GALEF, B. G., 1984. Cultural transmission without imitation: milk bottle

- opening by birds. *Anim. Behav.* 32, 937–938.
- SHERRY, D.F., HOSHOOLEY, J.S., 2010. Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365, pp. 933-43.
- SHERRY, VACCARINO, 1989. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behav Neurosci.*
- SHIFLETT, M. W., SMULDERS, T. V., BENEDICT, L. & DEVOOGD, T. J., 2003. Reversible inactivation of the hippocampal formation in food-storing black-capped chickadees (*Poecile atricapillus*). *Hippocampus* 13, pp. 437–444.
- SHU, S., JU, G., FAN, L., 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett.* 85, 169-171.
- SLOMIANKA, L., WEST, M., 2005. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. *Neuroscience.* 136, 757–767.
- TÖMBÖL, T., ALPÁR, A., EYRE, M.D., NÉMETH, A., 2006. Topographical organisation of projections from the nucleus isthmi magnocellularis to the optic *tectum* of the chick brain. *Anat Embryol (Berl).* 211, pp. 119-28.
- TÖMBÖL, T., NÉMETH, A., 1998. GABA-immunohistological observations, at the electron-microscopical level, of the neurons of isthmic nuclei in chicken, *Gallus domesticus*. *Cell Tissue Res.* 291, pp. 255-66.
- WADA, K., SAKAGUCHI, H., JARVIS, E.D., HAGIWARA, M., 2004. Differential expression of glutamate receptors in avian neural pathways for learned vocalization. *J Comp Neurol.* 476, pp. 44-64.
- WEST, M.J., 2002. Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res.* 135, 43-51.
- WEST, M.J., SLOMIANKA, L., GUNDERSEN, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231, 482-97.
- WILTSCHKO W., DAUM-BENZ P., MUNRO U., WILTSCHKO R., 1989. Interaction of magnetic and stellar cues in migratory orientation. *J Navig* 42:355-366.
- WYLIE DR. et al., 2009. The optic *tectum* of birds: Mapping our way to understanding visual processing. *Can J Exp Psychol.* 63: pp. 328-338.
- YAN, K., WANG, S.R., 1986. Visual responses of neurons in the avian nucleus isthmi. *Neurosci Lett.* 64, pp. 340-4.
- ZENGIN-TOKTAS, Y., WOOLLEY, S.C., 2017. Singing modulates parvalbumin

interneurons throughout songbird forebrain vocal control circuitry. PLoS One. 12, e0172944.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "NEUROECOLOGIA DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Padrões Migratórios Contrastantes, Respostas Adaptativas e Mecanismos Neurais Subjacentes.", protocolada sob o CEUA nº 1840281116, sob a responsabilidade de **Cristovam Wanderley Picanço Diniz e equipe; Nara Gyzely de Moraes Magalhaes; Cristovam Wanderley Picanço Diniz; David Francis Sherry; Cristovam Wanderley Picanço Diniz; Dario Carvalho Paulo; Marcus Augusto Oliveira; Camila Mendes de Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 22/03/2018.

We certify that the proposal "NEUROECOLOGY OF MIGRATORY MARINE BIRDS: contrasting migratory patterns, adaptive responses and underlying neural mechanisms.", utilizing 75 Birds (males and females), protocol number CEUA 1840281116, under the responsibility of **Cristovam Wanderley Picanço Diniz and team; Nara Gyzely de Moraes Magalhaes; Cristovam Wanderley Picanço Diniz; David Francis Sherry; Cristovam Wanderley Picanço Diniz; Dario Carvalho Paulo; Marcus Augusto Oliveira; Camila Mendes de Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 03/22/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 01/2011 a 12/2020

Área: Neurodegeneração E Infecção

Origem:	Cristovam Wanderlei Picanço Diniz	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 3 anos	N:	15
Espécie:	Aves			Peso:	50 a 64 g		
Linhagem:	Calidris pusilla						
Origem:	Cristovam Wanderlei Picanço Diniz	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 3 anos	N:	15
Espécie:	Aves			Peso:	50 a 64 g		
Linhagem:	Actitis macularia						
Origem:	Cristovam Wanderlei Picanço Diniz	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 3 anos	N:	15
Espécie:	Aves			Peso:	50 a 64 g		
Linhagem:	Charadrius colaris						
Origem:	Cristovam Wanderlei Picanço Diniz	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 3 anos	N:	15
Espécie:	Aves			Peso:	50 a 64 g		
Linhagem:	Charadrius semipalmatus						
Origem:	Cristovam Wanderlei Picanço Diniz	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 3 anos	N:	15
Espécie:	Aves			Peso:	50 a 64 g		
Linhagem:	Charadrius wilsonia						

Local do experimento: Ilhas costeiras

Belé, 22 de março de 2018



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44551-5	Data da Emissão: 05/01/2018 11:54	Data para Revalidação*: 04/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

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

Outras ressalvas

1	(1) Comunicar ida a campo com antecedência mínima de 15 dias (ednaldo.silva@icmbio.gov.br / (91) 98403-0251); (2) para a coleta, fazer-se acompanhar por extrativista indicado pela Chefia da UC e AUREMAT; (3) apresentar a proposta de pesquisa e os seus resultados para as comunidades que vivem na área onde haverá a coleta de material, além do Conselho Deliberativo da Resex Marinha de Tracuateua; e, (4) disponibilizar cópia dos produtos da pesquisa para a administração da Resex Marinha de Tracuateua.
2	Comunicar por email: resexcaete@icmbio.gov.br , ou pelo tel: (91)34251574, ou pessoalmente em nosso escritório em Bragança, as datas de coleta de fauna e flora no interior da UC, ou nos estuários do rio Caeté e Taperaçu com certa antecedência; Disponibilizar cópia dos resultados e produtos gerados com os dados coletados no interior da Unidade; Disponibilizar um membro da equipe para esclarecimento do projeto, caso seja necessário, junto ao Conselho Deliberativo, ou em alguma comunidade específica da RESEX que possa ter interesse nos resultados da pesquisa desenvolvida.

Equipe

#	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

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

Código de autenticação: 18379631



Research

Elsevier Editorial System(tm) for Brain Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Plasticity in the hippocampal formation of shorebirds during the wintering period: stereological analysis of parvalbumin neurons in *Actitis macularius*

Article Type: Research paper

Section/Category: Cell Biology, Signaling and Synaptic Transmission

Keywords: *Actitis macularius*; migration; wintering period; parvalbumin; hippocampal formation; magnocellular nucleus of isthmus.

Corresponding Author: Professor CRISTOVAM Wanderley PIKANÇO-DINIZ, Medical

Corresponding Author's Institution: Federal University of Pará First Author: Luma Guerreiro

Order of Authors: Luma Guerreiro; Ediely Henrique; João Rosa; Patrick Pereira; Cintya Abreu; Taiany Fernandes; Nara Magalhães; Anderson Silva; Emanuel Costa; Cristovam Guerreiro-Diniz; Cristovam W Diniz; Daniel Guerreiro Guerreiro Diniz, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: It is already known that parvalbumin (PV) neurons have their number modified in face of social, multisensory and cognitive stimuli, both in mammals and birds. However, nothing is known about its plasticity in long-distance migratory shorebirds during wintering period. Here we investigated in four distinct temporal windows of the wintering period, the plasticity of PV neurons of two brain areas of the spotted sandpiper (*Actitis macularius*) which includes in its migratory journey multiple stopovers for feeding and resting. We used PV as a marker of a subpopulation of inhibitory neurons and count them in the hippocampal formation (HF) and magnocellular nucleus of tectal isthmus (IMC). Based on previous evidence that HF is involved in learning and memory and social interaction, and IMC is essential for control of head and neck and eyes movements, we tested the hypothesis that PV neurons would increase in HF and remain unchanged in IMC. For this, we used the optical fractionator to estimate cell number. Brains were processed for PV immunostaining, followed by estimates of the number of PV neurons of the areas of interest. As compared with migratory rest 1, PV neurons estimates showed significant increase in the hippocampal formation of premigration group. We suggest that parvalbuminergic neurons proliferation is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits involved with the migratory process back to the reproductive niches in north hemisphere.

