

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

RHAMON RIBEIRO DA COSTA

**MODELO DE NEUROTUBERCULOSE EXPERIMENTAL COM CEPA
H37RV**

ARACAJU

2019

RHAMON RIBEIRO DA COSTA



Universidade Federal de Sergipe

**MODELO DE NEUROTUBERCULOSE EXPERIMENTAL COM CEPA
H37RV**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para graduação em Medicina sob orientação da Professora Dr.^a Ângela Maria da Silva e co-orientação da Dr.^a Patrícia Rodrigues Marques de Souza.

ARACAJU

2019

RHAMON RIBEIRO DA COSTA

**MODELO DE NEUROTUBERCULOSE EXPERIMENTAL COM CEPA
H37RV**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para graduação em Medicina sob orientação da Professora Dr.^a Ângela Maria da Silva e co-orientação da Dr.^a Patrícia Rodrigues Marques de Souza.

Aprovado em: 04 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria da Silva

Avaliador

Avaliador

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, à Deus que abraçou esse sonho junto comigo, e neste caminho tem trabalhado com uma precisão que só Ele é capaz. Pois sempre sinto que estou no momento certo, no lugar certa, rodeado das melhores pessoas, com o preparo adequado e com a vontade para dar o melhor de mim. Tenho certeza Pai que nenhum passo foi dado sozinho até aqui, nenhum.

À minha família maravilhosa que é formada pela mais inusitada mistura de personalidades possíveis. E nesse exato momento, o que sinto, é que cada um contribui do seu jeito para que eu chegasse até aqui. Minha mãe com seus pulsos firmes me ensinou que a disciplina é necessária e imprescindível. Com meu pai aprendi que estudar é melhor o caminho, e que sempre haverá um jeito de se destacar. Sem vocês nada seria possível...minha base, meus alicerces, meu caráter, obrigado pela melhor educação que alguém poderia ter. Grato também aos meus avós que me apresentaram a esse amor que mimma. Às tias e tios que me lapidaram com afeto e generosidade imensuráveis.

À minha grande parceira, que transcende todos os limites que o amor entre irmãos pode proporcionar. Não sei como, mas você é mais! Mais que companheira, mais que amiga, mais que confidente. Você é uma das pessoas que mais tornou esse sonho possível. Me lembro de você, logo após minha aprovação, dizendo “a gente vai dar um jeito”. E foi assim durante todo o curso, com você “dando o jeito” de me deixar mais confortável, tranquilo e conseguindo focar no que eu vim fazer aqui. Não tem um dia em que você não se fez presente aqui comigo. Ainda bem, porque sem você eu não teria nem razão de ser. Porque eu sei que juntos, nós podemos tudo! E assim tem sido, e assim continuará sendo. Eu te amo muito, garota.

À minha grande família sergipana, que eu posso chamar assim com muita certeza do significado e da importância que a palavra merece. Porque é exatamente assim que eu me sinto com vocês, em casa. E como isso fez a diferença! Além dos afetos trocados e de momentos tão íntimos compartilhados, vocês me deram suporte em momentos reais de sufoco. Pois não é fácil estar doente longe de todos, nem muito menos fazer uma cirurgia ortopédica. E vocês estava lá, com um sorriso no rosto e com muito carinho e atenção a oferecer. Digo com o peito estufado de orgulho que eu tenho uma casa em Itabaiana e em N. S. da Glória. É para onde eu corro quando algo dá muito errado, ou muito certo. É com vocês que eu quero estar. Não sei onde se originou essa empatia toda, mas sei que ela é para sempre e estarão comigo aonde eu for. Obrigado a

todos, em especial: Maria, Ninho, Menininha, Gilvânia e Prazeres, vocês são anjos de Deus nesta terra! Estão no meu coração.

Aos meus amigos que me suportam em amor, mesmo com meu lado ariano de ser. Vocês foram essenciais nessa caminhada. Sei que muitas vezes fui o chato CDF que fica falando da medicina ou da pesquisa, enfim. Mas sem o apoio diário de vocês, sem os desabafos, sem as comemorações e confraternizações, seria tudo no mínimo enfadonho. David, Lívio e Jaédson, vocês foram presentes que a universidade me deu e que hoje fazem parte de mim. Obrigado por tudo, de verdade. David por acreditar tão fortemente que eu sou muito inteligente e competente, isso me faz acreditar também. Lívio por ser um exemplo em engajamento científico, pois é o único que consegue enviar 19 resumos de um mesmo projeto, e que bom que compartilhamos apresentações juntos. E Jájá por conseguir me fazer rir e me divertir com as situações, por mais pesada que elas pareçam, além do mais compartilhamos os mesmos medos, ansiedade e inseguranças, por que não rir disso né? Enfim, amo vocês.

Finalmente à Prof^a Patrícia, que neste tempo todo foi mais do que mais do que uma docente, por toda sua acessibilidade e compreensão. Obrigado por acreditar em mim, e por confiar no meu trabalho nesses anos de iniciação científica. Aprendi muito com você, e te admiro demais como mulher, mãe, pessoa. À Prof^a Ângela por encarar o convite de participar deste trabalho, sem hesitar. À doutoranda e grande amiga Camillinha, que teve toda a paciência de ensinar este estudante que mal sabia focar um microscópio. Você é Luz, e fez meus dias de laboratório serem tão leves quanto esses olhos azuis. Gratidão!

A estes, e a tantos outros não citados, meu muito obrigado por terem colaborado com este momento!

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
BAAR	bacilo ácido-álcool resistente
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BHE	barreira hematoencefálica
CFU	<i>Colony-forming units</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HE	hematoxilina e eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IL	interleucina
LCR	líquido cefalorraquidiano
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NTB	neurotuberculose
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polimerase chain reaction</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC	sistema nervoso central
TB	tuberculose
TBEP	tuberculose extrapulmonar
TGF	<i>transforming growth factor</i>

TLR	<i>toll-like receptors</i>
UFS	Universidade Federal de Sergipe
USP	Universidade de São Paulo
ZN	Ziehl Neelsen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Secção cerebral mostrando os ventrículos cerebrais ocupados por corante	37
Figura 2 – Caracterização morfológica do pulmão do grupo controle	41
Figura 3 – Caracterização morfológica de cérebro do grupo controle	42
Figura 4 – Caracterização morfológica de pulmão do grupo de infecção intratraqueal	43
Figura 5 – Caracterização morfológica de cérebro do grupo de infecção intratraqueal	44
Figura 6 – Caracterização morfológica de cérebro infectado via intracerebroventricular	45
Figura 7 – Evidência do bacilo em cérebro de grupo infectado via intracerebroventricular ..	46

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	9
2 NORMAS DE PUBLICAÇÃO	19
3 ARTIGO ORIGINAL	32
3.1 Resumo	33
3.2 Introdução	34
3.3 Material e métodos	35
<i>3.3.1 Animais e questões éticas</i>	<i>35</i>
<i>3.3.2 Delineamento experimental</i>	<i>35</i>
<i>3.3.3 Infecção induzida por estereotaxia</i>	<i>35</i>
<i>3.3.4 Infecção pulmonar</i>	<i>37</i>
<i>3.3.5 Coleta de tecidos</i>	<i>38</i>
<i>3.3.6 Processamento tecidual</i>	<i>38</i>
<i>3.3.7 Microtomia</i>	<i>38</i>
<i>3.3.8 Análise morfológica</i>	<i>39</i>
<i>3.3.9 Descartes</i>	<i>39</i>
<i>3.3.10 Aquisição e análise das imagens</i>	<i>40</i>
3.4 Resultados	40
3.5 Discussão	47
3.6 Agradecimentos	49
3.7 Conflitos de interesse	49
3.8 Referências	49

ANEXO A – Processamento tecidual de cérebro

ANEXO B – Processamento tecidual de pulmão

ANEXO C – Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina

ANEXO D – Protocolo de coloração Ziehl-Neelsen

1 REVISÃO DA LITERATURA

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa difundida mundialmente, e os registros do seu surgimento e impacto se confundem com a história da humanidade. Daniel em 2006, afirmou que “o *Mycobacterium tuberculosis*” pode ter matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano”. Há hipóteses de que o gênero *Mycobacterium* tenha se originado há mais de 150 milhões de anos atrás. (HAYMAN, 1984), contudo, graças aos avanços tecnológicos atuais, baseados em genética molecular e sequenciamento de genoma, tem sido possível datação mais coerente acerca da evolução deste gênero (DANIEL, 2006). Sreevatsan et al. descobriram que o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) surgiu de um ancestral comum há cerca de 15.000 – 20.000 anos atrás.

Muitos pesquisadores já relataram seus achados de tuberculose em múmias egípcias, sendo que a mais antiga ultrapassa os 5.000 anos de idade (CRUBEZY et al, 1998). Entre os achados, tem-se destruições de sínfises vertebrais (mal de Pott) (CAVE, 1939), lesões pleuropulmonares e sangue na traquéia (ROSEMBERG, 1999), além de evidência da micobactéria em amostras teciduais analisadas por técnicas de amplificação de DNA por PCR (NERLICH et al, 1998) (CRUBEZY et al, 1998).

Os registros mais antigos descrevendo a doença ocorreram há 3.300 anos na Índia, e há 2.300 anos na China. E ao longo dos séculos cientistas de vários países descreveram a doença e seus achados, publicaram suas experiências terapêuticas e especularam quanto à etiologia da doença, que se dividia entre hereditária e infecciosa (DANIEL, 2006). Em 1882 Hermann Heinrich Robert Koch apresentou em “*Die Aetiologie der Tuberculose*” o *Mycobacterium tuberculosis* como o agente etiológico da doença (KOCH, 1932), sendo premiado por este feito em 1905 com o Prêmio Nobel em Medicina ou Fisiologia (BARBERIS et al, 2017).

Esta descoberta foi o início da modificação da história natural de uma doença pandêmica, que assusta em suas proporções até os dias de hoje. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1,7 bilhões de pessoas (23% da população geral) possuem a infecção de forma latente, podendo ter a doença ativada em qualquer momento da vida. Em 2017, 10 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose, sendo 5,8 milhões de homens, 3,2 milhões de mulheres e 1 milhão de crianças. (OMS, 2018).

Além da alta incidência, os números também nos mostram porque a doença está entre as 10 principais causas de morte no mundo, ficando inclusive acima da HIV/AIDS, como principal causa de morte por um único agente infeccioso. Em 2017, causou a morte de 1,3 milhões de pessoas não infectadas pelo HIV, e de mais 300.000 pessoas infectadas pelo HIV (OMS, 2018).

No cenário brasileiro, 86.858 casos de TB foram notificados no ano de 2017, sendo destes 87% por infecção pulmonar, e 78% (61.829) sabidamente HIV positivos. Neste mesmo ano a infecção resultou no óbito de 5.100 indivíduos não infectados pelo HIV, e de mais 1.900 co-infectados com HIV. Lamentavelmente estes dados mantêm o Brasil entre os 20 países com maior incidência de tuberculose no mundo, e também entre os 20 países de maior incidência da co-infecção de tuberculose com HIV (OMS, 2018).

Um grande estudo epidemiológico, realizado por pesquisadores da Universidade Federal do Espírito Santo em 2014, analisou o banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) quanto à situação da tuberculose no país. Entre o ano de 2007 e 2011 foram notificados 428.039 casos, sendo 13,37% apresentaram formas extrapulmonares, dos quais, 5,4% possuíam a forma meníngea da doença. (GOMES et al, 2014).

No estado de Sergipe, entre os anos de 2007-2016, 5788 casos foram notificados, e 407 morreram por tuberculose. Do número de casos totalizados, somente 62,1% dos indivíduos foram submetidos à testagem do HIV, e 284 pessoas estavam co-infectadas, mostrando que o estado ainda falha em buscar e notificar casos de co-infecção TB-HIV. Os dados se concentram na região de Aracaju, somando 46,7% do total (SERGIPE, 2017). No ano de 2016 foram notificados 659 casos novos, sendo 88,9% por tuberculose pulmonar, e 11% nas formas extrapulmonares (BRASIL, 2018).

