



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

GIOVANNI FREITAS GOMES

**Alterações da Morfologia da Micróglia do Septo Lateral e
Comportamento Semelhante ao Ansioso em um Modelo Murino de
Inoculação Sequencial de VDEN1 e VDEN4: Influência do
Enriquecimento Ambiental**

BELÉM-PARÁ

2016

GIOVANNI FREITAS GOMES

Alterações da Morfologia da Micróglia do Septo Lateral e do
Comportamento Semelhante ao Ansioso em um Modelo Murino de
Inoculação Sequencial de VDEN1 e VDEN4: Influência do
Enriquecimento Ambiental

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

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Marcia Consentino Kronka
Sosthenes

Coorientador:

Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço
Diniz

BELÉM-PARÁ

2016

GIOVANNI FREITAS GOMES

Alterações da Morfologia da Micróglia do Septo Lateral e do
Comportamento Semelhante ao Ansioso em um Modelo Murino de
Inoculação Sequencial de VDEN1 e VDEN4: Influência do
Enriquecimento Ambiental

Apresentado em: 05 de maio de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Marcia Consentino Kronka Sosthenes

Orientadora

Prof. Dr. Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira (UFMG)

Banca examinadora (Titular)

Prof. Dr. Cristovam Guerreiro Diniz (IFPA)

Banca examinadora (Titular)

Prof. Dr. João Bento Torres Neto (UFPA)

Banca examinadora (Suplente)

RESUMO

A infecção por dengue é a maior causa de mortes por infecções por arbovírus no Brasil. Apesar de sua importância epidemiológica e um século de estudos sistemáticos dedicados aos mecanismos patogênicos da doença eles permanecem mal compreendidos. No continente americano, as epidemias parecem associadas ao fato de que múltiplos sorotipos circulam de forma simultânea, mas pouco se sabe sobre as alterações que ela é capaz de induzir no sistema nervoso central. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar possível influência do enriquecimento ambiental sobre as manifestações do comportamento e da morfologia microglial no septo lateral associadas à inoculação sequencial alternada de diferentes sorotipos do vírus da dengue (VDEN1 e VDEN4). Para esse fim, foram usadas fêmeas adultas de 10 meses de idade de camundongos imunocompetentes da variedade suíça albina, mantidas em ambiente padrão ou enriquecido. Foi feita uma única infecção intraperitoneal com homogenado cerebral infectado com VDEN1 seguida 28 dias após, por infecção com homogenado cerebral infectado com VDEN4. Com o intuito de acentuar os sintomas clínicos, foi implantado nos últimos sete dias a contar do 29º dia após a primeira infecção, um regime de infecções múltiplas alternadas de VDEN1 e VDEN4 acentuadas por anticorpo heterólogo anti-VDEN3. Animais controles receberam igual regime de inoculações e volumes de homogenado cerebral não-infectado. A avaliação comportamental, feita por meio da atividade exploratória do campo aberto (CA) e do labirinto em cruz elevado (LCE), mostrou que animais infectados de ambiente padrão apresentaram redução do tempo de permanência na periferia do CA e no braço fechado do LCE, sendo esse o único grupo experimental que apresentou tal modificação do comportamento. Para avaliar possíveis alterações da morfologia microglial nesses grupos experimentais, foram sacrificados para análise neuropatológica de 5 indivíduos em função das janelas de infecção. Para imunomarcagem seletiva da micróglia, utilizamos anticorpo anti-IBA-1 e o método de reconstrução tridimensional para a análise morfométrica. De forma geral, células obtidas a partir de animais infectados de ambiente padrão, quando comparados aos não-infectados, apresentaram alterações significativas, com aumento significativo da complexidade, K-Dim, número e densidade de segmentos e comprimento dos ramos. Animais de ambiente enriquecido não apresentaram a mesma alteração. Além disso, testamos a hipótese de que as micróglia do septo lateral encontram-se divididas em subtipos e que essa conformação também poderia ser alterada pela infecção. Notamos que, em estado fisiológico, micróglia do septo lateral de animais de ambiente padrão ou enriquecido apresentam-se subdivididas em três subpopulações, uma mais complexa, uma menos complexa e uma intermediária. Após a infecção por VDEN1 ou por VDEN4, houve alteração desse padrão na população de micróglia do septo lateral do animais de ambiente padrão, com surgimento de um subtipo de alta complexidade e aumento do percentual de células mais complexas, porém não em animais de ambiente enriquecido. Baseado nessas evidências sugerimos que as micróglia do septo lateral apresentam um padrão morfológico heterogêneo e que a infecção pelos sorotipos 1 e 4 da dengue é capaz de induzir alterações na morfologia da micróglia e no padrão de subdivisão dessas células, associado ao aumento do percentual de células de alta complexidade, além de induzir alterações comportamentais importantes detectadas no CA e no LCE, e que o enriquecimento ambiental parece proteger os animais contra as alterações comportamentais e da morfologia da micróglia do septo lateral no presente modelo de infecção.

Palavras-chave: Infecção por dengue; enriquecimento ambiental; comportamento semelhante ao ansioso; micróglia; septo lateral; reconstrução tridimensional.

ABSTRACT

Dengue disease is the major cause of deaths by arbovirus infections in Brazil. In the American Continent, the epidemics seem to be associated to the fact that multiple dengue virus (VDEN) serotypes circulate simultaneously. Despite its epidemiological importance and a century of systematic studies dedicated to understand the disease, its detailed pathogenic mechanisms remain poorly understood. The objective of this study was to evaluate possible influence of environmental enrichment on behavioral changes and microglial morphology alterations in the lateral septum after sequential VDEN1 and VDEN4 intraperitoneal inoculations of infected brain homogenates. To that end, we used adult females ten months old of an immunocompetent albino Swiss mouse strain housed in standard or enriched cages. A single intraperitoneal infection of VDEN1 was followed after 28 days by another inoculation of VDEN4. To enhance clinical signs, a regimen of daily alternated injections of VDEN1 or VDEN4 followed 24 hours later by anti-VDEN2 antibody was applied in the last 7 days. Control animals received equal volumes and regime of inoculation of uninfected brain homogenate. We assessed the behavioral changes using the open field exploratory (OF) and elevated plus-maze (EPM). Infected animals housed in standard cages showed significant decrease in time of exploration of the periphery in the OF and in the time of exploration of enclosed arm in the EPM. Uninfected mice housed in standard cages and animal housed in enriched cages did not show same changes. To check how possible microglial changes could be influenced by acute DENV1 infection, secondary DENV4 infection or the passive anti-DENV4 inoculation, we decided to sacrifice groups of animals after which point of inoculation. To evaluate microglial changes, we did selective immunohistochemistry for microglia and macrophages using anti-IBA-1 antibody (Wako, Japan) and we used tri-dimensional reconstruction to morphometric evaluation. Compared to uninfected, infected mice from standard cages showed significant changes in microglial morphology. We also tested the hypothesis that septal microglia is clustered in subtypes and that DENV infection could change this pattern. We noticed microglia is subdivided in three subgroups in physiological conditions, a more complex pattern, a less complex pattern and an intermediate. After DENV1 or DENV4 infection, we observed changes in this pattern, including the appearance of a high complexity cell, increasing the percentage of complexes microglia. We observed these changes in animals from standard cages, but not in animals from enriched cages. Another interesting data is that environmental enrichment appears to reduce this morphometric changes. Based on the evidences, we suggest that sequential infection with VDEN1/VDEN4 in murine model induced behavioral changes and microglial changes in the lateral septum and EA appears to protect animals against these alterations. Based on these evidences, we suggest that microglial from lateral septum present a heterogeneous pattern of morphology and that DENV infection can induce morphological changes, and alterations in the pattern of subdivision, associated with the increase in the percentage of high complexity cells. In addition, infection can induces behavioral changes detected by EPM and OF tests and environmental enrichment seems to protect against microglial and behavioral changes.

Key words: Dengue infection, environmental enrichment; anxiety-like behavior; microglia; lateral septum; three-dimensional reconstruction.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por ser meu guia e protetor sempre.

Aos meus pais, Edson Rinaldo Monteiro Gomes e Maria de Fátima Freitas Gomes, por me oportunizarem, durante toda a minha vida, as melhores experiências de amor, amizade, carinho, confiança, por serem meus maiores incentivadores e por me ajudarem a construir meus sonhos e objetivos de vida. Você são o meu maior exemplo e muito do que sou, eu devo a vocês. Agradeço o apoio incondicional e incentivo nesse caminho difícil. Sou muito grato pela confiança e pelo amor que me fazem sentir todos os dias. O que eu faço de forma árdua e responsável também é por vocês e essa vitória é compartilhada entre nós. Eu os amo muito!

Ao meu irmão, Giordano Freitas Gomes, à minha avó Diná Freitas (*in memorian*), à minha madrinha Eunice Freitas, ao meu padrinho Edivaldo Gomes, à minha madrinha de crisma Jacilene Freitas, à minha tia Guilhermina Freitas e a todos os demais familiares que sempre acreditaram em mim e manifestaram seu afetuoso apoio. Sou imensamente grato pelo incentivo dado por vocês. Todos são muito importantes em minha vida. Amo vocês! “Vó, sei que ai de cima, da casa do Pai Celestial, a senhora está dando pulos de alegria por este momento, que também é em sua homenagem!”

À minha namorada, Isabella Cristina Ferreira Alves, por nunca me deixar baixar a cabeça para as dificuldades, por ser minha grande incentivadora e por acreditar em mim em todos os momentos. Devo muito dessa conquista ao seu apoio e ao seu carinho de namorada e amiga. Sem dúvidas você foi umas das pessoas mais importantes na construção desse momento que tem um final simbólico com esta dissertação. Devo agradecer também a sua compreensão nos momentos em que precisei me imergir neste trabalho. Outros momentos como esse virão e sei que sempre poderei tê-la ao meu lado, me ajudando a construir meus desejos e sonhos e a realizá-los também. Você sempre poderá esperar o mesmo de minha parte. Te amo grande!

Aos meus amigos de longa data Willian Gomes, Danilo Oliveira, Rafael Augusto e Márcio Caxias. Vocês fazem parte da minha vida há muito tempo e acompanharam muitos dos meus desafios. Agradeço o apoio e a amizade que é fundamental para mim. Vocês são grandes amigos e irmãos.

Aos demais amigos que fazem parte da minha vida, que torcem por mim e que estão comigo nos momentos importantes de minha caminhada.

Aos Salesianos Cooperadores, à Família Salesiana e aos jovens da Juventude Salesiana, em especial aos jovens da Acolhida, pois sem a saúde espiritual que eu exercito todos os dias com vocês, eu não teria a força que tenho para continuar. Os momentos com vocês sempre são de grande construção pessoal. Vocês são grandes e verdadeiros amigos com os quais Dom Bosco me presenteou. Agradeço por sempre me abrigarem de baixo de seus braços carinhosos.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a Marcia Kronka e Prof. Dr. Cristovam Diniz, por me ajudarem a construir meu caminho profissional até aqui, por serem grandes exemplos de professores, pesquisadores e de pessoas. Agradeço a grande generosidade e amizade com a qual sempre me trataram e pelo apoio científico e pessoal. Esta dissertação é fruto de grande trabalho e de excelentes conversas e discussões, que me ajudaram a crescer e progredir. Vocês merecem todo o meu carinho e admiração.

A todos os membros do Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção, em especial àqueles com quem atuei de forma direta e aqueles que fazem parte dos meus dias desde que iniciei a iniciação científica no LNI. Vocês também contribuem de forma grandiosa com a minha formação. Tenho construído grandes amizades e muitas experiências e conversas serão levadas por toda minha vida. Aqui estão ótimas pessoas e excelentes profissionais.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FINEP, que proporcionaram fomento financeiro, sem o qual não seria possível a realização do presente trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situação da Dengue no Mundo.....	15
Figura 2. Fatores que levam a doença severa causada pelo vírus da dengue....	18
Figura 3. Resposta Microglial à infecção por dengue no hospedeiro neonato...	23
Figura 4. Circuitos envolvidos na resposta semelhante à ansiosa.....	26
Figura 5. Localização Anatômica da Área Septal.....	27
Figura 6. Linha do Tempo Experimental.....	34
Figura 7. Representação da área de interesse para reconstrução das micróglias e distribuição sistemática das caixas.....	41
Figura 8. Gráfico representativo dos resultados do Labirinto em Cruz Elevado	45
Figura 9. Gráfico representativo dos resultados do Campo Aberto.....	45
Figura 10. Representação gráfica dos resultados de sete variáveis morfométricas obtidos a partir da análise paramétrica.....	47
Figura 11. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AP NI.....	54
Figura 12. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AP D1.....	55
Figura 13. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AP D1D4.....	56
Figura 14. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AP D1D4AD3.....	57
Figura 15. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AE NI.....	58
Figura 16. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AE D1.....	59

Figura 17. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AE D1D4.....	60
Figura 18. Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AE D1D4AD3.....	61
Figura 19. Representação gráfica dos resultados obtidos a partir da comparação entre os subtipos microgliais mais complexos de cada grupo experimental.....	63
Figura 20. Representação gráficos da análise discriminante e análise componentes principais realizadas a partir de células do septo lateral de animais de ambiente padrão.....	65
Figura 20. Representação gráficos da análise discriminante e análise componentes principais realizadas a partir de células do septo lateral de animais de ambiente enriquecido.....	66
Figura 22: Representação gráfica dos aglomerados gerados a partir dos animais dos grupos experimentais utilizados no presente trabalho.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais com suas respectivas descrições, abreviaturas e número amostral.....	35
Tabela 2. Variáveis morfométricas medidas pela reconstrução tridimensional utilizando-se os programas Neurolucida e Neurolucida Explorer.....	39
Tabela 3. Amplitude média em percentual das diferenças entre os grupos infectados e o grupo não infectado de ambiente padrão para as variáveis da figura 10.....	49
Tabela 4. Amplitude média em percentual das diferenças entre os grupos infectados e o grupo não infectado de ambiente enriquecido para as variáveis da figura 10.....	49
Tabela 5. Valores de média e erro padrão de sete variáveis morfométricas representadas na figura 10.....	50
Tabela 6. Valores de média e erro padrão das variáveis complexidade e volume do <i>convex-hull</i> apresentadas nos painéis das figuras 11 A 18.....	62

LISTA DE ABREVIÇÕES

AE – Ambiente enriquecido	IBA-1 – proteína ligante de cálcio ionizado 1
ANOVA – Análise variância	IFN- α –interferon alfa
Ant-VDEN – anticorpo anti-dengue	IFN- γ –interferon gama
AP – Ambiente padrão	IL-10 - interleucina 10
ATP – trifosfato de adenosina	IL-1 β – interleucina 1 beta
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	IL-2 – interleucina 2
CA – Tarefa exploratória do campo Aberto	IL-6 - interleucina 6
CA1 – Camada 1 do Corno de Amon do hipocampo	IL-8 - interleucina 8
CA2 – Camada 2 do Corno de Amon do hipocampo	JEV – Virus da encefalite japonesa
CCL2 – quimiocina ligante de (C-C motif) 2	LCE – Labirinto em cruz elevado
CCL3 - quimiocina ligante de (C-C motif) 3	MIF – fator inibidor da migração de macrófago
CCL4 - quimiocina ligante de (C-C motif) 4	NGF - Fator de Crescimento do Nervo
CCL5 - quimiocina ligante de (C-C motif) 5	PFC – Córtex pré-frontal
CSD – choque sindrômico da dengue	SNC – Sistema nervoso central
CXCL-10 - quimiocina ligante de (C-X-C motif) 10	TBS – tampão tris salina
CXCL-11 - quimiocina ligante de (C-X-C motif) 11	TNF- α –fator de necrose tumoral
CXCL-8 - quimiocina ligante de (C-X-C motif) 8	VDEN – vírus da dengue
FDH – febre da dengue hemorrágica	VDEN1 – sorotipo 1 do vírus da dengue
GABA – ácido gama aminobutírico	VDEN2 – sorotipo 2 do vírus da dengue
HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal	VDEN3 – sorotipo 3 do vírus da dengue
	VDEN4 – sorotipo 4 do vírus da dengue
	VEGF
	vHPC – Hipocampo ventral

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Doenças Dengue e Seus Sorotipos.....	14
1.2. Consequências Periféricas e Centrais da Dengue.....	16
1.3. Aspectos Morfofuncionais da Micróglia em Condições Homeostáticas.....	20
1.4. A Resposta da Micróglia no Sistema Nervoso Central Alterado..	21
1.5. Comportamento Semelhante ao Ansioso e a Importância do Septo Lateral nesse Tipo de Resposta Comportamental.....	24
1.6. O enriquecimento Ambiental.....	29
1.7. Quantificação de Alterações Morfológicas por Reconstrução Microscópica Tridimensional.....	31
2. Objetivos	32
2.1. GERAL.....	32
2.2. ESPECÍFICOS.....	32
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Comitê de Ética.....	33
3.2. Grupos Experimentais e Inoculações.....	33
3.3. Inóculo.....	35
3.4. Análise Comportamental.....	35
3.5. Perfusão e Microtomia.....	37
3.6. Imunohistoquímica.....	37
3.7. Reconstrução Tridimensional.....	38
3.8. Fotomicrografias e Pós-processamento das Imagens.....	41
3.9. Análise Estatística.....	41
4. Resultados	44
4.1. Análise Comportamental.....	44
4.2. Análise Morfométrica da micróglia obtida a partir do septo lateral.....	46

5. Discussão.....	69
5.1. Infecção por dengue e alterações na morfologia da micróglia do septo lateral no modelo de infecção por VDENV1 e VDEN4.....	69
5.2. Análise de aglomerados dos morfotipos microgliais presentes no septo lateral em estado fisiológico e em estado alterado pela infecção por VDEN.....	70
5.3. Possíveis implicações funcionais das alterações morfológicas da micróglia para a função sináptica.....	74
5.4. O comportamento semelhante ao ansioso no modelo de infecção alternada por VDEN1 e VDEN4.....	75
5.5. O impacto do ambiente enriquecido sobre as alterações comportamentais e morfológicas no modelo de infecção por VDENV1 e VDEN4.....	76
5.6. Limitações técnicas nas reconstruções tridimensionais	77
6. Conclusões.....	79
7. Referências.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença Dengue e Seus Sorotipos

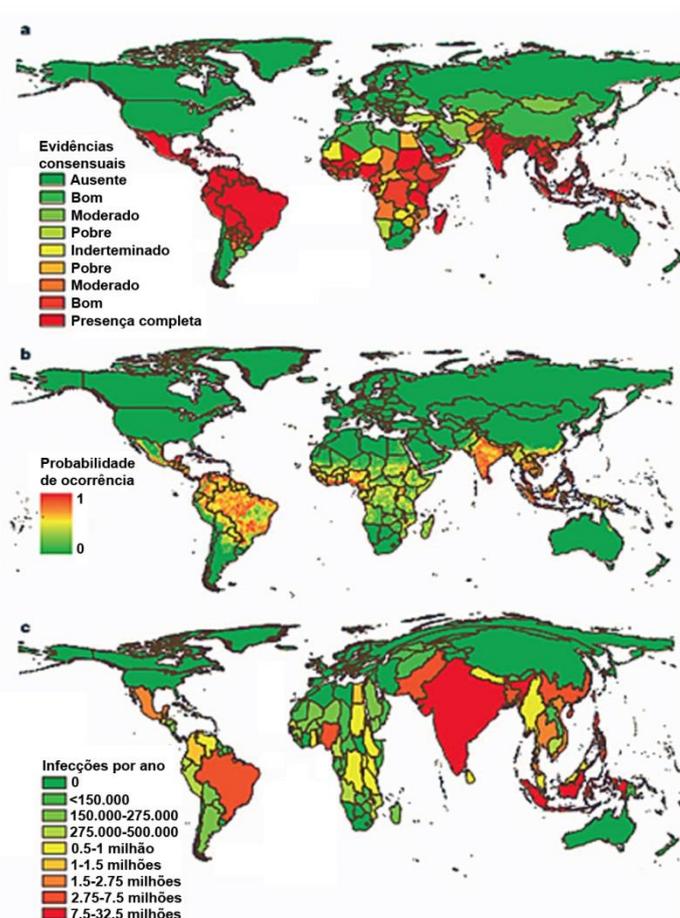
As doenças infecciosas possuem grande importância nas agendas de saúde em âmbito mundial, sendo as mesmas um grande desafio para o planejador de políticas públicas (MORENS, D. M., FOLKERS, G. K., & FAUCI, 2009). Tais acometimentos representam a segunda maior causa de mortes no mundo, perdendo somente para as cardiopatias (FAUCI, 2005). No Brasil, essas doenças também assumem proporções importantes, e isso inclui as hepatites virais, a leishmaniose, a esquistossomose, as meningites, a malária e a febre amarela. Nesse cenário, as chamadas doenças infecciosas emergentes e re-emergentes têm ganhado grande atenção dos órgãos de saúde. Um exemplo ilustrativo das doenças re-emergentes na agenda dos governantes é o caso da dengue no Brasil que assume proporções epidêmicas (AQUINO et al., 2006; CORDEIRO et al., 2007).

Dengue é a arbovirose de maior importância em países tropicais e subtropicais (GUZMÁN; KOURÍ, 2002) e é causada por um Flavivírus (*Flaviviridae*) de RNA de fita simples de sentido positivo e que possui quatro sorotipos geneticamente diferentes: VDEN1, VDEN2, VDEN3, VDEN4 (RICO-HESSÉ, 2010). O vírus da dengue é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), que estão presentes em países tropicais e subtropicais, o que leva a alta prevalência da doença nessas regiões. Com o vetor completamente fora de controle, as áreas de maior risco são as que estão situadas nessa faixa e isso inclui as Américas e Ásia, apesar da dengue ocorrer em todos os continentes (BHATT et al., 2013).

Em humanos, a infecção pelo vírus da Dengue pode levar a quadros assintomáticos, ao quadro de dengue clássica ou ainda ao quadro de dengue hemorrágica. A dengue clássica ou febre da dengue é caracterizada por febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia e dor retro-orbital. Já a dengue hemorrágica é diferenciada do quadro clássico principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular que leva aos episódios de hemorragia (GUZMÁN; KOURÍ, 2002). Os casos assintomáticos da dengue somam aproximadamente 294 milhões de casos e as formas sintomáticas, juntas, acumulam aproximadamente 96 milhões de casos por ano (BHATT et al.,

2013), com aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas vivendo em áreas risco de infecção no mundo (WILDER-SMITH et al., 2012).

Figura 1: Situação da dengue no mundo.



Os maiores números de infecções por ano se encontram nas Américas e na Ásia, sendo que nessas regiões a probabilidade de ocorrência é também maior. Fonte: (BHATT et al., 2013).

O quadro de doença severa nas infecções por dengue está relacionado tanto à imunidade inata quanto à adquirida e isso inclui a resposta imune celular e humoral. Entretanto, somente alguns pacientes, mais frequentemente idosos e recém-nascidos, desenvolvem a forma mais grave da doença: a dengue hemorrágica (FDH), cujo evento mais importante é o extravasamento de plasma e a hemoconcentração com redução do volume intravascular e insuficiência circulatória (GREEN; ROTHMAN, 2006). Pacientes que desenvolvem hipotensão menor do que 20mm de mercúrio (mmHg), ou mostram sinais de choque, com ou sem hemorragia são classificados

como portadores da forma mais grave intitulada de choque sindrômico da dengue (CSD).

1.2. Consequências Periféricas e Centrais da Dengue

Sabe-se que o aumento da severidade em comparação a uma infecção primária em casos de doença da dengue está relacionado à infecção secundária pelo vírus VDEN (PAWITAN, 2011; VAUGHN et al., 2000), o que pode estar associado ao aumento da expressão de citocinas após uma resposta imune secundária, sendo tal grupo de proteínas as principais mediadoras envolvidas nos sinais da doença secundária e que podem levar ao aumento da permeabilidade vascular (MALAVIGE; OGG, 2013; MATHEW; ROTHMAN, 2008). De fato, estudos têm mostrado que células T de memória VDEN-específicas geradas em uma infecção prévia por VDEN respondem com produção alterada de citocinas pró-inflamatórias em uma infecção por sorotipos heterólogos do vírus da dengue, e que os níveis de ativação e expansão das células T de memória durante a resposta aguda estão relacionados à severidade da doença (BEAUMIER et al., 2008; ROTHMAN, 2009). De forma complementar, os receptores do tipo TOLL TLR-2 e TLR-6 parecem ser os receptores mais envolvidos na infecção por VDEN, além de estarem envolvidos nos mecanismo de aumento de expressão de TNF-alfa e IL-6 durante a infecção por esse vírus (CHEN; NG; CHU, 2015). Além de linfócitos T, monócitos, macrófagos, hepatócitos e células endoteliais contribuem de forma significativa para o aumento da expressão de citocinas e quimiocinas, incluindo IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL-8, CXCL-10, CXCL-11, MIF e VEGF, no plasma de pacientes, constituindo a “tempestade” de citocinas associada às formas graves da doença (COSTA et al., 2013; GREEN; ROTHMAN, 2006).

Para testar a importância da imunidade celular durante a infecção secundária por VDEN, Beaumier e colaboradores (BEAUMIER et al., 2008) fizeram inoculações secundárias com sorotipos heterólogos encontrando respostas acentuadas de linfócitos T CD8+ após a infecção secundária em comparação com os linfócitos T da resposta aguda ou com os linfócitos T de memória após à infecção primária. Para demonstrar esse efeito e modelar a resposta das células T às infecções sequenciais, os autores imunizaram camundongos BALB/c com sequências diferentes de sorotipos

do vírus da dengue e mediram a frequência de células T específicas aos peptídeos de cada sorotipo após à infecção. Nessa variedade genética de camundongo, reconhecida como tendo resposta imune do tipo Th-2, encontrou-se resposta associada aos epítomos de proteínas virais não-estruturais após a infecção secundária e demonstrou que a infecção primária não previne a infecção secundária similar ao que ocorre em humanos. Coerente com esse achado, Mongkolsapaya e colaboradores (2003) haviam previamente demonstrado que uma vasta proporção dos linfócitos T ativados durante uma infecção secundária em humanos tem maior afinidade por antígenos do sorotipo heterólogo (MONGKOLSAPAYA et al., 2003)

A resposta humoral também tem papel importante no aumento da severidade da doença (BELTRAMELLO et al., 2010; ROTHMAN, 2011), já que após infecção secundária por sorotipo heterólogo (sorotipos geneticamente diferentes), linfócitos B gerados para combater a infecção primária respondem rapidamente, produzindo títulos altos de anticorpos que potenciam a infecção em curso, em vez de neutralizar o vírus (GUABIRABA et al., 2013). Essa resposta imune inadequada deu origem ao conceito de infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo. Essa é a situação na qual anticorpos gerados após uma infecção prévia por um determinado sorotipo acentua uma infecção subsequente por um outro sorotipo (sorotipo heterólogo). Esse processo envolve a ligação do vírus ao anticorpo, formando um complexo vírus-anticorpo, que será ancorado ao receptor Fc da célula e mais adiante será internalizado por esta (SUN; KOHEL, 2013). Esse mecanismo de internalização de complexos vírus-anticorpo em macrófagos e monócitos é cerca de 3 a 10% mais eficiente do que a infecção usual através de receptores virais Toll-like (ZAREMBER; GODOWSKI; ALERTS, 2013).