Cover Letter

[Click here to download Cover Letter: Cover letter - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020.docx](#)

To: Professor J. Matthew La Voie, Editor-in-Chief of Brain Research, Associate Professor of Neurology at

Brigham and Women's Hospital

Harvard Medical School

From: Professor Cristovam W Picanço Diniz, Head of the Laboratory of Investigations in Chronic Neurodegeneration and Infection, at the University Hospital João de Barros Barreto, Belém, Brazil

Belém (PA), Brazil, 08/01/2020

Dear Professor La Voie,

Bird migration from high latitudes to the tropics is one of the greatest seasonal events on the planet (Louchart, 2008). In previous studies, we investigated hippocampal morphological changes associated with long-distance migration (Carvalho-Paulo et al., 2017; de Moraes Magalhães et al., 2017; Diniz et al., 2016; Mendes de Lima et al., 2019) and demonstrated that the migratory route affects the morphology and number of astrocytes, as well as neurogenesis and hippocampal volume, suggesting that contrasting factors along the migratory journey affect these elements differentially. In the present report we shifted our attention to the wintering period and investigated in spotted sandpiper (*A. macularius*) progressive changes in brain plasticity during the wintering period in two regions of the central nervous system employing a parvalbuminergic neuronal subpopulation marker. This subpopulation has its number modified in the face of social (Rytova et al., 2019), multisensory and cognitive stimuli, both in mammals (Arida et al., 2007; Caroni, 2015a; Caroni, 2015b; Donato et al., 2015; Gainey and Feldman, 2017; Murueta-Goyena et al., 2018; Placencia et al., 2019) and in birds (Chaudhury et al., 2006; Cornez et al., 2017; Wada et al., 2004). To search for differential neuroplastic response, we also estimated in the same time windows, the number of parvalbuminergic neurons in the nucleus of the isthmus of the *tectum opticum*, a region that receives organized projections from the overlying layers of the *tectum opticum* and projects its axons highly divergently back to the *tectum* (Faunes et al., 2013). Because these tectal isthmus neurons are topographically organized and thus need to be preserved in order to perform their functions, plasticity is not expected to change during the migratory process. Visuotopic maps representing the visual field and allowing the spatial location of moving objects to which attention should be directed throughout the migratory process are therefore, required to remain unchanged after their construction, which is in largely genetically defined (Huberman et al., 2008; Karten, 2015). Therefore, we expect that by comparing these two regions in the same time windows we would find significant

differences in estimates of parvalbuminergic neuron numbers in the hippocampus but not in the magnocellular nucleus of the isthmus. We found that PV neurons estimates showed significant increase in the hippocampal formation of premigration group and we suggest that parvalbuminergic neurons proliferation is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits involved with the migratory process back to the reproductive niches in north hemisphere.

We believe that the Brain Research is a well-placed and largely appreciated journal, that may provide good visibility to our data.

Yours sincerely, Cristovam

References

- Arida, R.M., Scorza, C.A., Scorza, F.A., Gomes da Silva, S., da Graça Naffah-Mazzacoratti, M., Cavalheiro, E.A., 2007. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31, 814–22.
- Caroni, P., 2015a. Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. *Curr Opin Neurobiol*. 35, 66–73.
- Caroni, P., 2015b. Regulation of Parvalbumin Basket cell plasticity in rule learning. *Biochem Biophys Res Commun*. 460, 100–3.
- Carvalho-Paulo, D., de Moraes Magalhães, N.G., de Almeida Miranda, D., Diniz, D.G., Henrique, E.P., Moraes, I.A.M., Pereira, P.D.C., de Melo, M.A.D., de Lima, C.M., de Oliveira, M.A., Guerreiro-Diniz, C., Sherry, D.F., Diniz, C.W.P., 2017. Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper. *Front Neuroanat*. 11, 126.
- Chaudhury, S., Nag, T.C., Wadhwa, S., 2006. Prenatal acoustic stimulation influences neuronal size and the expression of calcium-binding proteins (calbindin D-28K and parvalbumin) in chick hippocampus. *J Chem Neuroanat*. 32, 117–26.
- Cornez, G., Madison, F.N., Van der Linden, A., Cornil, C., Yoder, K.M., Ball, G.F., Balthazart, J., 2017. Perineuronal nets and vocal plasticity in songbirds: A proposed mechanism to explain the difference between closed-ended and open-ended learning. *Dev Neurobiol*. 77, 975–994.
- de Moraes Magalhães, N.G., Guerreiro Diniz, C., Guerreiro Diniz, D., Pereira Henrique, E., Corrêa Pereira, P.D., Matos Moraes, I.A., Damasceno de Melo, M.A., Sherry, D.F., Wanderley Picanço Diniz, C., 2017. Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*). *PLoS One*. 12, e0179134.
- Diniz, C.G., Magalhaes, N.G.M., Sousa, A.A., Santos, C., Diniz, D.G., Lima, C.M., Oliveira, M.A., Paulo, D.C., Pereira, P.D.C., Sherry, D.F., Picanço-Diniz, C.W., 2016. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 49.
- Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M., Caroni, P., 2015. Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning. *Neuron*. 85, 770–86.
- Faunes, M., Fernández, S., Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A.N., Wylie, D.R., Mpodozis, J., Karten, H.J., Marin, G., 2013. Laminar segregation of GABAergic neurons in the avian nucleus isthmi pars magnocellularis: a retrograde tracer and comparative study. *J Comp Neurol*. 521, 1727–42.
- Gainey, M.A., Feldman, D.E., 2017. Multiple shared mechanisms for homeostatic plasticity in rodent somatosensory and visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 372.
- Huberman, A.D., Feller, M.B., Chapman, B., 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci*. 31, 479–509.
- Karten, H.J., 2015. Vertebrate brains and evolutionary connectomics: on the origins of the mammalian 'neocortex'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 370.
- Louchart, A., 2008. Emergence of long distance bird migrations: a new model integrating global climate changes.

Naturwissenschaften. 95, 1109–19.

Mendes de Lima, C., Douglas Corrêa Pereira, P., Pereira Henrique, E., Augusto de Oliveira, M., Carvalho Paulo, D., Silva de Siqueira, L., Guerreiro Diniz, D., Almeida Miranda, D., André Damasceno de Melo, M., Gyzely de Moraes Magalhães, N., Francis Sherry, D., Wanderley Picanço Diniz, C., Guerreiro Diniz, C., 2019. Differential Change in Hippocampal Radial Astrocytes and Neurogenesis in Shorebirds With Contrasting Migratory Routes. *Front Neuroanat.* 13, 82.

Murueta-Goyena, A., Ortuzar, N., Gargiulo, P., Lafuente, J.V., Bengoetxea, H., 2018. Short-Term Exposure to Enriched Environment in Adult Rats Restores MK-801-Induced Cognitive Deficits and GABAergic Interneuron Immunoreactivity Loss. *Mol Neurobiol.* 55, 26–41.

Placencia, E.V.D., Serra, F.T., Henrique, J.S., Arida, R.M., Gomes da Silva, S., 2019. Hippocampal distribution of parvalbumin neurons in female and male rats submitted to the same volume and intensity of aerobic exercise. *Neurosci Lett.* 690, 162–166.

Rytova, V., Ganella, D.E., Hawkes, D., Bathgate, R.A.D., Ma, S., Gundlach, A.L., 2019. Chronic activation of the relaxin-3 receptor on GABA neurons in rat ventral hippocampus promotes anxiety and social avoidance. *Hippocampus.* 29, 905–920.

Wada, K., Sakaguchi, H., Jarvis, E.D., Hagiwara, M., 2004. Differential expression of glutamate receptors in avian neural pathways for learned vocalization. *J Comp Neurol.* 476, 44–64.

***Highlights (for review)**

HIGHLIGHTS

- *Actitis macularius* migrates towards mangroves of Amazon region for wintering.
- The hippocampal (HP) parvalbumin neuron number increases as wintering progresses.
- HP response may be related to social interaction and memory formation.
- After wintering, birds fly back towards reproductive niches on North Hemisphere.
- Singly or flock migration rely on object and visuospatial recognition memories.

***Manuscript**

[Click here to download Manuscript: Text - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020.docx](#)
[here to view linked References](#)

[Click](#)

Plasticity in the hippocampal formation of shorebirds during the wintering period: stereological analysis of parvalbumin neurons in *Actitis macularius*

Luma Cristina Ferreira Guerreiro¹, Ediely Pereira Henrique², João Batista da Silva Rosa², Patrick Douglas Corrêa Pereira², Cintya Castro de Abreu², Taiany Nogueira Fernandes², Nara Gyzely de Moraes Magalhães², Anderson de Jesus Falcão da Silva², Emanuel Ramos da Costa¹, Cristovam Guerreiro Diniz², Cristovam Wanderley Picanço Diniz^{1*}, Daniel Guerreiro Diniz¹.

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

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

*Corresponding author: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Rua dos Mundurucus, nº4487, CEP: 66.073-005, Guamá, Belém, Pará, Brasil. E-mail: cwpdiniz@gmail.com

Abstract

It is already known that parvalbumin (PV) neurons have their number modified in face of social, multisensory and cognitive stimuli, both in mammals and birds. However, nothing is known about its plasticity in long-distance migratory shorebirds during wintering period. Here we investigated in four distinct temporal windows of the wintering period, the plasticity of PV neurons of two brain areas of the spotted sandpiper (*Actitis macularius*) which includes in its migratory journey multiple stopovers for feeding and resting. We used PV as a marker of a subpopulation of inhibitory neurons and count them in the hippocampal formation (HF) and magnocellular nucleus of tectal isthmus (IMC). Based on previous evidence that HF is involved in learning and memory and social interaction, and IMC is essential for control of head and neck and eyes movements, we tested the hypothesis that PV neurons would increase in HF and remain unchanged in IMC. For this, we used the optical fractionator to estimate cell number. Brains were processed for PV immunostaining, followed by estimates of the number of PV neurons of the areas of interest. As compared with migratory rest 1, PV neurons estimates showed significant increase in the hippocampal formation of premigration group. We suggest that parvalbuminergic neurons proliferation is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits involved with the migratory process back to the reproductive niches in north hemisphere.