Diante da situação epidemiológica é importante a eficaz imunização contra a TB. O Programa Nacional de Imunizações utiliza a BCG (Bacillus Calmette-Guérin) para a imunização contra a TB, em dose única e preferencialmente nas primeiras 12 horas de vida (BRASIL, 2014). Porém devido ao longo tempo de utilização desta, desde 1921, e por não ser derivada do agente patogênico da TB em humanos, o MTB apresenta resistência medicamentosa. Ainda assim, a BCG oferece proteção de 0% a 60% das crianças da forma grave da TB – TB miliar e meníngea (LOWRIE e SILVA, 2000).

Alguns fatores estão associados à dificuldade do controle mundial da TB, tais como: a desigualdade social, aumento da faixa etária populacional, o aumento das migrações e o

surgimento da AIDS. Diversas doenças infecciosas oportunistas, incluindo a TB, afetaram gravemente os pacientes imunocomprometidos (DOMINGUES et al, 2002), retomando a tuberculose ao rol de doenças desafiadoras dos tempos atuais e um dos problemas de saúde pública mundial (MUSELLIN et al, 2005). Enfim, esse novo contexto reforça a importância do conhecimento aprofundado do agente etiológico, da sua interação com o hospedeiro e a resposta imunológica desencadeada.

O *Mycobacterium tuberculosis* possui entre as principais características: formato de bastonete, imobilidade e capacidade de sobreviver no interior de células fagocitárias, sendo classificado então como patógeno intracelular facultativo e aeróbico obrigatório estrito. A transmissão ocorre quando o paciente com a forma pulmonar ativa de TB (bacilífero) tosse, espirra ou fala lançando no ar bacilos em partículas de aerossóis. Essas gotículas contêm cerca de 1 a 10 bacilos que atingem os alvéolos pulmonares (MOUTINHO, 2011).

Grande parte das pessoas infectadas (80 a 90%) consegue eliminar o bacilo sem manifestações clínicas da TB. Outros indivíduos infectados possuem um equilíbrio entre a virulência do Mtb e a ativação da resposta imunológica do hospedeiro (inata e adquirida), mantendo a TB de forma latente, permitindo que o patógeno permaneça vivo no granuloma formado (KAUFMANN e DORHOI, 2013).

A principal resposta imunológica contra o Mtb é a fagocitose, promovida pela interação entre proteínas e derivados lipídicos do Mtb, com os receptores de superfície celular de fagócitos (principalmente *Toll-Like receptor 2* – TLR2) (SALGAME, 2005) (ABEL et al, 2002). A resposta inicial ocorre em macrófagos, buscando a eliminação do bacilo através da mudança de pH ácido, enzimas lesivas pela fusão do lisossoma com o fagossoma e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KAUFMANN e DORHOI, 2013), (YUK e JO, 2014), (RUSSEL, 2003).

A resposta pode ser falha devido aos vários mecanismos de escape da resposta imunológica induzida pelo Mtb, dentre eles podemos citar a produção da molécula ESAT-6, que inibe a produção de IL-12 e IFN- α . Isto interfere tanto na apoptose de macrófagos infectados, quanto na fusão do fagócito ao lisossomo. Favorecendo a sobrevivência e a multiplicação do bacilo no interior do fagócito (MOUTINHO, 2011).

Dentre as células envolvidas na resposta imunológica contra a TB, o linfócito TCD4+ desempenha papel crucial nessa resposta contra a bactéria (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). Através do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), as células apresentadoras de antígenos (APC's) como macrófagos e células dendríticas

apresentam antígenos do bacilo às células TCD4+, e também produzem citocinas inflamatórias (por exemplo: TNF- α , IL-12, IL-6, e IL1) que são capazes de recrutar neutrófilos e monócitos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Essa variedade de células e citocinas são importantes para a formação do chamado granuloma ou reação granulomatosa. Caracterizada pelo infiltrado de neutrófilos e monócitos, com grande quantidade de Linfócitos T e B que circundam o concentrado de macrófagos e células dendríticas infectados com bacilos, além da presença de fibroblastos. Em indivíduos imunossuprimidos ocorre a má formação do granuloma, permitindo que o bacilo infecte outros órgãos, tornando a TB miliar (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003).

Logo, a tuberculose também atinge outros órgãos através da corrente sanguínea, o que se denomina de tuberculose extrapulmonar (TBEP). A doença pode afetar gânglios, ossos, articulações, fígado, baço, pele e sistema nervoso central (SNC). E sabe-se que as formas extrapulmonares da tuberculose se desenvolvem em regiões/órgãos com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio (CAMPOS, 2006).

A TB no SNC é a forma mais grave de infecção pelo *M. tuberculosis* em humanos, afetando predominantemente crianças e co-infectados com TB-AIDS, levando ao óbito de 19,3% e 40%, respectivamente, e deixando sequelas neurológicas graves nos sobreviventes (VAN DER FLIER et al, 2004) (SINNER e TUNKEL, 2002) (WILKINSON et al, 2017). O termo Neurotuberculose (Ntb) se refere às várias possíveis formas de TB no SNC, seja ela intracraniana, como a meningite tuberculosa, ou espinhal, como a espinha de Pott. (GARG, 1999).

A fisiopatologia desta apresentação baseia-se inicialmente nos postulados de Rich e McCordok, que em 1933, através de suas autópsias, descreveram que pacientes em fase de bacteremia apresentavam um pequeno foco tuberculoso chamado de “foco de Rich”. Esta lesão que pode se localizar nas meninges (cerebral ou medular), região subpial ou na superfície subependimária, e permanecer latente por um longo período (BINI e ROGELIO, 2013). A ruptura deste foco seria responsável pela disseminação local caracterizada por meningite, formação do tuberculoma ou vasculopatias (WILKINSON et al, 2017).

O mecanismo que explique a ultrapassagem do bacilo pela barreira hematoencefálica (BHE) ainda não está bem esclarecido (BE et al, 2009). Contudo, sabe-se que após a invasão, o patógeno é fagocitado pela micróglia desencadeando a produção de citocinas, principalmente IFN- α , TNF- α , IL-1 e IL-6 (BINI e ROGELIO, 2013). Destes, o TNF- α tem papel crucial, pois estudos mostraram sua importância na formação do tuberculoma e na alteração de permeabilidade da BHE, possibilitando invasão e leucocitose líquórica (ROCK et

al, 2008). Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e TGF- β se elevam, ao que parece, para equilibrar a resposta inflamatória e, conseqüentemente, diminuir os danos teciduais causados (HERNANDEZ et al, 2010).

A doença possui apresentação clínica muito inespecífica que inclui sinais e sintomas meníngeos como: dor de cabeça, febre, vômito e rigidez de nuca (THWAITES et al, 2013). Paralisia de nervos cranianos, hemiparesias, paraparesias e convulsões são comuns, e aumentam a possibilidade de meningite por Mtb. (CHIN, 2014).

O diagnóstico baseia-se em detecção microbiológica, análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), exames de imagem, como ressonância magnética nuclear e tomografia computadorizada, e por promissoras análises moleculares por PCR (WILKINSON et al, 2017). Contudo os aspectos de imagem são os mais utilizados na prática clínica. Os principais achados são: realce meníngeo, hidrocefalia, exsudatos basais, infartos e tuberculomas (RAUT et al, 2013).

A OMS em seu *guideline* de 2010 recomenda como primeira linha de tratamento o uso por dois meses de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguidos por 10 meses de rifampicina e isoniazida (OMS, 2010). O uso de corticoesteróides de forma adjuvante é recomendado, pois reduz o risco de morte ou incapacidades por déficits neurológicos residuais (PRASAD e SINGH, 2008).

Importante enfatizar que há necessidade de desenvolvimentos científicos que elucidem melhor a NTB em seus aspectos etiopatogênicos, para que possibilitem futuros avanços em sua prevenção, diagnóstico e tratamento. Para tanto, os modelos animais experimentais são de grande valia.

O registro mais antigo na literatura de um modelo experimental em tuberculose meníngea data de 1916, conduzido pelo Dr^o C. R. Austrian no hospital Johns Hopkins, nos Estados Unidos. Na ocasião os pesquisadores injetavam bacilos no canal espinhal de coelhos. (EXPERIMENTAL..., 1916).

Ao longo do século outros modelos foram publicados, como o estudo de Caspar e Knox (1932) que injetaram bacilos em porquinhos-da-índia via cisterna magna. Já Feldman, Behar e Weber (1960), utilizaram a mesma técnica para infecção em coelhos. Em 1997, Bolin et al. decidiram inovar infectando porcos por três vias diferentes (venosa, traqueal e pelas tonsilas) que levou a formas disseminadas da doença, incluindo o SNC.

Tsenova e colaboradores produziram dois trabalhos em 1998 e 2002, nos quais induziram a NTB em coelhos injetando *Mycobacterium bovis* via cisterna magna. Wu et al (2000) foram pioneiros ao trabalhar com camundongos, os quais foram infectados com

Mycobacterium avium (isolado do sangue de pacientes com HIV/AIDS) utilizando a via intravenosa e intracerebral. Mazzolla et al. (2002) seguiram esta linha, porém infectaram seus camundongos com *Mycobacterium bovis* por via intracerebral.

Em 2007, Van Well e col. trabalharam com camundongos fêmeas, e nelas utilizaram a cepa H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis* via intracerebral. Hernandez et al. em 2010, manusearam a mesma cepa em camundongos machos albinos, e os infectaram por via intratraqueal. Enquanto Majeed, Radotra e Sharma (2016) retomaram com a infecção de seus camundongos por injeções intracerebrais. Mais recentemente, em 2016, Tucker e colaboradores mimetizaram a infecção no SNC pós-natal em crianças trabalhando com coelhos, nos quais foram injetados bacilos via subaracnóidea.

Com essa multiplicidade de trabalhos, fica explícita a variedade de tentativas em padronizar-se o modelo animal de neurotuberculose. Rock e colaboradores (2008) publicaram uma revisão acerca dos aspectos clínicos e patogênicos da tuberculose no SNC. Os autores discutiram os modelos experimentais da doença, e concluíram que os estudos em coelhos são indiscutivelmente os mais relevantes. Contudo, algumas avaliações imunológicas são indisponíveis para tal modelo, sugerindo que o desenvolvimento de estudos em camundongos seja, necessariamente, o mais adequado.