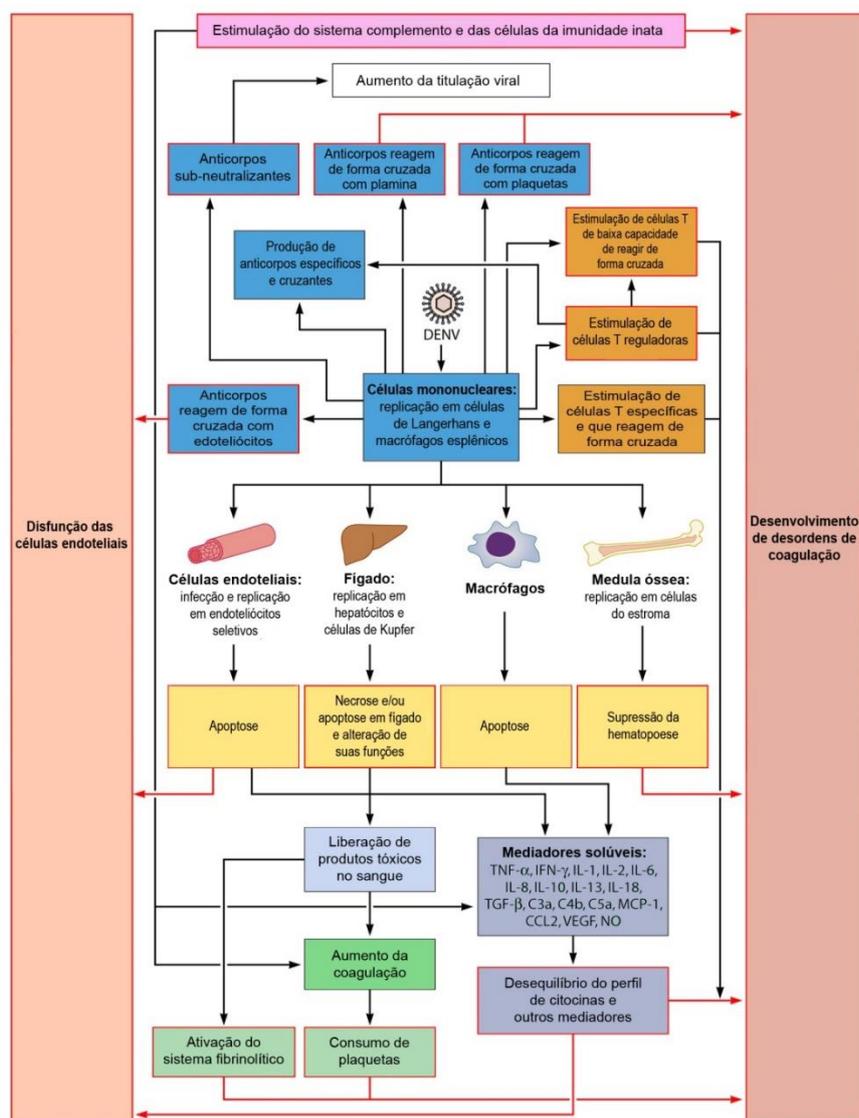
Recentemente em nosso laboratório, mostramos em um modelo de infecção por dengue exacerbada por inoculação de anticorpo heterólogo, que o ambiente no qual camundongos (*Mus musculus*) imunocompetentes são alojados pode influenciar no curso da doença (DINIZ et al., 2012; DINIZ et al., 2013). Nesse trabalho, tornou-se evidente que animais vivendo em grupo e expostos ao ambiente enriquecido por brinquedos e rodinhas de correr que propiciam o exercício voluntário (ambiente enriquecido) apresentaram sinais clínicos, comportamentais e histopatológicos mais severos, quando comparados a animais que não possuíam tais estímulos, e que isto

estaria relacionado à maior atividade de linfócitos T e consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (DINIZ et al., 2012).

Outro estudo utilizando o mesmo desenho experimental, porém em camundongos C57BL/6, reconhecidos como tendo uma resposta pró-inflamatória do tipo Th-1 (mais próxima do perfil de resposta imune humana à infecções virais por Dengue) mostrou resposta reativa cruzada com linfócitos T com afinidades distintas por diferentes epítomos e aumento da produção de citocinas em resposta à infecção secundária heteróloga (BEAUMIER et al., 2010). Ambos os achados estão de acordo com as descrições encontradas para os casos da doença severa em humanos.

A figura 2 resume vários dos achados citados acima.

Figura 2: Fatores que interferem na severidade da manifestação da dengue.



Esquema que mostra os fatores que levam a doença causada pelo vírus da dengue, explicitando a importância da imunidade adquirida, celular e humoral para a patogênese da doença. A figura também mostra as principais células/orgãos infectados pelo vírus. Adaptado de MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009.

Mais recentemente uma série de evidências tem reportado a ocorrência de alterações do sistema nervoso central em infecções por dengue incluindo encefalites, encefalomielites disseminadas, mielites transversas, síndrome de Guillain Barré, e paralisia de nervos cranianos (BRITO et al., 2007; DOMINGUES et al., 2008; LÚCIA; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005; SOARES et al., 2006; VARATHARAJ, 2010). Embora tenha sido sugerido que tais síndromes possam ser consequência de alterações metabólicas induzidas pela infecção, resposta inflamatória exacerbada, invasão do SNC pelo vírus ou a combinação em maior ou em menor proporção desses elementos, grande parte dos mecanismos fisiopatológicos dessas entidades clínicas permanecem por ser esclarecidos (DOMINGUES et al., 2008). Além disso, já foi demonstrado que que infecções por VDEN pode alterar a integridade da barreira hemoatoencefálica (CHATURVEDI et al., 1991) e, ao conseguir adentrar o parênquima cerebral, é capaz de utilizar o transporte axonal para se espalhar pelo encéfalo (AN et al., 2003; DESPRES et al., 1998; LUM et al., 1996).

A partir de autopsias realizadas em pacientes com formas severas de dengue foi possível identificar alterações neuropatológicas genéricas associadas à inflamação incluindo edema, congestão vascular e infiltração linfocítica perivascular (CHIMELLI et al., 1990). Além disso, foram descritas variadas anormalidades neuronais com células acidófilas exibindo retração do citoplasma, invasão de macrófagos imunomarcados com antígenos do vírus da dengue , tanto na substância branca quanto na substância cinzenta, em especial na proximidade de neurônios com características alterações citopáticas (MIAGOSTOVICH et al., 1997). Sabe-se que a infecção por alguns flavivirus, como o VDEN, é capaz de induzir morte neuronal e que essa isso pode ser consequência da liberação de TNF-alfa (COURAGEOT; CATTEAU; DESPRÈS, 2003; MARIANNEAU et al., 1998). Somam-se a isso numerosos trabalhos que descreveram a presença de antígenos virais em células endoteliais e perivascularares, oligodendrócitos, astrócitos e micróglia (BALSITIS et al., 2009; MARCHIORI et al., 2009; PAES et al., 2005). Num modelo de infecção periférica em animais neonatos, Velandia-Romero et al 2012 perceberam que esses últimos

desenvolveram alterações neurológicas, associadas a ativação microglial e presença do antígeno viral nesse tipo celular. Neurônios, oligodendrócitos e células endoteliais também encontraram-se infectadas. Além disso, notou-se aumento da permeabilidade vascular, acompanhada por disfunção da barreira hematoencefálica, em animais infectados pelo VDEN (VELANDIA-ROMERO; ACOSTA-LOSADA; CASTELLANOS, 2012).

Tendo em conta que o camundongo suíço albino também tem resposta imune à infecção viral semelhante ao C57Bl6 (VALEROL et al., 2008), apresentando resposta pró-inflamatória exacerbada após infecção por VDEN acentuada por anticorpo heterólogo (DINIZ *et al.*, 2013), resolvemos testar a hipótese de que a infecção secundária por VDEN com sorotipo heterólogo promoveria igualmente em camundongos albinos suíços uma resposta inflamatória exacerbada com sinais clínicos da doença e que isso poderia estar relacionado às manifestações neurológicas encontradas na dengue, possivelmente relacionadas com alterações na resposta de células microgliais já percebidas em nosso laboratório (TURIEL, 2010).

1.3. Aspectos Morfofuncionais da Micróglia em Condições Homeostáticas

As micróglia são células da glia que compõe 10 a 20% da população de células do Sistema Nervoso Central (VILHARDT, 2005) e estão presentes em todo o encéfalo, com maior densidade no hipocampo, nos gânglios basais e na substância negra. Estas células derivam da linhagem fagocítica mononuclear, a mesma dos macrófagos, compartilhando algumas propriedades com essas últimas (VILHARDT, 2005), sendo, portanto, as células que compõe o sistema imune inato do SNC. Essas células podem ser encontradas atuando tanto no sistema nervoso saudável como no sistema nervoso alterado (CĂTĂLIN et al., 2013), sendo que sua morfologia pode variar de acordo com seu estado funcional.

As células microgliais já são reconhecidas como o 4º elemento da sinapse, atuando como sensores sinápticos durante o desenvolvimento e no cérebro adulto, sendo capazes de responder às mudanças na atividade neural e à liberação de neurotransmissores (SCHAFER; LEHRMAN; STEVENS, 2013). Durante o desenvolvimento as células microgliais parecem influir em eventos associados à proliferação e diferenciação neuronais, vascularização, sinaptogênese e mielinização,

assim como participam da remoção de neurônios em apoptose, de debris celulares e de conexões sinápticas (BITZER-QUINTERO; GONZÁLEZ-BURGOS, 2012; MIYAMOTO et al., 2013; SCHAFER; LEHRMAN; STEVENS, 2013; TREMBLAY et al., 2011; WAKE et al., 2013).

Coerente com essas descrições, já é amplamente reconhecido que as células microgliais modulam a neurogênese, controlam o *turnover* de neurotransmissores e dão suporte ao metabolismo neuronal, participando da regulação da angiogênese e do fluxo sanguíneo cerebral (BLANK; PRINZ, 2013). Mais recentemente, as células microgliais têm sido implicadas na restauração de circuitos sinápticos lesionados, além de modular a faixa de operação sináptica através do assim chamado *synaptic scalling*. O monitoramento constante dos contatos sinápticos e parte de sua regulação extra-sináptica através da matriz extracelular realizada pelas micróglia, revela bem o seu potencial no controle do desenvolvimento, estabilização e função de redes neurais (KETTENMANN; KIRCHHOFF; VERKHRATSKY, 2013; KETTENMANN et al., 2011a).

Assim, tradicionalmente a micróglia encontrada em estado homeostático é aquela chamada de “quiescente” (do inglês *resting*) e que apresenta braços longos e bem ramificados, com alta motilidade e de corpo celular pequeno com formato bipolar ou em bastão (KIM; DE VELLIS, 2005).

As mudanças estruturais pronunciadas que ocorrem na micróglia de longe excedem aquelas descritas para os astrócitos (HIRRLINGER; HULSMANN; KIRCHHOFF, 2004) e neurônios (GRUTZENDLER; KASTHURI; GAN, 2002) para um mesmo intervalo de tempo.

Tendo em vista a importância inquestionável das micróglia para a manutenção da saúde do sistema nervoso central, é fácil associar as alterações neurológicas ocorridas durante um processo infeccioso às alterações ocorridas nessas células, que são o alvo do nosso estudo.

1.4. A Resposta da Micróglia no Sistema Nervoso Central Alterado

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

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

Não se sabe ainda que fatores locais determinam essa variação numérica e morfológica ou se essas pequenas variações refletem contribuições funcionais diferentes, apesar de haver variações regionais de magnitude semelhante na expressão de receptores imunológicos (DE HAAS; BODDEKE; BIBER, 2008); ver (RANSOHOFF; PERRY, 2009).

Assim, as micróglias são encontradas em todas as regiões do SNC de forma organizada com ramificações em todas as direções e sem sobreposição, definindo domínios ou territórios circunscritos. No cérebro adulto, a micróglia pode responder à mudanças na atividade neural influenciando-a tanto no curto, quanto no longo prazo monitorando igualmente a função sináptica (WAKE; MOORHOUSE; NABEKURA, 2011).

A micróglia, portanto, normalmente têm suas funções inflamatórias reguladas para baixo por conta de numerosas influências inibitórias no microambiente que as circundam e que são produzidas em sua maioria por neurônios (RANSOHOFF; PERRY, 2009). Durante processos patológicos que levam ao dano do SNC são observadas alterações morfológicas mais vigorosas em função da natureza, da duração e da intensidade do processo em curso, quando então se instala um perfil microglial pró-inflamatório.

A retração dos processos microgliais é aparente durante a neurodegeneração e neuroinflamação e está fortemente correlacionada com sua transformação funcional para o estado pró-inflamatório ou ativado (KETTENMANN et al., 2011a). As alterações morfológicas associadas à ativação consistem em: processos citoplasmáticos encurtados e mais espessos e um corpo celular arredondado representando um contínuo de estágios de ativação que para fins didáticos podem

ser classificados em inicial, intermediário e avançado e são acompanhadas pelo aumento da expressão de genes envolvidos em respostas imunes (ZIELASEK; HARTUNG, 1996).

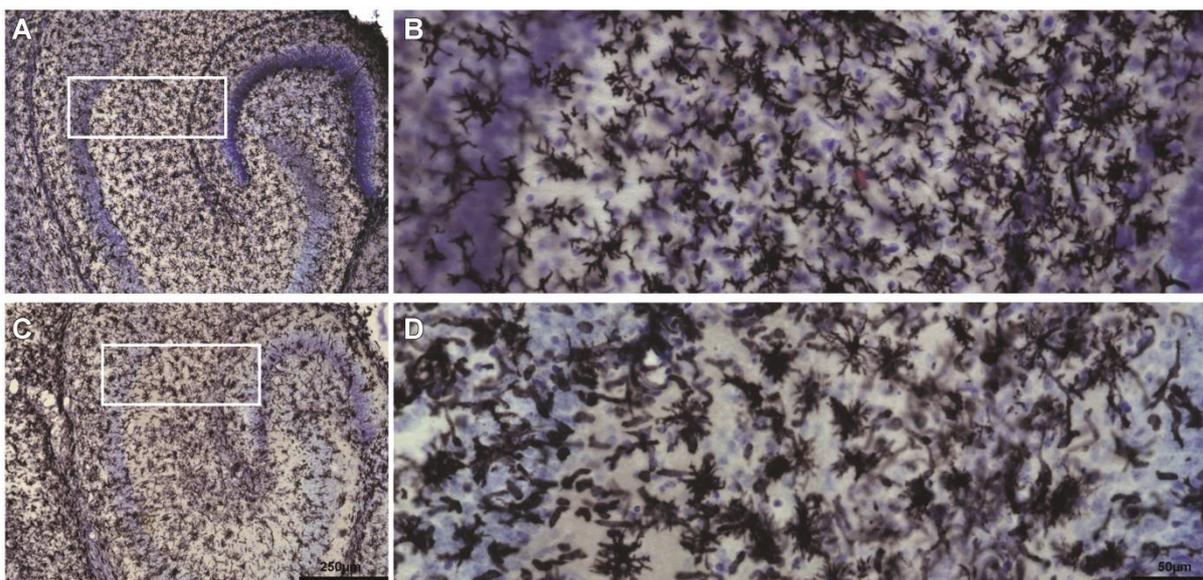
É fato que além da mudança morfológica à injúria, a ativação microglial também é caracterizada pela indução da liberação de várias moléculas, tais como marcadores mielóides, citocinas, radicais livres e óxido nítrico (BECHMANN; NITSCH, 1997; STREIT; WALTER; PENNELL, 1999), assim como, CD14, MHC e quimiocinas (JACK et al., 2005; TOWN; NIKOLIC; TAN, 2005).

Doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, e aquelas induzidas por infecção são capazes de levar à ativação microglial. Outros fatores, tais como a sinalização por ATP e glutamato, também podem influenciar no papel funcional e na morfologia das células microgliais (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; FONTAINHAS et al., 2011; ROCK et al., 2004).

Alterações microgliais associadas à infecção por vírus da família Flaviviridae (gênero Flavivirus) são de interesse para o presente trabalho. O flavivírus da Encefalite Japonesa (JEV) por exemplo, está associado a muitos casos de encefalite e uma intensa alteração microglial ligada principalmente à liberação exagerada de espécies reativas de oxigênio (GHOSHAL et al., 2007) e de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α (CHEN et al., 2012; GHOSHAL et al., 2007). No que concerne ao vírus da dengue, principal interesse do presente trabalho, pouco se sabe sobre a relação entre as alterações microgliais e a infecção por ele provocada.

Um dos raros trabalhos que abordam a morfologia microglial na dengue foi realizado em nosso laboratório por Turiel (2010) que quantificou, pelo método do fracionador óptico, a resposta inflamatória microglial em três camadas de CA1-2 do hipocampo (*lacunosum molecular*, *radiatum* e *pyramidale*) e na camada molecular do giro denteado de camundongos albinos suíços neonatos com encefalite induzida por vírus da dengue (sorotipo 3, genótipo III), observando intensa ativação microglial em sujeitos que apresentaram sinais clínicos de meningoencefalite (Figura 3).

Figura 3: Resposta microglial à infecção por dengue no hospedeiro neonato.



As micróglia de animais neonatos infectados intracerebralmente com vírus da dengue respondem de forma alterada na camada molecular do giro denteado. Fonte: TURIEL, 2010.

No presente trabalho escolhemos investigar possíveis alterações microgliais e comportamentais associadas à infecção secundária heteróloga por dengue em camundongos adultos tendo em conta sua possível participação em resposta inflamatória no SNC, seja em função da presença dos antígenos virais seja através de sua ativação por citocinas inflamatórias cruzando a barreira hematoencefálica.

1.5. Quantificação de Alterações Morfológicas por Reconstrução Microscópica Tridimensional

Desse conjunto de dados torna-se evidente que as mudanças sistemáticas na forma da micróglia em condições normais ou alteradas alteram a distribuição dos ramos microgliais tornando difícil a análise de sua morfologia utilizando métodos descritivos tradicionais. Para contornar essa dificuldade mais recentemente foi proposta a análise quantitativa da complexidade do padrão de ramificação da micróglia como instrumento útil para caracterizar sua morfologia (KARPERIEN; AHAMMER; JELINEK, 2013). Nesse trabalho, a forma e as funções microgliais são consideradas intrinsecamente ligadas e é proposto que se adote a análise fractal como instrumento quantitativo dos fenótipos morfológicos que parecem variar ao longo de um gradiente. A posição relativa da morfologia da micróglia nesse gradiente

pode ser expressa em graus de complexidade distintos que se refletem no valor da dimensão fractal (K-dim) de cada célula reconstruída (KARPERIEN; AHAMMER; JELINEK, 2013).

Para avaliar as possíveis alterações na morfologia da micróglia induzidas por infecção sequencial por vírus VDEN1 e VDEN4, nós utilizamos o método de reconstrução tridimensional seguida da quantificação do padrão de ramificação sugerida por Karperien e colaboradores, assim como, as utilizadas por outros autores (BINZEGGER, 2004; DA ROCHA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2008; GOMES-LEAL et al., 2002; VIANA et al., 2013).

1.6. Comportamento Semelhante ao Ansioso e a Importância do Septo Lateral Nesse Tipo de Resposta Comportamental

O comportamento semelhante a ansiedade descrito em animais é tido como comparável ao comportamento ansioso observado em seres humanos. O comportamento ansioso está associado ao estado de atenção e proteção contra estímulos perigosos ou potencialmente perigosos (HODGE et al., 2002; WU et al., 2007) e é caracterizado por uma série de manifestações comportamentais e fisiológicas, tais como, o estado de tensão e atenção/precaução, sudorese, tontura, aumento da pressão arterial e da taxa de batimentos cardíacos.

O comportamento semelhante ou relacionado ao ansioso em outros animais também parece ter motivações parecidas àquelas citadas em humanos (CRYAN; HOLMES, 2005) e pode ser avaliado e medido por testes comportamentais padronizados, como por exemplo, a atividade exploratória do Campo Aberto, a Caixa Claro-Escuro e o Labirinto em Cruz Elevado (CRYAN; HOLMES, 2005), sendo que o uso dessas metodologias é, na maior parte dos casos, feito de forma complementar, e não isoladamente, no intuito de validar-se a análise do possível estado semelhante ao ansioso. Esses testes ditos etológicos, utilizam-se do comportamento exploratório inato dos animais, num paradigma chamado de “conflito de aproximação-esquiva” (do inglês, *approach-avoid conflict*), no qual a tendência natural do animal é a de evitar visitar ou permanecer em ambiente aberto em conflito com sua curiosidade inata em explorar ambientes novos. A alteração dessa tendência natural é utilizada para avaliá-lo no teste (ver (BAILEY; CRAWLEY, 2009). Em particular, as infecções produzem um

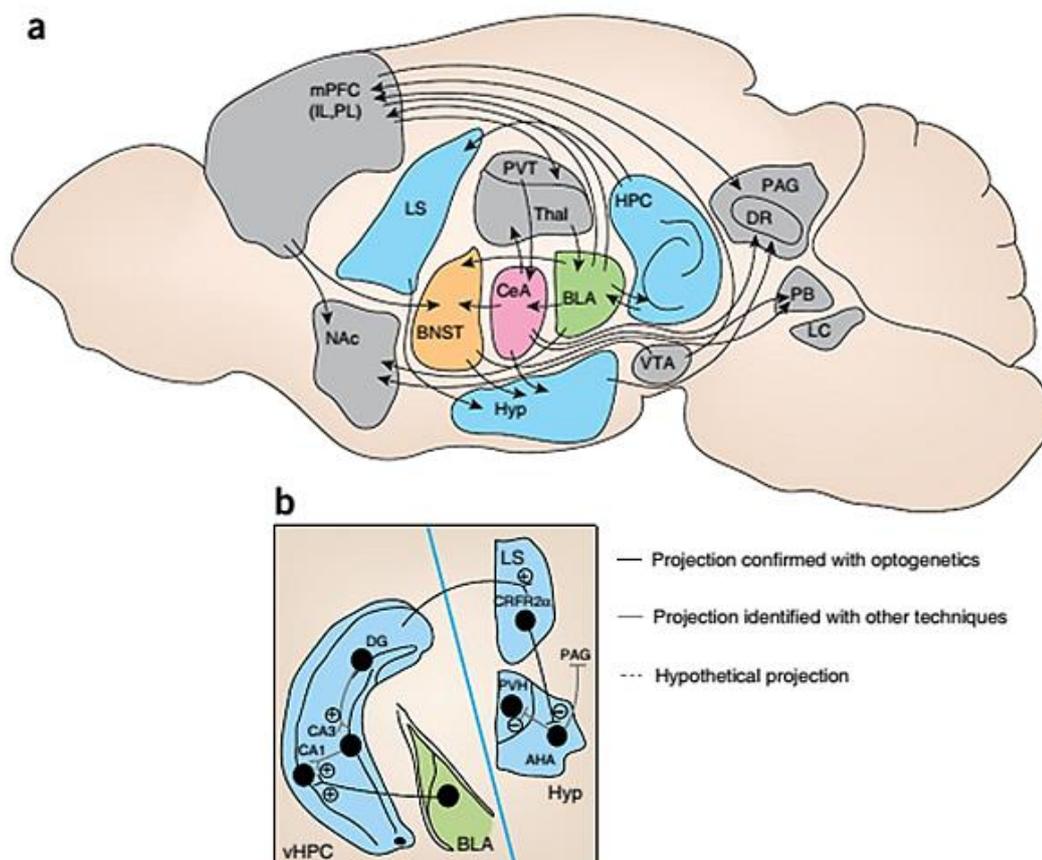
repertório de alterações que podem ser quantificados, permitindo aferir o agravamento ou a remissão da doença (CUNNINGHAM et al., 2007).

Quanto às bases neurais desse comportamento, é sabido que tanto áreas corticais quanto subcorticais são fundamentais (Figura 4a). Para que um estímulo de ameaça seja interpretado no SNC, o primeiro passo é a chegada desse estímulo por meio dos sistemas sensoriais. A atividade coordenada da amígdala, do hipocampo ventral (vHPC) e do córtex pré-frontal (PFC) permite tal interpretação de ameaça no ambiente. Estas estruturas são altamente interligadas, apresentando várias projeções recíprocas que facilitam suas interações. Posteriormente, quando é necessário iniciar as respostas comportamentais, essas áreas recrutam núcleos do tronco encefálico e do hipotálamo para responderem ao estímulo de ameaça (CALHOON; TYE, 2015).

Neste conjunto de relações recíprocas, envolvendo amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, a amígdala é o centro-chave responsável pela resposta gerada como medo e a ansiedade (GROSS; HEN, 2004; LEDOUX, 2000; SHIN; LIBERZON, 2010), principalmente por sua função na percepção aos estímulos de ameaça (RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009), pelos *inputs* que chegam através de seu complexo basolateral (BLA) (MCDONALD, 1998). O hipocampo é também uma estrutura importante nesse estudo, pelo menos a sua porção ventral (BANNERMAN et al., 2004; ENGIN; TREIT, 2007; KJELSTRUP et al., 2002), sendo que alguns trabalhos já comprovaram que a deficiência no processo de neurogênese hipocampal favoreceria as desordens afetivas, como estresse e ansiedade (KOO et al., 2010; KOZOROVITSKIY; GOULD, 2004; SCHLOESSER et al., 2010). Já o PFC é relacionado, conjuntamente com a amígdala, na construção das memórias de aversão e na capacidade do indivíduo em manter essas memórias por longos períodos (LIVNEH; PAZ, 2012; OCHSNER et al., 2002).

A figura 4 resume o macrocircuito e o microcircuito septo-hipocampal envolvidos no comportamento semelhante ao ansioso.

Figura 4: Circuitos envolvidos na resposta semelhante à ansiosa.