Keywords: *Actitis macularius*, Migration, Wintering Period, Parvalbumin, Hippocampal Formation, Magnocellular Nucleus of Isthmus.

1. Introduction

Hippocampal formation of migratory birds seems to be essential for navigation based on recognition of landscape landmarks around breeding sites, wintering sites and resting and feeding stop-over sites during migration (Bingman and MacDougall-Shackleton, 2017). In previous studies, we investigated hippocampal morphological changes associated with long-distance migration (Carvalho-Paulo et al., 2017; de Morais Magalhães et al., 2017; Diniz et al., 2016a; Mendes de Lima et al., 2019) and demonstrated that the migratory route affects the morphology and number of astrocytes, as well as neurogenesis and hippocampal volume, suggesting that contrasting factors along the migratory journey affect these elements differentially. In work dedicated to the morphological characterization of hippocampal formation of *Actitis macularius* and *Calidris pusilla* (Diniz et al., 2016b), species with contrasting migratory routes, we quantified the number of neurons with selective marker for neurons (NEUN), and we reconstructed in three dimensions the morphology of microglia using a selective marker for immunostaining of this glial cell population (IBA-1). We found a larger HF, in addition to more microglia, in *A. macularius*, species migrating over visually complex landmasses compared to *C. pusilla* that mostly migrates over water. In this work we shifted our attention to the wintering period of *A. macularius* in the mangroves of the Amazon River estuary in the state of Pará, Brazil. In this region, food availability is dependent of mangrove forests which are also of greater importance to the carbon stocks, overpassing twice those of upland evergreen forests and almost 10-fold those of tropical dry forests (Kauffman et al., 2018). Despite the importance of this region for the wintering of migratory birds (Bulluck et al., 2019), no study has focused in the neuroecology of these birds in this period in this large tidal region heavily influenced by tropical rainfall (Barros and Albernaz, 2014). Spotted Sandpipers migrate singly or in small groups to their wintering grounds, which extend from the extreme southern United States to southern South America <https://birdsna.org/Species-Account/bna/species/sposan/introduction>. Previous data based on field observations, museum collections, ringing information and censuses, revealed large distribution of *A. macularius* in the Brazilian territory, including larger numbers on the coast of the states of Amapá, Pará, Maranhão and Rio Grande do Norte, where higher density is found in September and between November and April (Serrano, 2010). In the present report we investigated in *A. macularius* potential progressive changes in brain plasticity during the wintering period in two anatomical regions employing a parvalbuminergic neuronal

subpopulation marker. This subpopulation has its number modified in the face of social (Rytova et al., 2019), multisensory and cognitive stimuli, both in mammals (Arida et al., 2007; Caroni, 2015a; Caroni, 2015b; Donato et al., 2015; Gainey and Feldman, 2017; Murueta-Goyena et al., 2018; Placencia et al., 2019) and in birds (Chaudhury et al., 2006; Cornez et al., 2017; Wada et al., 2004). In fact, previous work in birds has shown that calcium binding protein (parvalbumin) is a neuroplastic marker that increases its number as a result of multisensory stimulation in regions responsible for learning and memory, including the hippocampus (Barkan et al., 2017) and songbird singing nucleus (Brenowitz and Larson, 2015; Zengin-Toktas and Woolley, 2017). To search for differential neuroplastic response, we also estimated in the same time windows, the number of parvalbuminergic neurons in the nucleus of the isthmus of the *tectum opticum*, a region that receives organized projections from the overlying layers of the *tectum opticum* and projects its axons highly divergently back to the *tectum* (Faunes et al., 2013). Because these tectal isthmus neurons are topographically organized and thus need to be preserved in order to perform their functions, no significant plastic changes is expected during the migratory process. Visuotopic maps representing the visual field and allowing the spatial location of moving objects to which attention should be directed throughout the migratory process are therefore, required to remain unchanged after their construction, which is in largely genetically defined (Huberman et al., 2008; Karten, 2015). Therefore, we expect that by comparing these two regions in the same time windows we would find significant differences in estimates of parvalbuminergic neuron numbers in the hippocampus but not in the magnocellular nucleus of the isthmus.

2. Results

Significant changes were observed between the total number of immunolabeled parvalbumin neurons in the hippocampal formation in the two-time windows (MR1= 186700 \pm 27755 vs PM= 332706 \pm 49218, mean \pm s.d., $t = 5.77$, $p = 0.0004$). As indicated in Table 1, CVB² (coefficient of biological variation) was the main responsible for more than 90% of the total variation suggesting little contribution of methodological errors. Figure 1 and Table 1 show numerical detailed information of these changes.

Contrastingly, the magnocellular isthmus nuclei stereological counting results of parvalbumin neurons, did not show significant differences between time windows of wintering periods (newcomers = 86703 \pm 10296, migratory rest 1 = 92305 \pm 5812, migratory

rest 2 = 89500 ± 1452 , pre-migration = 95694 ± 4028 , mean \pm s.d. $p = 0.174$, one-way ANOVA, $F_{1-20} = 1.87$).

Table 2 exhibits detailed stereological count results for IMC. As indicated in Table 2, CVB^2 (coefficient of biological variation) was the main responsible for almost all variation, suggesting negligible contribution of methodological errors. Table 2 shows numerical detailed information of IMC PV neurons in the wintering time windows.

3. Discussion

Based on previous evidence that HF is involved in learning and memory (Barkan et al., 2017), and social interaction (Rytova et al., 2019), and IMC is essential for control of head and neck and eyes movements (Faunes et al., 2013), we tested the hypothesis that PV neurons would increase in HF and remain unchanged in IMC during the wintering period of *A. macularius*. We found no significant difference in the total number of PV neurons between different time windows in IMC, while PV neurons estimates showed significant increase in the hippocampal formation in the pre-migration group. We suggest that parvalbuminergic neurons proliferation in HF is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits involved with learning and memory and social interaction necessary to the migratory process back to the reproductive niches in north hemisphere.

3.1 Social interaction, parvalbumin neurons and migration

The mammal's ventral hippocampus seems to be essential for emotional information processing and this includes social interaction and parvalbumin (Perez et al., 2019). In addition, deficits in parvalbumin neurons in the ventral hippocampus have been associated with social avoidance throughout an aberrant dopamine system function (Boley et al., 2014). If these findings are also valid for the hippocampal formation of *A. macularius* it is likely to expect that an increase in PV neurons may increase inhibitory activity facilitating social interaction.

It has been previously described that social relationships between birds of the same group may facilitate collective behavior to follow similar interaction rules to form flocks and organize collective flights during migration. Indeed, within flocks, paired birds interacted with fewer neighbors than unpaired birds and flapped their wings more slowly, which may

result in energy savings. In contrast, flocks with more paired birds reduces efficiency in the transfer of information through the flock (Ling et al., 2019). Because social relationship, learning and memory is influenced by PV neurons in the hippocampus, it is a temptation to speculate that significant increase of parvalbumin immunolabeled neurons in the hippocampal formation of pre-migration group may be important to establish social relationships among group members. Important to highlight that *A. macularius* migrate singly or in small groups (Reed et al., 2013), which in the last case, social interaction may increase efficiency transferring information through the flock.

3.2 Parvalbumin neurons, hippocampal neurogenesis, learning and memory

PV neurons are important for learning and memory which includes landscape recognition along the journey and small scale local visuospatial stimuli to recognize stopovers associated with the migratory process, (Bingman and MacDougall-Shackleton, 2017). Because we found an increase of its number in the hippocampal formation, we suggest that increase of PV neurons may be at least part of the adaptive response of the local hippocampal circuitry associated to these tasks. In agreement, previous reports demonstrated that PV number is modified in the face of somatomotor, visuospatial and cognitive stimuli, both in mammals (Arida et al., 2007; Caroni, 2015a; Caroni, 2015b; Donato et al., 2015; Gainey and Feldman, 2017; Murueta-Goyena et al., 2018; Placencia et al., 2019) and in birds (Chaudhury et al., 2006; Cornez et al., 2017; Wada et al., 2004). It has been also demonstrated, that calcium binding protein (parvalbumin) is a neuroplastic marker in learning and memory bird's brain regions, that increases its number as a result of multisensory stimulation, including the hippocampus (Barkan et al., 2017) and the songbird singing nucleus (Brenowitz and Larson, 2015; Zengin-Toktas and Woolley, 2017).