O presente estudo se propõe a desenvolver um modelo experimental de neurotuberculose em camundongos C57Bl/6 (*blacks*), através do estabelecimento de Ntb com a cepa virulenta H37Rv, e posterior avaliação do processo inflamatório desenvolvido pela mesma.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI S. **Imunologia Celular E Molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc, 2008.
- ABEL, B.; THIEBLEMONT, N.; QUESNIAUX, V.J.F.; BROWN, N.; MPAGI, J.; MIYAKE, K; et al. Toll-Like Receptor 4 Expression Is Required to Control Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3155–62, Sep. 2002.
- ALGOOD, H.M.S.; CHAN, J.; FLYNN, J.L. Chemokines and tuberculosis. Cytokine Growth Factor. **Rev. Elsevier**, v. 14, n. 6, p. 467-77, Dec. 2003.
- BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N.L.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **J Prev Med Hyg**, v. 58, n. 1, p. E9-E12, Mar. 2017.
- BE, N.A.; KIM, K.S.; BISHAI, W.R.; JAIN, S.K. Pathogenesis of central nervous system tuberculosis. **Curr Mol Med.**, v. 9, n. 2, p. 94-9, Mar. 2009.
- BOLIN, C.A.; WHIPPLE, D.L.; KHANNA, K.V.; RISDAHL, J.M.; PETERSON, P.K.; MOLITOR, T.W. Infection of swine with Mycobacterium bovis as a model of human tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 176, n. 6, p. 1559-66, Dec. 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.
- CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**, v. 15, n. 1, p. 29 – 35, Mar. 2006. Disponível em: <<http://www.sopterj.com.br/tuberculose/curso/2.pdf>>.
- CASPAR G.B.; KNOX H.F. The rôle of hypersensitivity in the production of experimental meningitis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 56, n. 2, p. 203-221, Aug. 1932. DOI: 10.1084/jem.56.2.203
- CAVE, A.J.E. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. **Br J Tuberc**, v. 33, n. 3, p. 142–52, July. 1939.
- CHIN, J.H. Tuberculous meningitis: Diagnostic and therapeutic challenges. **Neurol Clin Pract**, v. 4, n. 3, p. 199-205, Jun. 2014.
- CRUBEZY, E.; LUDES, B.; POVEDA, J-D.; CLAYTON, J.; CROUAU-ROY, B.; MONTAGNON, D. Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. **C R Acad Sci Paris (Sciences de la vie)**, v. 321, n. 11, p. 941–51, Nov. 1998.
- DANIEL, T.M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p.1862 – 1870, Nov. 2006. ([https://www.resmedjournal.com/article/S0954-6111\(06\)00401-X/pdf](https://www.resmedjournal.com/article/S0954-6111(06)00401-X/pdf))

DOMINGUES, F.S.; de SOUZA, J.M.; CHAGAS, H.; CHIMELLI, L.; VAISMAN, M. Pituitary Tuberculoma: An Unusual Lesion of Sellar Region. **Pituitary**, v. 5, n. 3, p. 149–53. Sep, 2002.

EXPERIMENTAL Tuberculous Meningitis. **Hospital** (Lond 1886), v. 60, p. 542, Sep. 1916.

FELDMAN, S.; BEHAR, A.J.; WEBER, D. Experimental Tuberculous Meningitis in Rabbits II: Effect of Hydrocortisone on the Hypersensitivity Reaction of the Meninges. **Arch Neurol**, v. 3, n. 4, p. 420–424, Oct. 1960. (doi:10.1001/archneur.1960.00450040070010)

GARG, R. K. Tuberculosis of the central nervous system. **Postgrad. Med. J**, v. 75, n. 881, p. 133-140, Mar. 1999.

Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

GOMES, T.; REIS-SANTOS, B.; BERTOLDE, A.; JOHNSON, J.L.; RILEY, L.W.; MACIEL, E.L. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. **BMC Infect Dis**, v. 14, n. 9, Jan. 2014. (doi:10.1186/1471-2334-14-9)

HAYMAN J. Mycobacterium ulcerans: an infection from Jurassic time? **Lancet**, v. 2, n. 8410, p. 1015–6, Nov. 1984.

HERNANDEZ, P. R.; AGUILAR, D.; COHEN, I.; GUERRERO, M.; RIBON, W.; ACOSTA, P.; OROZCO, H.; MARQUINA, B.; SALINAS, C.; REMBAO, D.; ESPITIA, C. Specific bacterial genotypes of Mycobacterium tuberculosis cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 90, n. 4, p. 268-77, Jul. 2010. (doi:10.1016/j.tube.2010.05.002.)

ISABEL, B.E.; ROGELIO, H.P. Pathogenesis and immune response in tuberculous meningitis. **Malays J Med Sci**, v. 21, n. 1, p. 4-10, Jan. 2014.

KAUFMANN, S.H.E.; DORHOI, A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions. **Curr Opin Immunol**, Elsevier Ltd, v. 25, n. 4, p. 441–9, Aug. 2013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725875>

KOCH R. Die aetiologie der tuberculose, a translation by Berna Pinner and Max Pinner with an introduction by Allen K. Krause. **Am Rev Tuberc**, v. 25, p. 285–323, 1932.

LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1712–6, Feb. 2000.

MAJEED, S.; RADOTRA, B.D.; SHARMA, S. Adjunctive role of MMP-9 inhibition along with conventional anti-tubercular drugs against experimental tuberculous meningitis. **Int J Exp Pathol**, v. 97, n. 3, p. 230-7, Jun. 2016.

MAZZOLLA, R.; PULITI, M.; BARLUZZI, R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BARBOLINI, G.; BLASI, E. Differential microbial clearance and immunoresponse of Balb/c (Nrampl1 susceptible) and DBA2 (Nrampl1 resistant) mice intracerebrally infected

with *Mycobacterium bovis* BCG (BCG). **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 14, n. 32, p. 149-58, Jan. 2002.

MOUTINHO, I.L.D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 42-48, Mar. 2011.

MUSELLIM, B.; ERTURAN, S.; SONMEZ, D.E.; ONGEN, G. Comparison of extrapulmonary and pulmonary tuberculosis cases: factors influencing the site of reactivation. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n. 11, p. 1220-3, Nov. 2005.

NERLICH, A.G.; HAAS, C.J.; ZINK, A.; SZEIMIES, U.; HAGEDORN, H.G. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. **Lancet**, v. 350, n. 9088, p. 1404, Nov. 1997.

PRASAD, K.; SINGH, M. Corticosteroids for managing tuberculous meningitis (review). **Cochrane Database Syst Ver**, v. 4, n. 4, May. 2016.

RAUT, T.; GARG, R.K.; JAIN, A. Hydrocephalus in tuberculous meningitis: incidence, its predictive factors and impact on the prognosis. **J Infect**, v. 66, n. 4, p. 330–337, Jan. 2013.

RICH, A. R.; MCCORDOCK, H. A. The pathogenesis of tuberculous meningitis. **Bull. Johns Hopkins Hosp**, v. 52, p. 5–37, 1933.

ROCK, R.B.; OLIN, M.; BAKER, C.A.; MOLITOR, T.W.; PETERSON, P.K. Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects. **Clin Microbiol Ver**, v. 21, n. 2, p. 243-61, Apr. 2008.

ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Bol. Pneumol. Sanit.** Rio de Janeiro , v. 7, n. 2, p. 5-29, dez. 1999 . Disponível em http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103460X1999000200002&lng=pt&nrm=iso.

RUSSELL, D.G. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. **Nat Cell Biol.** Nature Publishing Group, v. 5, n. 9, p. 776–8, Sep. 2003.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 374–80, Aug. 2005.

SERGIPE. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Planejamento. Núcleo Estratégico (Nest.SES). **Panorama da Tuberculose em Sergipe, 2007 - 2016**. 19 p. - Aracaju: Secretaria de Estado da Saúde, 2017.

SINNER, S.W.; TUNKEL, A.R. Approach to the diagnosis and management of tuberculous meningitis. **Curr Infect Dis Rep.** 4(4):324–31. Aug, 2002.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K.E.; CONNELL, N.D.; KREISWIRTH, B.N.; WHITTAM, T.S. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 94, n. 18, p. 9869–74, Sep. 1997.

TEIXEIRA, H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da Tuberculose: Problemas e estratégias para o sucesso. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 3, p. 323–34, Jun. 2007.

THWAITES, G.E.; VAN TOORN, R.; SCHOEMAN, J. Tuberculous meningitis: more questions, still too few answers. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 10, p. 999–1010, Aug. 2013.

TSENOVA, L.; MANGALISO, B.; MULLER, G.; CHEN, Y.; FREEDMAN, V.H.; STIRLING, D.; KAPLAN, G. Use of IMiD3, a thalidomide analog, as an adjunct to therapy for experimental tuberculous meningitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 6, p. 1887–95, Jun. 2002.

TSENOVA, L.; SOKOL, K.; FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G. A combination of thalidomide plus antibiotics protects rabbits from mycobacterial meningitis-associated death. **J Infect Dis**, v. 177, n. 6, p. 1563–72, Jun. 1998.

TUCKER, E.W.; POKKALI, S.; ZHANG, Z. Microglia activation in a pediatric rabbit model of tuberculous meningitis. **Dis Model Mech**, v. 9, n. 12, p. 1497–1506, Dec. 2016.

VAN DER FLIER, M.; HOPPENREIJS, S.; VAN RENSBURG, A.J.; RUYKEN, M.; KOLK, A.H.J.; SPRINGER, P. Vascular Endothelial Growth Factor and Blood-Brain Barrier Disruption in Tuberculous Meningitis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, n. 7, p. 608–13, Jul. 2004.

VAN WELL, G.T.; WIELAND, C.W.; FLORQUIN, S.; ROORD, J.J.; VAN DER POLL, T.; VAN FURTH, A.M. A new murine model to study the pathogenesis of tuberculous meningitis. **J Infect Dis**, v. 195, n. 5, p. 694–7, Mar. 2007.

WILKINSON, R.J.; ROHLWINK, U.; MISRA, U.K.; VAN CREVEL, R.; MAI, N.T.H.; DOOLEY, K.E.; CAWS, M.; FIGAJI, A.; SAVIC, R.; SOLOMONS, R.; THWAITES, G.E. Tuberculous Meningitis. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 10, p. 581–598, Oct. 2017.

WU, H.S.; KOLONOSKI, P.; CHANG, Y.Y.; BERMUDEZ, L.E. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2979–84, May. 2000.

YUK, J.M.; JO, E.K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. **Clin Exp Vaccine Res**, v. 3, n. 2, p. 155–67, Jul. 2014.

2 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

Instruções aos autores

Escopo e política

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é um periódico mult/idisciplinar, com acesso aberto, que publica pesquisas originais e estudos clínicos sobre Medicina Tropical (incluindo Epidemiologia, Patologia, Imunologia, etc.) e doenças infecciosas. É um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Os artigos de revisão são a convite do Editor, mas também publica artigos originais, comunicações breves, relatos de caso, editoriais, cartas ao editor, imagens em doenças infecciosas e parasitárias, relatórios técnicos e números especiais (suplementos). A Revista possui um sistema de revisão por pares, é publicada em inglês e sua periodicidade é bimestral e o conteúdo é de acesso livre para os leitores e nenhuma taxa é cobrada dos autores.

Considerando que a partir de 2016, a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical apenas recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), não tendo recebido fomento de nenhum outro órgão. O suporte financeiro foi essencial para garantir a qualidade, a melhoria do fator de impacto, número de citações, a geração do XML e revisão/edição do inglês em todos os artigos aceitos, que foram pagos pela própria revista.

A partir de 2017, a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical estabeleceu que, quando necessário, solicitará gentilmente aos autores que paguem pelo serviço profissional de revisão e edição do inglês realizado por uma empresa especializada, na versão final de seus manuscritos aceitos para publicação.

Política de avaliação

Submissões à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical indicam que não foram publicadas anteriormente (exceto resumo) e que não estão sendo consideradas para publicação em outro periódico.

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação em nosso periódico, são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria, quanto à adequação às normas. Em seguida, se estiverem dentro das Normas para Publicação, serão encaminhados, no mínimo, para dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado através do sistema de revisão por pares. Os editores, com base no parecer dos revisores, irão decidir quanto à aceitação ou não do manuscrito. Se houver divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro revisor para validar a decisão editorial final de acordo com o fluxograma da Revista, disponível no seguinte endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>

Os manuscritos devem ser escritos em Inglês e submetidos apenas eletronicamente através do endereço: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

A baixa qualidade do inglês é a maior causa de atraso na publicação. Recomendamos fortemente aos autores, com inglês como língua estrangeira, que seus manuscritos sejam preferencialmente traduzidos e editados por um serviço profissional de inglês ou verificados por um cientista com inglês como primeira língua, e uma cópia do certificado deve ser enviada para a Revista.