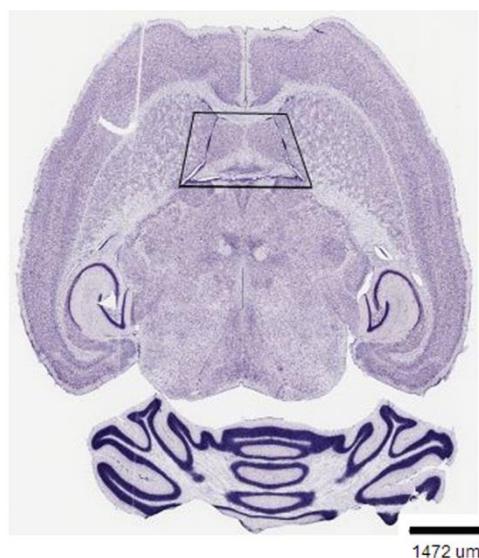
(a) Representação de um corte sagital mostrando as vias e núcleos envolvidos na resposta semelhante a ansiosa. (b) Microcircuito septo-hipocampal ligado à regulação da ansiedade. BLA: complexo basolateral da amígdala; BNST: núcleo da estria; DG: giro denteado do hipocampo; CA1: corno de Amon 1 do hipocampo; CA3: corno de Amon 3 do hipocampo; CeA: amígdala central; CRFR2 α : receptor de fator de liberação de corticotrofina 2; DR: núcleo dorsal da rafe; HPC: hipocampo; Hyp: hipotálamo; IL: divisão infralímbica do mPFC; LS: septo lateral; mPFC: córtex pré-frontal medial; NAc: núcleo accumbens; PAG: substância cinzenta pariaquedutal; PB: núcleo parabraqueal; PL: divisão pré-límbica do mPFC; PVH: núcleo paraventricular do hipotálamo; VTA: área tegumentar ventral; PVT: tálamo paraventricular; Thal: tálamo; vHPC: hipocampo ventral. Adaptado de (CALHOON; TYE, 2015).

Além dos núcleos citados acima, que compõem esse grande circuito recíproco, outros núcleos também estão envolvidos na interpretação e modulação da resposta no comportamento semelhante ao ansioso. Um exemplo é aquele existente entre o hipocampo e o septo lateral, importante microcircuito relacionado a esse comportamento (RISOLD; SWANSON, 1996; TRENT; MENARD, 2010).

Anatomicamente, o septo e o hipocampo são extensivamente conectados. O septo contém corpos celulares colinérgicos e GABAérgicos que projetam suas fibras para o hipocampo através da via fórnix-fimbria (FREUND; ANTAL, 1988; KISS et al., 1990; NAUMANN; LINKE; FROTSCHER, 1992). O hipocampo por sua vez, projeta para o septo suas fibras tanto através de vias GABAérgicas quanto vias glutamatérgicas (ver (NIEWIADOMSKA; BAKSALERSKA-PAZERA; RIEDEL, 2009).

O septo é uma área anatomicamente localizada abaixo do rostro do corpo caloso e anterior à comissura anterior (Figura 5). Juntamente com o hipocampo, hipotálamo, tálamo, amígdala e outras áreas do encéfalo, compõem o sistema límbico, responsável principalmente pelo comportamento e pelas emoções. A área septal é uma região do prosencéfalo que atua na retransmissão de informações oriundas do tronco encefálico e do hipotálamo em direção ao neocórtex (GAYKEMA, 1991). Ela também recebe sinais que retornam de áreas corticais e subcorticais específicas, como, por exemplo, dos córtex entorrinal e frontal (GAYKEMA, 1991; LERANTH et al., 1999), além de possuir vias de transmissão recíprocas com o hipocampo (OKADA; OKAICHI, 2010). Histologicamente, o septo pode ser dividido em duas áreas: a medial, que inclui o septo medial e o núcleo da banda diagonal de Broca, e o lateral, que inclui os núcleos laterais (KHAKPAI; NASEHI *et al.*, 2013).

Figura 5: Localização anatômica do Complexo septal.



Localização anatômica da área septal em corte horizontal no camundongo corado pelo cresil violeta. O trapézio preto destaca seus limites para esse plano dorsoventral. Seus limites lateral e posterior são definidos pelos ventrículos laterais e o limite anterior pelo corpo caloso. Fonte: <http://brainmaps.org/ajax-viewer.php?datid=9&sname=091>

A região septal lateral tem sido descrita como contribuindo de forma complementar às funções hipocâmpais em tarefas de reconhecimento da localização espacial empregando uma variedade de abordagens experimentais, dentre estas, a lesão das regiões septal lateral ou medial seguida de avaliação comportamental (FRASER et al., 1991), ensaios comportamentais seguidos de análise da atividade metabólica empregando citocromo-oxidase (MÉNDEZ-LÓPEZ et al., 2009), ensaios comportamentais associadas ao registro eletrofisiológico realizado com auxílio de implante crônico de eletrodos na região septal (TAKAMURA et al., 2006; ZHOU et al., 1999), ou ainda registro de potenciação de longa duração (LTP) ou de depressão de longa duração (LTD) durante a execução de teste de memória espacial ou de trabalho (JAFFARD et al., 1996).

Além disso, tem sido demonstrado que o septo lateral pode mediar comportamentos semelhantes ao da ansiedade (ZARRINDAST et al., 2008), através do sistema histaminérgico do núcleo túbero-mamilar do hipotálamo posterior com quem se conecta bidirecionalmente (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). De fato, microinjeções de agentes histaminérgicos na região septal lateral promovem

comportamento semelhante a ansiedade decrescendo número de entradas no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado, enquanto que microinjeções de antagonista dos receptores H1 de histamina reduziram o efeito ansiogênico da histamina (ZARRINDAST et al., 2008). Corroborando essa tese, foi recentemente demonstrado que o septo lateral medeia de forma diferencial efeitos ansiolíticos através dos receptores de histamina 1, 2 e 3 em testes comportamentais específicos (CHEE; MENARD, 2013). Adicionalmente, evidências funcionais têm encontrado repetidamente que a lesão do septo reduz as reações de medo em ratos não treinados, sugerindo que o septo normalmente atua na via excitatória do controle da ansiedade (MENARD; TREIT, 1999). Especialmente, lesões eletrolíticas e excitotóxicas do septo produzem efeitos semelhantes ao ansiolítico, avaliados pelo labirinto em cruz elevado, com aumento do tempo de exploração do braço aberto (DEGROOT; TREIT, 2004; MENARD; TREIT, 1996a, 1996b; PESOLD; TREIT, 1992; THOMAS; GUNTON, 2011; TREIT; PESOLD; ROTZINGER, 1993; TREIT; PESOLD, 1990). Por fim, lesões físicas ou farmacologicamente induzidas no septo lateral parecem seletivamente suprimir a resposta defensiva em roedores, associada a aversão a ambientes perigosos e medido, por exemplo, pelo LCE (DEGROOT; KASHLUBA; TREIT, 2001; DEGROOT; TREIT, 2004; MENARD; TREIT, 1996b; THOMAS et al., 2013; TREIT; MENARD, 2010).

Esse aspecto do comportamento mediado pelo septo lateral está relacionado ao circuito em conexão ao vHPC, como já mencionado anteriormente. Também é possível perceber na figura 4.b que o septo lateral é um núcleo de aferência da amígdala basolateral e o único com núcleo de eferências para o hipotálamo. Portanto, o septo lateral está relacionado à uma importante via de conexão entre duas regiões de fundamental importância para a comportamento mencionado. Ver (CALHOON; TYE, 2015) para revisão. Dessa forma, o septo é um importante núcleo de retransmissão entre o mesencéfalo e o tronco cerebral para o prosencéfalo (KHAKPAI et al., 2013a, 2013b).

Tendo em conta que a possível inflamação associada à infecção por vírus induzida no presente trabalho pode levar ao comportamento semelhante ao ansioso (DE SOUSA et al., 2011; GIBNEY et al., 2013) e o septo lateral modula esses

comportamentos, decidimos investigar possíveis alterações da morfologia microglial nessa região.

1.7. O Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental, um modelo que tenta mimetizar, em animais, o estilo de vida ativo de um ser humano, proporcionado por um conjunto de estímulos físicos e somatossensoriais, é conhecidamente capaz de gerar uma série de alterações biológicas aos animais expostos a ele, tanto em nível comportamental, quanto celular e molecular (MO; RENOIR; HANNAN, 2015). Em nosso laboratório, temos gerado uma quantidade razoável de evidências da influência do ambiente enriquecido sobre o comportamento dos animais em uma série de testes comportamentais, como os de memória de trabalho e episódica e os que avaliam comportamento semelhante ao ansioso. Também tem sido demonstrado os efeitos do ambiente enriquecido sobre a plasticidade celular no sistema nervoso central – aqui podemos citar as alterações microgliais, astrocíticas e em neurônios -, em vários contextos, sejam esses contextos envolvendo infecção viral - que é o caso do presente trabalho - ou não (BORNER et al., 2011; DE SIQUEIRA MENDES et al., 2013; DE SOUSA et al., 2011, 2015; DINIZ et al., 2010; VIANA et al., 2013).

Os benefícios ao sistema nervoso central gerados pelo enriquecimento ambiental estão relacionados ao aumento da proliferação celular no encéfalo adulto, como por exemplo no hipocampo, aumento da expressão de genes envolvidos na formação de novas sinapses e reorganização de sinapses já existentes, assim como, no crescimento e amadurecimento neuronal e em mecanismos de excitabilidade celular, aumento na produção de neurotrofinas – como Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) e o Fator de Crescimento do Nervo (NGF, do inglês *Nerve growth factor*), e ainda há o fato de o ambiente ser fator chave no desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas, em conjunto, com os fatores genéticos (LAVIOLA et al., 2008; MO; RENOIR; HANNAN, 2015; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

Poucos trabalhos têm se dedicado ao estudo da relação entre as infecções por arbovírus que induzem alterações no sistema nervoso central e o comportamento ansioso e muito menos sobre aquelas alterações induzidas pela infecção pelo vírus da dengue, mesmo considerando que há manifestações neurológicas envolvidas

nessa doença. O único esforço orientado nesse sentido foi feito por Miranda *et al* (2012), que mostraram em um modelo murino, que a infecção intracranial do sorotipo 3 do vírus da dengue é capaz de induzir comportamento semelhante ao ansioso, acompanhado de meningoencefalite, infiltração de células do sistema imune periférico no SNC, perda de neurônios em CA3 do hipocampo e aumento da expressão de TNF- α e IL-6 no hipocampo (DE MIRANDA et al., 2012).

A influência benéfica do ambiente enriquecido nas *performances* de animais submetidos a testes de memória espacial e reconhecimento de objetos são decorrentes de alterações dos circuitos hipocampais; ver (HIRASE; SHINOHARA, 2014) para revisão recente. Além do mais, sugere-se que o enriquecimento ambiental é capaz de proteger contra distúrbios emocionais associados ao estresse e à ansiedade (FRANCIS et al., 2002; LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002; ROY et al., 2001). Trabalhos que usam modelos de estresse, como o de contenção do animal, mostram o papel do ambiente enriquecido na inibição ou reversão da resposta do tipo semelhante à ansiosa gerada por estímulo estressor (FOX; MERALI; HARRISON, 2006). A neurogênese adulta hipocampal encontrada em animais alojados nesse ambiente é apontada como candidata no papel protetor do ambiente enriquecido contra esses distúrbios, que em parte é explicado pelos efeitos do AE sobre o eixo HPA (SCHLOESSER et al., 2010; SNYDER et al., 2011).

Dessa forma, sabendo que a infecção pelo vírus da dengue está associada a manifestações neurológicas, resolvemos testar a hipótese de que tais manifestações estariam relacionadas às alterações na resposta da micróglia e do comportamento semelhante ao ansioso. Além disso, tendo em mente o papel protetor do enriquecimento ambiental já demonstrado em vários modelos, resolvemos testar a hipótese de que o ambiente enriquecido é capaz de proteger animais adultos imunocompetentes contra as alterações comportamentais e da morfologia da micróglia num modelo de infecção pelas sorotipos 1 e 4 do vírus da dengue.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto da infecção sequencial por VDEN1 e VDEN4 sobre o comportamento semelhante ao ansioso e sobre a morfologia da micróglia do septo lateral, testando a hipótese de que o ambiente enriquecido é capaz de reduzir as consequência da infecção.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever as alterações comportamentais induzidas pela infecção sequencial por VDEN1 e VDEN4 no modelo adulto imunocompetente, avaliadas pelo Labirinto em Cruz Elevado e pela Tarefa do Campo Aberto;
- Descrever a morfologia da micróglia do septo lateral em estado fisiológico utilizando o método de reconstrução tridimensional;
- Analisar as mudanças da morfologia da micróglia pelo método de reconstrução tridimensional induzidas pela infecção por DENGUE sorotipos 1 e 4 no modelo adulto imunocompetente;
- Avaliar o impacto do enriquecimento ambiental sobre as alterações comportamentais e da morfologia da micróglia do septo lateral induzidas pela infecção sequencial de VDEN1 e VDEN4 no modelo murinho.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

Os experimentos realizados no presente trabalho estão de acordo com as Normas de Utilização de Animais de Experimentação em Pesquisa do Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará, aprovado sob o parecer de número **221-14**, de 01 de maio de 2014. O termo pode ser encontrado em anexo I.

3.2. Grupos Experimentais e Inoculações

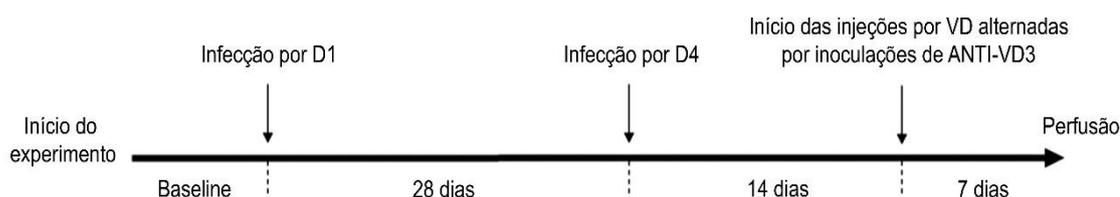
Camundongos da variedade albina suíça de dez meses de idade, obtidos a partir do biotério do Instituto Evandro Chagas (Belém/PA), foram divididos em ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE). O ambiente enriquecido é definido como uma gaiola (100×50×100 cm) na qual há estimulação de atividade exploratória e motora, com uma variedade de brinquedos, túneis, correntes, pontes e rodas de correr para estimular o exercício físico voluntário dos animais. Comida e água foram oferecidas no primeiro e segundo andar respectivamente, obrigando os camundongos a se deslocarem na gaiola para obter comida e água. Em oposição a essa condição, gaiolas de plástico (32×39×100 cm) do ambiente padrão não contem equipamentos ou brinquedos. Indivíduos de ambiente enriquecido e padrão têm livre acesso à comida e água com 12 horas de ciclo claro e escuro.

Quanto às inoculações, para mimetizar as múltiplas infecções que podem ocorrer em casos da doença em humanos, foram feitas inoculações seriais por via intraperitoneal (i.p.) de homogenado cerebral infectado com VDEN1, seguidas de inoculação de homogenado cerebral infectado com VDEN4 após 28 dias. O tempo decorrido entre a primeira e a 2^a infecção foi estabelecido com base em estudos prévios de cinética da resposta imune no camundongo (BEAUMIER et al., 2008). Com o intuito de intensificar alterações clínicas ou comportamentais semelhante às obtidas sob o regime de múltiplas infecções acentuadas por anticorpo heterólogo (DINIZ et al., 2012) , todos os animais foram inoculados na fase final do experimento com homogenado cerebral infectado com VDEN1 ou VDEN4 em dias alternados, seguido

24h após da inoculação de soro hiperimune contendo anti-VDEN3, durante 7 dias (Figura 6).

Os animais controle receberam igual volume de homogenado cerebral não infectado. Todos os animais controles foram sacrificados após o término de todas as inoculações.

Figura 6: Linha do tempo experimental.



Linha do tempo experimental mostrando a sequência de eventos durante todo o período de experimento. Os animais foram submetidos a uma semana de LCE e CA previamente à primeira infecção, período chamado de *baseline*. Após esse período, no dia 7, inoculou-se macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue (D1) (primeira seta), seguida, 28 dias após, por uma inoculação de macerado infectado com sorotipo 4 (D4) (segunda seta). Na última semana de experimento, adotou-se um regime de inoculação de macerado infectado alternada por inoculação de soro hiperimune contendo anticorpo anti-VDENV3, por sete dias (terceira seta). O LCE foi aplicado no 6º dias após as infecções e o CA no 5º dia. Os testes comportamentais foram aplicados durante todo o curso do experimento. DV – Vírus da dengue.

Com a necessidade de avaliar a morfologia microglial após cada ponto de infecção, foram feitos sacrifícios 7 dias após a inoculação de VDEN1, 7 dias após a infecção por VDEN4 e ao final da semana de inoculações de homogenado infectado, alternadas com inoculações de soro contendo anti-vden3. Ou seja, os resultados de morfologia apresentados nesse trabalho irão corresponder a 3 janelas diferentes de infecção, em grupo controle injetado com homogenado cerebral não-infectado por vírus. No total serão apresentados os resultados de 8 grupos experimentais. Um resumo dos grupos experimentais e suas abreviaturas podem ser encontrados na tabela abaixo.

Tabela 1: Grupos experimentais com suas respectivas descrições, abreviaturas e número amostral (n).

Ambiente	Infecção	Abreviação	n
Padrão	Homogenado não-infectado	AP NI	7
Padrão	VDEN1	AP D1	12
Padrão	VDEN1 + VDEN4	AP D1D4	8
Padrão	VDEN1 + VDEN4 + ANTIDENV3	AP D1D4ANTIDV3	8
Enriquecido	Homogenado não-infectado	AE NI	5
Enriquecido	VDEN1	AP D1	12
Enriquecido	VDEN1 + VDEN4	AP D1D4	8
Enriquecido	VDEN1 + VDEN4 + ANTIDENV3	AE D1D4ANTIDV3	8

3.3. Inóculo

Animais neonatos (2 dias de idade) foram intracerebralmente infectados com 10 µl de sobrenadante de cultura células C6-36 infectadas por VDEN1 ou VDEN4, cedida pelo Departamento de Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (Belém/PA). Esses sobrenadantes continham $1,7 \times 10^4$ pfu/ml de VDEN1 ou $1,4 \times 10^5$ pfu/mL de VDEN4 obtidas a partir de amostras de soro humano. Ao apresentarem os sinais clínicos da infecção, os animais foram sacrificados imediatamente e congelados em freezer -80° C. Posteriormente, o tecido cerebral (0,2g/animal) foi homogenado e misturado com 0,8ml de água destilada contendo 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. A suspensão era centrifugada a 10.000 g por 15 minutos à temperatura ambiente (16° C) e o sobrenadante inoculado intraperitonealmente (0,2 ml/animal).

3.4. Análise Comportamental

As análises comportamentais foram realizadas durante todo o período do experimento, uma semana prévia à infecção e todas as semanas pós-infecção. Os testes utilizados foram a Tarefa Exploratória do Campo Aberto e o Labirinto em Cruz Elevado.

3.4.1. Teste do Campo Aberto: O aparato é composto por uma caixa de madeira cinza (30 cm x 30 cm x 40 cm) com o chão dividido em nove quadrantes. O teste foi aplicado previamente às inoculações e no 5º dia após as infecções. Nesse teste, o animal é posto no centro do aparato e deixado no campo aberto por 3 min. Um metro acima do aparato foi colocada uma vídeo-câmera (*webcam*) conectada a um computador e todos os testes foram gravados em vídeo e posteriormente analisados com auxílio do *software* Any-Maze (Stöelting©). O parâmetro analisado foi a atividade exploratória, medida pelo tempo total de permanência na zona central ou na zona periférica. Após cada sessão o aparato foi limpo com álcool 70% para remover pistas olfatórias.

3.4.2. Labirinto em cruz elevado (LCE): o LCE é constituído por dois braços abertos e dois fechados (30x5cm) colocados em posições opostas, e uma plataforma central (5x5cm) (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008). Os braços fechados possuem paredes de 15 cm de altura, enquanto que nos braços abertos não há paredes. Os braços e a plataforma central são feitos de madeira e pintados de tinta preta e elevados a 45 cm do chão. O protocolo usado para este teste é o mesmo utilizado por Carola *et al.*, 2002. O animal é colocado na plataforma central do LCE, solto com a face virada para um dos braços abertos permitindo-se a exploração do ambiente por um período de 5 minutos. O teste foi aplicado previamente às inoculações e no 6º dia após as infecções. As imagens de cada treino são capturadas por uma câmera de vídeo instalada a 1 m de altura do LCE e conectada a um computador, com o objetivo de armazenar os testes para posterior análise. Após cada sessão o LCE é limpo com uma solução de etanol a 70%. Os seguintes parâmetros comportamentais são analisados: distância percorrida (m), velocidade média (m/s), tempo de imobilidade (s), número de entradas nos braços abertos, fechados e na plataforma central,

tempo total nos braços abertos, fechados e na plataforma central e distância percorrida nos braços abertos, fechados e na plataforma central.

3.5. Perfusão e Microtomia

Após os testes comportamentais e a bateria de inoculações os camundongos foram anestesiados com Avertina, 0,5ml/5g de peso corporal, por via intraperitoneal e perfundidos por via intracardíaca com solução salina heparinizada e paraformaldeído a 4% utilizando-se uma bomba de infusão. Após a craniotomia, os cérebros foram seccionados em vibrátomo em plano axial na espessura de 70 μ m (MICROM, modelo HM 650 V). As secções do cérebro de cada animal foram divididas em cinco amostras igualmente representativas de todo o eixo dorsoventral do cérebro para posterior processamento por imunohistoquímica.

3.6. Imunohistoquímica

Séries alternadas de cortes cerebrais (70 μ m de espessura) obtidos com Vibrátomo (Micrótomo por vibração) foram imunorreagidas para marcação seletiva da micróglia como segue: as secções de cérebro foram submetidas à recuperação antigênica em tampão borato (pH 9.0) a 65-70 °C por 60 minutos para recuperação antigênica, lavados em tampão tris salina (TBS), imersos por 20 minutos em solução de caseína a 10% (Vector© Laboratories), e depois incubados em anticorpo primário anti-IBA1 (Wako © Chemicals, USA; Coelho anti-iba1, 2 μ g/ml), diluído em TBS 0,1 M (pH 7.2 – 7.4) por 3 dias a 4 °C. Depois de lavadas, as secções foram incubadas “overnight” em solução contendo anticorpo secundário (cabra anti-coelho-anti-camundongo, 1:250 em TBS, Vector© Laboratories). Para inativação da peroxidase endógena as secções foram imersas em H₂O₂ a 3% em TBS, lavadas em TBS e depois transferidas para a solução de complexo Avidina-Biotina (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) por uma hora. Os cortes foram lavados novamente antes da incubação em tampão acetato 0.1 M pH 6.0, por 3 minutos, e expostos a uma solução de diamidobenzidina em concentração 0.6 mg/ml, contendo cloreto de amônia e níquel a 2.5 mg/ml e glicose oxidase a 0.1 mg/ml. A confirmação da especificidade da reação foi feita por experimento controle no qual os cortes não são expostos ao anticorpo primário.

3.7. Reconstrução Tridimensional

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

As reconstruções das micróglia foram feitas a partir do septo lateral do camundongo albino suíço (*Mus musculus*). Foram selecionadas para reconstrução apenas as micróglia que apresentavam terminações completas em secções que cobriam toda extensão dorsoventral da região septal. Micróglia incompletas com ramos seccionados durante o corte foram excluídas. Aplicamos correção para retração induzida pelo processamento histológico nos dados da morfometria de forma linear para todos os grupos experimentais exclusivamente para o eixo z, onde, presumiu-se 75% de retração tal como previamente sugerido previamente (CARLO; STEVENS, 2011). Foram reconstruídas 1.170 micróglia no total, obtidas de 5 animais de cada grupo (8 grupos ao todo), sendo 30 micróglia por animal - 15 células do septo lateral direito e 15 células do septo lateral esquerdo -, 150 células por grupo. Particularmente, o grupo AE NI teve analisados 4 animais, totalizando 120 células nesse grupo. Essas células foram submetidas à análise morfométrica realizada com o programa Neuroexplorer (Microbrightfield©, Williston, VT, USA).

Tem-se a seguir a definição dos parâmetros morfométricos do soma e das ramificações da micróglia (Tabelas 2).

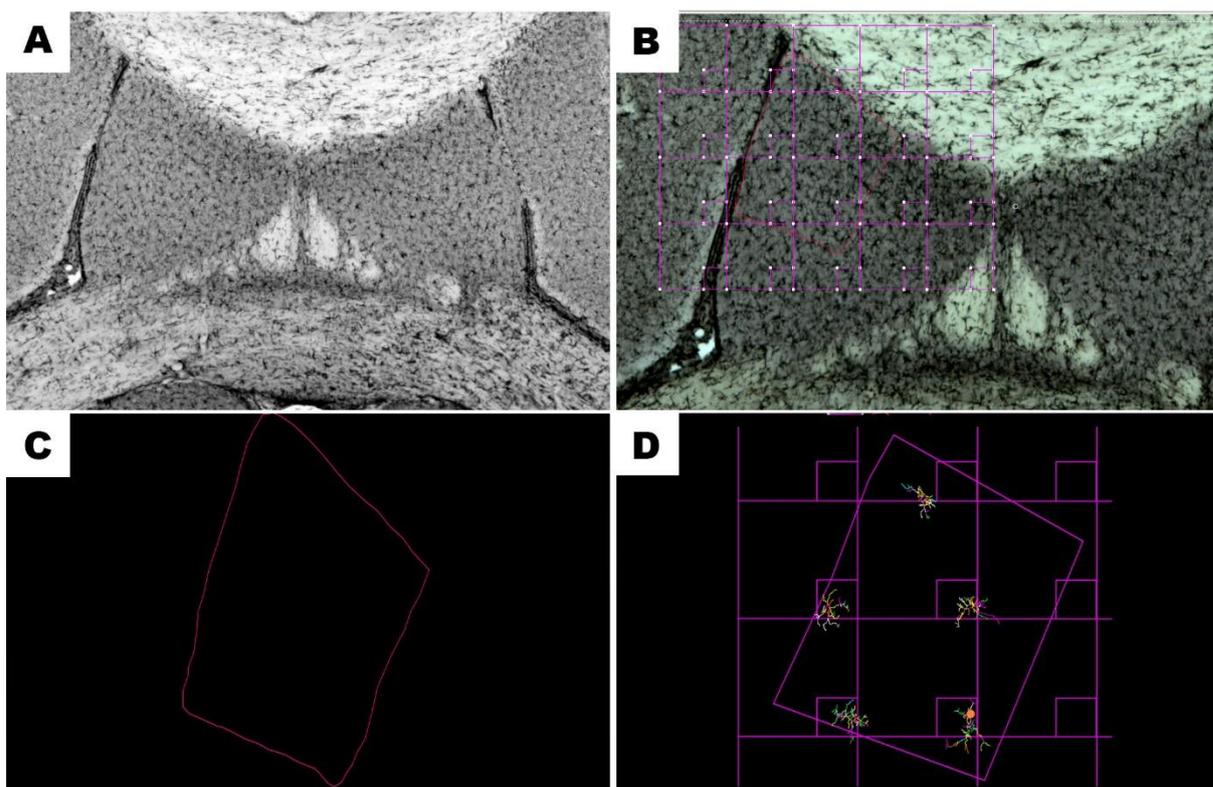
Tabela 2: Variáveis morfométricas medidas pela reconstrução tridimensional utilizando-se os *software* Neurolucida e Neurolucida Explorer.