In addition, neurogenesis also increases in the hippocampal formation of other two species of shorebirds with contrasting migratory flights (*Calidris pusilla* and *Charadrius semipalmatus*) during the wintering period at the Bragança coastline, when radial astrocytes already increased their convex-hull area in linear correlation with an increase in the total number of new neurons (DCX immunolabeled) (Mendes de Lima et al., 2019). Important to say that greater neurogenesis was found in *Charadrius semipalmatus*, the species that relies more on visuospatial information to complete its migratory journey (Mendes de Lima et al., 2019). Because *A. macularius* migratory route is closer to that of *C. semipalmatus*, with multiple stopover for feeding and rest, we speculate that neurogenesis in the hippocampal

formation of *C. semipalmatus* may similarly peak at premigration time window, as it happened in *A. macularius*, and conversely, *A. macularius* newcomers would show increased radial astrocytes changes after the migratory process.

From our previous studies regarding the influences of contrasting migratory routes on hippocampal astrocytes of *C. pusilla* (Carvalho-Paulo et al., 2017) and *C. semipalmatus* (unpublished results) we have learnt that transatlantic uninterrupted 4 – 5 days flight of *C. pusilla* was associated with significant reduction of astrocytes number and shrinkage of their arbors reducing significantly its morphological complexity, whereas *C. semipalmatus* hippocampal astrocytes changes, were limited to reduction of its morphological complexity. Because these morphological changes were not influenced by phylogenetic differences (Henrique et al., unpublished results), we suggested that these distinct effects on astrocyte morphology and numbers were associated with the contrasting migratory patterns of the two species. Although *A. macularius* is a different species, its migratory route is closer to that of *C. semipalmatus*, suggesting that they possibly would have their astrocytes numbers unchanged in the newcomers, and that potential deleterious morphological changes detected in the newcomers would be less intense and recovered at the pre-migration time. Thus, it is reasonable to speculate that during the wintering period all required physiological changes necessary to the migration towards the breeding sites in the north hemisphere are to be achieved before boreal summer, and these includes glial cells and neuronal recovering.

3.3 Limited plasticity, visual maps, head and neck and eye movement control

Different from hippocampal formation, PV neurons in the magnocellular isthmus nuclei remained unchanged. Indeed, the number of parvalbuminergic neurons in the nucleus of the isthmus of the *tectum opticum*, a region that receives organized projections from the overlying layers of the *tectum opticum* (Faunes et al., 2013) remained in the premigration group, as it was in the newcomers. Because these tectal isthmus neurons are topographically organized they need to be preserved in order to perform their functions. Thus, non-significant neuronal plasticity is expected during the migratory process. Visuotopic maps representing the visual field in the *tectum* and their projections to command IMC neurons allowing the spatial location of moving objects to which attention should be directed throughout the migratory process are therefore, required to remain unchanged. After their construction, which is largely genetically defined (Huberman et al., 2008; Karten, 2015) they circuits have to be maintained with little plasticity.

3.4 Methodological limitations

To quantify the number of PV neurons in the hippocampal formation and IMC nucleus, we applied the optical fractionator, an accurate method of quantification combining properties of an optical dissector and fractionator that has been used in a variety of studies to determine cell numbers in multiple brain regions. The optical fractionator is unaffected by histological changes or shrinkage, an important issue when performing comparative analysis between experimental groups (Glaser and Glaser, 2000; West et al., 1991; West, 2002).

The main variability in the present analysis was biological, with the ratio $CE^2/CV^2 < 0.5$, where CE is the estimated coefficient of error (coefficient of Scheaffer) and CV is the coefficient of variation, i.e. the ratio between CE^2 and observed variance of the group, CV^2 , should be less than 0.5 (Slomianka and West, 2005). To minimize possible sources of variation, all data were collected and analyzed with the same unbiased methodology and we all samples were obtained using the same tissue processing protocols. Thus, we expected to reduce non-biological sources of errors to acceptable levels.

3.4.1 Non stereological technical limitations

Stereological analysis may reveal contradictory results from differences in estimation methods, different animal lineages, variations in histological procedures, different stereological protocols, and ambiguities in the definition of the objects and areas of interest. To reduce these possible sources of error, all samples were obtained with the same tissue processing protocols (perfusion, immunoreaction, dehydration, counterstaining, and clearing) and all data were collected and analyzed with the same stereological method, software, and hardware. To detect possible variations in the criteria for identifying the objects of interest, we underwent checking procedures of the results by having different investigators count the same regions using the same monoclonal PV antibody as a selective marker for inhibitory neurons.

As a result, possible variations associated with non-biological sources were reduced to acceptable levels (Mouton et al., 2002; Slomianka and West, 2005).

3.4.2 Conclusions

In the present report we focused our attention on the wintering period of long-distance migratory bird spotted sandpiper (*A. macularius*) and studied the progressive changes in brain plasticity in two regions of the central nervous system employing a parvalbuminergic neuronal subpopulation marker. This neuroplastic subpopulation has its hippocampal number modified in the face of social, multisensory and cognitive stimuli, both in mammals and in birds. To search for differential neuroplastic response, we also estimated in the same time windows, the number of parvalbuminergic neurons in the nucleus of the isthmus of the *tectum opticum*, a region that receives organized projections from the overlying layers of the *tectum opticum* and projects its axons highly divergently back to the tectum. Because these tectal isthmus neurons are topographically organized and thus need to be preserved in order to perform their functions, plasticity is not expected to change very much during the migratory process. As compared with newcomers, we found significant increase of the parvalbumin total number of cells in the hippocampal formation of the pre-migration group but no significant changes in the magnocellular nucleus of isthmus. We suggest that parvalbuminergic neurons proliferation in the pre-migratory period is part of the adaptive changes of the hippocampal circuits to face the long-distance journey back to the reproductive niches in north hemisphere.

4. Experimental Procedure

Birds were captured in four different windows (newcomers: August – October; Migratory Rest 1: November – January; Migratory Rest 2: February – April and premigration: May – July) of the wintering period in the island of Otelina (0 ° 45'42.57 "S 46 ° 55'51.86" W) in the tropical coastal zone of northern Brazil, under the approval of the university institutional ethics committee CEUA / UFPA No. 1840281116 and license No. 44551-5 from Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA, which regulates Brazilian wildlife use for research. At dusk, 12m x 2.5m mist nets were opened for capture. The nets were inspected every ten minutes for the removal of the captured birds. Table 3 shows experimental groups, time windows and capture dates of birds' samples.

4.1 Perfusion and immunohistochemistry

The animals were perfused transcardially with heparinized 0.9% saline solution (1ml / l) for 10 minutes, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.2-7.4 for 10 minutes. The beginning of saline flow was initiated after the jugular vein cut with

incision in the right side of the neck thus allowing the brain to be better permeated by saline and paraformaldehyde 4%. After brain removal, with the brain regions of interest, 100 μ m slices were obtained in a vibratome (LEICA, VT, 1000s) at a 1: 4 intervals.

After perfusion, dissection, and sectioning, brain tissue sections were stored in 4% paraformaldehyde in 0.1M PB at 4 ° C. The selected sections were washed with 0.1 M pH 7.2-7.4 PB, prior to incubation for 60min in 0.2M boric acid pH 9.0 at 70 ° C. Non-specific binding sites were blocked by incubating sections in 10% casein for 60 minutes. Incubation of the sections in the primary antibody parvalbumin (1: 200 dilution, Millipore, mab code 1572) for immunostaining occurred for three days at 4 ° C with gentle agitation. Endogenous peroxidase was inactivated by incubation sections in 0.3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in PB saline for 15 minutes. After washing sections were incubated for 60 minutes in the avidin-biotin-peroxidase complex (Vector ABC elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Peroxidase enzyme activity was detected using 3'3-diaminobenzidine (DAB, sigma) and p-d-glucose / glucose oxidase reaction (Shu et al., 1988). After the reaction product was formed a dark blue-gray precipitate was generated at the antigen-antibody interaction sites and reaction was stopped in 0.1 M PB. The sections were mounted on gelatinized glass slides and dehydrated in ethanol series (70%, 80%, 90%, 100%, and 100%) followed by xylene series.

4.2 Stereological cell counts

When performing cell counting, we used the optical microscope (Eclipse 80i, Nikon) with motorized stage and analog-to-digital converters (MAC6000 system, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Three-dimensional digital conversion of X, Y e Z axis of each digitized point was stored into a computer that controls the movements of the motorized stage with the aid of a specialized software (Stereoinvestigator, MicroBrightField, Williston, VT, USA). In order to avoid ambiguity in identifying objects of interest and ensure greater accuracy in counting, the 4.0x objective was replaced by another Plan Fluor, 100x objective (N.A. = 1.3; df = 0.2 μ m; Nikon, Japan) used for counting.