O contato com a Secretaria da Revista pode ser estabelecido no endereço abaixo:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Av. Getúlio Guraritá s/n, Caixa Postal: 118, CEP: 38001-970 Uberaba, Minas Gerais, Brasil

Tel: 55 34 3318-5287; Fax: 55 34 3318-5279

e-mail: rsbmt@rsbmt.ufm.edu.br; <http://www.scielo.br/rsbmt>

Tipos de manuscrito

A Revista convida à publicação Artigos Originais, Artigos de Revisão e Minirrevisões, Editoriais, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas e Números Especiais.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500

(excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo com até 250 palavras (não estruturado). Cinco ilustrações são permitidas (tabelas e figuras). São publicadas também minirrevisões. Minirrevisões têm no máximo 3.000 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo (não estruturado) com até 200 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo não estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. As comunicações breves devem ter no máximo 2.000 palavras (excluindo resumo, título e referências); Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Até três palavras-chaves devem ser fornecidos. O corpo do manuscrito não devem conter subdivisões ou subtópicos. Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro devem ser incluídos.

Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras (excluindo título, resumo e referências), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo não estruturado com no máximo 100 palavras e três palavras-chaves. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo, Palavras-Chaves, Texto do Manuscrito (Introdução, Relato de Caso, Discussão), Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro devem ser incluídos.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de experts. Será considerado, se formatado como um editorial.

Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Até três autores e até três referências são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras (excluindo título e referências) com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras.

Cartas: leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da Revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (figura ou tabela) e pode tratar de material anteriormente publicado na revista, com até 12 referências.

Números Especiais: Propostas de números especiais devem ser feitas ao o Editor e/ou Editor Convidado. A proposta será analisada levando em consideração o tema, organização do programa ou produção de acordo com escopo da revista.

Preparação do manuscrito

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores reservam-se o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

- Sistema de Submissão on-line: Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser

submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão on-line no endereço: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>. O autor deve escolher dentro do item “Tipos de Manuscrito” uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Réplica à Carta ou Outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

- Carta de Apresentação: a) deve conter uma declaração, assegurando de que se trata de pesquisa original e que, ainda, não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar pelos outros co-autores, mediante procuração. c) Os autores devem incluir na Cover Letter uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. d) Devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

- Contribuição dos autores: Os autores devem incluir, em documento separado, uma declaração de responsabilidade especificando a contribuição, de cada um, no estudo.

- Edição da Pré-Submissão: todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser em inglês. É altamente recomendável que os autores utilizem os serviços de uma empresa profissional de edição e/ou tradução. A revisão/edição da língua inglesa não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

Formatação do manuscrito

O manuscrito deve ser preparado usando software padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte Times New Roman tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada

ao Editor-Chefe), Página de Título, Título, Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Declaração de Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte financeiro. A quantidade de autores por manuscrito deve ser limitada ao número real de autores que realmente contribuíram com o manuscrito, exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, que devem limitar-se a vinte autores. Quando exceder a vinte autores, o restante será publicado em notas de rodapé.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de instituições diferentes dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 40 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos, em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista. No caso de pesquisa em seres humanos, os autores devem incluir na seção métodos no subtítulo Considerações Éticas uma declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separados por vírgula ou por hífen quando houver uma sequência sem intervalo. Ex.: Mundo^{1,2}; Vida^{30,42,44-50}. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus (Consulte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

A responsabilidade pelas citações bibliográficas contidas no texto e na lista de referências recai exclusivamente sobre os autores.

Alguns exemplos de referências:

- Citação de Artigos em Geral: Sobrenome seguido das iniciais dos seis primeiros autores. Para sete ou mais autores, liste os seis primeiros, seguidos de “et al.”), título completo do artigo (no idioma original), título abreviado do periódico (pode ser encontrado Em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), ano de publicação, volume (número), páginas inicial e final abreviada.

Exemplo 1: Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol*. 2005;62(1):112-6.

Exemplo 2: Freitas EC, Oliveira MF, Vasconcelos ASOB, Filho JDS, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;50(1):115-21.

- Capítulo de livro: Sobrenome seguido das iniciais dos autores do capítulo, título completo do capítulo, editores, título do livro, Edição, local de publicação: editor, ano de publicação, páginas inicial e final do capítulo abreviada.

Exemplo: Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health*. 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.

- Livro: Sobrenome seguido das iniciais dos autores do livro, título do livro, edição, local de publicação: editor, ano de publicação e número de páginas do livro.

Exemplo: Carlson BM. *Human embryology and developmental biology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.

- Sites: Nome do autor/organização. Título da página [Internet]. Local de publicação: Nome do editor; Data ou ano de publicação [atualizado ano mês dia; Citado ano mês dia]. Disponível em: endereço.

Exemplo: Diabetes Australia. *Diabetes globally* [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/DiabetesGlobally/>

- Dissertação/Tese: A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não aceitará a citação de dissertação/mestrado, teses de doutorado ou similar.

- Ilustrações: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, pela primeira vez, em ordem numérica crescente.

- Título e Legendas: devem ser digitados com espaçamento duplo no final do manuscrito.

- Dimensões: As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:
 - Imagens/Fotografias: devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato TIFF. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (Adobe Photoshop, Corel Photo Paint, etc).

 - Gráficos: Devem ser criados usando software estatístico e devem ser salvos/exportados com a extensão original (.xls, .xlsx, .wmf, .eps ou .pdf).

 - Mapas: devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os softwares Corel Draw ou Illustrator em alta resolução.

 - Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer abaixo da mesma. O significado de todas as siglas e símbolos utilizados na tabela devem constar no rodapé da tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, em ordem numérica crescente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte Times New Roman, tamanho 9.

 - Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

- Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

- Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

- Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

- Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.

Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las assim que possível.

Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.

Todos os artigos aceitos que ainda não tenham sido impressos estarão disponíveis online enquanto aguardam publicação na versão impressa (ahead of print).

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não indica qualquer tipo de serviços de tradução.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.

Workflow

Workflow do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão online no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>.

Política de Revisão do Periódico (workflow):

Todos os manuscritos submetidos para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são inicialmente avaliados pela Secretaria quanto à adequação do texto às normas do periódico.

Após esta etapa, os manuscritos adequados às Normas Para Publicação da Revista serão avaliados pelo Editor ou Editores Associados quanto ao escopo e a política editorial do periódico. A Secretaria envia o manuscrito para o Editor-Chefe.

O Editor-Chefe designa um Editor Associado ou designa revisores.

O manuscrito será enviado a pelo menos dois revisores num sistema duplo-cego para avaliação e emissão de um relatório fundamentado (peer review), que será usado pelos Editores para decidir se o manuscrito será aceito ou não. O manuscrito também é enviado para Revisores de Métodos Quantitativos para análise. No caso de conflito de pareceres dos revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro parecerista para validar uma decisão final.

Comentários dos Revisores (Free Form Review) serão encaminhados ao autor correspondente (autor principal para correspondência editorial) para responder aos questionamentos feitos.

Os autores enviam suas respostas aos questionamentos e reenviam a versão revisada do manuscrito. A versão revisada será enviada aos revisores que emitirão um relatório final fundamentado.

Os apontamentos dos Revisores e as respostas dos autores serão analisados pelo Editor-Chefe, Editores Associados ou Editores de Seção.

O Editor-Chefe emite uma decisão final.

A decisão editorial final (aceitação ou rejeição) é enviada aos autores.

Após esta etapa, inicia-se o processo de edição. O manuscrito aceito é enviado à edição quanto à qualidade linguística do inglês.

A revisão de inglês é enviada aos autores para análise e declaração de aceitação da revisão.

Após esta etapa, inicia-se o processo de diagramação, com contato com o autor correspondente no que diz respeito às figuras, tabelas, fotografias, mapas, ilustrações e formatação em geral.

Após esta etapa, é requerido aos autores declarar formalmente qualquer conflito de interesse, suporte financeiro e cessão de direitos autorais.

Provas são enviadas ao autor correspondente para cuidadosa correção e acuidade tipográfica.

A versão final de cada manuscrito é selecionada para compor o próximo número e será enviada ao Ahead of Print na plataforma SciELO.

A versão impressa é publicada a cada dois meses e será disponibilizada em acesso aberto em <http://www.scielo.br/rsbmt>.

Disponível em: < <http://www.sgmt.org.br/portal/normas-p-publicacao/> >

3 ARTIGO ORIGINAL

MODELO DE NEUROTUBERCULOSE EXPERIMENTAL COM CEPA H37RV

Rhamon Ribeiro da Costa¹, Camilla de Aguiar Dalan², Patrícia Rodrigues Marques de Souza³,
Waldecy de Lucca Júnior⁴, Celio Lopes Silva⁵, Ângela Maria da Silva⁶.

¹ Graduando em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, Brasil

² Doutoranda do Programa de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, Brasil

³ Professora do Departamento de Educação em Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Lagarto-SE, Brasil

⁴ Professora do Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, Brasil

⁵ Professor do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto-SP, Brasil.

⁶ Professora do Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, Brasil

Correspondência para:

Rhamon Ribeiro da Costa

Rua Cláudio Batista, 295, Santo Antônio

49060-108 – Aracaju, SE, Brasil

Rhamon_rc@hotmail.com

(79) 9.9162-2336

3.1 Resumo

Introdução: A neurotuberculose destaca-se dentre as formas mais graves de tuberculose extrapulmonar. Afeta predominantemente crianças e co-infectados com TB-AIDS, levando ao óbito de 19,3% e 40%, respectivamente. Apesar das grandes contribuições dos postulados de Rich e McCordock (1933), os aspectos celulares e moleculares da patogênese continuam obscuros. E no intuito de contribuir na elucidação destes, o atual estudo se propõe a desenvolver um modelo experimental de neurotuberculose em camundongos *black*. **Métodos:** Dezoito camundongos C57Bl/6 foram divididos em três grupos de seis. Dois grupos foram infectados com a cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, um por via intracerebroventricular e outro por via intratraqueal. O grupo restante foi utilizado como controle negativo. Após quatro semanas, todos os grupos foram sacrificados, e os órgãos coletados (pulmões e cérebros) seguiram para análise qualitativa-morfológica em lâminas coradas por hematoxilina e eosina e Ziehl Neelsen. **Resultados:** Evidenciamos edema cerebral, infiltrado perivascular, extravasamento de células sanguíneas, desorganização ependimária e aumento de células da micróglia na histologia dos animais infectados com a cepa virulenta, porém não foram encontradas formações granulomatosas. Assim como houve preservação morfológica dos animais do grupo controle, que receberam solução salina via estereotaxia. **Conclusão:** Demonstrou-se o estabelecimento de neurotuberculose em sua apresentação meníngea, tendo como destaque a via intratraqueal que aproxima este modelo murino ao processo infeccioso em humanos. Além disso, a utilização dos camundongos C57BL/6 amplia grandemente a viabilidade de estudos imunobiológicos futuros devido suas possibilidades, já conhecidas, de manipulação genética.

Palavras-chave: Tuberculose no sistema nervoso central; modelos animais; tuberculose meníngea; histologia.