Segmento	Qualquer porção de estrutura ramificada microglial com terminações que são ou nós ou rescisões sem nós intermediários
Comprimento do segmento	Comprimento total do segmento traçado
Densidade de segmentos	Número de segmentos dividido pelo comprimento total dos segmentos expressa em milímetros (nº de segmentos/mm)
Comprimento do ramo	Comprimento total dos segmentos de linha utilizados para traçar o ramo de interesse
Comprimento total da árvore	Comprimento total de todos os ramos da árvore = [Comprimento] / [Número de ramos]
Tortuosidade	= [comprimento real do segmento] / [distância entre os pontos finais do segmento]. O menor valor é 1; isto representa um segmento de recta. Tortuosidade permite segmentos de diferentes comprimentos a serem comparadas em termos da complexidade dos caminhos que tomam
Área de superfície	Computadorizada, modelando-se cada ramo como um tronco (truncado cone circular reto)
Volume do ramo	Computadorizada, modelando-se cada peça de cada ramo como um tronco.
Diâmetro da base do ramo primario	Diâmetro no início da primeira segmento
Ângulo planar	Calculado com base nos pontos finais dos segmentos. Ele refere-se à mudança de direcção de um segmento em relação ao segmento precedente
K-dim (dimensão fractal)	O "K-dim" da análise fractal, descreve como a estrutura de interesse ocupa espaço. Diferenças estatísticas significativas na K-dim sugerem diferenças morfológicas.
Nº de Varicosities, segmentos, árvores	Referem-se ao número total de segmentos, varicosidades e árvores encontrada numa única microglia.
Área do soma	Refere-se à área da secção transversal do 2-dimensional contido dentro da fronteira da célula corpo.
Perímetro do soma	Comprimento do contorno que representa o corpo celular
Feret máx/mín do soma	Dimensões maiores e menores dimensões do corpo da célula como se um compasso de calibre foi usada para medir transversalmente o contorno. As duas medições são independentes um do outro e não necessariamente no ângulos retos entre si.
Índice de aspecto do soma	= [diâmetro Min] / [diâmetro Max] Indica o grau de achatamento do corpo da célula: <ul style="list-style-type: none"> • Faixa de valores é 0-1. • Um círculo tem uma proporção de 1.
Compactação do soma	$Compacidade = \sqrt{(4/\pi) \times \frac{Área}{diâmetro Max}}$ <ul style="list-style-type: none"> • Faixa de valores é 0-1. • Um círculo tem uma forma mais compacta (=1).

Convexidade do soma	<p>Convexidade = [Convex Perímetro] / [Perimetral]</p> <ul style="list-style-type: none"> • Um objeto completamente convexa não tem entalhes, e tem um valor de 1 convexidade (por exemplo, círculos, elipses e quadrados). • objetos côncavos tem convexidade valores inferiores a 1. • Contornos com baixa convexidade tem uma grande fronteira entre as áreas internas e externas.
Fator de forma do soma	<p>$Fator\ da\ forma = 4\pi \times \frac{Área}{Perímetro^2}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Como a forma de contorno que se aproxima de um círculo perfeito, esse valor se aproxima de um máximo de 1,0. • À medida que a forma de contorno achata, esse valor se aproxima de 0.
Esfericidade do soma	<p>Arredondamento = [Compacidade]²</p> <p>É usado a para diferenciar objetos que possuem valores de compacidade pequenos.</p>
Solidez do soma	<p>Solidez = [área] / [Convex Area]</p> <p>A área delimitada por um 'elástico' esticada em torno de um contorno é chamada a área convexa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Círculos, quadrados e elipses têm uma solidez de um. • Os entalhes na zona do contorno tomar longe da área convexa, diminuindo a área real dentro do contorno.
Volume do convex-hull	<p>Volume estimado a partir de um campo de cobertura tridimensional de um sólido construído a partir da modelagem de uma superfície conectando as terminações mais distais da célula reconstruída.</p>
Área do convex-hull	<p>Área estimada a partir de um campo de cobertura tridimensional de um sólido construído a partir da modelagem de uma superfície conectando as terminações mais distais da célula reconstruída.</p>
Domínio da micróglia	<p>Para isso, utilizamos os dados de Bartol (), que estimou 449 sinapses contidas em um cubo de 6x6x8 μm (180 μm³) e estimamos o número provável de sinapses contidas no volume da micróglia obtido a partir da análise de <i>convex-hul</i>.</p>

Com o objetivo de gerar dados obtidos a partir de amostragens sistemáticas e aleatórias, caixas de 60 x 60 μm foram distribuídas em cada secção, distanciadas umas das outras por 120 μm. O número de células reconstruídas em cada secção foi estipulado por meio de uma regra simples de proporção, ou seja, cada secção contribui com o número de células proporcional à sua área (Figura 7).

Figura 7: Representação da área de interesse para reconstrução das micróglia e distribuição sistemática das caixas.



(A) Complexo septal; (B) Contorno do septo lateral e demonstração da distribuição das caixas nessa área; (C) representação apenas do contorno do septo lateral utilizado para delimitação da área; e (D) contorno e caixas distribuídas dentro do contorno, mostrando as células dentro das caixas.

3.8. Fotomicrografias e Pós-processamento das Imagens

Para obtenção de fotomicrografias utilizamos câmera digital (Microfire, Optronics, CA, USA) acoplada a microscópio Nikon (Eclipse 80i, NIKON) sendo as imagens pós-processadas com auxílio de software especializado (Adobe Photoshop 7.0.1 C.S.2, San José, CA, USA) ajustando brilho e contraste. As imagens das micróglia fotografadas foram selecionadas a partir de reconstruções cujos parâmetros morfométricos mais se aproximaram dos valores médios obtidos para cada animal em particular.

3.9. Análise Estatística

Para análise comportamental, utilizamos análise de variância um critério (ANOVA one-way) e test T para as análises pareadas; para comparações dos

achados morfométricos realizadas entre animais infectados ou não-infectados, de ambiente padrão ou enriquecido, utilizamos a análise de variância dois-critérios. Nas comparações da complexidade das células ou do volume do *convex-hull* das mesmas entre os subtipos de cada grupo experimental utilizamos a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis, assim como utilizamos a mesma análise não-paramétrica para comparações entre os subgrupos de células mais complexas de cada grupo experimental ou igual comparação entre os domínios (volume de sinapses contidas dentro do volume da micróglia) dessas células. Já as comparações simples e pareadas entre subgrupos, aplicamos a análise não-paramétrica Mann-Whitney.

A aplicação da análise não-paramétrica foi feita devido as amostras apresentarem variâncias desiguais. Todos os testes com intervalo de confiança estabelecido em 95% ou 99% ($p < 0.05$ ou $p < 0.01$).

Para evitar tratamentos baseados em medidas isoladas de tendência central (média e desvio ou erro padrão) quando da ocorrência de altos níveis de variabilidade empregamos a análise de aglomerados (também denominada de análise conglomerados ou de aglomerados ou de grupos). Essa análise é um tipo de estatística multivariada que tem sido aplicada a uma ampla variedade de abordagens comportamentais (CASARRUBEA; SORBERA; CRESCIMANNO, 2009) e em estudos morfológicos, incluindo o de reconstruções tridimensionais (DE OLIVEIRA et al., 2008; ROCHA et al., 2007; VIANA et al., 2013) sendo principalmente utilizada quando não há nenhuma hipótese *a priori* acerca da ocorrência de conglomerados na amostra (CASARRUBEA; SORBERA; CRESCIMANNO, 2009; LANE et al., 2010). Essa análise nos permite identificar se há formação de aglomerados de estereótipos celulares dentro de uma determinada população celular. No caso do presente trabalho, esta análise permite avaliar se as populações celulares de animais infectados ou não-infectados, de ambiente padrão ou enriquecido, se diferem quanto aos subtipos celulares dentro de cada conjunto.

Em linha com essas recomendações, detectamos grupos distintos dentro de nossa amostra selecionada para estudar a morfologia da micróglia no septo lateral após inoculação de homogenado cerebral infectante ou não infectante. A análise discriminante desses aglomerados permitiu identificar as variáveis que mais

contribuíram para a discriminação dos grupos. Para a análise estatística foram utilizados os Programas: BioEstat® 5.0; Statistical for Windows® version 5.0 A.

Alguns autores sugerem que, para a utilização da análise de conglomerados, somente variáveis bi ou multimodais sejam utilizadas (GOLDER; YEOMANS, 1973; KOLB et al., 1994; YAMADA; JINNO, 2013). A seleção dessas variáveis é feita por meio do índice de multimodalidade, que é baseado na assimetria e na curtose da amostra. Desse modo, somente variáveis morfométricas com índice de multimodalidade > 0.05 devem ser utilizadas, pois são bi ou multimodais. Como não obtivemos três ou mais variáveis multimodais em todos os grupos experimentais propostos nesse trabalho, optamos pela utilização da análise de componentes principais, um teste preditivo que examina um grupo de variáveis transformando-as em combinações lineares em ordem decrescente de importância designadas por índices chamados de componentes principais. Atribui-se maior ênfase aos índices que representam 80% da variância total, denominados de fatores. Esse teste foi aplicado como o objetivo de validar a análise multivariada já mencionada acima.

4. RESULTADOS

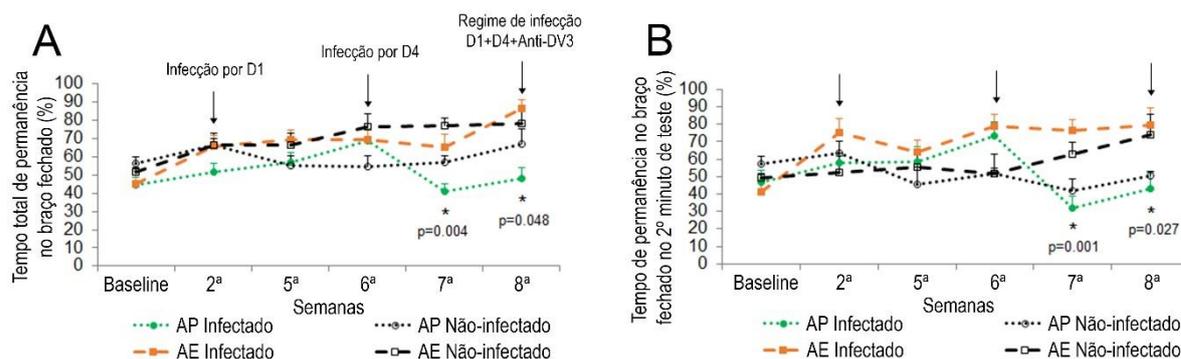
4.1. Análise Comportamental

Os resultados de comportamento que se seguem foram obtidos a partir dos grupos experimentais mantidos até o experimento se encerrar, para que fosse possível visualizar a progressão das alterações comportamentais durante a linha do tempo da infecção (ver figura 6). Portanto, os grupos serão identificados como infectados de ambiente padrão, não-infectados de ambiente padrão, infectados de ambiente enriquecido e não-infectados de ambiente enriquecido.

De modo geral, animais infectados de ambiente padrão apresentaram alteração comportamental nos pontos que sucederam a infecção por VDEN4, na 7ª e 8ª semanas (figuras 8 e 9). Identificamos também redução significativa do tempo de exploração do braço fechado no LCE e o segundo minuto parece ser o momento mais sensível para detectar esse comportamento [2º minuto: (6ª semana = $73.25 \pm 8.1\%$ vs 7ª semana = $32.2 \pm 6.28\%$) (teste t, $p=0.001$) e (6ª semana = $73.25 \pm 8.1\%$ vs 8ª semana = 43.33 ± 9.1) (teste t, $p=0.027$)] (Figura 8B). Por outro lado, esse grupo experimental mostrou redução significativa no tempo de exploração da periferia no Campo Aberto, sendo o primeiro minuto o mais importante para essa detecção [1º minuto: (6ª semana = $69.65 \pm 1.79\%$ vs 7ª semana = $57.32 \pm 1.79\%$) (teste t, $p=0.021$) e (6ª semana = $69.65 \pm 1.79\%$ vs 8ª semana = $60.4 \pm 2.84\%$) (teste t, $p=0.019$)] (Figura 9B).

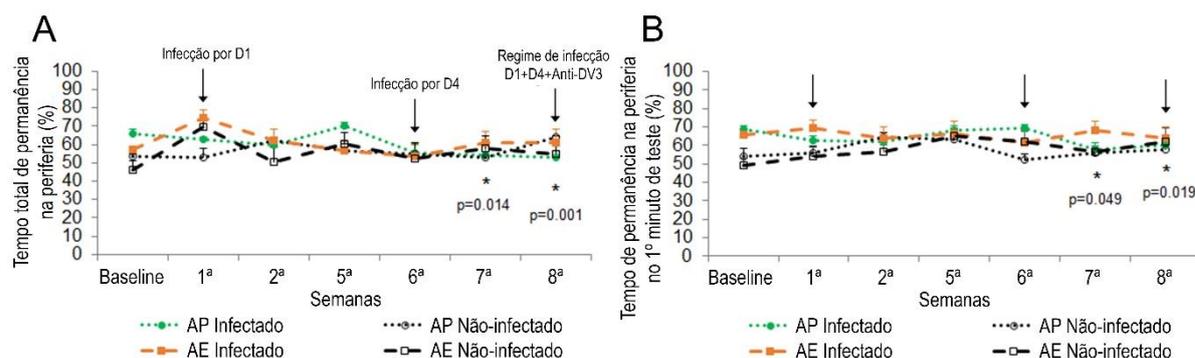
Todos os demais grupos apresentaram, de forma similar, aumento do tempo de exploração dos braços fechados no LCE e da periferia no Campo Aberto, mesmo após a infecção por VDEN4, comportamento oposto ao percebido para os animais infectados de ambiente padrão (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Gráfico representativo dos resultados do Labirinto em Cruz Elevado.



O gráfico mostra que animais infectados alojados em ambiente padrão apresentaram redução significativa no tempo de permanência no braço fechado após o ponto de infecção por VDENV4. (A) Representação gráfica mostrando os pontos de infecção (setas) em correlação ao tempo gasto no braço fechado, (B) segundo minuto de teste. D1 – homogenado cerebral infectado com VDEN1. D4 – homogenado cerebral infectado com VDEN4. Anti-DV3 – soro contendo anticorpo anti-dengue3. As setas indicam os pontos de infecção. (*) indica diferença estatística entre o ponto pós-infecção em comparação ao ponto de infecção, $p < 0.05$.

Figura 9: Gráfico representativo dos resultados do Campo Aberto.



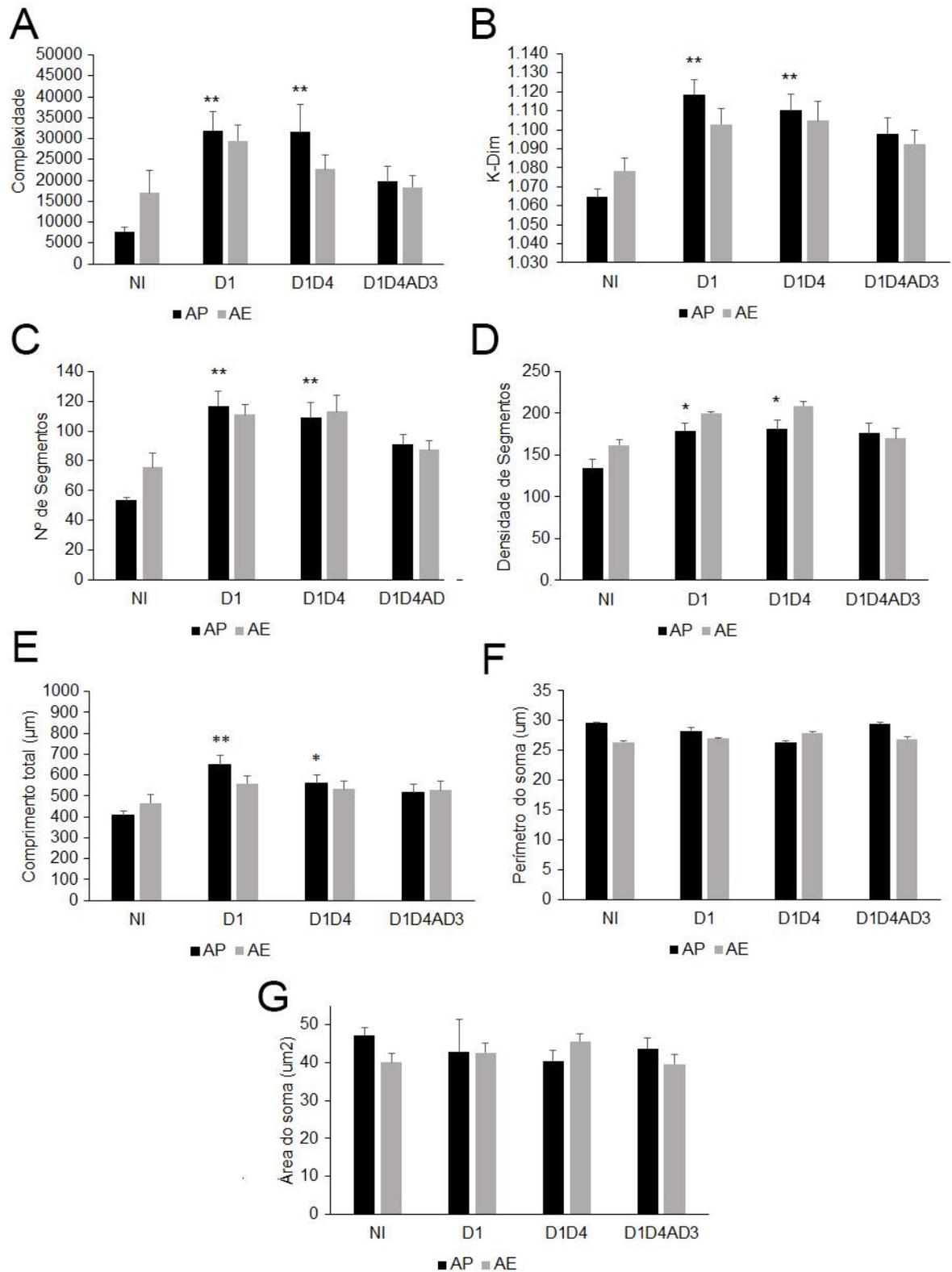
O gráfico mostra que animais infectados alojados em ambiente padrão apresentaram redução significativa no tempo de permanência na periferia após o ponto de infecção por VDENV4. (A) Representação gráfica mostrando os pontos de infecção (setas) em correlação ao tempo gasto na periferia, (B) primeiro minuto de teste. D1 – homogenado cerebral infectado com VDEN1. D4 – homogenado cerebral infectado com VDEN4. Anti-DV3 – soro contendo anticorpo anti-dengue3. As setas indicam os pontos de infecção. (*) indica diferença estatística entre o ponto pós-infecção em comparação ao ponto de infecção, $p < 0.05$.

4.2. Análise Morfométrica de micróglia obtidas a partir do septo lateral

Para a análise tridimensional da micróglia do septo lateral foram gerados 8 grupos experimentais (ver tabela 1).

De modo geral, micróglia do septo lateral dos animais infectados de ambiente padrão são significativamente diferentes daquelas dos animais não infectados (Figura 10), com exceção do grupo APD1D4AD3, que foi diferente de APNI em nenhuma das variáveis. As alterações mais importantes foram percebidas para as variáveis complexidade, análise fractal (K-Dim), número, comprimento e densidade de segmentos. Na tabela x é possível verificar as amplitudes das alterações em percentual existentes ao compararmos os valores médios das células de animais infectados àquelas de animais não infectados. Apesar das alterações observadas nos ramos/segmentos, não houve alterações significativas no corpo celular (Figura 10 e tabela 10). Por outro lado, as alterações percebidas em células de animais de AP não foram encontradas em células de animais de ambiente enriquecido (Figura 10). É possível perceber na tabela 4 que a amplitude das diferenças médias entre as células de animais infectados quando comparadas àquelas de animais não infectados é menor e não significativa, quando comparamos às amplitudes encontradas para as células de animais de ambiente padrão, encontrados na tabela 3. Os valores de média e erro padrão podem ser encontrados na tabela 5.

Figura 10: Representação gráfica dos resultados de sete variáveis morfométricas obtidos a partir da análise paramétrica.



Representação gráfica dos valores de média e erro padrão de características morfométricas, comparando-se os grupos de animais infectados ao não-infectado de ambiente padrão ou enriquecido. (A) complexidade, (B) análise fractal (K-Dim), (C) número de segmentos, (D) área do soma planar. AP NI – animais não infectados de ambiente padrão; AP D1 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AP D1D4 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AP D1D4ANTIDV3 – animais de ambiente padrão submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3; AE NI – animais não infectados de ambiente enriquecido; AE D1 – animais de ambiente enriquecido infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AE D1D4 – animais de ambiente enriquecido infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AE D1D4ANTIDV3 – animais de ambiente enriquecido submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3. (*) indica diferença significativa entre os grupos infectados e o não infectado dentro cada ambiente, definido pelo valor de p obtido a partir da ANOVA um critério. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Tabela 3: Amplitude média em percentual das diferenças entre os grupos infectados e o grupo não-infectado de ambiente padrão para as variáveis da figura 10, com seus respectivos valores de p. Os pareamentos foram os seguintes: APNI vs APD1; APNI vs APD1D4; APNI vs APD1D4AD3.

	AP D1	AP D1D4	AP D1D4ANTIDV3
Complexidade	75,89 p = 0,007	75,66 p = 0,008	60,92 p > 0,05
K-Dim	4,82 p = 0,0008	4,11 p = 0,006	3,03 p > 0,05
Número de segmentos	54,29 p = 0,0001	50,84 p = 0,0009	41,35 p > 0,05
Densidade de segmentos	25,31 p = 0,046	26,01 p = 0,032	23,78 p > 0,05
Comprimento de segmentos (μm)	37,5 p = 0,0021	27,32 p = 0,4	21,73 p > 0,05
Área do soma (μm^2)	-10,22 p > 0,05	-16,18 p > 0,05	-8,08 p > 0,05
Perímetro do soma (μm)	-4,69 p > 0,05	-12,36 p > 0,05	-0,38 p > 0,05

Tabela 4: Amplitude média em percentual das diferenças entre os grupos infectados e o grupo não infectado de ambiente enriquecido para as variáveis da figura 10, com seus respectivos valores de p. Os pareamentos foram os seguintes: AENI vs AED1; AENI vs AED1D4; AENI vs AED1D4AD3.

	AE D1	AE D1D4	AE D1D4ANTIDV3
Complexidade	42,43 p > 0,05	25,38 p > 0,05	7,53 p > 0,05
K-Dim	2,22 p > 0,05	2,38 p > 0,05	1,28 p > 0,05
Número de segmentos	31,91 p > 0,05	33,09 p > 0,05	13,54 p > 0,05
Densidade de segmentos	18,96 p > 0,05	22,45 p > 0,05	4,76 p > 0,05
Comprimento de segmentos (μm)	16,62 p > 0,05	12,61 p > 0,05	11,62 p > 0,05
Área do soma (μm^2)	5,90 p > 0,05	12,26 p > 0,05	-1,24 p > 0,05
Perímetro do soma (μm)	2,14 p > 0,05	4,48 p > 0,05	1,81 p > 0,05

Tabela 5: Valores de média e erro padrão de sete variáveis morfométricas representadas na figura 10.

	Complexidade	K-Dim	Nº de segmentos	Densidade de Segmentos	Comprimento dos segmentos (μm)	Perímetro do soma (μm)	Área do soma (μm^2)
AP NI	7687,69	1,065	53,44	134,06	406,76	29,60	47,16
	1054,07	0,004	2,30	10,41	22,22	0,16	1,99
AP D1	31884,99	1,119	116,92	179,49	650,86	28,28	42,78
	4681,23	0,008	9,95	8,96	43,45	0,60	8,62
AP D1D4	31592,75	1,110	108,71	181,20	559,72	26,35	40,37
	6671,66	0,008	10,34	10,59	41,07	0,26	2,72
AP D1D4ANTID3	19675,69	1,098	91,12	175,91	519,69	29,49	43,63
	3585,97	0,008	6,48	12,59	38,72	0,22	2,89
AE NI	16941,02	1,078	75,51	162,08	466,96	26,39	40,03
	5535,38	0,006	9,33	6,91	40,60	0,27	2,38
AE D1	29430,06	1,103	110,90	200,02	560,06	26,97	42,54
	3904,67	0,008	6,82	2,18	34,35	0,17	2,49
AE D1D4	22704,97	1,105	112,87	209,02	534,40	27,93	45,62
	3371,43	0,010	10,72	5,55	38,36	0,14	1,92
AE D1D4ANTID3	18320,54	1,092	87,34	170,19	528,41	26,88	39,54
	2740,74	0,007	5,85	12,23	43,71	0,32	2,58

Levando em consideração os achados citados acima, buscamos verificar se as alterações importantes encontradas em células de animais de ambiente padrão, quando comparadas às células de animais de ambiente enriquecido, poderiam estar relacionadas ao surgimento de novos padrões morfológicos nos grupos de animais infectados. Para isso, aplicamos a análise de conglomerados, seguida de análise discriminante, para avaliar o padrão de distribuição das famílias ou subtipos de células dentro de cada grupo experimental. Os resultados podem ser visualizados nas figuras de 11 a 18 e as células médias representadas foram aquelas que mais se aproximaram dos valores médios de complexidade em cada grupo. A variável complexidade foi escolhida, pois foi a variável discriminante mais importante em todos os grupos experimentais (ver anexo II).