The estimate of cells in the region of the magnocellular nucleus of the tectal isthmus and hippocampal formation was done using the optical fractionator, which allows us to estimate the total cells of the region of interest. For this, the number of neurons within the counting blocks arranged in the area of interest is multiplied by the probability values of the sample fractions using the following equation:

$$N = \Sigma Q * 1 / \text{ssf} * 1 / \text{asf} * 1 / \text{tsf}$$

Where N is the estimate of the total number of cells, ΣQ is the sum of counted neurons, ssf is the sample fraction of the number of sections, asf is the sample fraction of the section area and tsf is the sample fraction of the section thickness (West, 2002).

Table 4 shows stereological parameters and volume estimates of the magnocellular isthmus nuclei of five birds captured in four different time windows of the wintering period (newcomers, migratory rest 1, migratory rest 2 and pre-migration).

Table 5 shows stereological parameters and the total number of parvalbumin neurons in the hippocampal formation of 5 individuals of *A. macularius* captured in migratory rest 1 and pre-migration time windows of the wintering period.

Figure 2 illustrates random and systematic sampling approach for stereological counts and volume estimate. We used the optical fractionator to estimate the total number of cells of the areas of interest (hippocampal formation and the magnocellular nucleus of isthmus). This method uses thick sections to estimate the total number of cells from the number of cells sampled with a systematic randomly sampled set of unbiased digitally defined counting boxes, covering the entire area of interest. Uniform distance between unbiased selected counting boxes, located over preselected grids covering the whole area of interest, is part of the fractionator method.

Figure 3 shows the magnocellular nucleus of the isthmus and the objects of interest for cell counting (immunolabeled parvalbumin neurons). Figure 4 shows the area (hippocampal formation) and the objects of interest (parvalbumin immunolabeled neurons) from *A. macularius* individuals captured in the migratory rest 1 and in the pre-migratory time windows of the wintering period.

4.3 Statistical analysis

One-way ANOVA with confidence levels set at 95 or 99% ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) was used to compare three or more different groups. For comparisons between only 2 experimental groups, parametric analysis was used, adopting two-tail t-tests for independent samples with a confidence interval of 95% or 99% ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). Outliers were removed based on standard deviation.

References

- Arida, R.M., Scorza, C.A., Scorza, F.A., Gomes da Silva, S., da Graça Naffah-Mazzacoratti, M., Cavalheiro, E.A., 2007. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31, 814-22.
- Barkan, S., Yom-Tov, Y., Barnea, A., 2017. Exploring the Relationship between Brain Plasticity, Migratory Lifestyle, and Social Structure in Birds. *Front Neurosci*. 11, 139.
- Barros, D.F., Albernaz, A.L., 2014. Possible impacts of climate change on wetlands and its biota in the Brazilian Amazon. *Braz J Biol*. 74, 810-20.
- Bingman, V.P., MacDougall-Shackleton, S.A., 2017. The avian hippocampus and the hypothetical maps used by navigating migratory birds (with some reflection on compasses and migratory restlessness). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 203, 465-474.
- Boley, A.M., Perez, S.M., Lodge, D.J., 2014. A fundamental role for hippocampal parvalbumin in the dopamine hyperfunction associated with schizophrenia. *Schizophr Res*. 157, 238-43.
- Brenowitz, E.A., Larson, T.A., 2015. Neurogenesis in the adult avian song-control system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7.
- Bulluck, L., Ames, E., Bayly, N., Reese, J., Viverette, C., Wright, J., Caguazango, A., Tonra, C., 2019. Habitat-dependent occupancy and movement in a migrant songbird highlights the importance of mangroves and forested lagoons in Panama and Colombia. *Ecol Evol*. 9, 11064-11077.
- Caroni, P., 2015a. Regulation of Parvalbumin Basket cell plasticity in rule learning. *Biochem Biophys Res Commun*. 460, 100-3.
- Caroni, P., 2015b. Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. *Curr Opin Neurobiol*. 35, 66-73.
- Carvalho-Paulo, D., de Morais Magalhães, N.G., de Almeida Miranda, D., Diniz, D.G., Henrique, E.P., Moraes, I.A.M., Pereira, P.D.C., de Melo, M.A.D., de Lima, C.M., de Oliveira, M.A., Guerreiro-Diniz, C., Sherry, D.F., Diniz, C.W.P., 2017. Hippocampal Astrocytes in Migrating and Wintering Semipalmated Sandpiper. *Front Neuroanat*. 11, 126.
- Chaudhury, S., Nag, T.C., Wadhwa, S., 2006. Prenatal acoustic stimulation influences neuronal size and the expression of calcium-binding proteins (calbindin D-28K and parvalbumin) in chick hippocampus. *J Chem Neuroanat*. 32, 117-26.
- Cornez, G., Madison, F.N., Van der Linden, A., Cornil, C., Yoder, K.M., Ball, G.F., Balthazart, J., 2017. Perineuronal nets and vocal plasticity in songbirds: A proposed mechanism to explain the difference between closed-ended and open-ended learning. *Dev Neurobiol*. 77, 975-994.
- de Morais Magalhães, N.G., Guerreiro Diniz, C., Guerreiro Diniz, D., Pereira Henrique, E., Corrêa Pereira, P.D., Matos Moraes, I.A., Damasceno de Melo, M.A., Sherry, D.F., Wanderley Picanço Diniz, C., 2017. Hippocampal neurogenesis and volume in migrating and wintering semipalmated sandpipers (*Calidris pusilla*). *PLoS One*. 12, e0179134.
- Diniz, C.G., Magalhaes, N.G.M., Sousa, A.A., Santos, C., Diniz, D.G., Lima, C.M., Oliveira, M.A., Paulo, D.C., Pereira, P.D.C., Sherry, D.F., Picanco-Diniz, C.W., 2016a. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 49.

- Diniz, C.G., Magalhães, N.G., Sousa, A.A., Santos Filho, C., Diniz, D.G., Lima, C.M., Oliveira, M.A., Paulo, D.C., Pereira, P.D., Sherry, D.F., Picanço-Diniz, C.W., 2016b. Microglia and neurons in the hippocampus of migratory sandpipers. *Braz J Med Biol Res.* 49, e5005.
- Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M., Caroni, P., 2015. Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning. *Neuron.* 85, 770-86.
- Faunes, M., Fernández, S., Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A.N., Wylie, D.R., Mpodozis, J., Karten, H.J., Marín, G., 2013. Laminar segregation of GABAergic neurons in the avian nucleus isthmi pars magnocellularis: a retrograde tracer and comparative study. *J Comp Neurol.* 521, 1727-42.
- Gainey, M.A., Feldman, D.E., 2017. Multiple shared mechanisms for homeostatic plasticity in rodent somatosensory and visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372.
- Glaser, J.R., Glaser, E.M., 2000. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem Neuroanat.* 20, 115-26.
- Gundersen, H., Jensen, E., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147, 229-263.
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., Kieu, K., Nielsen, J., 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc.* 193, 199-211.
- Huberman, A.D., Feller, M.B., Chapman, B., 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu Rev Neurosci.* 31, 479-509.
- Karten, H.J., 2015. Vertebrate brains and evolutionary connectomics: on the origins of the mammalian 'neocortex'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370.
- Kauffman, J.B., Bernardino, A.F., Ferreira, T.O., Giovannoni, L.R., de O Gomes, L.E., Romero, D.J., Jimenez, L.C.Z., Ruiz, F., 2018. Carbon stocks of mangroves and salt marshes of the Amazon region, Brazil. *Biol Lett.* 14.
- Ling, H., Mclvor, G.E., van der Vaart, K., Vaughan, R.T., Thornton, A., Ouellette, N.T., 2019. Costs and benefits of social relationships in the collective motion of bird flocks. *Nat Ecol Evol.* 3, 943-948.
- Mendes de Lima, C., Douglas Corrêa Pereira, P., Pereira Henrique, E., Augusto de Oliveira, M., Carvalho Paulo, D., Silva de Siqueira, L., Guerreiro Diniz, D., Almeida Miranda, D., André Damasceno de Melo, M., Gyzely de Moraes Magalhães, N., Francis Sherry, D., Wanderley Picanço Diniz, C., Guerreiro Diniz, C., 2019. Differential Change in Hippocampal Radial Astrocytes and Neurogenesis in Shorebirds With Contrasting Migratory Routes. *Front Neuroanat.* 13, 82.
- Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E., Ingram, D.K., 2002. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res.* 956, 30-5.
- Murueta-Goyena, A., Ortuzar, N., Gargiulo, P., Lafuente, J.V., Bengoetxea, H., 2018. Short-Term Exposure to Enriched Environment in Adult Rats Restores MK-801-Induced Cognitive Deficits and GABAergic Interneuron Immunoreactivity Loss. *Mol Neurobiol.* 55, 26-41.
- Perez, S.M., Boley, A., Lodge, D.J., 2019. Region specific knockdown of Parvalbumin or Somatostatin produces neuronal and behavioral deficits consistent with those observed in schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 9, 264.
- Placencia, E.V.D., Serra, F.T., Henrique, J.S., Arida, R.M., Gomes da Silva, S., 2019. Hippocampal distribution of parvalbumin neurons in female and male rats submitted to the same volume and intensity of aerobic exercise. *Neurosci Lett.* 690, 162-166.