3.2 Introdução

A tuberculose (TB) continua sendo um problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde,¹ estima-se que 1,7 bilhões de pessoas (23% da população geral) possuem a infecção de forma latente, podendo ter a doença ativada em qualquer momento da vida. Em 2017, causou a morte de 1,3 milhões de pessoas não infectadas pelo HIV, e de mais 300.000 pessoas infectadas pelo HIV.¹

É evidente que a TB acomete mais frequentemente os pulmões, porém a tuberculose também atinge outros órgãos através da corrente sanguínea, tais como gânglios, ossos, articulações, fígado, baço, pele e sistema nervoso central (SNC), o que se denomina de tuberculose extrapulmonar (TBEP).² Que pode afetar No Brasil, entre o ano de 2007 e 2011 foram observados notórios 13,37% de casos de TBEP de um total de 428.039 notificações.³

Dentre as formas mais graves destaca-se o acometimento no SNC, chamado de neurotuberculose (NTB). Esta afeta predominantemente crianças e co-infectados com TB-AIDS, levando ao óbito de 19,3% e 40%, respectivamente, além de deixar sequelas neurológicas graves nos sobreviventes.⁴⁻⁶ As apresentações clínicas mais comuns, em ordem decrescente, são: meningite tuberculosa, tuberculoma, abscesso tuberculoso, tuberculose miliar cerebral, encefalopatia tuberculosa, encefalite tuberculosa e arterite tuberculosa.⁷

Os aspectos fisiopatológicos desta apresentação baseiam-se em postulados de autópsias datados de 1933.⁸ Porém detalhes celulares e moleculares envolvidos nesta patogênese continuam obscuros, necessitando assim de modelos experimentais que possibilitem avanços científicos e tecnológicos para alcançar impactos na doença, desde a sua prevenção ao prognóstico. O presente estudo se propõe a desenvolver um modelo experimental de neurotuberculose em camundongos black, através do estabelecimento de Ntb com a cepa virulenta H37Rv, e posteriormente avaliar o processo inflamatório desenvolvido pela mesma.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Animais e questões éticas

Foram utilizados 18 camundongos C57Bl/6 machos de 5 a 8 semanas de idade e pesando entre 20 e 30 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP – USP) com regime livre de comida e água, com ciclos de claro/escuro de 12:00h/12:00h (claro das 6:00h às 18:00h) e sob temperatura ambiental de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tiveram uma semana de aclimatação ao biotério onde foram mantidos durante o experimento. O estudo foi submetido e autorizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da (FMRP – USP), sob o protocolo de número 146/2008 CETEA.

3.3.2 Delineamento Experimental

Os 18 animais foram divididos em três grupos de seis, denominados: grupo PBS – SNC, grupo H37Rv – SNC e grupo H37Rv – pulmão. Nos dois primeiros grupos foi realizada a estereotaxia para microinjeção nos ventrículos laterais direitos de solução salina e H37Rv, respectivamente. Já no último grupo, a inoculação da cepa H37Rv foi realizada via intratraqueal.

Após quatro semanas, todos os grupos foram sacrificados e tiveram o cérebro e o pulmão removidos. Os órgãos coletados seguiram para análise qualitativa-morfológica, passando por protocolos de: processamento tecidual, emblocamento em parafina, microtomia e coloração (hematoxilina e eosina e Ziehl Neelsen).

3.3.3 Infecção Induzida por Estereotaxia

Todos os procedimentos de infecção dos camundongos com a cepa laboratorial (H37Rv) de Mtb foram realizados no biotério, com o nível de segurança necessário (nível 3 de biossegurança) e com capela de fluxo laminar ligada. Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (1mL/100g de peso corporal) de cetamina (80mg/Kg) e xilasina

(10mg/Kg) diluídas em solução salina isotônica (NaCl 0,15M). Com a intenção de reduzir os riscos de infecção, antes do início da cirurgia, os camundongos foram submetidos à tricotomia da região dorsal da cabeça. Posteriormente, para a realização da cirurgia, os animais foram posicionados com a cabeça fixada pelas barras auriculares do aparelho estereotáxico (Insight) e receberam analgésico via subcutânea (Babamine® injetável pet – flunixinina-meglumina – 1,1mg/Kg – Schering).

Logo após a assepsia da pele com solução de álcool iodado, por via subcutânea foi aplicada lidocaína contendo vasoconstritor (norepinefrina 2%) para evitar sangramento durante o procedimento estereotáxico. Feito isto, foi realizada a incisão longitudinal para expor a calota craniana. Utilizou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 10V) para melhor visualização das suturas do tecido ósseo. A torre do aparelho estereotáxico foi posicionada no ângulo zero e tendo como referência inicial o bregma. A partir dessas coordenadas, foi definido o ponto da microinjeção que atingiria o ventrículo lateral direito do cérebro do animal. O local exato da microinjeção foi definido nas seguintes subtrações a partir do ponto do bregma: -0,4 mm anteroposterior; -1,0 mm latero-lateral; -2,1 mm dorsoventral. Com as coordenadas da microinjeção estabelecidas, realizou-se a trepanação da calota craniana utilizando broca odontológica esférica acoplada à um motor. Anteriormente às infecções, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, porém com a utilização do corante com o objetivo de verificar a localização das coordenadas. Na figura 1 percebemos que o local da aplicação da microinjeção, mostrando a ocupação dos espaços ventriculares do Sistema Nervoso Central (SNC).

Através do orifício feito, foi microinjetada, no ventrículo lateral direito do cérebro dos animais, solução contendo Mtb com 1×10^5 CFU/mL. Terminada a aplicação da microinjeções, os animais foram suturados. Durante a recuperação da anestesia, independentemente do grupo, os animais foram mantidos em sala do Biotério do Departamento de Imunologia Pura e Aplicada (nível 3 de biossegurança) da FMRP-USP com atmosfera e temperatura controladas.

A concentração de bacilos utilizada na infecção foi controlada através do plaqueamento das soluções em Placas de Petri contendo meio de cultura 7H11, o meio de cultura utilizado para o desenvolvimento do Mtb. Transcorridas quatro semanas de incubação, fez-se a determinação de unidades formadoras de colônias (CFU) nas placas.

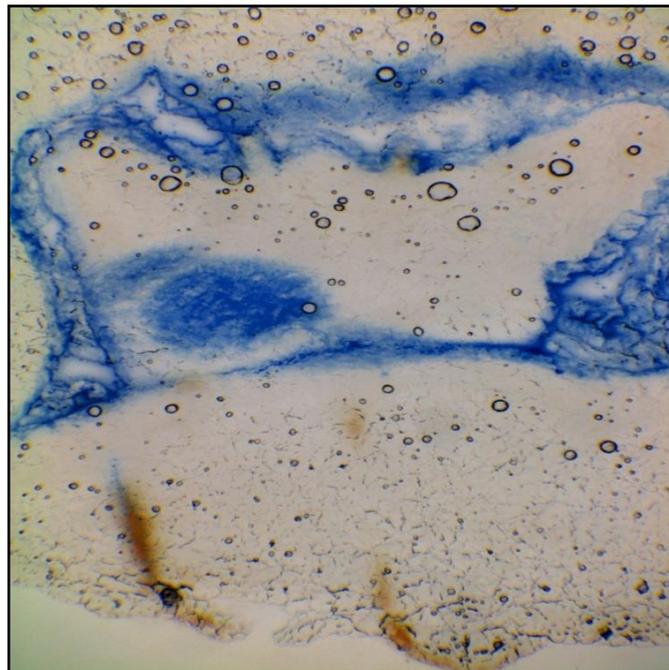


Figura 1: Secção cerebral mostrando os ventrículos cerebrais ocupados por corante (Azul de Metileno) proveniente de microinjeção intracerebroventricular durante a cirurgia estereotáxica. Esse procedimento foi realizado para confirmar que as coordenadas estereotáxicas usadas para infectar os camundongos estavam corretas

3.3.4 Infecção Pulmonar

A infecção pulmonar foi realizada na capela de fluxo no biotério do Departamento de Imunologia Pura e Aplicada (nível de segurança 3) da FMRP/USP. Os animais escolhidos para esse método, foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (1mL/100g de peso corporal) de cetamina (80mg/Kg) e xilasina (10mg/Kg) diluídas em solução salina isotônica (NaCl 0,15M), fixados com o abdômen voltado para cima e a região da traqueia em evidência. Foi

feita uma pequena incisão e exposta a traqueia, onde foi inoculada a solução com o bacilo (1×10^5 CFU/mL). Após esse procedimento verificou se o animal respirava normalmente e em seguida realizada pequena sutura com monofilamento de Nylon. O restabelecimento do animal aconteceu no biotério.

3.3.5 Coleta dos Tecidos

Quatro semanas após a infecção, os animais foram anestesiados e sacrificados. Foram coletados alguns de seus órgãos (cérebro e pulmão). De maneira aleatória, foram selecionados animais cujos tecidos destinaram-se ao processamento para análise morfológica.

3.3.6 Processamento Tecidual para a Histologia

Após a dissecação, os tecidos determinados para análise histológica passaram pela fixação em formol tamponado 10%. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em diferentes concentrações de etanol, diafanizados em xileno e emblocados em parafina. Os cérebros e pulmões passaram por processamento com tempos de banho diferentes de acordo com protocolos pré-estabelecidos (Anexos A e B).

3.3.7 Microtomia

Os tecidos incluídos em parafina (cérebro e pulmão) foram cortados a $5\mu\text{m}$ com auxílio do micrótomo histológico (Lupetec MRP-09). Foram realizados cortes seriados para analisar a morfologia dos tecidos e caracterizá-los quanto à presença ou ausência do bacilo (*Mycobacterium tuberculosis*) através das colorações Hematoxilina-Eosina e Ziehl Neelsen, respectivamente. Na histologia, utilizou-se lâminas de vidro sem a presença de gelatina ou silano.

O cérebro foi incluído dividindo-o através de um corte coronal, separando-o em duas porções: anterior e posterior. Cada lâmina contempla dois cortes de cérebro, tendo como

primeiro corte a parte da porção anterior e o segundo a parte da porção posterior. Esse procedimento foi realizado para possibilitar uma melhor avaliação das regiões periventriculares, onde foi provocada a infecção inicial pelo bacilo. O pulmão foi incluído de forma a obter-se um corte com maior área possível para análise histológica.

3.3.8 Análise morfológica

As lâminas obtidas contendo os cortes histológicos (5 µm) foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (ANEXO C), a qual permite identificar o tipo de tecido, o formato e a organização das células, uma vez que essa técnica cora o núcleo (hematoxilina) e o citoplasma (eosina) celulares. Também foi realizada a técnica de coloração conhecida como Ziehl Neelsen (ZN) (ANEXO D), específica para identificar as bactérias classificadas como BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes) e, neste caso, detectar *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) nos tecidos analisados.

3.3.9 Descartes

Após a coleta dos tecidos, as carcaças dos animais foram depositadas em sacos plásticos apropriados e destinados ao tratamento específico para resíduos infectantes. Esse processo ocorreu no Centro de Pesquisa em Tuberculose da FMRP-USP.

Os resíduos perfuro cortantes foram armazenados em caixas adequadas para posterior descarte. Os resíduos líquidos, provenientes das etapas de processamento tecidual e colorações, foram coletados e armazenados em vasilhames específicos e destinados à coleta seletiva do Campus São Cristóvão da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

3.3.10 Aquisição e Análise das Imagens

Com as lâminas coradas, as imagens foram capturadas usando o microscópio óptico acoplado a um computador com o programa de captura e análise de imagens LAS (Leica). As

fotos obtidas abrangeram todo o tecido do animal (cérebro e pulmão), considerando o intervalo de 50µm de distância entre os cortes seriados. As imagens foram analisadas sem a interferência do conhecimento de cada grupo.

3.4 Resultados

No experimento foram evidenciados aspectos inflamatórios, celulares e vasculares, na histologia dos animais infectados com a cepa H37Rv (grupos H37Rv-pulmão e H37Rv-SNC), porém não foram encontradas formações granulomatosas. Assim como houve preservação morfológica dos animais do grupo controle, que receberam solução salina via estereotaxia (grupo PBS-SNC).

Nas imagens da análise histológica, conseguimos visualizar a manutenção estrutural do tecido parenquimatoso do pulmão, com seus alvéolos, brônquios e bronquíolos, além de uma rede vascular bem delimitada e sem extravasamento sanguíneo. Essa conformação mostra que o grupo PBS – SNC não indicou sinais de infecção no pulmão, pois o tecido não apresentou modificação significativa dos espaços alveolares (Figura 2).