A análise de conglomerados mostrou que no septo lateral de animais não infectados de ambiente padrão (figura 11) ou de ambiente enriquecido (figura 15) há ocorrência de três subtipos celulares, um grupo de células mais complexas e de maior volume medido por *convex-hull*, um grupo de células menos complexas e de menor volume medido por *convex-ull* e um grupo intermediário, sendo que os valores médios de complexidade são de $7.687,69 \pm 1.054,07$ para o grupo APNI e de $16.941,02 \pm 5.535,38$ para o grupo AENI (tabela 6), não havendo diferença significativa de complexidade entre células desses dois grupos não infectados (teste de Mann-Whitney; $p = 0,1416$). Além disso, o subgrupo de células mais complexas representa somente 9,32% do número total para AP e 13,97% para AE, sendo ambos os grupos compostos em sua maioria por células pouco complexas (AP = 50,84% e AE = 52,68%)

Ao observarmos a análise de agrupamentos de células obtidas a partir do septo lateral de animais de grupos infectados de AP, percebemos uma ampla alteração no cenário descrito para os grupos não infectados. Sete dias após a infecção por VDEN1 (APD1), percebemos o surgimento de um quarto subtipo celular, de células altamente complexas (APD1 = 67.609 de complexidade) (figura 12C), muito ramificadas (figura 12B), além dos outros três subtipos já notados no estado não infectado. Portanto, somadas às células mais complexas já presentes anteriormente à infecção, o percentual de células de alta complexidade ampliou para aproximadamente 44% do total. O mesmo perfil de famílias celulares é encontrado 7 dias após a infecção por VDEN4 (APD4) (figura 13) e após o período de inoculações alternadas com anticorpo heterólogo (figura 14), porém o percentual de células de alta complexidade é menor

nesses dois últimos grupos (aproximadamente 30% e 33%, respectivamente), quando comparados a APD1 (44%). Adicionalmente, ao compararmos os subtipos de células mais complexas de cada grupo experimental, notamos que, em média, esses subtipos de células dos grupos de animais infectados é largamente diferente daquele de animais não infectados [APNI = $21.286,9 \pm 1.040,83$ vs APD1 = $47.407,07 \pm 2.035,06$ ($P < 0,0001$); APNI = $21.286,9 \pm 1.040,83$ vs APD1D4 = $51.990,3 \pm 2.682,2$ ($p < 0,0001$); APNI = $21.286,9 \pm 1.040,83$ vs APD1D4AD3 = $30.199,9 \pm 1.261$ ($p = 0,0002$); teste de Mann-Whitney] e que os subtipos de células mais complexas de APD1D4AD3 possui valores de complexidade menores, quando comparadas àqueles subtipos dos outros dois grupos infectados [APD1D4AD3 = $30.199,9 \pm 1.261$ vs APD1 = $47.407,07 \pm 2.035,06$ ($p < 0,0001$); APD1D4AD3 = $30.199,9 \pm 1.261$ vs APD1D4 = $51.990,3 \pm 2.682,2$ ($p < 0,0001$); teste de Mann-Whitney] (figura 19A).

Ainda sobre as alterações percebidas em células obtidas a partir do septo lateral dos animais alojados em ambiente padrão, notamos que, apesar da alteração do padrão de distribuição percebido pela análise de aglomerados e da presença da ampliação do percentual de células altamente complexas no septo de animais infectados, tais células não alteraram seus domínios de monitoramento de sinapses. Isso pode ser visto na figura 19, na qual percebemos que a alta complexidade não acompanhada de alteração do número de sinapses contidas no volume da micróglia dos diferentes morfotipos (figura 19 A e C, respectivamente).

De forma diferente do que foi encontrado para os grupos infectados de ambiente padrão, células obtidas a partir do septo lateral de animais infectados de ambiente enriquecido não apresentaram configurações diferentes de subtipos celulares quando comparados aos animais não infectados (figuras 15 a 18, e tabela 6). Apesar desse fato, em média, nos animais de AED1 e AED1D4, mas não em animais AED1D4AD3, o subtipo de células mais complexas apresenta valores maiores de complexidade, ao compararmos ao subtipo de células de maior complexidade de AENI [AENI = $33.644,91 \pm 1.218,2$ vs AED1 = $55.464,56 \pm 1.678,3$ ($P < 0,0001$); AENI = $33.644,91 \pm 1.218,2$ vs AED1D4 = $55.370,8 \pm 3.2918$ ($p < 0,0001$); teste de Mann-Whitney] e, da mesma forma como observado em AP, os subtipos de células mais complexas de AED1D4AD3 possui valores de complexidade menores, quando comparadas àqueles subtipos dos outros dois grupos infectados como observado para os grupos AE [AED1D4ADE3 = $30.355,27 \pm 725,6$ vs AED1 = $55.464,56 \pm 1.678,3$ ($p < 0,0001$); AED1D4ADE3 = $30.355,27 \pm 725,6$ vs AED1D4 = $55.370,8 \pm 3.2918$

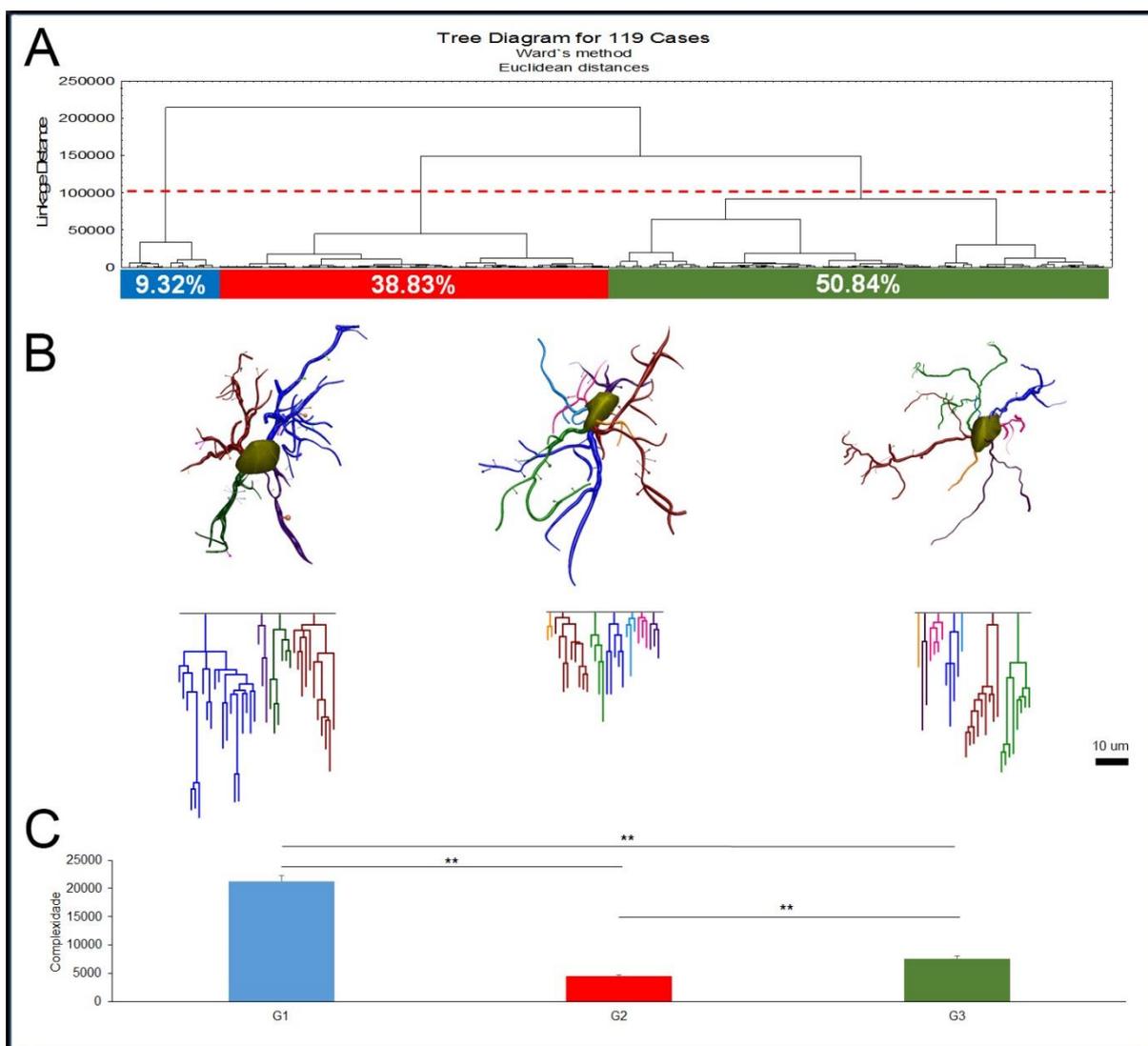
($p < 0,0001$); teste de Mann-Whitney] (figura 19B), porém, a amplitude da diferença no percentual desses subtipos celulares em cada grupo experimental é pequena (AENI ~ 14%, AED1 ~ 23%, AED1D4 ~ 12% e AED1D4AD3 ~ 21%). Similar ao encontrado para células de animais de ambiente padrão, diferenças na complexidade dos subgrupos não é acompanhada de aumento no domínio das células e, conseqüentemente, não há alteração do número de sinapses contidas no volume das células de diferentes morfotipos (Figura 19 B e D, respectivamente).

Ao observarmos a análise discriminante e a análise de componentes principais, percebemos que os dados obtidos a partir da análise de aglomerados são corroborados por essas análises. As mesmas subdivisões notas pela análise de aglomerados foram obtidas pela análise discriminante e análise de componentes principais para células de animais de ambiente padrão (figura 20) e ambiente enriquecido (figura 21) e, dessa forma, comprovamos a veracidade dos dados obtidos. Os dados numéricos obtidos na análise discriminante podem ser encontrados no anexo II.

Portanto, a análise multivariada reforça o que foi encontrado na análise paramétrica, na qual percebemos que animais de ambiente enriquecido não apresentaram alterações significativas, diferentemente do que foi observado para animais de ambiente padrão, nos quais houve uma grande amplitude de alterações em animais infectados. Tais achados podem estar relacionados à presença de um novo subtipo celular, quando comparamos os aglomerados celulares presentes em estado fisiológico com aqueles presentes após a infecção por VDEN1, VDEN4 ou após o período de infecção alternado com inoculação passiva de anticorpo heterólogo.

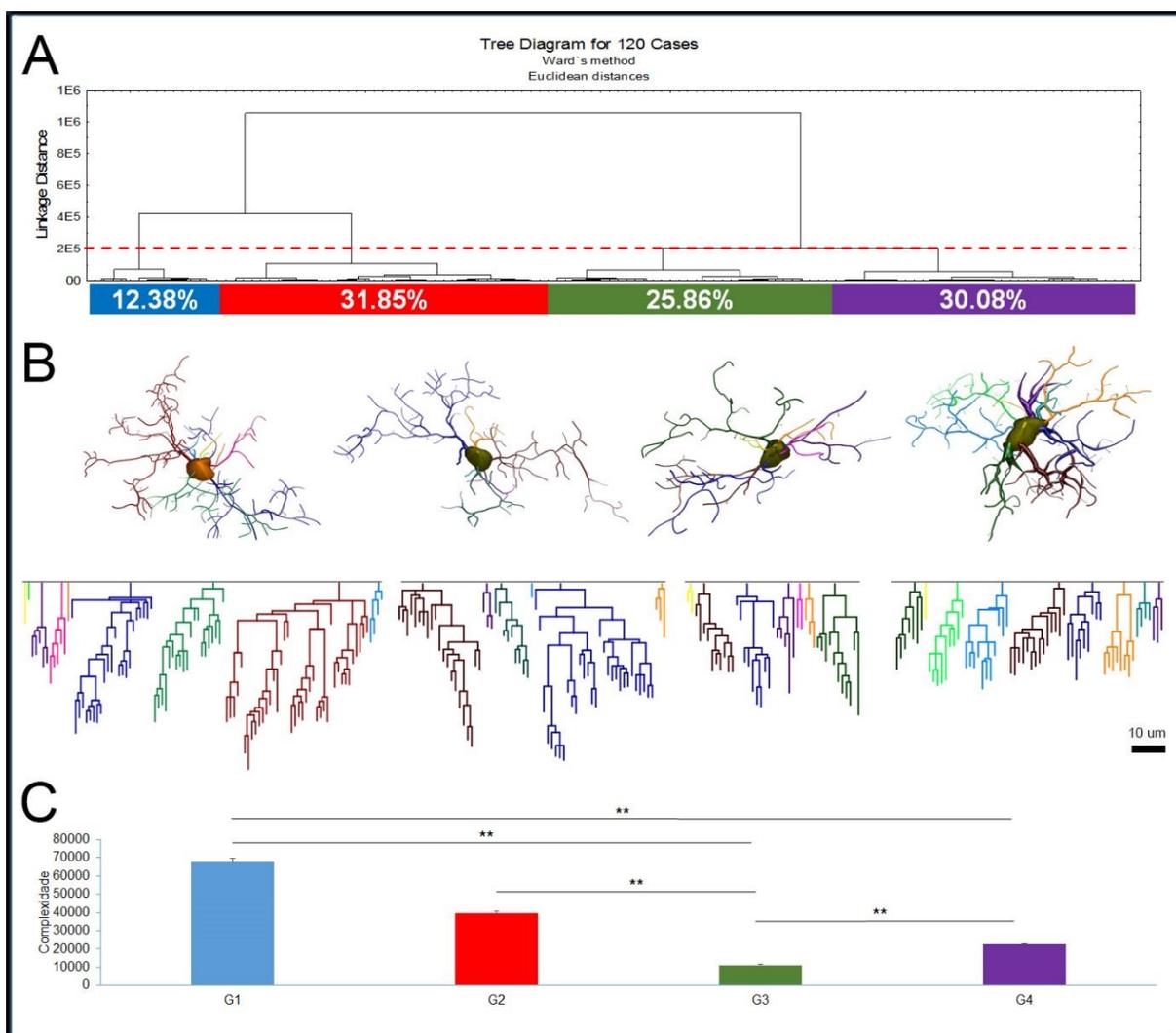
A tabela 6 mostra os valores de média e erro padrão para a variável complexidade mostrados nas figuras de 11 a 18.

Figura 11: Painel ilustrativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade do grupo AP NI.



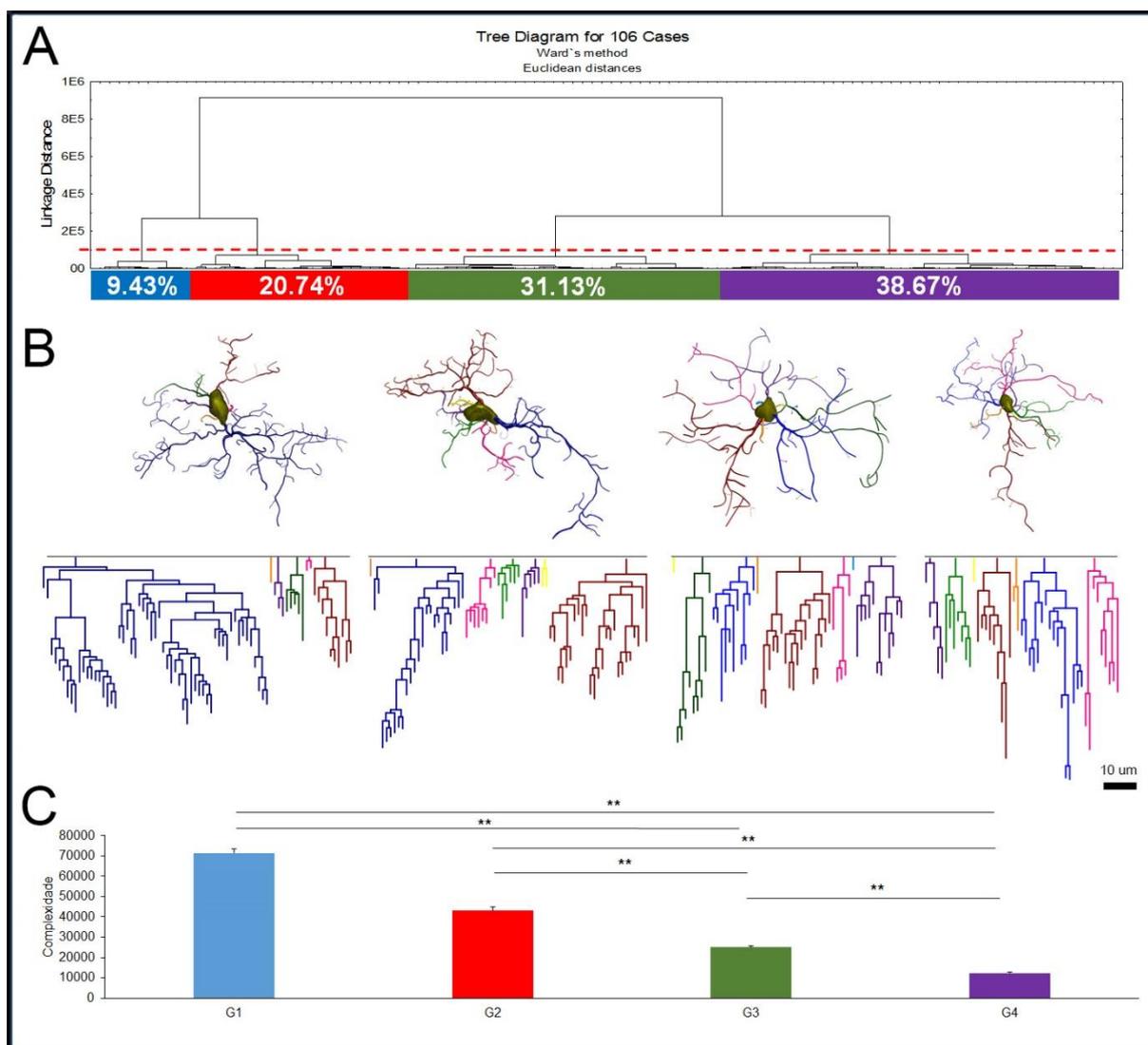
Representação referente ao grupo AP NI da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2 e G3 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 µm.

Figura 12: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AP D1.



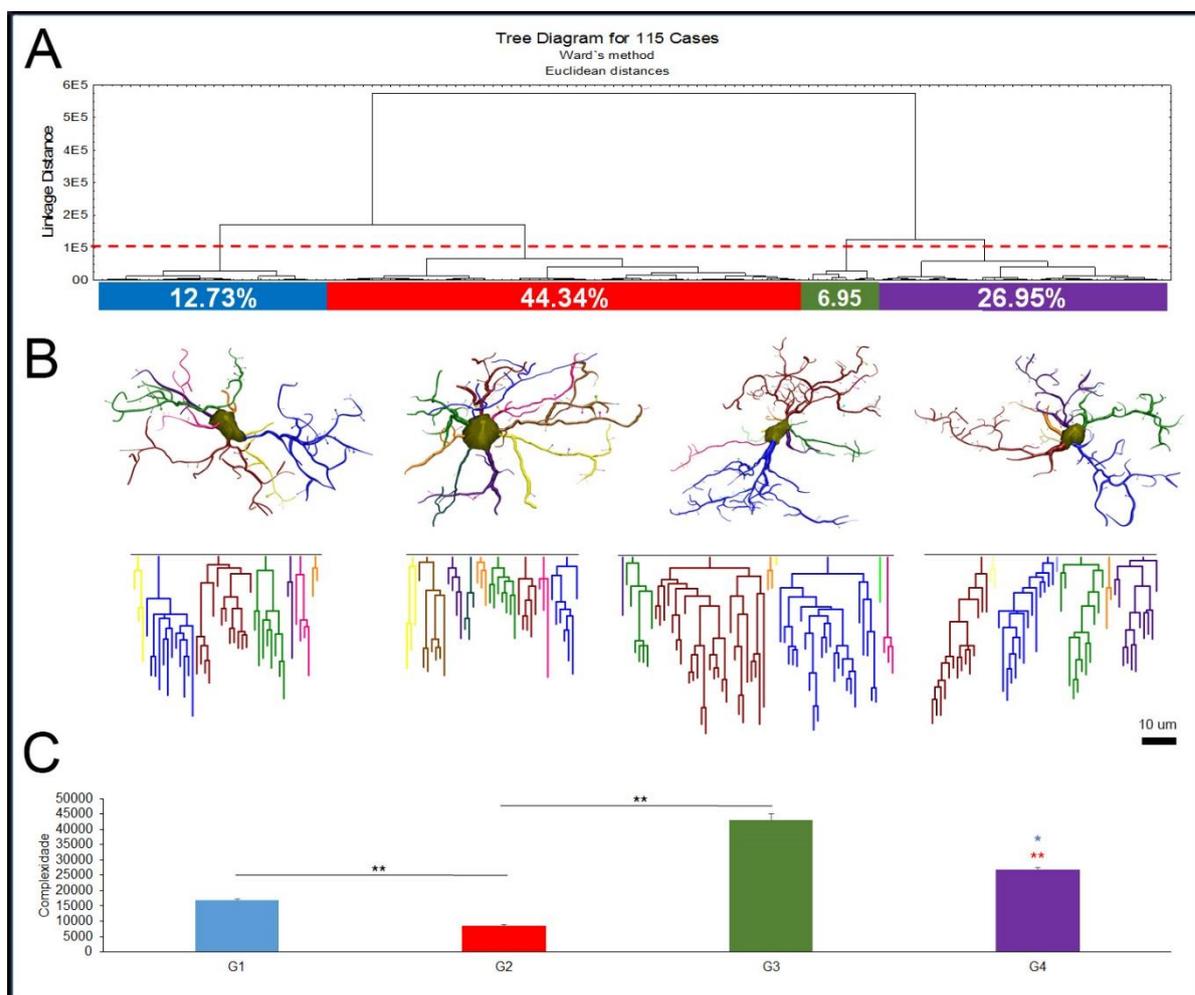
Representação referente ao grupo AP D1 da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hul*. G1, G2, G3 e G4 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 μ m.

Figura 13: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AP D1D4.



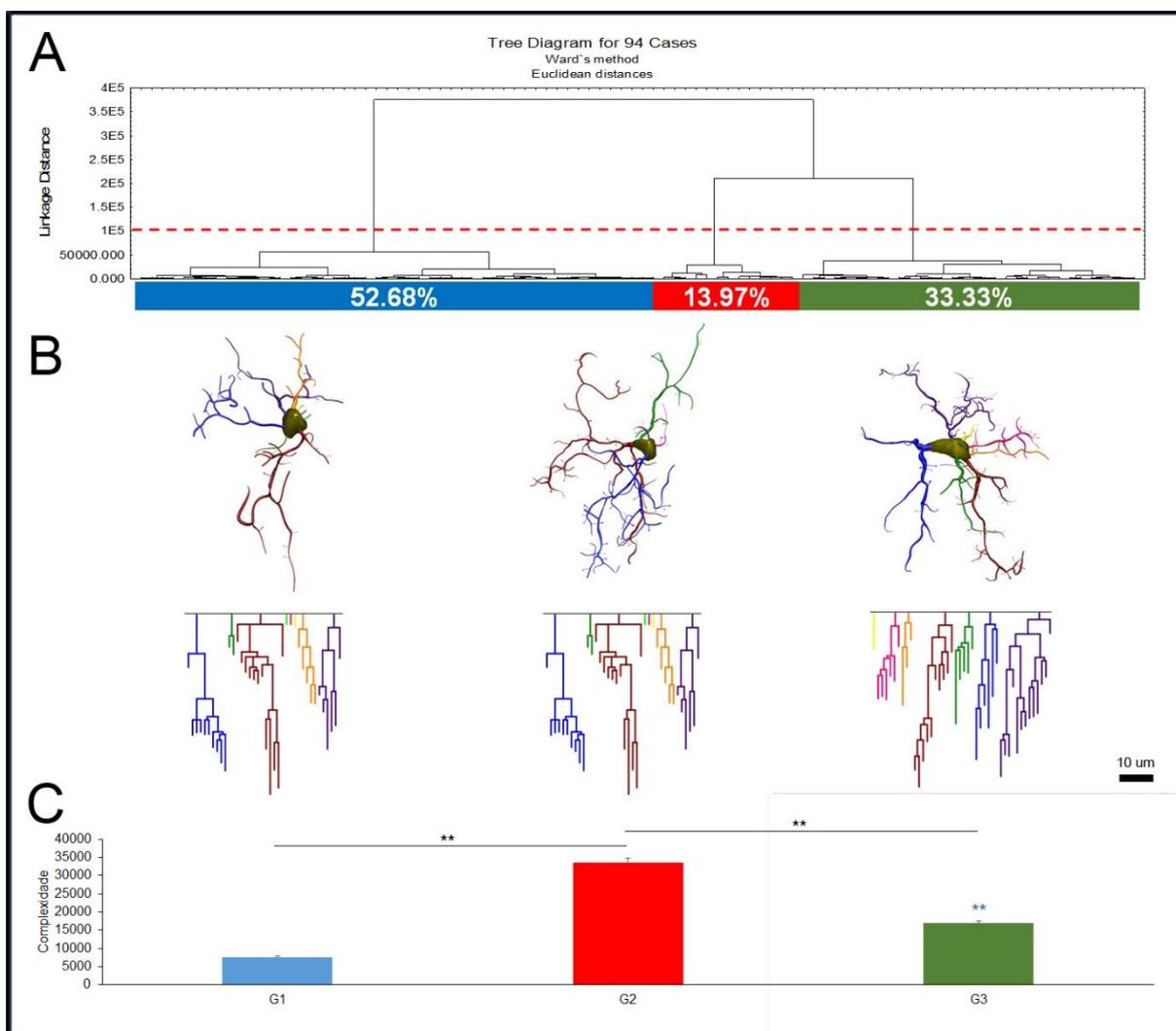
Representação referente ao grupo AP D1D4 da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2, G3 e G4 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 µm.

Figura 14: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AP D1D4AD3.