- Reed, J., Oring, L., Gray, E., 2013. Spotted Sandpiper (*Actitis macularius*), version 2.0. In The Birds of North America. In The Birds of North America. Vol., A. Poole, ed.^eds. Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.
- Rytova, V., Ganella, D.E., Hawkes, D., Bathgate, R.A.D., Ma, S., Gundlach, A.L., 2019. Chronic activation of the relaxin-3 receptor on GABA neurons in rat ventral hippocampus promotes anxiety and social avoidance. *Hippocampus*. 29, 905-920.
- Serrano, I., 2010. Distribuição e conservação de aves migratórias neárticas da ordem charadriiformes (famílias charadriidae e scolopacidae) no brasil. In Department of Zoology. Vol. Doutorado, ed.^eds. Universidade Federal do Pará Museu paraense Emílio Goeldi. Programa de pós-graduação em zoologia curso de doutorado em zoologia, Belém (PA) - Brazil, pp. 174.
- Shu, S., Ju, G., Fan, L., 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*. 85, 169-171.
- Slomianka, L., West, M., 2005. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. *Neuroscience*. 136, 757-767.
- Wada, K., Sakaguchi, H., Jarvis, E.D., Hagiwara, M., 2004. Differential expression of glutamate receptors in avian neural pathways for learned vocalization. *J Comp Neurol*. 476, 44-64.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 231, 482-97.
- West, M.J., 2002. Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res*. 135, 43-51.
- Zengin-Toktas, Y., Woolley, S.C., 2017. Singing modulates parvalbumin interneurons throughout songbird forebrain vocal control circuitry. *PLoS One*. 12, e0172944.

Legends of tables and figures

Table 1. Stereological detailed results of parvalbumin counting neurons of the hippocampal formation of five individuals of *A. macularius* in pre-migration (PM) and in migratory rest 1 (MR1).

Table 2. Estimate of the total number of parvalbumin labeled neurons of the magnocellular isthmus nuclei of five individuals of *Actitis macularius* captured in the four distinct time windows of the wintering period.

Table 3. Time windows and capture dates of *Actitis macularius* in the wintering temporal windows (newcomers, migratory rest 1, migratory rest 2 and pre-migration).

Table 4. Stereological parameters for counting parvalbumin neurons and volume estimates of the magnocellular isthmus nuclei of 5 individuals of *A. macularius* captured in four different time windows (Newcomers, Migratory Rest 1, Migratory Rest 2 and Pre-migration).

Table 5. Stereological parameters for counting parvalbumin neurons and volume estimates of the hippocampal formation of *A. macularius* in migratory rest 1 and pre-migration time windows.

Figure 1. Graphic representation of stereological counting results of parvalbumin immunolabeled neurons of the hippocampal formation of 5 individuals of *A. macularius*, captured on pre-migration and migratory rest 1 of wintering period. As compared with migratory rest 1, the hippocampal formation of individuals captured on pre-migration showed significant increase or parvalbumin immunolabeled neurons.

Figure 2. Optical Fractionator approach for counting cells. A – B Magnocellular isthmus nucleus (IMC). C – D Hippocampal formation (HF). Counting boxes exhibit rejection (red lines) and acceptance (green lines) regions (B and D). Pink shaded areas indicate the area of interest (A)=IMC, (C) HF.

Figure 3. Parvalbumin immunolabeled sections to illustrate magnocellular isthmus nuclei from newcomer (pink), migratory rest 1 (orange), migratory rest 2 (green) and pre-migration (blue) individuals. Dotted squares indicate parvalbumin immunolabeled neurons inside the area of interest.

Figure 4. Parvalbumin immunolabeled sections from *A. macularius* captured just after arrival (newcomer) and during migratory rest 1 to illustrate area and object of interests. Scale bars: A - C; = 250 μ m; D = 25 μ m.

Figure 1 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

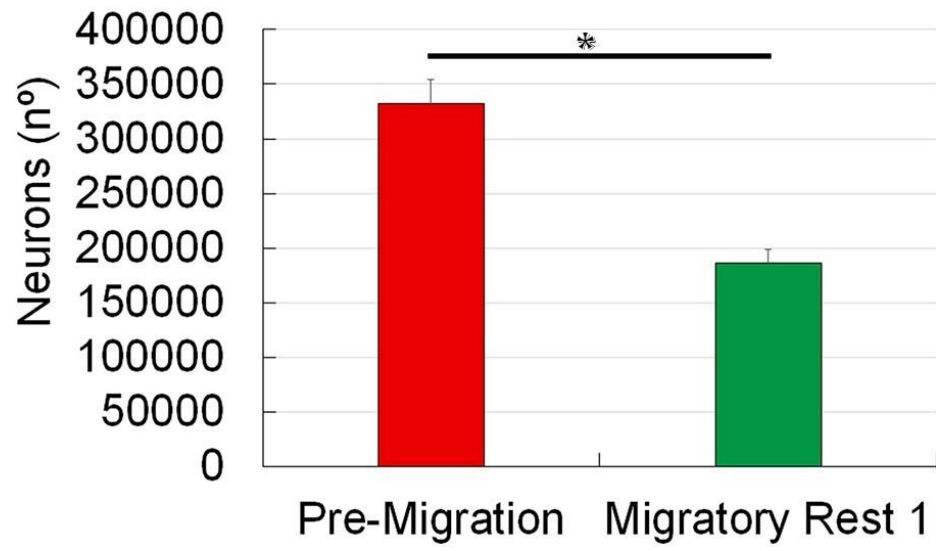
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020
image

[Click here to download high resolution image](#)

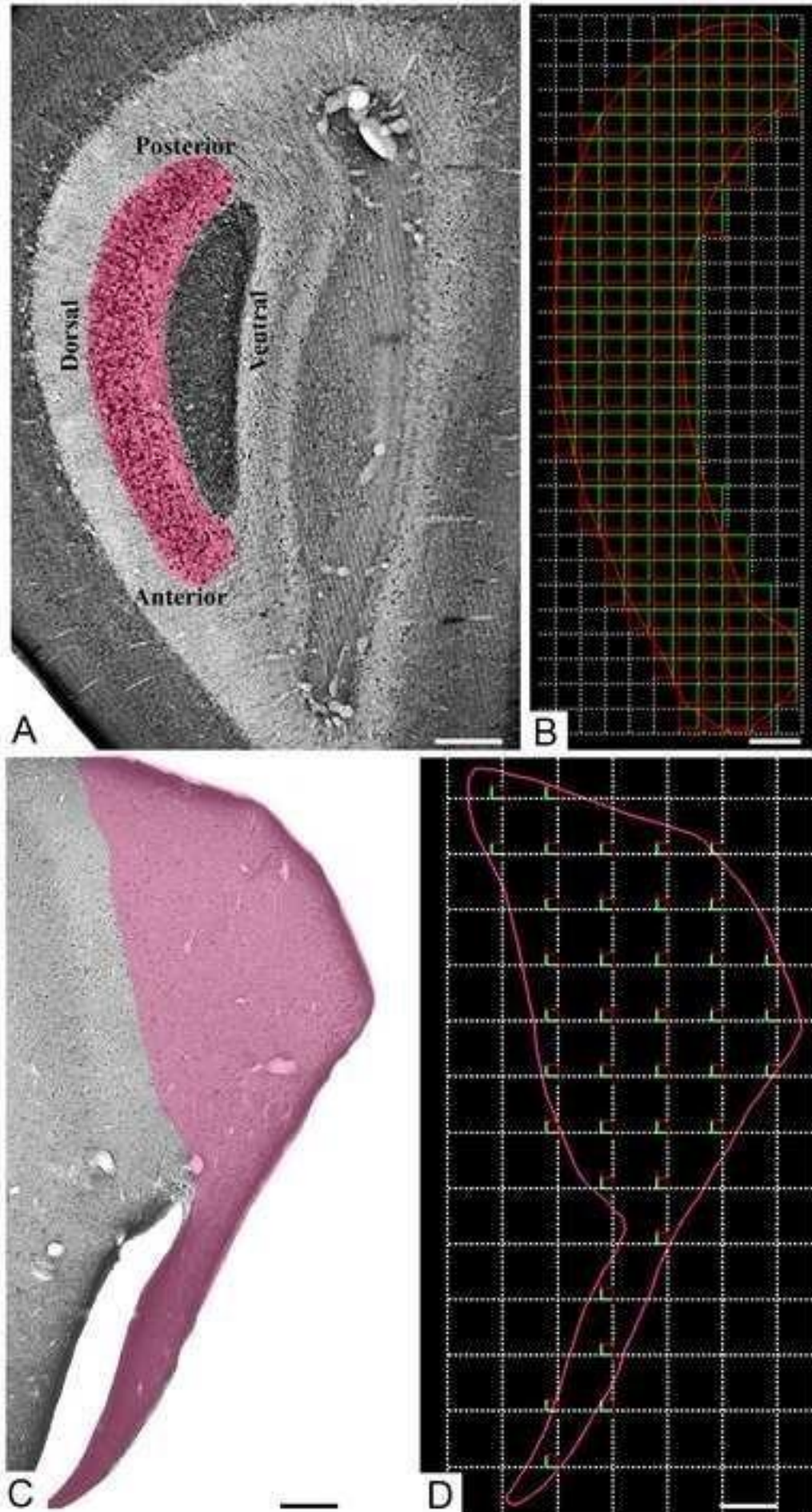


Figure 3 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

[Click here to download high resolution image](#)