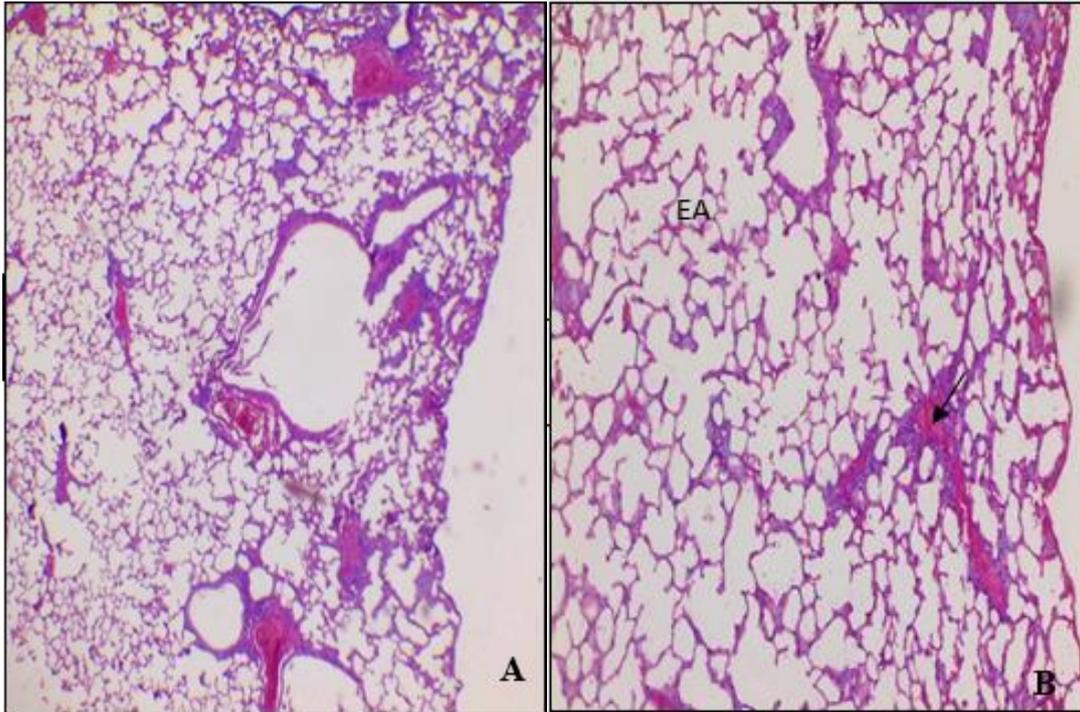


Figura 2: Caracterização morfológica do pulmão de camundongos do grupo controle (PBS – SNC) após 4 semanas. **A.** Após quatro semanas do procedimento de estereotaxia com solução salina, a histologia mostra a preservação do tecido. **B.** Na imagem é possível perceber as estruturas do parênquima pulmonar preservadas. Os vasos sanguíneos com células sanguíneas também estão preservados. **Legenda:** EA: espaços alveolares; seta: vaso sanguíneo congestionado. **Aumento:** A.: 40x; B. 400x. **HE.**

Igualmente, na arquitetura tecidual dos cérebros deste grupo controle, não houveram alterações, confirmando que o procedimento estereotáxico em si não causou processos reacionais que pudessem confundir os achados dos grupos sabidamente infectados. Nas figuras 3 (A e B) observa-se os pericários (corpo celular dos neurônios) no córtex cerebral (CC) assim como as células endimárias (EC), organizadas em epitélio cúbico simples, que são responsáveis por revestir os ventrículos cerebrais. Em maior aumento (Fig. 3B) é possível visualizar células com morfologia características das células da micróglia, além dos cílios das células endimárias, que são responsáveis por facilitar a movimentação do líquido cefalorraquidiano (LCR).

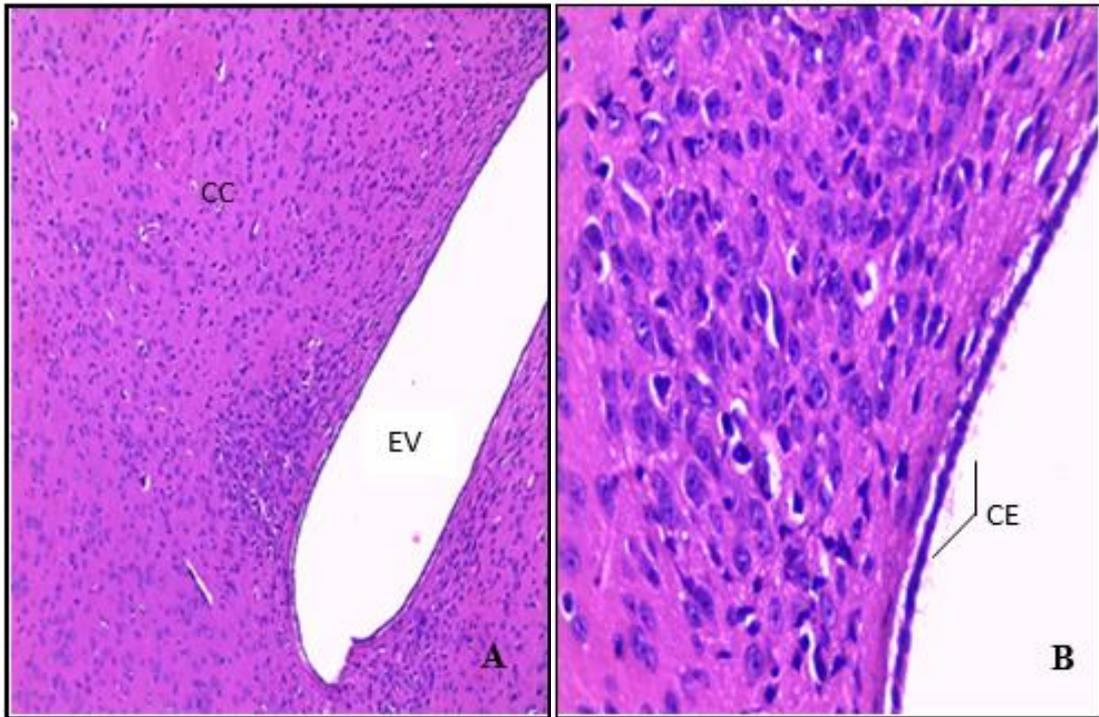


Figura 3: A caracterização morfológica de cérebro murino do grupo controle negativo (PBS – SNC) após 4 semanas. **A.** Os animais que receberam micro injeção intracerebroventricular com PBS não apresentaram alterações morfológicas após as quatro semanas da infecção. **B.** Pode ser observado a preservação das células ependimárias, pericários e células da micróglia. Em maior aumento, os cílios das células ependimárias podem ser notados, que são características destas células. **Legenda:** **CE:** células ependimárias; **EV:** espaço ventricular; **CC:** córtex cerebral. **Aumento:** **A.:** 40x; **B.** 400x. **HE.**

Já os pulmões dos animais infectados via intratraqueal com a cepa laboratorial de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) demonstraram resposta inflamatória evidenciada pela redução dos espaços alveolares, devido a aglomeração de macrófagos alveolares e espessamento dos brônquios, observa-se também o aumento da concentração de células com características inflamatórias, e de células sanguíneas dispersas no tecido (Figura 4).

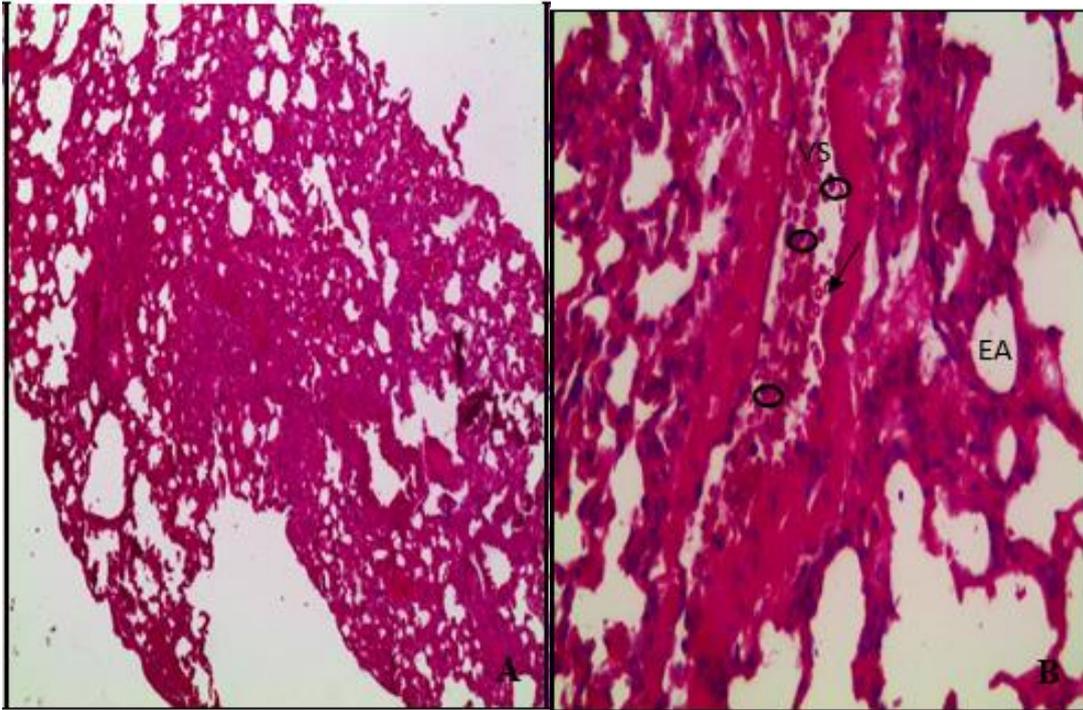


Figura 4: A caracterização morfológica de pulmão murino no grupo da infecção intratraqueal (H37Rv-Pulmão) após 4 semanas. **A.** O pulmão apresentou aumento do número de células devido ao processo inflamatório, com as estruturas funcionais danificadas. **B.** Diminuição dos espaços alveolares devido ao recrutamento de células inflamatórias para o sítio da infecção; estas células são caracterizadas com a morfologia evidenciando grande quantidade de citoplasma e núcleo central. Além de vasos sanguíneos com os glóbulos vermelhos e células pequenas sem citoplasma e núcleo visível. **Legenda:** EA: espaço alveolar; VS: vaso sanguíneo; círculos: células com características morfológicas de resposta imunológica; seta: eritrócitos. **Aumento:** A.: 40x; B. 400x. **HE.**

Ao analisar o cérebro dos animais que receberam 10^5 CFU/mL do bacilo via intratraqueal, podemos perceber que o parênquima cerebral também apresentou sinais de edema, tais como o extravasamento de células sanguíneas e líquidos pelos vasos sanguíneos, caracterizados pelos espaçamentos no parênquima, além da presença de vasos sanguíneos sem delimitação (Figuras 5 A e B). Percebe-se também a perda do revestimento endotelial no espaço ventricular.