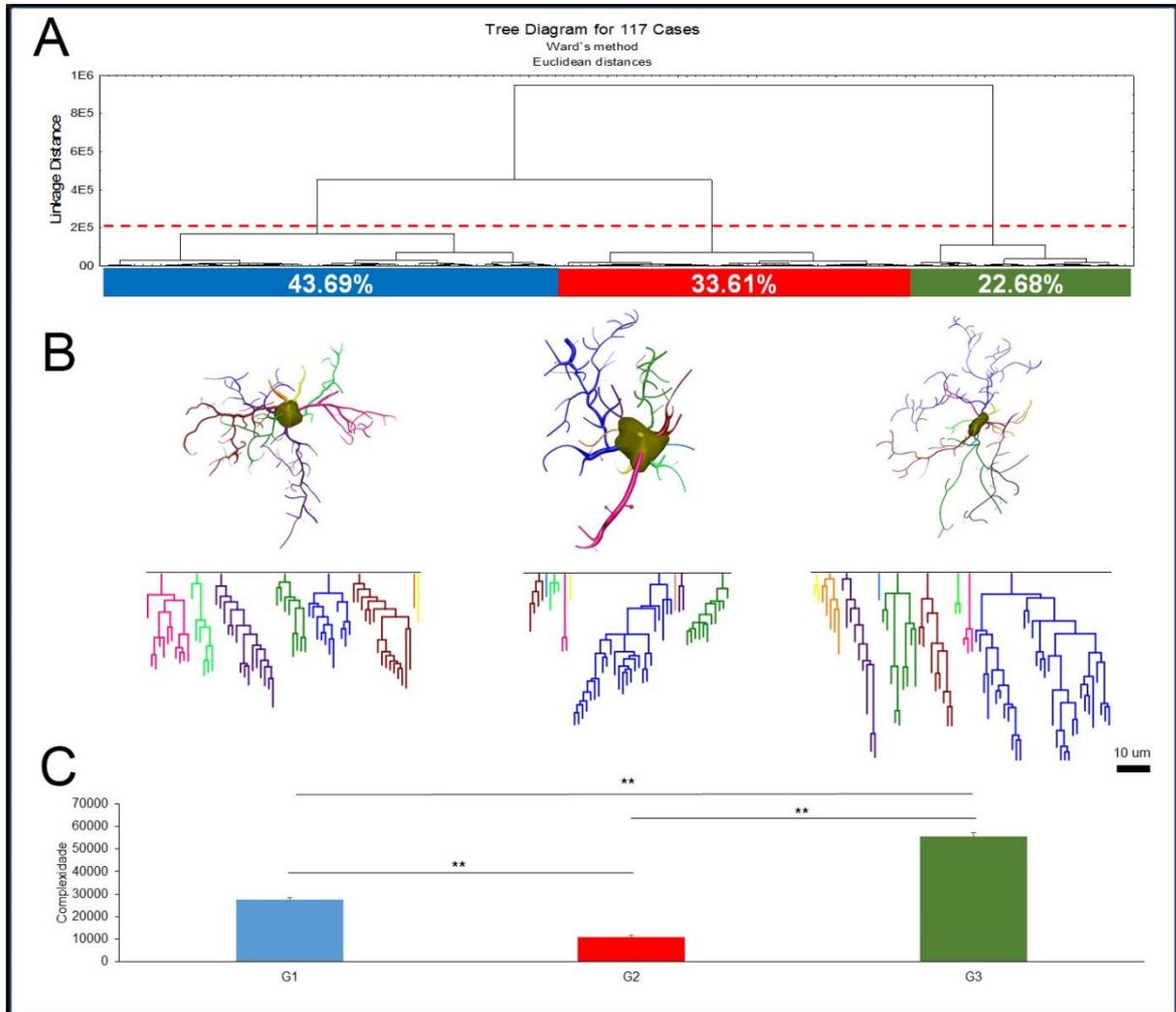
Representação referente ao grupo AP D1D4AD3 da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2, G3 e G4 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 μ m.

Figura 15: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AE NI.



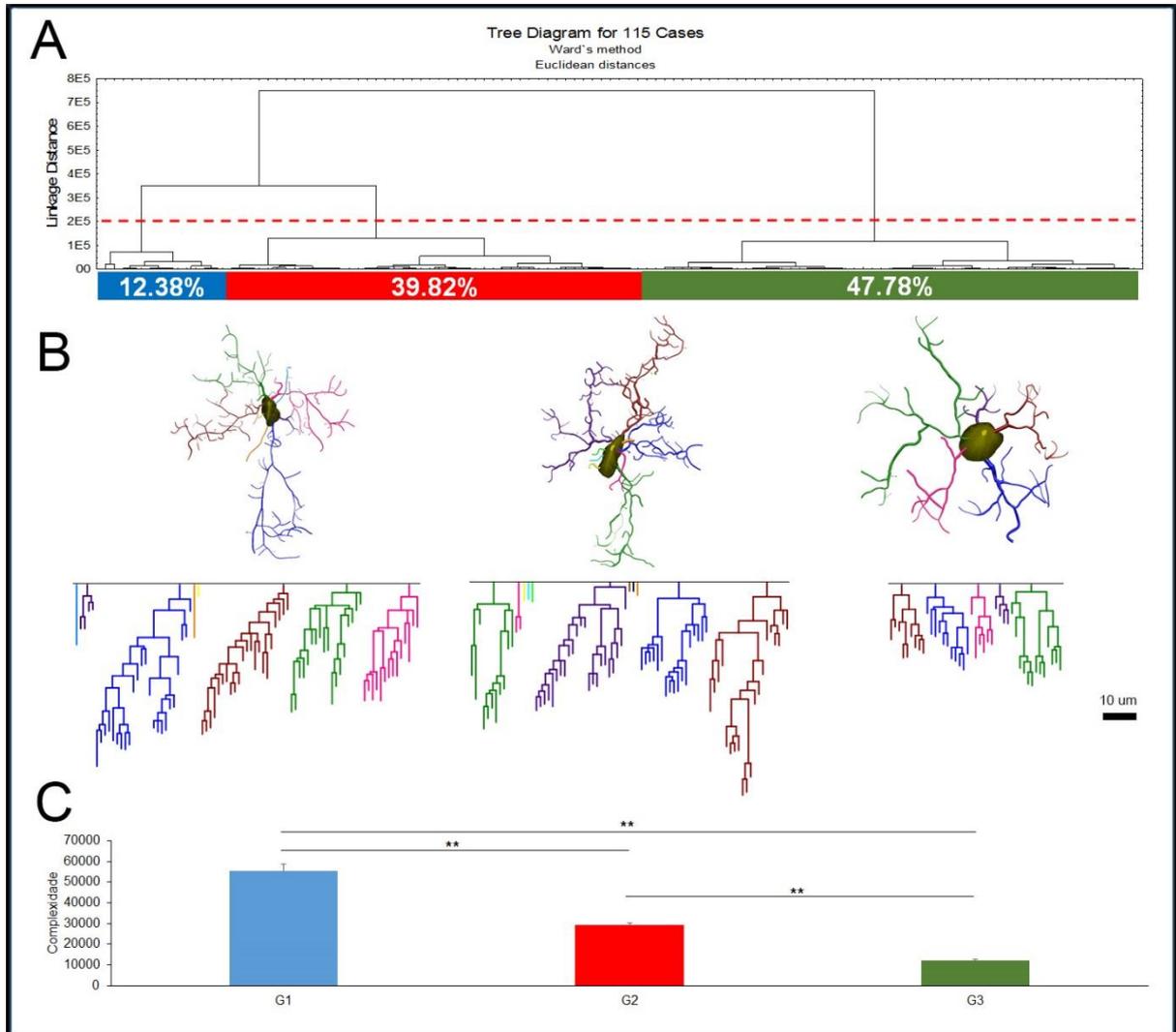
Representação referente ao grupo AE NI da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2, G3 e G4 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 μ m.

Figura 16: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AE D1.



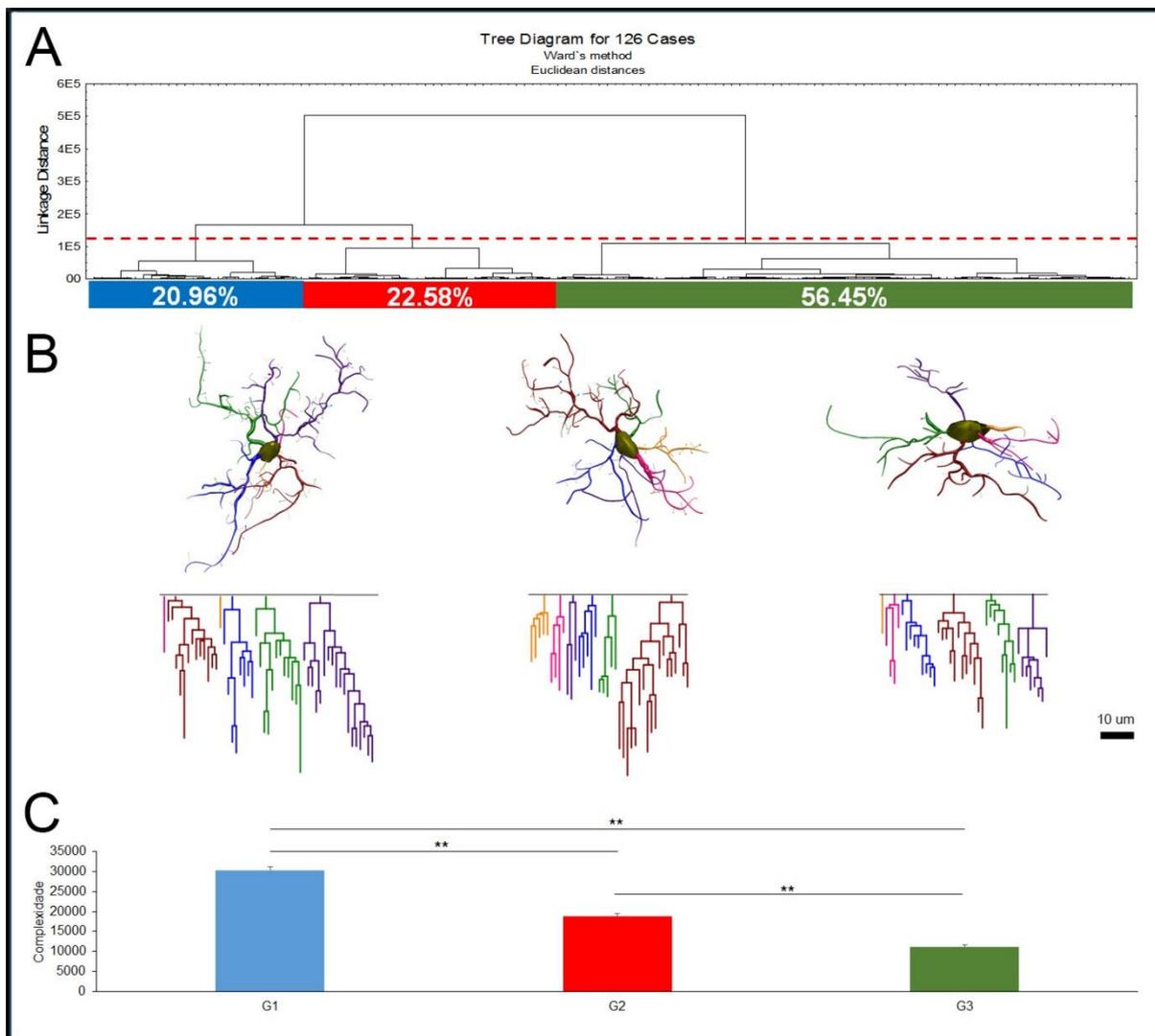
Representação referente ao grupo AE D1 da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2 e G3 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 µm.

Figura 17: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AE D1D4.



Representação referente ao grupo AE D1D4 da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2 e G3 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 µm.

Figura 18: Painel representativo da análise de aglomerados, células médias e dendogramas de cada subgrupo de micróglias e análise não paramétrica para para a variável complexidade e volume do *convex-hul* do grupo AE D1D4AD3.

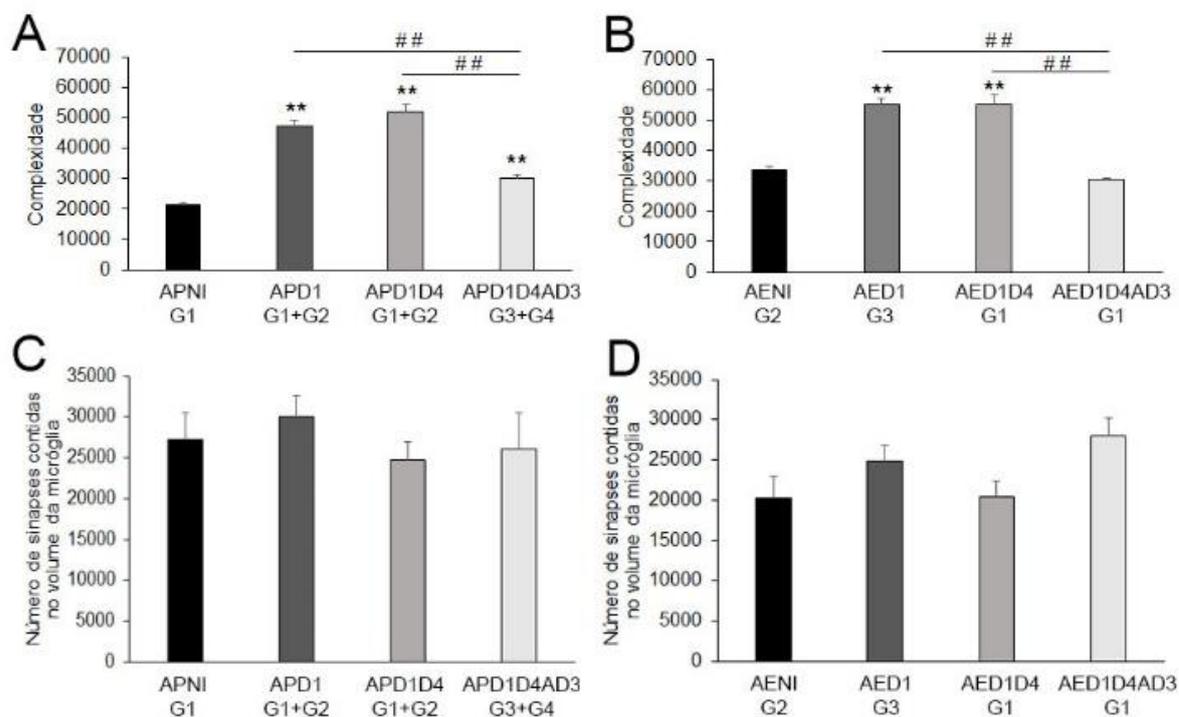


Representação referente ao grupo AE D1D4AD3 da (A) análise de aglomerados, (B) células médias de cada subgrupo e seus respectivos dendogramas, (C) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável complexidade e (D) análise não paramétrica de Kruskal Wallis entre os subgrupos para a variável volume do *convex-hull*. G1, G2 e G3 representam os subgrupos gerados a partir da análise de aglomerados. Escala = 10 μ m.

Tabela 6: Valores de média e erro padrão da variável complexidade apresentada nos painéis das figuras 11 A 18. AP NI – animais não infectados de ambiente padrão; AP D1 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AP D1D4 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AP D1D4ANTIDV3 – animais de ambiente padrão submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3; AE NI – animais não infectados de ambiente enriquecido; AE D1 – animais de ambiente enriquecido infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AE D1D4 – animais de ambiente enriquecido infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AE D1D4ANTIDV3 – animais de ambiente enriquecido submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3.

	G1	G2	G3	G4
AP NI	21286.9	4506.838	7624.573	
	1040.83	286.3075	487.7359	
AP D1	67609.06	39550.74	11139.51	22412.65
	2178.044	1034.181	689.7826	570.4603
AP D1D4	71527.41	43109.79	25035.07	12261.7
	2158.291	1588.344	743.2996	668.9284
AP D1D4ANTID3	16997.43	8393.383	43076.4	26877.01
	342.8603	459.9642	2029.556	701.1041
AE NI	7543.061	33644.91	16890.61	
	358.8372	1218.18	539.9708	
AE D1	27483.69	11083.31	55464.56	
	960.2931	570.5647	1678.361	
AE D1D4	55370.83	29096.26	12205.03	
	3291.87	959.8367	597.5728	
AE D1D4ANTID3	30355.27	18765.55	11183.63	
	725.6313	790.7886	478.5838	

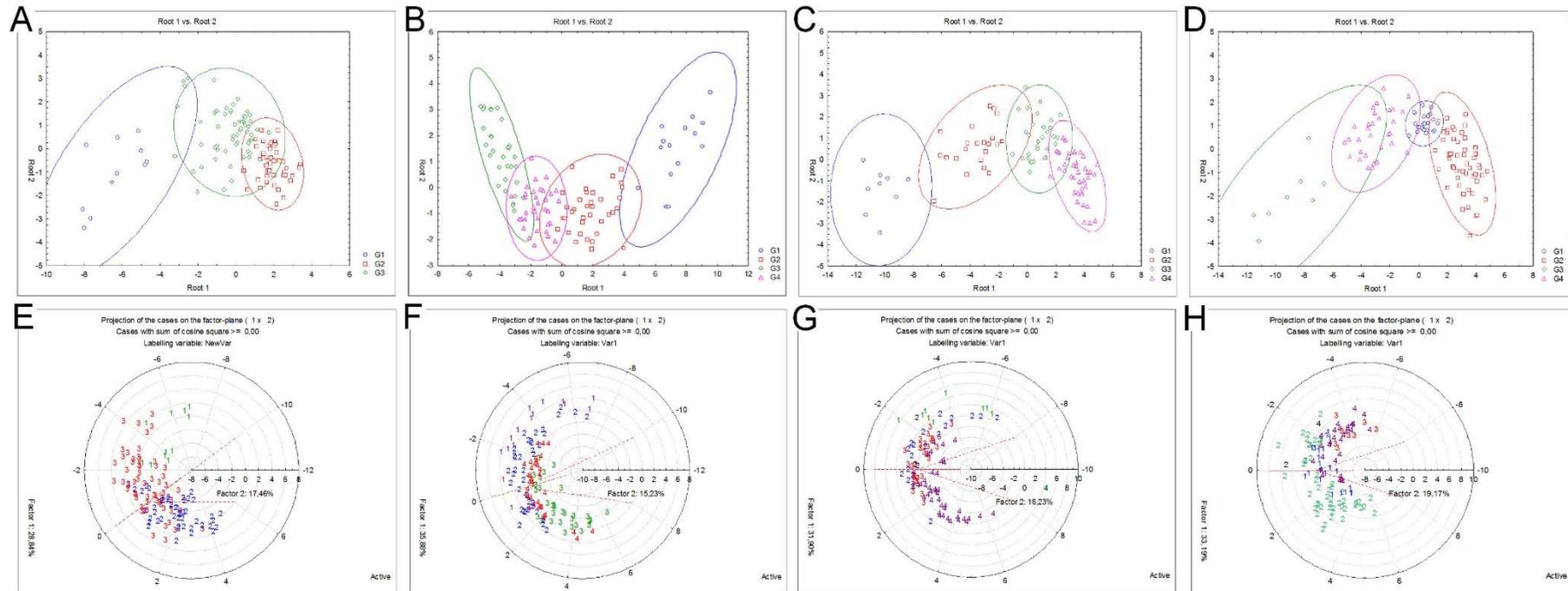
Figura 19: Representação gráfica dos resultados obtidos a partir da comparação entre os subtipos microgliais mais complexos de cada grupo experimental.



(A) Gráfico comparativo entre os subtipos de maiores valores de complexidade de cada grupo experimental obtidos a partir do septo lateral de animais de ambiente padrão, (B) Gráfico comparativo entre os subtipos de maiores valores de complexidade de cada grupo experimental obtidos a partir do septo lateral de animais de ambiente enriquecido, (C) Valores de número de sinapses contidas dentro do volume (domínio da micróglia) relativo às micróglia mais complexas de cada grupo experimental obtidos a partir do septo lateral de animais de ambiente padrão, (D) Valores de número de sinapses contidas dentro do volume (domínio da micróglia) relativo às micróglia mais complexas de cada grupo experimental obtidos a partir do septo lateral de animais de ambiente padrão. AP NI G1 – grupo de células mais complexas de animais não infectados de ambiente padrão; AP D1 G1+G2 – grupos de células mais complexas de animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AP D1D4 G1+G2 – grupos de células mais complexas de animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AP D1D4ANTIDV3 G2+G3 – grupos de células mais complexas de animais de ambiente padrão submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3; AE NI G2– grupo de células mais complexas de animais não infectados de ambiente enriquecido; AE D1 G3 – grupo de células mais complexas de animais de ambiente enriquecido infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AE D1D4 G1 – grupo de células mais complexas de animais de ambiente enriquecido infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AE D1D4ANTIDV3 G1 – grupo de células mais complexas de animais de ambiente enriquecido submetidos ao regime de

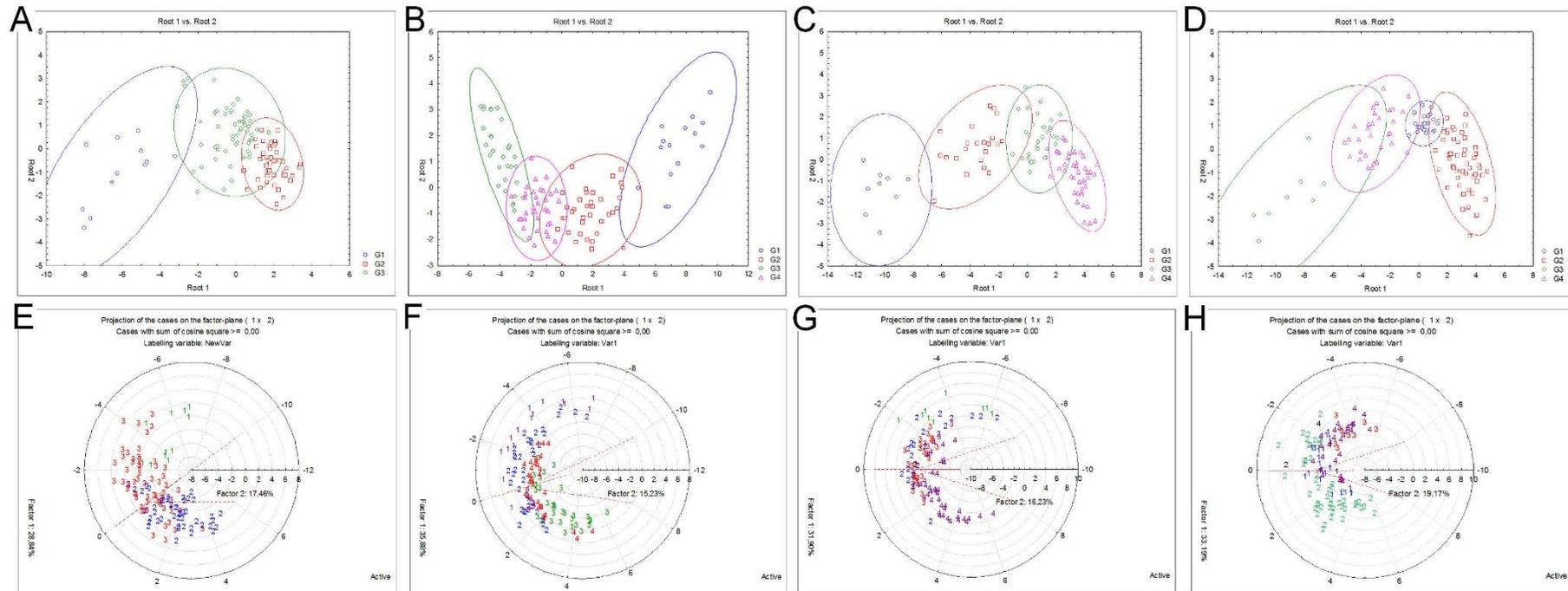
inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3. Aplicou análise não paramétrica de Kruskal Wallis, com intervalo de confiança de 95%. (*) representa diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo não infectado de cada ambiente e (#) representa diferença estatística entre os grupos de animais infectados dentro de cada ambiente. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (#) $p < 0.05$ e (##) $p < 0.01$.

Figura 20: Representação gráfica da análise discriminante e análise de componentes principais realizadas a partir de células do septo lateral de animais de ambiente padrão



(A) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AP NI, (B) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AP D1, (C) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AP D1D4, (D) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AP D1D4AD3, (E) análise de componentes principais feita a partir das células do grupo AP NI, (F) feita a partir das células do grupo AP D1, (G) feita a partir das células do grupo AP D1D4A, (H) feita a partir das células do grupo AP D1D4AD3.

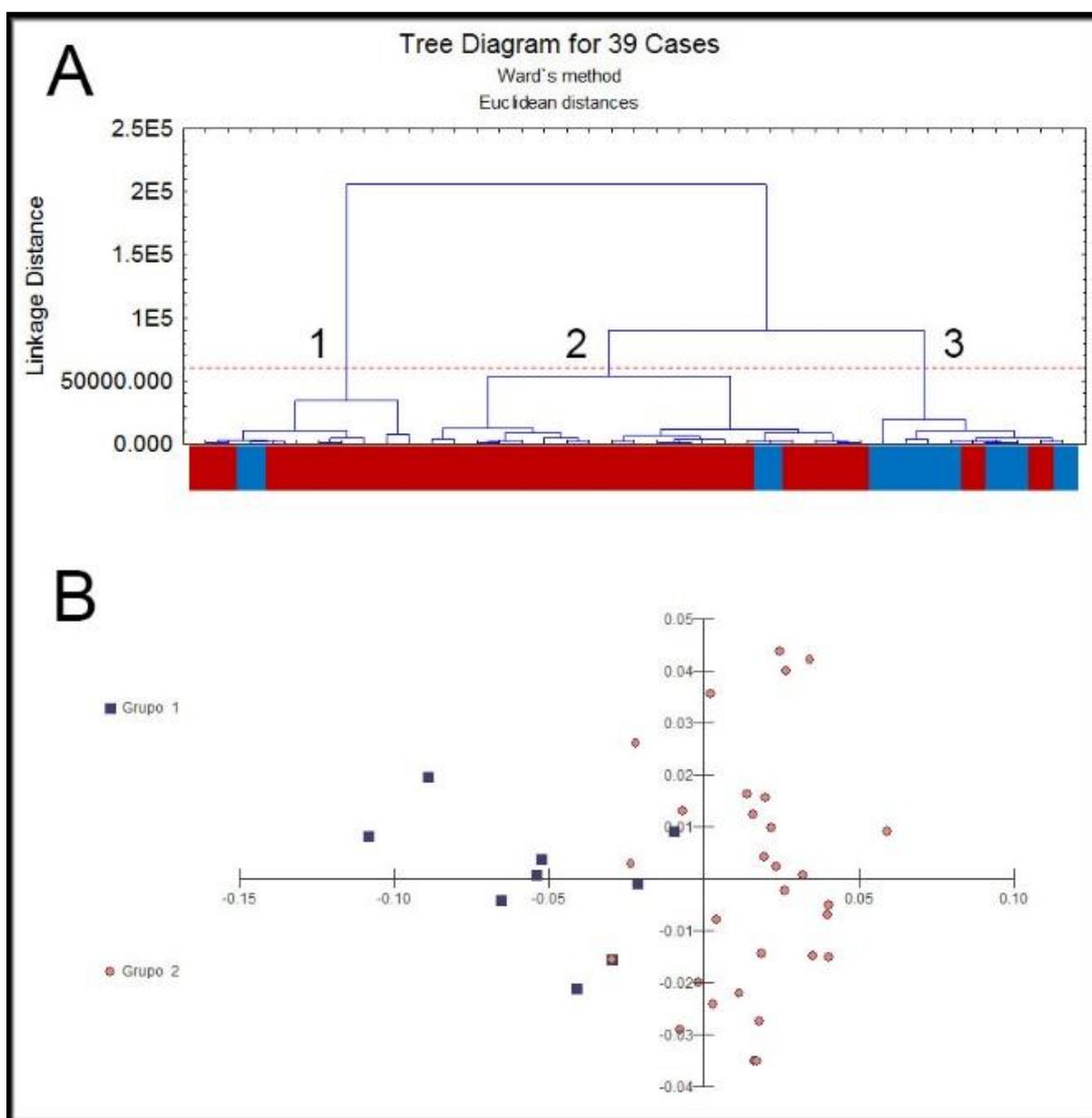
Figura 21: Representação gráfica da análise discriminante e análise de componentes principais realizadas a partir de células do septo lateral de animais de ambiente enriquecido.