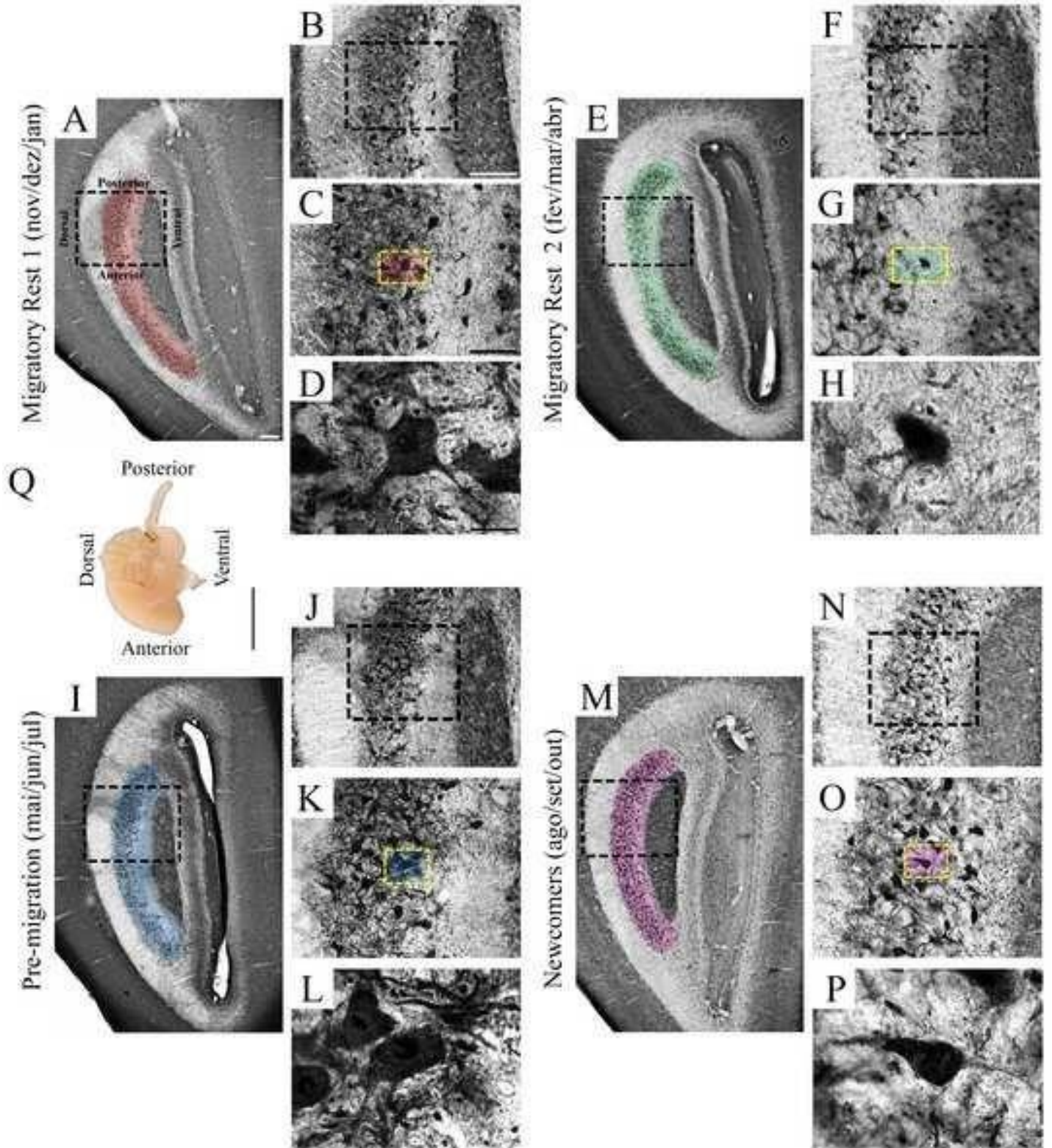


Figure 4 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

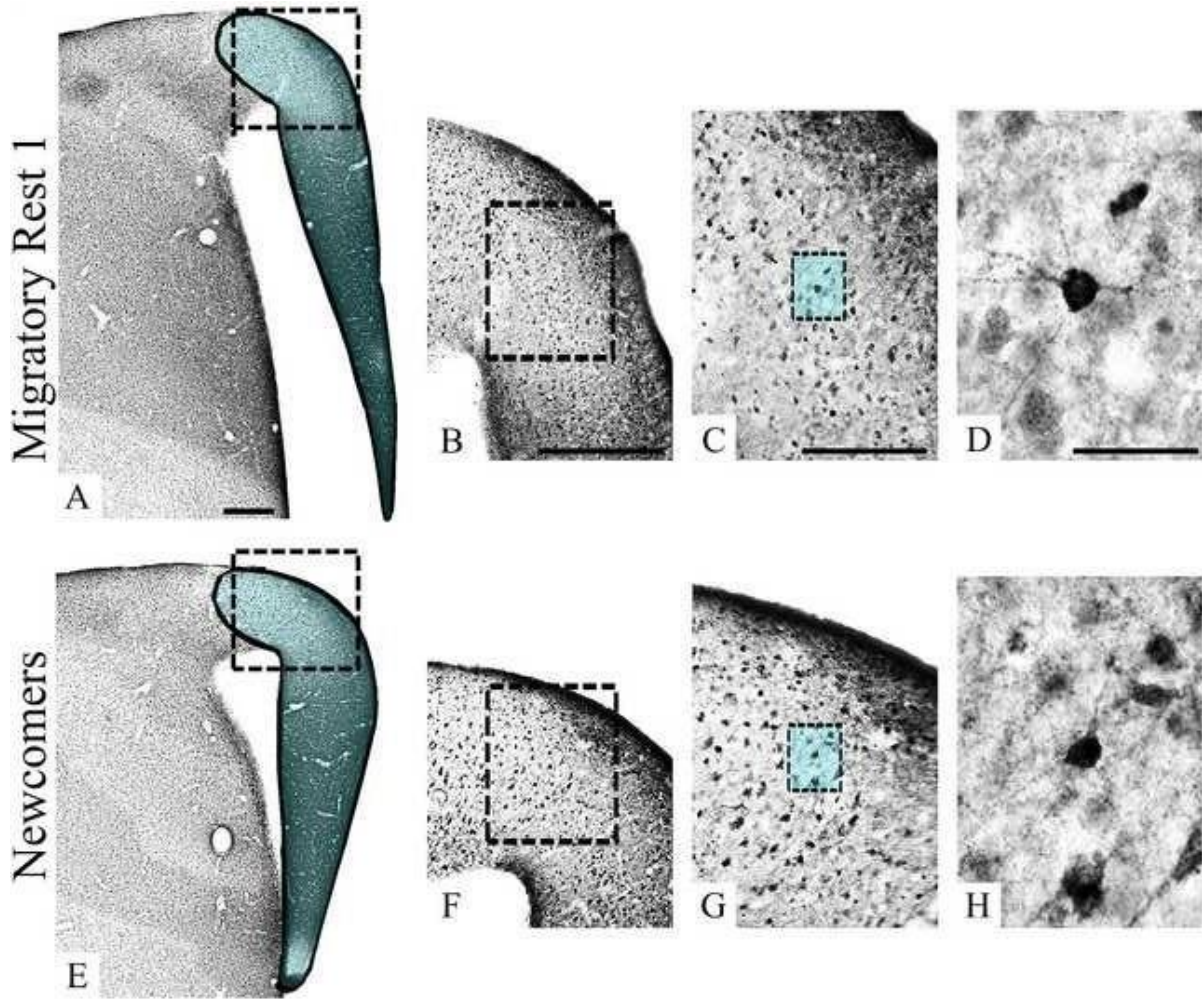
[Click here to download high resolution image](#)

Table 1 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

Table 1. Stereological detailed results of parvalbumin counting neurons of the hippocampal formation of five individuals of *A. macularius* in pre-migration (PM) and in migratory rest 1 (MR1).