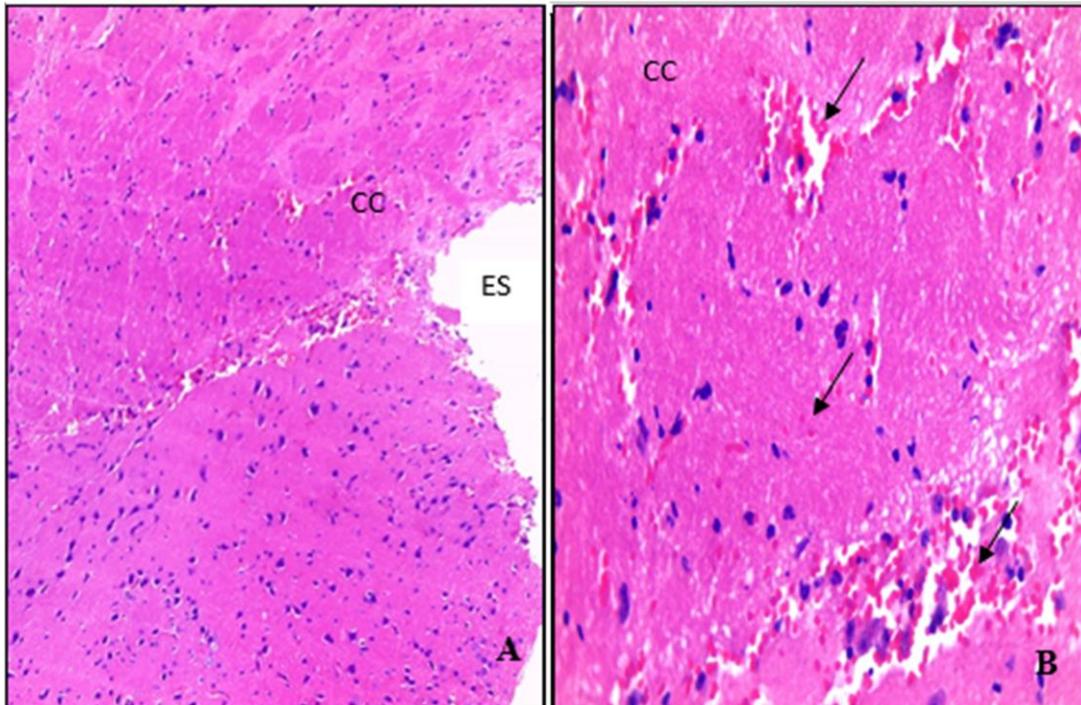


Figura 5: A caracterização morfológica de cérebro murino do grupo que recebeu infecção intratraqueal (10^5 CFU/mL de *M. tuberculosis*) (H37Rv – Pulmão) após 4 semanas. **A.** Apresentaram alterações morfológicas após as quatro semanas da infecção como a ausência de tecido pertencente à pia-máter e edema cerebral. **B.** Pode ser observado a presença de células sanguíneas dispersas no córtex cerebral, bem como espaços próximos a uma estrutura de vascularização destruída por edema. **Legenda:** ES: espaço subaracnóide; CC: córtex cerebral; seta: eritrócitos dispersos no parênquima. **Aumento:** A.: 40x; B. 400x. HE.

Após as verificações anteriores, prosseguiu-se com a análise das infecções com a cepa virulenta (H37Rv) que ocorreram diretamente no ventrículo lateral do cérebro, por meio do procedimento de estereotaxia (H37Rv – SNC), que foi realizado com as mesmas coordenadas do grupo controle (PBS – SNC).

O grupo em questão (H37Rv – SNC), exibiu alteração na morfologia do tecido de revestimento dos ventrículos, assim como no parênquima cerebral. Próximo ao local da infecção, o tecido de revestimento apresentou a proliferação de células de caráter inflamatório. Além disso, foram observados sinais clássicos de edema, principalmente pela existência de espaços no tecido e células sanguíneas dispersas (Figura 6 A e B).

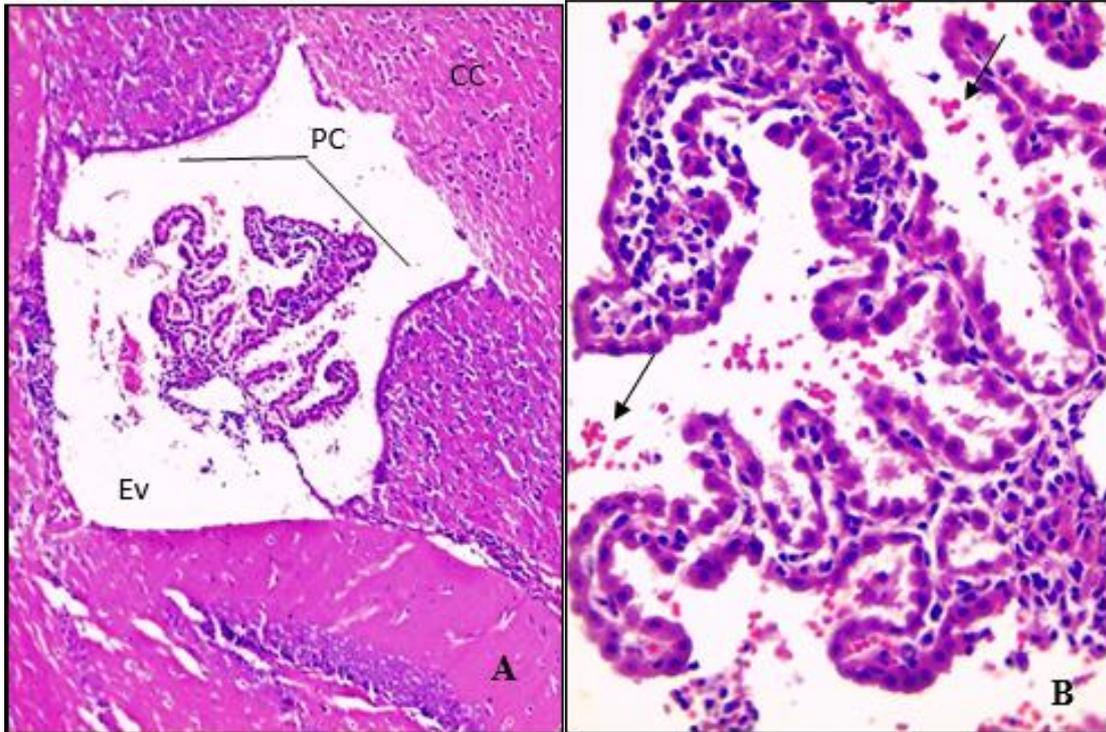


Figura 6: Caracterização morfológica de cérebro murino infectados intracerebroventricular (H37Rv – SNC) após 4 semanas. A. Os animais que receberam micro injeção intracerebroventricular (H37Rv – SNC) demonstraram mudança morfológica no plexo coroide, (B) em destaque é percebida a presença de células fagocitárias e células vermelhas do sangue, o que indica uma maior intensidade da inflamação. **Legenda:** EV: espaço ventricular; CC: córtex cerebral; PC: plexo coroide; seta: eritrócitos dispersos no ventrículo. **Aumento da Objetiva:** A: 40x; B: 400x. **HE.**

Os tecidos nervosos infectados por via intracerebroventricular (H37Rv – SNC) foram explorados quanto à evidencia do bacilo em imagens coradas pela técnica Ziehl-Neelsen. Nas lâminas estudadas constatou-se mais uma vez a perda da morfologia cerebral, vista na Figura 7A, pela alteração dos ventrículos cerebrais e região parenquimatosa. Em maior aumento (Figura 7B) foi observada a região que apresentou sinais de inflamação, onde foram encontrados os bacilos, alguns formando um aglomerado (típico do bacilo) envolto por células, e outros, dispersos no tecido de células endimárias.

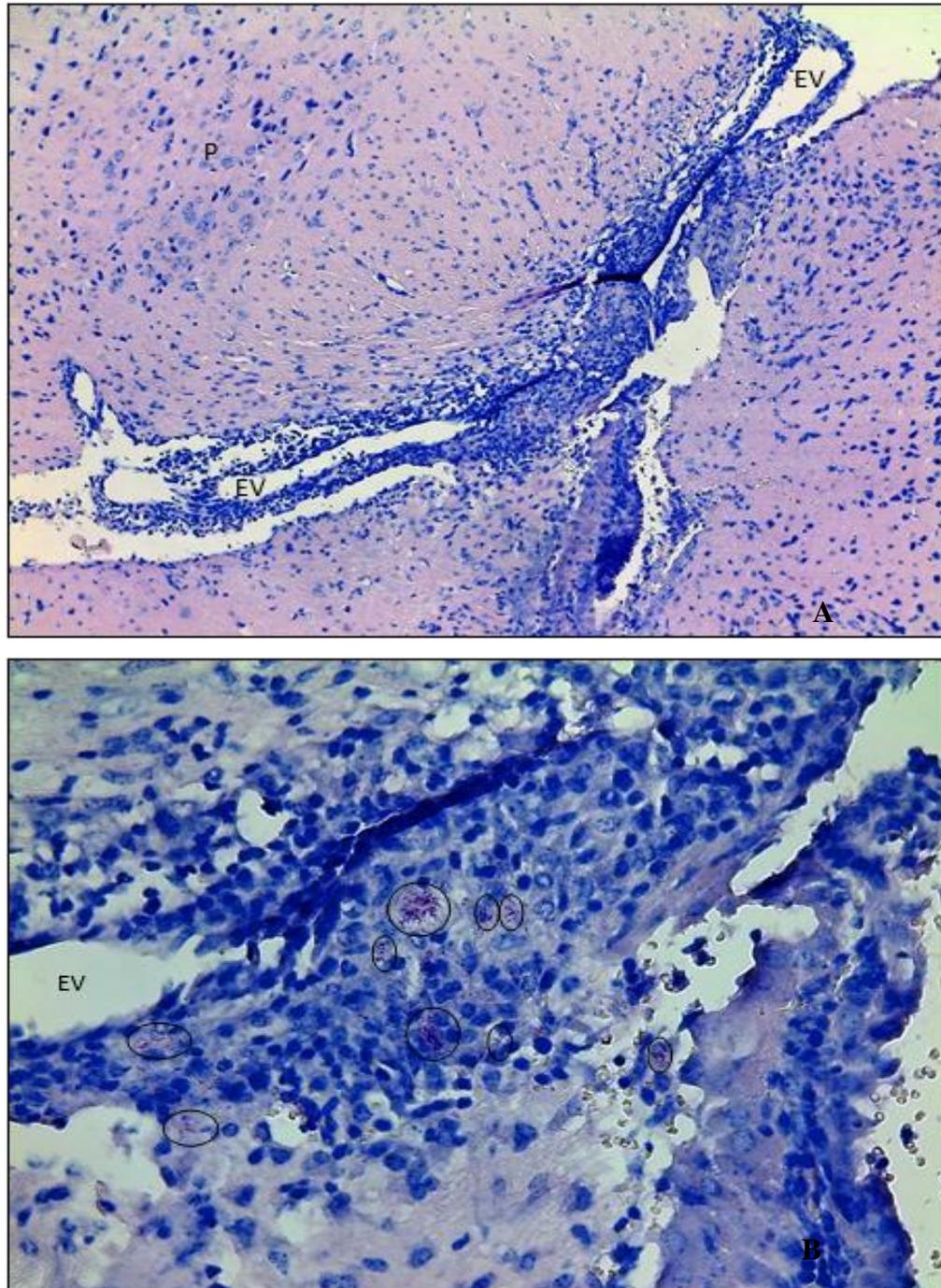


Figura 7: Evidência do bacilo em cérebro de grupo infectado por microinjeções via intracerebroventricular em um intervalo de 4 semanas de infecção. A. Epitélio de revestimento dos ventrículos do SNC desorganizado, assim como os espaços ventriculares. **B.** Em maior aumento é possível identificar aglomerados de bacilos entre as células do tecido de revestimento do ventrículo cerebral. **Legenda:** EV: espaços ventriculares; P: pericários; **Círculos:** Aglomerados de bacilos. **Objetivas:** A: 40x; B: 1000x. Coloração: ZN.

3.5 Discussão

Neste estudo, através do modelo exposto, demonstramos o estabelecimento de neurotuberculose, em sua apresentação meníngea, através da inoculação da cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) em camundongos *black*. Seja por via intratraqueal ou intracerebroventricular, se evidenciou o padrão inflamatório, histologicamente, no sistema nervoso central.