(A) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AE NI, (B) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AE D1, (C) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AE D1D4, (D) Análise discriminante feita a partir das células do grupo AE D1D4AD3, (E) análise de componentes principais feita a partir das células do grupo AE NI, (F) feita a partir das células do grupo AE D1, (G) feita a partir das células do grupo AE D1D4A, (H) feita a partir das células do grupo AE D1D4AD3.

Por fim, a figura 22 ilustra a representação do *cluster* gerado a partir dos indivíduos que compõem cada grupo experimental, evidenciando a divisão existente em três aglomerados, sendo os aglomerados 1 e 2 são formados em sua maioria por animais infectados e o aglomerado 3, em sua maioria, por animais não-infectados, independente do ambiente (Figura 18A). A mesma situação pode ser visualizada no gráfico da análise discriminante (Figura 18B). O resultado da análise discriminante pode ser encontrado no anexo II.

Figura 22: Representação gráfica dos aglomerados gerados a partir dos animais dos grupos experimentais utilizados no presente trabalho.



Análise de cluster e análise discriminante para ilustrar em representação gráfica a distinção entre os grupos experimentais. (A) análise de cluster mostrando a separação entre os grupos infectados e não-infectados. O **cluster a** é composto em sua maioria por animais infectados e o **cluster b** é composto majoritariamente por animais não infectados. (B) gráfico da análise discriminante demonstrando concentração dos animais infectados no quadrante inferior direito e os demais grupos infectados distribuídos nos demais quadrantes e abaixo as variáveis que compuseram a análise de cluster e discriminante, sendo a complexidade a variável discriminante. AP NI – animais não infectados de ambiente padrão; AP D1 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AP D1D4 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AP D1D4ANTIDV3 – animais de ambiente padrão submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3; AE NI – animais não infectados de ambiente enriquecido; AE D1 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue; AE D1D4 – animais de ambiente padrão infectados com macerado infectado com sorotipo 1 do vírus da dengue seguido 28 dias após por infecção por macerado infectado com sorotipo 4 do vírus da dengue; AE D1D4ANTIDV3 – animais de ambiente enriquecido submetidos ao regime de inoculações por vírus da dengue alternadas inoculações de anticorpo anti-VD3.

5. DISCUSSÃO

5.1. Infecção por dengue e alterações na morfologia da micróglia do septo lateral no modelo de infecção por VDENV1 e VDEN4

Os resultados sugerem que a infecção sequencial por VDEN1 e VDEN4 é capaz de alterar a morfologia da micróglia na região septal lateral de animais alojados em ambiente padrão e tais alterações são compatíveis com a ativação microglial. Ainda não se sabe quais outras alterações celulares importantes no SNC são induzidas por infecções subsequentes com dois sorotipos diferentes por VDEN1 e VDEN4 em modelo murino imunocompetente assim como, demais manifestações comportamentais, sendo este o primeiro relato nessa direção.

Em um trabalho anterior realizado em nosso laboratório, demonstrou-se que a infecção por vírus da dengue sorotipo III genótipo III, intensificada por inoculação de anticorpo heterólogo, foi capaz de induzir sinais clínicos e alterações em testes comportamentais associados a infiltrados mononucleares dominados por linfócitos sem alterações visíveis no SNC (DINIZ et al., 2012). O modo de infecção sequencial VDEN1 e VDEN4 portanto parece ser capaz de induzir resposta microglial não detectada previamente quando da infecção com o sorotipo 3 genótipo III acentuada por anticorpo heterólogo.

Alguns autores já descreveram alterações no SNC induzidas por vírus da dengue (AMARAL et al., 2011), propiciando encefalite após inoculação intracerebral de VDEN3, mas não foram documentadas alterações significativas após inoculação intraperitoneal. De forma semelhante, (DE MIRANDA et al., 2012), descreveram alterações inflamatórias no hipocampo e morte neuronal induzida após infecção por vírus VDEN3 em camundongos C57BL/6, mas apenas após inoculação intracerebral. Em nosso laboratório, encontrou-se, em primatas não-humanos, alterações da morfologia da micróglia do giro denteado do hipocampo associada a expressão de TNF-alfa nessa área (DINIZ et al., 2016). Apesar dos achados citados, nenhum trabalho mostrou alterações significativas no SNC induzidas após infecção periférica pelo vírus da dengue em modelo murino imunocompetente, embora não tenham sido testados os mesmos sorotipos empregados no presente trabalho.

Vários vírus são capazes de induzir infecção no SNC, tais como o Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), o Vírus *West Nile*, o Vírus da Encefalite Murray e o Herpes

Vírus (KAUSHIK *et al.* 2011). Dentre esses arbovírus, o JEV (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) é capaz de causar alterações significativas no SNC, dentre essas alterações morfológicas as alterações microgliais induzidas principalmente por citocinas IL-12, IL-1 β , TNF- α , MCP-1 e IL-6 (CHEN. *et a.*, 2010; GHOSHAL *et a.*, 2007; SWARUP *et a.*, 2008); sabe-se também que a infecção por JEV é acompanhada por produção aumentada de TNF- α (SWARUP *et al.*, 2008). Recentemente, Diniz *et al* (2016), mostraram em primatas não-humanos, que a infecção pelo vírus da dengue 3 exacerbada pela inoculação passiva de anticorpo heterólogo anti-VDEN2 é capaz de induzir alterações importantes na morfologia da micróglia do giro denteado do hipocampo e isso está associado à expressão de TNF- α na região estudada (DINIZ *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Ainda sobre nossos achados, é possível notar que micróglia obtidas a partir de animais submetidos ao modelo de infecção associado a inoculação passiva de anticorpo heterólogo – utilizado com o objetivo de acentuar os sinais da doença – não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas às micróglia de animais não-infectados. Esses dados são compatíveis com outros já encontrados por nós em um modelo murino de infecção por sorotipo 3 da dengue exacerbada por inoculação passiva de anticorpo heterólogo anti-VDEN2, no qual não houve alterações microgliais importantes, apesar da evidente resposta inflamatória periférica (DINIZ *et al.*, 2012), porém não sabemos quais fatores estão por trás desses resultados, já que o presente trabalho é o primeiro a testar tal pergunta no modelo de infecção por VDEN1 e VDEN4.

Portanto, mediadores inflamatórios produzidos no SNC ou aqueles produzidos na periferia e que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, tal como o TNF-alfa, ou ainda outros fatores, como o acúmulo de glutamato extracelular associado ou não à produção de citocinas pró-inflamatórias, podem estar agindo de forma individual ou em conjunto para gerar as resposta observadas. Porém, não possuímos evidências que nos permitam aceitar uma ou outra hipótese.

5.2. Análise de aglomerados dos morfotipos microgliais presentes no septo lateral em estado fisiológico e em estado alterado pela infecção por VDEN

No presente trabalho observamos que, em estado fisiológico, a população microglial do septo lateral de animais de ambiente padrão encontra-se dividida em três subpopulações morfológicas, dado que foi demonstrado pela aplicação da análise de

aglomerado, seguida de análise discriminante, e que a variável complexidade é a variável mais importante para a subdivisão da população de micróglia dessa área específica. As micróglia são células de grande atividade e alta motilidade (HANISCH; KETTENMANN, 2007; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005) e que assumem uma série de funções no sistema nervoso homeostático, sempre monitorando os elementos sinápticos (TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010; WAKE et al., 2009) e microambiente que as circundam (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). A sua diversidade de atuação é acompanhada de uma diversidade morfológica, mesmo na ausência de agressão ao SNC (FITZNER et al., 2011; PANNELL et al., 2014; SCHEFFEL et al., 2012). Além do mais, a morfologia ramificada e a atividade dos processos da micróglia sofrem variações ao redor das regiões encéfalo (LAWSON et al., 1990a). Sendo assim, assume-se que a micróglia não é uma entidade homogênea e diferentes subpopulações podem se distinguir em forma e em suas capacidades funcionais (FITZNER et al., 2011; PANNELL et al., 2014; SCHEFFEL et al., 2012). A heterogeneidade já proposta anteriormente para outras áreas do SNC também pode ser vista por nós no septo lateral do camundongo albino suíço, independentemente do ambiente no qual foi alojado.

Assim como é razoável sugerir que a micróglia, mesmo em estado fisiológico, possui uma diversidade de fenótipos, é igualmente sensato sugerir que durante processos que levam alterações no SNC os diferentes subtipos micróglia também respondam de forma variada, tanto em forma quanto em função. No presente trabalho, notamos por meio da aplicação da análise de aglomerados, que, em animais de ambiente padrão, somente uma parte das micróglia do septo lateral responde com alteração da morfologia no modelo de infecção por VDEN proposto. Notamos ainda que há aumento do percentual de células altamente complexas após a infecção por VDEN1 ou VDEN4 e que isso está relacionado ao surgimento de um novo subtipo celular de grande complexidade, não existente na população de micróglia do septo lateral em estado fisiológico. Ainda, os subtipos de complexidade baixa e intermediária não parecem ser alterados em seu percentual.

Alguns trabalhos já observaram que, no SNC sob condições patológicas, há aumento da diversidade microglial com o aparecimento de células que apresentam hipertrofia dos ramos (AYOUB; SALM, 2003). Ayoub e Salm (2003), utilizando um

modelo de desidratação induzido pela ingestão de solução salina 2%, perceberam aumento do número total e da densidade de micróglia hipertrofiadas no núcleo hipotalâmico supra-óptico após 2 e 7 dias de desidratação, sendo que após a rehidratação, esses parâmetros retornaram aos números do estado fisiológico. Houve, ainda, aumento do número e densidade de células com morfologia ameboide 7 dias após a desidratação. Portanto, a modificação do estado fisiológico é capaz de alterar a diversidade morfológica das micróglia na região estudada por esses autores (AYOUB; SALM, 2003). Morrison e Filosa (2013) observaram, num modelo de isquemia focal, que após 60 minutos de dano houve aumento do número de processos microgliais (hiper-ramificação) na região estriatal, porém, no córtex, o número dos processos é reduzido, sugerindo que a resposta microglial é pleomórfica – é possível observar tanto o aumento quanto a redução dos processos da micróglia em resposta ao dano isquêmico - e que isso é dependente da região observada (MORRISON; FILOSA, 2013).

Os dados aqui reportados também são compatíveis com outros, onde mostrou-se a presença de perfis morfológicos microgliais hiper-ramificados em associação à resposta inflamatória gerada por LPS (KLOSS et al., 2001) ou por vírus (DE SOUSA et al., 2015). Adicionalmente, Kloss *et al.* (2001) mostraram que o aumento do número de ramificações da micróglia induzido pela resposta ao LPS está associado ao aumento da expressão de integrina- $\beta 1$ (CD29) nessas células. Outro trabalho, já citado anteriormente nesta discussão, observou ampla alteração da morfologia da micróglia do giro denteado do hipocampo para um perfil hiper-ramificado associado a expressão de TNF- α , num modelo de infecção por vírus da dengue exacerbado por anticorpo heterólogo, em primatas não-humanos (DINIZ et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2015).

O que foi percebido por nós pode ser explicado pela diversidade de resposta que as subpopulações de micróglia podem assumir a um determinado estímulo danoso. Por exemplo, o estímulo com IFN-gama pode levar a expressão de MHCII em células apresentadoras de antígeno e as micróglia respondem nesse sentido tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FITZNER et al., 2011). No entanto, é possível encontrar diferentes respostas de capacidade de indução da expressão de MHCII em diferentes regiões do SNC (MCCLUSKEY; LAMPSON, 2001) e somente parte dessas células são capazes de gerar essa resposta, apesar de possuírem arsenal de expressão gênica

para isso (FITZNER et al., 2011). Outro exemplo é que, apesar de não ser observada expressão diferenciada do receptor TLR4 em subpopulações de micróglia (um receptor que responder à estimulação com TNF-alfa, por exemplo), há células que utilizam a cascata iniciada com a sinalização através de TLR4 e há células que não o fazem (SCHEFFEL et al., 2012). Sabe-se também que é possível que subpopulações microgliais respondem de formas diferenciadas a neurotransmissores e neuro-hormônios (PANNELL et al., 2014).

Classicamente, encontramos na literatura que micróglia e macrófagos podem assumir dois tipos de resposta: aquela do tipo M1, que tem perfil pró-inflamatório e pode ser mediada por TNF-alfa e IFN-gama, e aquela do tipo M2, uma via alternativa anti-inflamatória, que atua na resolução da inflamação e no reparo tecidual, podendo ser mediada por IL-4 (HANISCH, 2013). Apesar dessa classificação original, muito se tem discutido no sentido da existência da diversidade de fenótipos reativos de micróglia (DALEY et al., 2010; MARTINEZ et al., 2006; MIKITA et al., 2011; MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY; WYNN, 2011; POLLARD, 2009; VAN ROSSUM et al., 2008; WEBER et al., 2007). Além do mais, é razoável pensar que estímulos variados levam a respostas diferentes, como já citado acima. Isso significa que, mesmo numa resposta de ativação microglial, não necessariamente encontramos o mesmo tipo de perfil de resposta, seja essa resposta molecular, bioquímica ou morfológica (GERTIG; HANISCH, 2014).

Os presentes resultados sugerem que a infecção sequencial por VDEN1 e VDEN4 é capaz de alterar a morfologia da micróglia na região septal lateral de animais alojados em ambiente padrão e isso é acompanhado da observação de um novo subtipo morfológico de alta complexidade de ramos. Sugerimos, portanto, que o novo subtipo encontrado foi gerado a partir de um conjunto de células capazes de responder especificamente ao estímulo induzido após a infecção por VDEN, porém nem todas as células responderam a esse estímulo, o que pode ser confirmado pela manutenção dos subtipos de média e baixa complexidade nos grupos de animais infectados. No entanto, ainda não se sabe quais alterações celulares importantes no SNC são induzidas por infecções subsequentes com dois sorotipos diferentes por VDEN1 e VDEN4 em modelo murino imunocompetente e, portanto, é necessário investigar de forma mais profunda tais alterações associadas às modificações morfológicas em modelos de infecção por flavivírus.

5.3. Possíveis implicações funcionais das alterações morfológicas da micróglia para a função sináptica

É possível hipotetizar sobre as diferentes funções que tal diversidade de formas é capaz assumir. Em estado fisiológico, por exemplo, a micróglia é muito ramificada e tais ramificações possuem alta motilidade que constantemente monitoram o microambiente que as circunda, ao entender e retrair seus processos (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Além de sua alta motilidade, as micróglias realizam contatos diretos frequentes com elementos da sinapse durante todas as fases da vida do indivíduo (MIYAMOTO et al., 2013; TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010; WAKE et al., 2009, 2013), provavelmente com o papel de regular sua função, sendo possível que tal fato também seja verdade para estados alterados do SNC. Além do mais, mesmo em estados alterados de atividade neuronal, não se identificou redução da motilidade da micróglia, nem redução da velocidade de extensão e retração dos processos (NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005; WAKE et al., 2009; WU; ZHUO, 2008). Essa última observação é compatível com o que encontramos na presente dissertação, pois células altamente complexas observadas após a infecção por VDEN1 ou VDEN4 não alteraram seus domínios de contato com as sinapses.

A pergunta que cabe é: quais as possíveis implicações funcionais das alterações encontradas por nós no presente trabalho? Forma e função da micróglia podem ser influenciados por uma série de fatos. É possível perceber, por exemplo, que uma variedade de receptores para neurotransmissores e neuromoduladores podem ser expressos na superfície da micróglia, que quando ativadas podem levar a liberação de citocinas, a alterações no potencial de membrana e a alterações na morfologia celular durante disfunções no SNC (KETTENMANN et al., 2011b). Além disso, durante a interação neurônio-micróglia, os neurônios podem ter influência sobre a regulação e manutenção da ativação microglial através da secreção de fatores que influenciam as propriedades basais da micróglia, como a liberação de neurotransmissores que influenciam o comportamento dessas células da glia, além de serem capazes de liberar purinas que induzem quimiotaxia durante um dano agudo (BIBER; VINET; BODDEKE, 2008; CARDONA et al., 2006; DE HAAS et al., 2007; HOEK et al., 2000). Portanto, sugerimos que as alterações percebidas por nós estejam ocorrendo como uma resposta rápida de um subtipo microglial do septo lateral

no sentido de aumentar a sensibilidade de percepção de seu microambiente e dos neurônios vizinhos, objetivando a rápida percepção do problema e resolução do mesmo.

5.4. O comportamento semelhante ao ansioso no modelo de infecção alternada por VDEN1 e VDEN4

Os dados obtidos a partir do LCE e do CA mostram que animais de ambiente padrão apresentaram queda no tempo de exploração do braço fechado do LCE e da periferia do CA após a infecção secundário por VDEN4 e que permanece até o final do experimento, sugerindo que esses animais não são capazes de responder de forma adaptativa ao evento de possível estímulo perigoso. Resultados semelhantes ao nosso já foram descritos por outros autores e há muito já se sabe que estão relacionados à integridade das funções do septo lateral, que em conjunto com outras área do sistema límbico, é uma importante área de controle do comportamento semelhante ao ansioso (DEGROOT; KASHLUBA; TREIT, 2001; DEGROOT; TREIT, 2004; MENARD; TREIT, 1996a, 1996b; PESOLD; TREIT, 1992; TREIT; PESOLD; ROTZINGER, 1993; TREIT; PESOLD, 1990). As consequências da disfunção do septo lateral podem ser caracterizadas pela supressão do comportamento defensivo e da tendência natural de roedores em evitar ambientes perigosos (ex. braço aberto do LCE).

Esse fato observado por nós e por outros pode levar animais que apresentam alterações celulares importantes nessa região a apresentarem deficiência na capacidade de reconhecer o estímulo perigoso (supressão do medo) representado pelo braço aberto do LCE e pelo centro do CA. Thomas e Guton (2011), num modelo de convulsão gerado a partir de estímulos crônicos sub-convulsivos (do termo em inglês Kindling), perceberam que animais que tiveram o septo lateral estimulados nesse modelo exibiram significativo efeito de anti-conflito, passando a explorar por maior tempo o braço aberto do LCE, o que não foi percebido em animais controle (THOMAS; GUNTON, 2011). Além disso, Thomas *et al.* (2013) sugeriram que quando animais são expostos ao braço aberto do LCE, pode ocorrer um processo compensatório que suprime o medo e permite ao animal se adaptar ao ambiente e isso parece estar associado ao aumento da taxa de disparos no septo lateral e à redução da taxa de disparos na núcleo central da amígdala (THOMAS *et al.*, 2013).

Sabe-se também que sob condição de estimulação do septo lateral, ocorre a diminuição de respostas somáticas, viscerais e comportamentais associadas ao medo, como da taxa de batimentos cardíacos, da pressão sanguínea, respiração, redução do comportamento vigilante e liberação de corticosteroide (COVIAN; ANTUNES RODRIGUES; O'FLAHERTY, 1964; HOLDSTOCK, 2013; YADIN; THOMAS, 1996).

Levando em consideração as amplas alterações morfológicas da micróglia encontrada no septo lateral de animais de ambiente padrão e que isso pode estar associado a disfunções induzidas pela infecção por VDENV1 nessa área específica, e tendo em mente que as alterações microgлияis sabidamente estão envolvidas em transtornos relacionados a emoção e ao comportamento (DANTZER et al., 2008; HASHIOKA et al., 2007; KREISEL et al., 2014; REICHENBERG et al., 2001; YIRMIYA et al., 2001) e de forma mais específica no comportamento semelhante ao ansioso (KREISEL et al., 2014; NEMETH et al., 2014), nossa hipótese é de que a alteração comportamental percebida por nós está relacionada a ampla alteração microgлияl encontrada no septo lateral. O que nos resta saber, e por isso são necessários mais esforços, é se tais alterações da micróglia são a causa ou a consequência, ou se ambas.

5.5. O impacto do ambiente enriquecido sobre as alterações comportamentais e morfológicas no modelo de infecção por VDENV1 e VDENV4

Nossos dados revelaram que, no modelo de infecção por VDENV1 e VDENV4, animais de ambiente enriquecido não apresentaram redução do tempo de exploração do braço fechado do LCE nem da periferia do CA, como ocorreu em animais de ambiente enriquecido, e não apresentaram alterações da morfologia da micróglia do septo lateral, tanto revelado pela análise paramétrica quanto pela análise de aglomerados, seguida de análise discriminante. Portanto, podemos sugerir que o enriquecimento ambiental atuou de forma protetora contra as alterações comportamentais e da morfologia da micróglia no modelo proposto nesta dissertação.

Há muito já se sabe que o enriquecimento ambiental atua de forma neuroprotetora em uma série de situações fisiológicas ou patológicas (LAVIOLA et al., 2008; MO; RENOIR; HANNAN, 2015; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Além do mais, já é amplamente descrito que o enriquecimento ambiental é

capaz de proteger os indivíduos submetidos a esse estilo de vida contra distúrbios emocionais associados ao estresse e à ansiedade (FRANCIS et al., 2002; LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002; ROY et al., 2001).

Em nosso laboratório, muito se tem feito no sentido de avaliar a influência do ambiente enriquecido sobre o comportamento dos animais em uma série de testes comportamentais, como os de memória de trabalho e episódica e os que avaliam comportamento semelhante ao ansioso. Também tem sido demonstrado os efeitos do ambiente enriquecido sobre a plasticidade celular no sistema nervoso central (BORNER et al., 2011; DE SIQUEIRA MENDES et al., 2013; DE SOUSA et al., 2011, 2015; DINIZ et al., 2010; VIANA et al., 2013). Recentemente, de Sousa *et al* (2015), demonstraram que, após infecção por arbovírus Piry, tanto micróglia do hipocampo de animais de ambiente padrão quanto de ambiente enriquecido foram alteradas pela infecção, mas os últimos parecem recuperar a morfologia microglial homeostática mais rapidamente do que os primeiros (DE SOUSA et al., 2015). No entanto, o nosso trabalho é o primeiro a investigar a influência do enriquecimento ambiental sobre as alterações morfológicas da micróglia e do comportamento semelhante ao ansioso gerados pela infecção pelo vírus da dengue..

Portanto, o presente trabalho corrobora com outros e com observações já feitas por nosso laboratório, de que o enriquecimento ambiental é um importante fator que contribui com a proteção contra danos no sistema nervoso central, sendo o primeiro a investigar tais influências no modelo de infecção por VDEN.

5.6. Limitações nas reconstruções tridimensionais

É importante chamar atenção, tal como previamente discutido em estudos anteriores em nosso laboratório (DINIZ *et al.*, 2012; GUERREIRO-DINIZ 2013; VIANA *et al.*, 2013) para as limitações técnicas associadas ao processamento do tecido utilizado para imunomarcagem seletiva e reconstrução tridimensional. Tais limitações são impostas pela fixação e pelos fatores mecânicos associados ao seccionamento do encéfalo dos animais, assim como pelo subsequente processo de desidratação, de tal forma que o tecido sofre retração não uniforme no eixo z em comparação aos eixos x-y prontamente evidente nas secções montadas em lâmina (HOSSEINI-SHARIFAB; NYEGAARD, 2007).

Assim as estimativas de possíveis modificações nos eixos x/y após o processo de desidratação não podem ser extrapoladas linearmente para o eixo z. Essa impossibilidade difícil de ser circunscrita por sua influência multifatorial, impõe limitações que precisam ser consideradas quando analisando o conjunto dos dados aqui apresentados.

Entretanto é preciso realçar que uma indicação segura da ocorrência de retração severa do eixo z é a ondulação frequente dos ramos retraídos, normalmente mais evidentes na superfície das secções, o que indica que os processos individuais não retraem de forma homogênea como um todo, mas refletem variações de retração regionais da fatia que tendem a ser de maior amplitude na superfície, decrescendo em profundidade no eixo z.

Esse padrão, entretanto, não foi observado nas micróglias eleitas para reconstrução neste estudo que normalmente foram selecionadas da região média do eixo z, onde o impacto dessas alterações é menor.

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

6. Conclusões

Baseado nos ensaios morfológicos aplicados a amostra microglial colhida de maneira aleatória e sistemática e nos ensaios comportamentais realizados antes e após às infecções, concluímos que:

- 1) a população microglial do septo lateral em condições homeostáticas apresenta um padrão morfológico heterogêneo, composto por três fenótipos morfológicos de valores de complexidade diferentes;
- 2) a infecção sequencial com homogenado cerebral infectado pelos sorotipos 1 e 4 do vírus da dengue com intervalo de 28 dias entre uma inoculação e outra é capaz de induzir alterações na morfologia da micróglia e no padrão morfológico dessas células, induzindo aumento significativo do percentual de células de alta complexidade;
- 3) a infecção também está associada a alterações comportamentais importantes detectadas na exploração do campo aberto e do labirinto em cruz elevado particularmente nos animais mantidos em ambiente padrão;
- 4) o enriquecimento ambiental parece proteger os animais contra as alterações comportamentais e minimizando as alterações da morfologia da micróglia do septo lateral;
- 5) permanece por ser investigado se as alterações microgliais precedem às comportamentais assim como as bases moleculares de cada alteração.

7. Referências

- AMARAL, D. C. G. et al. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 23, jan. 2011.
- AN, J. et al. The pathogenesis of spinal cord involvement in dengue virus infection. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 442, n. 5, p. 472–481, 2003.
- AQUINO, V. H. et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 4, p. 710–5, out. 2006.
- AYOUB, A. E.; SALM, A K. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 21, p. 7759–7766, 2003.
- BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**, p. 13, 2009.
- BALSITIS, S. J. et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 416–24, mar. 2009.
- BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–83, maio 2004.
- BEAUMIER, C. M. et al. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 4, p. 608–17, 15 fev. 2008.
- BEAUMIER, C. M. et al. Differential in vivo clearance and response to secondary heterologous infections by H2(b)-restricted dengue virus-specific CD8+ T cells. **Viral immunology**, v. 23, n. 5, p. 477–85, out. 2010.
- BECHMANN, I.; NITSCH, R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. **Glia**, v. 20, n. 2, p. 145–154, 1997.
- BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 3, p. 271–83, 16 set. 2010.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BIBER, K.; VINET, J.; BODDEKE, H. W. G. M. Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. **Journal of neuroimmunology**, v. 198, n. 1-2, p. 69–74, 31 jul. 2008.
- BINZEGGER, T. Axons in Cat Visual Cortex are Topologically Self-similar. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 2, p. 152–165, 2004.
- BITZER-QUINTERO, O. K.; GONZÁLEZ-BURGOS, I. Immune system in the brain: a modulatory role on dendritic spine morphophysiology? **Neural plasticity**, v. 2012, p.