Animal	total cell number	thickness (µm)	CE Scheaffer	Animal	total cell number	thickness (µm)	CE Scheaffer
Pre -Migration				Migratory Rest 1			
01	359694.59	37.2	0.037	01	152604.36	34.2	0.040
02	309463.34	36.7	0.040	02	222377.50	39.4	0.043
03	288854.47	37.1	0.050	03	201246.34	35.8	0.038
04	299403.44	37.9	0.047	04	166123.38	39.1	0.052
05	406116.13	37.7	0.039	05	191149.02	38.1	0.035
Mean	332706.39	37.3	0.043	Mean	186700.12	37.3	0.042
SD	49218.0591			SD	27794.7106		
CV	0.147932712			CV	0.148873555		
CV ²	0.0218840873			CV ²	0.0221633354		
CE ²	0.001849			CE ²	0.001764		
CE ² /CV ²	0.0844906152			CE ² /CV ²	0.0795909085		
CV ² - CE ²	0.0200350873			CV ² - CE ²	0.0203993354		
CVB ² (%)	91.55			CVB ² (%)	92.04		

CV = coefficient of variation; CE = Scheaffer error; CVB² = biological coefficient of variation; SD = standard deviation, Nc = newcomers, MR1 = migratory rest 1, MR2 = migratory rest 2, PM = pre-migration.

Table 2 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

Table 2. Estimate of the total number of parvalbumin labeled neurons of the magnocellular isthmus nuclei of five individuals of *Actitis macularius* captured in the four distinct time windows of the wintering period.

Animal	Total cells	Thickness (μm)	CE Scheaffer	Animal	Total cells	Thickness (μm)	CE Scheaffer
Newcomers				Migratory Rest 1			
01	75906.65	56.3	0.033	01	89558.08	57.4	0.027
02	88014.84	56.2	0.031	02	91256.18	56.9	0.033
03	96814.56	57.8	0.028	03	84616.27	59.2	0.026
04	76307.64	58.1	0.029	04	98889.91	56.8	0.027
05	96471.66	57.1	0.029	05	97205.89	58.0	0.031
Mean	86.703	57.1	0.030	Mean	92.305	57.7	0.029
SD	10.296			SD	5.812		
CV	1.19			CV	6.30		
CV ²	1.42			CV ²	39.69		
CE ²	0.001			CE ²	0.001		
CE ² /CV ²	7.042			CE ² /CV ²	5.520		
CV ² - CE ²	1.419			CV ² - CE ²	39.689		
CVB ² (%)	99.93			CVB ² (%)	99.99		
Migratory Rest 2				Pre-Migration			
01	90563.60	58.5	0.032	01	98558.81	57.6	0.028
02	90186.81	58.4	0.026	02	89976.37	57.2	0.030
03	87111.20	57.0	0.028	03	96283.66	56.9	0.026
04	90502.30	58.8	0.029	04	93577.60	56.8	0.060
05	89140.69	57.2	0.027	05	100075.09	57.6	0.029
Mean	89.500	57.9	0.028	Mean	95.694	57.2	0.029
SD	1.452			SD	4.028		
CV	1.62			CV	4.21		
CV ²	2.62			CV ²	17.72		
CE ²	0.001			CE ²	0.001		
CE ² /CV ²	3.8168			CE ² /CV ²	5.6433		
CV ² - CE ²	2.619			CV ² - CE ²	17.719		
CVB ² (%)	99.97			CVB ² (%)	99.99		

CV = coefficient of variation; CE = Scheaffer error; CVB² = biological coefficient of variation; SD = standard deviation.

Table 3 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

Table 3. Time windows and capture dates of *Actitis macularius* in the wintering temporal windows (newcomers, migratory rest 1, migratory rest 2 and pre-migration).

Groups	Time windows	N	Capture Date
Newcomers	August - October	5	08/09/2018
Migratory Rest 1	November - January	5	16/12/2017
Migratory Rest 2	February - April	5	17/03/2018
Pre-migration	May - July	5	17/05/2018

Table 4 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

Table 4. Stereological parameters for counting parvalbumin neurons and volume estimates of the magnocellular isthmus nuclei of 5 individuals of *A. macularius* captured in four different time windows (Newcomers, Migratory Rest 1, Migratory Rest 2 and Pre-migration).

Animals	Thicknes (μm)	Volume (mm^3)	Number of sections	Number of counted boxes	Total Markers	Counting box (μm^2)	Grid (μm^2)	Dissector Height (μm)	Between sections interval
Newcomers									
01	56.3	0.6	6	424	2401	50x50	65x65	12	1: 4
02	56.2	0.6	6	429	2775	50x50	65x65	12	1: 4
03	57.8	0.7	6	505	2977	50x50	65x65	12	1: 4
04	58.1	0.5	6	391	2342	50x50	65x65	12	1: 4
05	57.1	0.6	6	428	2993	50x50	65x65	12	1: 4
Mean	57.1	0.6	6	435	2698				
S.E.	0.38	0.03	0	18.76	138.88				
Migratory Rest 1									
01	57.4	0.5	6	416	2757	50x50	65x65	12	1: 4
02	56.9	0.7	6	513	2870	50x50	65x65	12	1: 4
03	59.2	0.6	6	477	2564	50x50	65x65	12	1: 4
04	56.8	0.5	6	432	3093	50x50	65x65	12	1: 4
05	58.0	0.6	6	438	2969	50x50	65x65	12	1: 4
Mean	57.7	0.6	6	455	2851				
S.E.	0.44	0.04	0	17.58	90.56				
Migratory Rest 2									
01	58.5	0.5	6	396	2752	50x50	65x65	12	1: 4
02	58.4	0.6	6	477	2744	50x50	65x65	12	1: 4
03	57.0	0.6	6	450	2720	50x50	65x65	12	1: 4
04	58.8	0.5	6	371	2730	50x50	65x65	12	1: 4
05	57.2	0.7	6	505	2768	50x50	65x65	12	1: 4
Mean	57.9	0.6	6	440	2743				
S.E.	0.37	0.04	0	24.89	8.38				
Pre-migration									
01	57.6	0.6	6	480	3037	50x50	65x65	12	1: 4
02	57.2	0.6	6	478	2790	50x50	65x65	12	1: 4
03	56.9	0.7	6	545	2993	50x50	65x65	12	1: 4
04	56.8	0.6	6	459	2899	50x50	65x65	12	1: 4
05	57.6	0.6	6	469	3072	50x50	65x65	12	1: 4
Mean	57.2	0.6	6	486	2958				
S.E.	0.16	0.02	0	15.16	51.07				

Table 5 - GUERREIRO, L. C. F. et al., 2020

Table 5. Stereological parameters for counting parvalbumin neurons and volume estimates of the hippocampal formation of *A. macularius* in migratory rest 1 and premigration time windows.

Animals	Thickness (µm)	Volume (mm ³)	Number of sections	Number of counting boxes	Total Markers	Counting Box (µm ²)	Grid (µm ²)	Dissector Height (µm)	Between sections interval
Migratory Rest 1									
01	37.2	4.2	7	366	2254	50x50	180x180	12	1: 4
02	36.7	3.7	8	338	1945	50x50	180x180	12	1: 4
03	37.1	2.7	6	253	1802	50x50	180x180	12	1: 4
04	37.9	3.5	6	312	1830	50x50	180x180	12	1: 4
05	37.7	4.3	8	397	2496	50x50	180x180	12	1: 4
Mean	37.3	3.7	7	333	2065				
S.E.	0.21	0.29	0.45	24.55	134.22				
Pre-migration									
01	34.2	3.4	5	314	1042	50x50	180x180	12	1: 4
02	39.4	4.1	8	364	1271	50x50	180x180	12	1: 4
03	35.8	5.2	9	465	1309	50x50	180x180	12	1: 4
04	39.1	3.1	5	282	976	50x50	180x180	12	1: 4
05	38.1	3.3	6	293	1164	50x50	180x180	12	1: 4
Mean	37.3	3.8	7	344	1152				
S.E.	1.00	0.38	0.81	33.45	64.04				

Title Page*Plasticity in the hippocampal formation of shorebirds during the wintering period: stereological analysis of parvalbumin neurons in *Actitis macularius***

Luma Cristina Ferreira Guerreiro¹, Ediely Pereira Henrique², João Batista da Silva Rosa², Patrick Douglas Corrêa Pereira², Cintya Castro de Abreu², Taiany Nogueira Fernandes², Nara Gyzely de Moraes Magalhães², Anderson de Jesus Falcão da Silva², Emanuel Ramos da Costa¹, Cristovam Guerreiro Diniz², Cristovam Wanderley Picanço Diniz^{1*}, Daniel Guerreiro Diniz¹.

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

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

*Corresponding author: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Rua dos Mundurucus, nº4487, CEP: 66.073-005, Guamá, Belém, Pará, Brasil. E-mail: cwpdiniz@gmail.com