Os achados histológicos aqui listados, como edema cerebral, infiltrado perivascular, extravasamento de células sanguíneas, desorganização ependimária e aumento de células da micróglia, caracterizam o quadro de meningite tuberculosa, que também foram citados em outros modelos animais prévios, utilizando coelhos,⁹⁻¹¹ camundongos albinos,¹²⁻¹⁶ porquinhos da Índia¹⁷ e suínos.¹⁸ Segundo Rock e colaboradores, apesar dos estudos em coelhos serem indiscutivelmente os mais relevantes, algumas avaliações imunológicas são indisponíveis para tal modelo, sugerindo que o desenvolvimento de estudos em camundongos seja, necessariamente, o mais adequado.¹⁹

É sabido que um importante fator para este aspecto inflamatório se encontra na resposta imune local desencadeada pela ativação da micróglia, considerada a primeira linha de defesa contra infecções no SNC.^{20, 21} Apesar deste estudo não conter uma análise imunológica em seu delineamento, pesquisas semelhantes têm contribuído através de marcações imunohistoquímicas e dosagens de substâncias relacionadas à resposta imune. A exemplo das evidências de elevação das citocinas pró-inflamatórias: INF- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-12 diretamente relacionados à reação local.^{10, 12, 16} Já foram dosados também: TGF- β , IL-4 e IL-10,¹⁶ que parecem agir como imunomoduladores, conferindo neuroproteção.

Diferentemente de outros modelos,^{9, 11, 13-16, 18} nossas análises não evidenciaram a formação do tuberculoma. Este fato pode estar diretamente relacionado ao tempo de sacrifício estabelecido,

quatro semanas, visto que a formação granulomatosa advém de um processo inflamatório crônico.²² Esta ausência também foi relatada por Mazzolla, que manteve seus animais infectados por seis semanas¹². Hernandez et al. em seu estudo de 2010 descreveram apenas processo inflamatório inicial em seus camundongos sacrificados entre 3 – 4 semanas. Diferente de órgãos coletados após 60 – 120 dias da infecção pelos mesmos pesquisadores, nos quais foram retratados grandes nódulos inflamatórios (tuberculomas).¹⁶

Deve-se destacar que a utilização da infecção por via intratraqueal aproxima este modelo murino ao processo infeccioso em humanos. O mesmo já havia sido realizado em outro experimento,¹⁶ contudo utilizando camundongos BALB/c (albinos). O que pode justificar respostas diferentes do hospedeiro, pois há descrição de que estes animais secretam mais IL-10, o que se relaciona com susceptibilidade na fase inicial da infecção.²³ Fornefett et al. em 2018, também compararam a resposta imune entre camundongos BALB/c e C57BL/6, e concluíram que os últimos responderam melhor à infecção devido sua propensão à resposta Th1.²⁴

Além disso, a utilização dos camundongos C57BL/6 amplia grandemente as possibilidades de estudos futuros, visto que esta representa a cepa murina mais utilizada mundialmente,²⁵ sendo o primeiro mamífero não humano a ser sequenciado geneticamente.²⁶ Isso expande a viabilidade aos estudos genéticos e imunobiológicos envolvendo animais *knockout*, que podem ser a chave para a elucidação de aspectos desconhecidos da doença em questão.

Em suma, o modelo experimental de neurotuberculose foi estabelecido pela evidência do processo inflamatório e da presença do bacilo em análises morfológicas. Contudo, a não identificação da estrutura granulomatosa induz à reflexão sobre o tempo de infecção utilizado. Ressalta-se também que um número amostral maior pode enriquecer os resultados através da maior diversidade histológica proporcionada. Ainda assim, a escolha da cepa bacilar e murina,

associada à via de infecção intratraqueal merecem destaque, pois visa-se a ampliação de perspectivas experimentais futuras.

3.6 Agradecimentos

À Coordenação de Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, pelo fomento financeiro durante a pesquisa. Aos colaboradores do Laboratório de Vacinas Gênicas da FMRP/USP, que viabilizaram o estudo através da sua infraestrutura em biossegurança. E ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, em especial ao Laboratório de Neurociência Molecular, pelo aporte estrutural e material.

3.7 Conflitos de interesse

Não houve conflitos de interesse no estudo.

3.8 Referências

1. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. Campos HS. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão*. Jan 2006; 15(1): 29 – 35.
3. Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infect Dis*. 2014 Jan 8;14:9. doi:10.1186/1471-2334-14-9
4. Van der Flier M, Hoppenreijns S, van Rensburg AJ, Ruyken M, Kolk AHJ, Springer P, et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Blood-Brain Barrier Disruption in Tuberculous Meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jul 1;23(7):608–13.
5. Sinner SW, Tunkel AR. Approach to the diagnosis and management of tuberculous meningitis. *Curr Infect Dis Rep*. 2002 Aug;4(4):324–31.
6. Wilkinson RJ, Rohlwink U, Misra UK, Van Crevel R, Mai NTH, Dooley KE, Caws M, Figaji A, Savic R, Solomons R, Thwaites GE. Tuberculous Meningitis. International Research Consortium. *Nature Reviews Neurology*. 2017 Oct;13(10):581–598. doi: 10.1038/nrneuro.2017.120
7. Hernández PR. Modelling of Cerebral Tuberculosis: Hope for Continuous Research in Solving the Enigma of the Bottom Billion's Disease. *Malays J Med Sci*. 2011 Jan-Mar;18(1):12-5.
8. Rich AR, McCordock, HA. 1933. The pathogenesis of tuberculous meningitis. *Bull. Johns Hopkins Hosp*. 52:5–37.
9. Feldman S, Behar AJ, Weber D. Experimental Tuberculous Meningitis in RabbitsII. Effect of Hydrocortisone on the Hypersensitivity Reaction of the Meninges. *Arch Neurol*. 1960 Oct;3(4):420–424. doi:10.1001/archneur.1960.00450040070010

10. Tsenova L, Sokol K, Freedman VH, Kaplan G. A combination of thalidomide plus antibiotics protects rabbits from mycobacterial meningitis-associated death. *J Infect Dis.* 1998 Jun;177(6):1563-72.
11. Tucker EW, Pokkali S, Zhang Z, et al. Microglia activation in a pediatric rabbit model of tuberculous meningitis. *Dis Model Mech.* 2016 Dec 1;9(12):1497-1506. doi: 10.1242/dmm.027326
12. Mazzolla R1, Puliti M, Barluzzi R, Neglia R, Bistoni F, Barbolini G, Blasi E. Differential microbial clearance and immunoresponse of Balb/c (Nramp1 susceptible) and DBA2 (Nramp1 resistant) mice intracerebrally infected with *Mycobacterium bovis* BCG (BCG). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 Jan 14;32(2):149-58. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00547.x
13. Van Well GT, Wieland CW, Florquin S, Roord JJ, van der Poll T, van Furth AM. A new murine model to study the pathogenesis of tuberculous meningitis. *J Infect Dis.* 2007 Mar 1;195(5):694-7. DOI: 10.1086/511273
14. Wu HS, Kolonoski P, Chang YY, Bermudez LE. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. *Infect Immun.* 2000 May;68(5):2979-84. PMID: 10768998
15. Majeed S, Radotra BD, Sharma S. Adjunctive role of MMP-9 inhibition along with conventional anti-tubercular drugs against experimental tuberculous meningitis. *Int J Exp Pathol.* 2016 Jun;97(3):230-237. doi: 10.1111/iep.12191
16. Hernandez PR, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb).* 2010 Jul;90(4):268-77. doi: 10.1016/j.tube.2010.05.002. Epub 2010 Jun 30.
17. Caspar GB, Knox HF. The rôle of hypersensitivity in the production of experimental meningitis. *Journal of Experimental Medicine.* 1932 Aug; 56(2):203-221. doi: 10.1084/jem.56.2.203
18. Bolin CA, Whipple DL, Khanna KV, Risdahl JM, Peterson PK, Molitor TW. Infection of swine with *Mycobacterium bovis* as a model of human tuberculosis. *J Infect Dis.* 1997 Dec;176(6):1559-66. PMID: 9395368
19. Rock RB, Olin M, Baker CA, Molitor TW, Peterson PK. Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Apr;21(2):243-61. doi: 10.1128/CMR.00042-07
20. Mucke L, Eddleston M. Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J.* 1993 Oct;7(13):1226-1232. PMID: 8405808
21. Gehrman J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* 1995 Mar;20(3): 269-287. PMID: 7550361
22. Kummar V, et al. Inflamações. In: Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças. 8th ed. Tradução de Patrícia Dias Fernandes et al. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 73-74.
23. Ana Paula J-K, Andre K, Amanda J, Mercedes GJ, Andreas D, David HR, Joanne T, Ian MO. NK Cells Respond to Pulmonary Infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but Play a Minimal Role in Protection. *The Journal of Immunology.* 2003 December 1;171(11): 6039-6045. PMID: 14634116
24. Fornefett J, Krause J, Klose K, et al. Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent *Rodentibacter pneumotropicus* (*Pasteurella*

- pneumotropica) strain. BMC Microbiol. 2018 May 30;18(1):45. doi:10.1186/s12866-018-1186-8
25. Song HK, Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. Lab Anim Res. 2017 Jun;33(2):119-123. doi: 10.5625/lar.2017.33.2.119
 26. Waterston RH, et al. (Mouse Genome Sequencing Consortium), "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome," Nature. 2002 Dec;420(6915):520-62. doi: 10.1038/nature01262

ANEXOS

ANEXO A – Processamento do cérebro

1. Desprezada a coluna vertebral;
2. Os cérebros foram cortados de forma transversa;
3. Os cortes foram colocados em cassetes separados e identificados com lápis (tipo HB) em papel;
4. Rodagem da bateria:
 - Álcool 70% - 30'
 - Álcool 80% - 30'
 - Álcool 90% - 30'
 - Álcool 100% I - 40'
 - Álcool 100% II - 40'
 - Álcool-Xilol (1:1) - 15'

Tirado o excesso de álcool antes de seguir para os Xilol's

Xilol I - 60'

Xilol II - 60'

Xilol III - 60'

Tirado, novamente, o excesso do xilol para ir para a parafina

Parafina infiltração - 60'

Inclusão da peça

ANEXO B – Processamento do pulmão

Os pulmões foram identificados em papel escrito com lápis HB e nos cassetes, e seguiu-se a rodagem de bateria:

Álcool 90% = 90'

Álcool 95% = 90'

Álcool 100%= 60'

Álcool 100%= 30'

Álcool-Xilol = 60'

Xilol = 30'

Xilol = 12'

Xilol = 13'

Parafina 1 = 45'

A peça anatômica ficou com o ápice voltado para cima.

ANEXO C - Protocolo de coloração - Hematoxilina e Eosina

Xilol I – 2’

Xilol II – 2’

Xilol III – 2’

Álcool Absoluto – 2’

Álcool Absoluto – 2’

Álcool 95% - 2’

Álcool 80% - 2’

Álcool 70% - 2’

Água destilada I – 2’

Água destilada II – 2’

Hematoxilina – 3’

3 Lavagens em água destilada

Água destilada III – 2’

Eosina 1% - 30’’

Álcool 80% - 2’

Álcool 95% - 2’

Álcool absoluto – 2’

Xilol I – 2’

Xilol II – 2’

Xilol III – 2’

Montagem em Entellan ® e lamínula

ANEXO D – Protocolo de coloração Ziehl-Neelsen

Xilol I – 15’

Xilol II – 15’

Xilol III – 15’

Álcool Absoluto – 2’

Álcool 90% - 2’

Álcool 80% - 2’

Água corrente – 5’

Fucsina – 60’

Água – 10’ a 30’ (até ver a água límpida)

Diferenciador (até tirar o excesso do tecido)

Azul de metileno – 5’

Água destilada (até o tecido ficar azulado)

Álcool 70% - 2 mergulhos

Álcool 80% - 2 mergulhos

Álcool 90% - 2 mergulhos

Álcool absoluto – 2 mergulhos

Álcool absoluto – 2 mergulhos

Xilol I – 2 mergulhos

Xilol II – 2 mergulhos

Montagem em Entellan ® e lamínula

Solução de fucsina básica

0,5g de fucsina básica

5 mL de álcool absoluto

1g de fenol cristal

50 mL de água destilada

Diferenciador

990 mL de álcool 70%

10 mL de ácido clorídrico

Solução Estoque azul de metileno

1,4g de azul de metileno

100 mL de álcool 95%

Solução Uso de azul de metileno

10 mL da solução estoque

90 mL de água destilada