348642, jan. 2012.

BLANK, T.; PRINZ, M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 62–70, jan. 2013.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57–69, jan. 2007.

BORNER, R. et al. Stereological analysis in the albino Swiss mice model Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease. n. September, p. 215–227, 2011.

BRITO, C. A. A. et al. Acute disseminated encephalomyelitis in classic dengue Encefalomielite disseminada aguda em dengue clássica. v. 40, n. 2, p. 236–238, 2007.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. v. 18, n. 10, 2015.

CARDONA, A. E. et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 917–24, jul. 2006.

CARLO, C. N.; STEVENS, C. F. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **The Journal of comparative neurology**, v. 519, n. 14, p. 2803–10, 1 out. 2011.

CASARRUBEA, M.; SORBERA, F.; CRESCIMANNO, G. Multivariate data handling in the study of rat behavior: an integrated approach. **Behavior research methods**, v. 41, n. 3, p. 772–81, ago. 2009.

CĂTĂLIN, B. et al. Microglia: first responders in the central nervous system. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 54, n. 3, p. 467–72, jan. 2013.

CHATURVEDI, U. C. et al. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. **J Gen Virol**, v. 72 (Pt 4), n. May, p. 859–866, 1991.

CHEE, S.-S. A.; MENARD, J. L. The histaminergic H1, H2, and H3 receptors of the lateral septum differentially mediate the anxiolytic-like effects of histamine on rats' defensive behaviors in the elevated plus maze and novelty-induced suppression of feeding paradigm. **Physiology & Behavior**, v. 116-117, p. 66–74, 2013.

CHEN, C.-J. et al. Glial activation involvement in neuronal death by Japanese encephalitis virus infection. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 4, p. 1028–37, abr. 2010.

CHEN, C.-J. et al. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF- α signaling and contributes to neuronal death. **Glia**, v. 60, n. 3, p. 487–501, mar. 2012.

CHEN, J.; NG, M. M.-L.; CHU, J. J. H. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005053, 2015.

CHIMELLI, L. et al. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. **Clinical neuropathology**, v. 9, n. 3, p. 157–162, 1990.

CORDEIRO, M. T. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco , 1995-2006 Dengue e febre hemorrágica do dengue no Estado de

Pernambuco , 1995-2006. v. 40, n. 6, p. 605–611, 2007.

COSTA, V. V. et al. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 6, p. 1950–61, jun. 2013.

COURAGEOT, M.-P.; CATTEAU, A.; DESPRÈS, P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. **Advances in virus research**, v. 60, p. 157–86, jan. 2003.

COVIAN, M. R.; ANTUNES RODRIGUES, J.; O'FLAHERTY, J. J. EFFECTS OF STIMULATION OF THE SEPTAL AREA UPON BLOOD PRESSURE AND RESPIRATION IN THE CAT. **Journal of neurophysiology**, v. 27, p. 394–407, maio 1964.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. Model organisms: The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 775–790, 2005.

CUNNINGHAM, C. et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 4, p. 490–502, maio 2007.

DA ROCHA, E. G. et al. Dendritic structure varies as a function of eccentricity in V1: A quantitative study of NADPH diaphorase neurons in the diurnal South American rodent agouti, *Dasyprocta prymnolopha*. **Neuroscience**, v. 216, p. 94–102, 2012.

DALEY, J. M. et al. The phenotype of murine wound macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 1, p. 59–67, jan. 2010.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 752–8, jun. 2005.

DE HAAS, A. H. et al. Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. **Molecular neurobiology**, v. 36, n. 2, p. 137–51, out. 2007.

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

DE MIRANDA, A. S. et al. Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice. **Behavioural brain research**, v. 230, n. 1, p. 237–42, 21 abr. 2012.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Three dimensional morphometric analyses of axon terminals early changes induced by methylmercury intoxication in the adult cat striate cortex. **Brain research**, v. 1244, p. 155–63, 9 dez. 2008.

DE SIQUEIRA MENDES, F. D. C. C. et al. Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. **BMC Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 63, 2013.

DE SOUSA, A. A. et al. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. e15597, jan. 2011.

DE SOUSA, A. A. et al. Three-dimensional morphometric analysis of microglial changes in a mouse model of virus encephalitis: age and environmental influences.

European Journal of Neuroscience, v. 42, n. 4, p. 2036–2050, 2015.

DEGROOT, A.; KASHLUBA, S.; TREIT, D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, n. 3-4, p. 391–399, jul. 2001.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Research**, v. 1001, n. 1-2, p. 60–71, 2004.

DESPRES, P. et al. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **J Virol**, v. 72, n. 1, p. 823–829, 1998.

DINIZ, D. G. et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. April, p. 509–519, 2010.

DINIZ, D. G. et al. Environmental influences on antibody-enhanced dengue disease outcomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1021–9, dez. 2012.

DINIZ, D. G. et al. Aging and environmental enrichment exacerbate inflammatory response on antibody-enhanced dengue disease in immunocompetent murine model. **European Journal of Inflammation**, v. 13, n. 3, p. 719-732, 2013.

DINIZ, D. G. et al. Hierarchical Cluster Analysis of Three-Dimensional Reconstructions of Unbiased Sampled Microglia Shows not Continuous Morphological Changes from Stage 1 to 2 after Multiple Dengue Infections in *Callithrix penicillata*. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 10, p. 23, 22 jan. 2016.

DOMINGUES, R. B. et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Journal of the neurological sciences**, v. 267, n. 1-2, p. 36–40, 15 abr. 2008.

ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, n. 5-6, p. 365–374, 2007.

EYO, U. B.; DAILEY, M. E. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 494–509, 2013.

FAUCI, A. S. Emerging and reemerging infectious diseases: the perpetual challenge. **Academic medicine : journal of the Association of American Medical Colleges**, v. 80, n. 12, p. 1079–85, dez. 2005.

FITZNER, D. et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 3, p. 447–58, 1 fev. 2011.

FONTAINHAS, A. M. et al. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e15973, jan. 2011.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 1–8, 2006.

FRANCIS, D. D. et al. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **The Journal of neuroscience**, v. 22, n. 18, p. 7840–

3, 2002.

FRASER, K. A. et al. Role of the medial and lateral septum in a variable goal spatial problem solving task. **Physiology and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 739–744, 1991.

FREUND, T. F.; ANTAL, M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. **Nature**, v. 336, n. 6195, p. 170–3, 10 nov. 1988.

GAYKEMA, R. P. A. PATI ' ERNS OF DIRECT PROJECTIONS FROM THE HIPPOCAMPUS TO THE MEDIAL S E P T U M - D I A G O N A L B A N D COMPLEX : A N T E R O G R A D E TRACING WITH PHASEOL US VULGARIS LEUCOAGGLUTININ COMBINED WITH IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF CHOLINE ACETYLTRANSFERASE. v. 43, n. 2, p. 349–360, 1991.

GERTIG, U.; HANISCH, U.-K. Microglial diversity by responses and responders. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. April, p. 101, 2014.

GHOSHAL, A. et al. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 483–496, 2007.

GIBNEY, S. M. et al. Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 28, p. 170–181, 2013.

GOLDER, P.; YEOMANS, K. The use of cluster analysis for stratification. **Applied Statistics**, v. 22, n. 2, p. 213–219, 1973.

GOMES-LEAL, W. et al. Computer-assisted morphometric analysis of intrinsic axon terminals in the supragranular layers of cat striate cortex. **Anatomy and Embryology**, v. 205, n. 4, p. 291–300, 2002.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 429–436, 2006.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545–552, 2004.

GRUTZENDLER, J.; KASTHURI, N.; GAN, W.-B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 812–816, 2002.

GUABIRABA, R. et al. IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. **European journal of immunology**, v. 43, n. 6, p. 1529–44, jun. 2013.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue : an update. v. 2, n. January, p. 33–42, 2002.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiological reviews**, v. 88, p. 1183–1241, 2008.

HANISCH, U.-K. Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 65, jan. 2013.

HANISCH, U.-K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387–94, nov. 2007.

HASHIOKA, S. et al. Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. **Experimental neurology**, v. 206, n. 1, p. 33–42,

jul. 2007.

HIRASE, H.; SHINOHARA, Y. Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment. **Neuroscience**, v. 280, p. 282–98, 7 nov. 2014.

HIRRLINGER, J.; HULSMANN, S.; KIRCHHOFF, F. Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 2235–2239, 2004.

HODGE, C. W. et al. Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase C ϵ . **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 1003–1010, 2002.

HOEK, R. M. et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5497, p. 1768–71, 1 dez. 2000.

HOLDSTOCK, T. L. Effects of septal stimulation in rats on heart rate and galvanic skin response. **Psychonomic Science**, v. 9, n. 1, p. 37–38, 4 nov. 2013.

JACK, C. S. et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 7, p. 4320–30, 1 out. 2005.

JAFFARD, R. et al. Long-term potentiation and long-term depression in the lateral septum in spatial working and reference memory. **Journal of physiology, Paris**, v. 90, n. 5-6, p. 339–41, 1996.

KARPERIEN, A.; AHAMMER, H.; JELINEK, H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. January, p. 1–18, 2013.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of Microglia. p. 461–553, 2011a.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 461–553, abr. 2011b.

KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron**, v. 77, n. 1, p. 10–8, 9 jan. 2013.

KHAKPAI, F. et al. Septo-Hippocampo-Septal Loop and Memory Formation. v. 4, n. 1, p. 5–23, 2013a.

KHAKPAI, F. et al. Mini review : THE ROLE OF GLUTAMATERGIC PATHWAY BETWEEN SEPTUM AND HIPPOCAMPUS IN THE MEMORY FORMATION. p. 41–51, 2013b.

KIM, S. U.; DE VELLIS, J. Microglia in health and disease. **Journal of neuroscience research**, v. 81, n. 3, p. 302–13, 1 ago. 2005.

KISS, J. et al. Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. **Neuroscience**, v. 36, n. 1, p. 61–72, jan. 1990.

KJELSTRUP, K. G. et al. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10825–30, 2002.

KLOSS, C. U. et al. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. **Experimental neurology**, v. 168, n. 1, p. 32–46, 2001.

- KOLB, H. et al. Are there three types of horizontal cell in the human retina? **The Journal of Comparative Neurology**, v. 343, n. 3, p. 370–386, 1994.
- KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 22, p. 2007–2009, jan. 2008.
- KOO, J. W. et al. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2669–2674, 2010.
- KOZOROVITSKIY, Y.; GOULD, E. Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 30, p. 6755–6759, 2004.
- KREISEL, T. et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 699–709, 2014.
- LANE, A. E. et al. Sensory processing subtypes in autism: association with adaptive behavior. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 40, n. 1, p. 112–22, jan. 2010.
- LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 193–207, 2002.
- LAVIOLA, G. et al. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. **Neurobiology of disease**, v. 31, n. 2, p. 159–68, 2008.
- LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–70, 1990a.
- LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990b.
- LEDOUX, J. E. Emotional Circuits in the Brain. **New York**, p. 155–184, 2000.
- LERANTH, C. et al. The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. **Neuroscience**, v. 88, n. 3, p. 701–18, jan. 1999.
- LIVNEH, U.; PAZ, R. Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. **Neuron**, v. 75, n. 1, p. 133–142, 2012.
- LÚCIA, M.; FERREIRA, B.; CAVALCANTI, C. G. MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS DE DENGUE Estudo de 41 casos. v. 63, p. 488–493, 2005.
- LUM, L. C. et al. Dengue encephalitis: a true entity? **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 3, p. 256–9, mar. 1996.
- MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. T cell responses in dengue viral infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 4, p. 605–611, out. 2013.
- MARCHIORI, E. et al. Pulmonary hemorrhage syndrome associated with dengue fever, high-resolution computed tomography findings: a case report. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 4, p. 8, jan. 2009.
- MARIANNEAU, P. et al. Apoptotic cell death in response to dengue virus infection: the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. **Clinical and diagnostic virology**, v. 10, n. 2-3, p. 113–119, 1998.

- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–81, out. 2009.
- MARTINEZ, F. O. et al. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 10, p. 7303–11, 15 nov. 2006.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological reviews**, v. 225, p. 300–13, out. 2008.
- MCCLUSKEY, L. P.; LAMPSON, L. A. Local immune regulation in the central nervous system by substance P vs. glutamate. **Journal of Neuroimmunology**, v. 116, n. 2, p. 136–146, 1 jun. 2001.
- MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 257–332, 1998.
- MENARD, J.; TREIT, D. Does tolerance develop to the anxiolytic effects of septal lesions? **Physiology & behavior**, v. 59, n. 2, p. 311–18, fev. 1996a.
- MENARD, J.; TREIT, D. Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. **Physiology & behavior**, v. 60, n. 3, p. 845–53, set. 1996b.
- MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 4, p. 591–613, mar. 1999.
- MÉNDEZ-LÓPEZ, M. et al. Spatial working memory in Wistar rats: brain sex differences in metabolic activity. **Brain research bulletin**, v. 79, n. 3-4, p. 187–92, 2009.
- MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, v. 16, n. 4, p. 204–208, 1997.
- MIKITA, J. et al. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)**, v. 17, n. 1, p. 2–15, jan. 2011.
- MIYAMOTO, A. et al. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. May, p. 70, jan. 2013.
- MO, C.; RENOIR, T.; HANNAN, A. J. What's wrong with my mouse cage? Methodological considerations for modeling lifestyle factors and gene–environment interactions in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, 2015.
- MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921–927, 2003.
- MORENS, D. M., FOLKERS, G. K., & FAUCI, A. S. Emerging infections : a perpetual challenge. v. 8, n. 11, p. 710–719, 2009.
- MORRISON, H. W.; FILOSA, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia

morphology during ischemic stroke and reperfusion. **Journal of neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 4, 2013.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–69, dez. 2008.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–37, nov. 2011.

NAUMANN, T.; LINKE, R.; FROTSCHER, M. Fine structure of rat septohippocampal neurons: I. Identification of septohippocampal projection neurons by retrograde tracing combined with electron microscopic immunocytochemistry and intracellular staining. **The Journal of comparative neurology**, v. 325, n. 2, p. 207–18, 8 nov. 1992.

NEMETH, C. L. et al. Microglial activation occurs in the absence of anxiety-like behavior following microembolic stroke in female, but not male, rats. **J Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 174, 2014.

NIEWIADOMSKA, G.; BAKSALERSKA-PAZERA, M.; RIEDEL, G. The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. **Progress in neuro-psycho-pharmacology & biological psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 791–805, 1 ago. 2009.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5726, p. 1314–8, 27 maio 2005.

OCHSNER, K. N. et al. Rethinking feelings: an fMRI study of the cognitive regulation of emotion. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 14, n. 8, p. 1215–29, 2002.

OKADA, K.; OKAICHI, H. Functional cooperation between the hippocampal subregions and the medial septum in unreinforced and reinforced spatial memory tasks. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 2, p. 295–304, 19 jun. 2010.

PAES, M. V et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. **Virology**, v. 338, n. 2, p. 236–46, 1 ago. 2005.

PANNELL, M. et al. The subpopulation of microglia sensitive to neurotransmitters/neurohormones is modulated by stimulation with LPS, interferon- γ , and IL-4. **Glia**, v. 62, n. 5, p. 667–79, maio 2014.

PAWITAN, J. A. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. **Acta medica Indonesiana**, v. 43, n. 2, p. 129–35, abr. 2011.

PESOLD, C.; TREIT, D. Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and the shock-probe burying tests. **Physiology & Behavior**, v. 52, n. 1, p. 37–47, jul. 1992.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–70, abr. 2009.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 119–145, 2009.

REICHENBERG, A. et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. **Archives of general psychiatry**, v. 58, n. 5, p. 445–52, maio 2001.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Current**

topics in microbiology and immunology, v. 338, p. 45–55, 2010.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1484–1486, 1996.

ROCHA, E. G. et al. Callosal axon arbors in the limb representations of the somatosensory cortex (SI) in the agouti (*Dasyprocta prinnolopha*). **The Journal of comparative neurology**, v. 500, n. 2, p. 255–266, 2007.

ROCK, R. B. et al. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. v. 17, n. 4, p. 942–964, 2004.

RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 289–313, 2009.

ROTHMAN, A. L. T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171 Suppl, p. E36–41, set. 2009.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus : a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011.

ROY, V. et al. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 3, p. 313–20, 2001.

SCHAFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 24–36, jan. 2013.

SCHEFFEL, J. et al. Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. **Glia**, v. 60, n. 12, p. 1930–43, dez. 2012.

SCHLOESSER, R. J. et al. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1152–63, 2010.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169–191, 2010.

SNYDER, J. S. et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 458–461, 2011.

SOARES, C. N. et al. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **Journal of the neurological sciences**, v. 249, n. 1, p. 19–24, 1 nov. 2006.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563–581, 1999.

SUN, P.; KOCHER, T. J. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 843469, jan. 2013.

SWARUP, V. et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain mediated neuronal death contributes to the glial activation and subsequent neuroinflammation in Japanese encephalitis. **Neurochemistry international**, v. 52,

n. 7, p. 1310–21, jun. 2008.

TAKAMURA, Y. et al. Spatial firing properties of lateral septal neurons. **Hippocampus**, v. 16, n. 8, p. 635–44, jan. 2006.

THOMAS, E. et al. Single unit activity in the lateral septum and central nucleus of the amygdala in the elevated plus-maze: A model of exposure therapy? **Neuroscience Letters**, v. 548, p. 269–274, 2013.

THOMAS, E.; GUNTON, D. J. Kindling of the lateral septum and the amygdala: Effects on anxiety in rats. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 5, p. 653–658, 2011.

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial “activation” continuum: from innate to adaptive responses. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, p. 24, 31 out. 2005.

TREIT, D.; PESOLD, C. Septal lesions inhibit fear reactions in two animal models of anxiolytic drug action. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 2, p. 365–71, fev. 1990.

TREIT, D.; PESOLD, C.; ROTZINGER, S. Noninteractive effects of diazepam and amygdaloid lesions in two animal models of anxiety. **Behavioral neuroscience**, v. 107, n. 6, p. 1099–105, dez. 1993.

TREMBLAY, M.-È. et al. The role of microglia in the healthy brain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16064–9, 9 nov. 2011.

TREMBLAY, M.-È.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS biology**, v. 8, n. 11, p. e1000527, 11 jan. 2010.

TRENT, N. L.; MENARD, J. L. The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats’ open-arm exploration in the elevated plus-maze. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 1, p. 141–52, 4 ago. 2010.

TURIEL, M. C. P. Encefalite viral induzida pelo vírus da dengue em camundongos suíços albinos: a resposta inflamatória no sistema nervoso central do hospedeiro neonata. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 2011.

VALEROL, N. et al. [Increase of interleukin-1 beta, gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in serum and brain of mice infected with the Venezuelan Equine Encephalitis virus]. **Invest Clin**, v. 49, n. 4, p. 457–467, 2008.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. December, p. 191–198, 2000.

VAN ROSSUM, D. et al. Myelin-phagocytosing macrophages in isolated sciatic and optic nerves reveal a unique reactive phenotype. **Glia**, v. 56, n. 3, p. 271–83, fev. 2008.

VARATHARAJ, A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. **Neurology India**, v. 58, n. 4, p. 585–591, 2010.

VASCONCELOS, B. C. B. et al. Antibody-enhanced dengue disease generates a marked CNS inflammatory response in the black-tufted marmoset *Callitrix penicillata*. **Neuropathology**, p. 3–16, 2015.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 2–9, jan. 2000.

- VELANDIA-ROMERO, M. L.; ACOSTA-LOSADA, O.; CASTELLANOS, J. E. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. **Journal of neurovirology**, v. 18, n. 5, p. 374–87, out. 2012.
- VIANA, L. C. et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v. 238, p. 280–96, 15 maio 2013.
- VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 1, p. 17–21, jan. 2005.
- WAKE, H. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 3974–80, 1 abr. 2009.
- WAKE, H. et al. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 209–17, abr. 2013.
- WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. **Neuron glia biology**, v. 7, n. 1, p. 47–53, 2011.
- WEBER, M. S. et al. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. **Nature medicine**, v. 13, n. 8, p. 935–43, ago. 2007.
- WILDER-SMITH, A. et al. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Global health action**, v. 5, jan. 2012.
- WU, L.-J. et al. Increased Anxiety-Like Behavior and Enhanced Synaptic Efficacy in the Amygdala of GluR5 Knockout Mice. **PLoS ONE**, v. 2, n. 1, p. e167, 2007.
- WU, L.-J.; ZHUO, M. Resting microglial motility is independent of synaptic plasticity in mammalian brain. **Journal of neurophysiology**, v. 99, n. 4, p. 2026–32, abr. 2008.
- YADIN, E.; THOMAS, E. Stimulation of the lateral septum attenuates immobilization-induced stress ulcers. **Physiology and Behavior**, v. 59, n. 4-5, p. 883–886, 1996.
- YAMADA, J.; JINNO, S. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 5, p. 1184–1201, 2013.
- YIRMIYA, R. et al. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 531–44, maio 2001.
- ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J.; ALERTS, E. This information is current as of December 26, 2013. 2013.
- ZARRINDAST, M.-R. et al. Histaminergic system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviour in rats. **European journal of pharmacology**, v. 583, n. 1, p. 108–14, 31 mar. 2008.
- ZHOU, T. L. et al. Comparison of medial and lateral septal neuron activity during performance of spatial tasks in rats. **Hippocampus**, v. 9, n. 3, p. 220–34, 1999.
- ZIELASEK, J.; HARTUNG, H.-P. Molecular mechanisms of microglial activation. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, n. 2, p. 191–222, 1996.

Anexo I: Comitê de ética em pesquisa

**PARECER 221-14**

Projeto: Alterações Comportamentais, Histopatológicas e da Morfologia Microglial Induzidas por Inoculação Sequencial de VDEN1 e VDEN4 em Modelo Murino

Coordenador: Prof. Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes

Área Temática: Neurociências

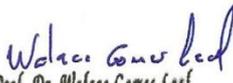
Vigência: 04/2014 a 05/2016

Nº no CEPAE-UFGA: 221-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1032/2014 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (camundongos, N=80) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de maio de 2014


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFGA

Anexo II: Dados obtidos a partir da análise discriminante para os grupos experimentais adotados no presente trabalho.

	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
AP NI						
Complexidade	0.194583	0.515069	49.42806	0.000000	0.120771	0.879229
Volume do <i>Convex-hull</i> (μm^3)	0.122798	0.816167	11.82511	0.000023	0.455354	0.544647
Comprimento médio dos segmentos (μm)	0.107366	0.933483	3.74098	0.026952	0.088625	0.911375
Densidade de segmentos	0.109481	0.915447	4.84906	0.009677	0.191418	0.808582
Comprimento total dos segmentos (μm)	0.115730	0.866017	8.12238	0.000525	0.138466	0.861534
Nº de árvores	0.107045	0.936275	3.57330	0.031526	0.132115	0.867885
AP D1						
Complexidade	0.067739	0.424125	4.616.508	0	0.407181	0.592819
K-dim	0.032393	0.886913	433.521	0.006423	0.345297	0.654703
Comprimento médio dos segmentos (μm)	0.031676	0.90698	348.705	0.018507	0.171516	0.828484
Densidade de segmentos	0.031654	0.907608	346.110	0.019118	0.054365	0.945635
Superfície do <i>Convex-hull</i> (μm^2)	0.031826	0.902702	366.472	0.014818	0.346685	0.653315

AP D1D4						
Complexidade	0.055766	0.464289	33.84577	0.000000	0.307773	0.692227
Comprimento total dos segmentos (μm)	0.030843	0.839449	5.61022	0.001445	0.022758	0.977242
Densidade	0.030448	0.850346	5.16242	0.002471	0.064594	0.935406
Volume do <i>Convex-hull</i> (μm^3)	0.031130	0.831705	5.93558	0.000981	0.450866	0.549134
AP D1D4AD3						
Complexidade	0.109193	0.340993	65.70872	0.000000	0.299575	0.700425
Nº de árvores	0.042232	0.881667	4.56330	0.004840	0.186295	0.813706
Nº de segmentos	0.042055	0.885362	4.40237	0.005909	0.037105	0.962896
Comprimento médio dos segmentos (μm)	0.041478	0.897688	3.87507	0.011393	0.214770	0.785230
Nº de árvores	0.042232	0.881667	4.56330	0.004840	0.186295	0.813706
Área do soma (μm^2)	0.041809	0.890577	4.17751	0.007815	0.288960	0.711040
Feret Min do soma (μm)	0.041302	0.901517	3.71419	0.013929	0.276392	0.723608
AE NI						
Complexidade	0.107917	0.527286	36.75673	0.000000	0.257047	0.742953
Nº de segmentos	0.064393	0.883691	5.39633	0.006285	0.185860	0.814140

Vertex	0.062104	0.916259	3.74715	0.027718	0.952010	0.047990
Nº de árvores	0.061289	0.928448	3.15972	0.047650	0.156450	0.843550
AE D1						
Complexidade	0.119490	0.550084	42.53094	0.000000	0.290073	0.709927
Comprimento médio dos segmentos (μm)	0.090780	0.724055	19.81773	0.000000	0.323734	0.676266
Nº de espinhas	0.071390	0.920714	4.47792	0.013630	0.707826	0.292174
Densidade	0.074352	0.884033	6.82134	0.001646	0.203541	0.796459
Superfície do <i>Convex-hull</i> (μm^2)	0.069902	0.940313	3.30076	0.040753	0.396397	0.603603
AP D1D4						
Complexidade	0.180145	0.526155	44.12845	0.000000	0.224021	0.775979
Comprimento médio dos segmentos (μm)	0.115063	0.823763	10.48315	0.000075	0.299930	0.700070
AP D1D4AD3						
Complexidade	0.170764	0.540116	45.97853	0.000000	0.148676	0.851324
Volume do <i>Convex-hull</i> (μm^3)	0.110857	0.831991	10.90455	0.000049	0.444223	0.555777
Nº de segmentos	0.101500	0.908698	5.42572	0.005684	0.103729	0.896271
K-dim	0.098462	0.936731	3.64727	0.029323	0.429335	0.570666