



Universidade Federal de Sergipe

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

**LESÕES TECIDUAIS E ATIVAÇÃO MICROGLIAL NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL PROVOCADOS PELO BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN**

JOSÉ EDUARDO HASMAN

ARACAJU-SE

2015



Universidade Federal de Sergipe

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

**LESÕES TECIDUAIS E ATIVAÇÃO MICROGLIAL NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL PROVOCADOS PELO BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN**

JOSÉ EDUARDO HASMAN

Monografia apresentada ao Departamento de
Medicina da Universidade Federal de Sergipe
como pré-requisito obrigatório para obtenção
de título de bacharel em Medicina

Orientador: Prof. Dr. Waldecy de Lucca Junior

ARACAJU-SE

2015

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

JOSÉ EDUARDO HASMAN

**LESÕES TECIDUAIS E ATIVAÇÃO MICROGLIAL NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL PROVOCADOS PELO BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN**

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Monografia apresentada ao Departamento de
Medicina da Universidade Federal de Sergipe
como pré-requisito obrigatório para obtenção
de título de bacharel em Medicina

Orientado: José Eduardo Hasman

Orientador: Prof. Dr. Waldecy de Lucca Junior

BANCA EXAMINADORA

ARACAJU-SE

2015

Dedico este trabalho à minha mãe, Izaura Martins Hasman (*in memoriam*) por ter me mostrado, desde muito cedo, o que é integridade, honestidade e justiça, e que o caráter de um indivíduo não está atrelado à sua condição financeira ou educacional.

“El que estudia Medicina sin libros navega un mar desconocido, pero el que estudia la Medicina sin Pacientes no va a la mar en lo absoluto”

Willian Osler

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem me educado para o entendimento do senso de responsabilidade e justiça que deve permear a vida de todo indivíduo.

Aos meus irmãos e amigos, por me apoiarem nessa nova fase de mudança profissional, sem questionar pormenores que certamente ocorreriam.

Ao meu orientador, Waldecy de Lucca Junior, por me dar a chance de trabalhar ao seu lado e participar da construção de um espaço de aprendizado de ciência na Academia.

Aos colegas de curso, Tércio, Genilson, Tayanne, Dimas, Freed Melo e Arnaldo, pela companhia, momentos de descontração e aprendizado durante o período no Laboratório de Biologia Celular.

A todas as pessoas que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1 – Fotomicrografia de secção do SNC, evidenciando a presença do corante Azul de Evans em ventrículo lateral 32
- Figura 2 – Fotomicrografia de secção do SNC corada pelo método de Ziehl-Neelsen, evidenciando, em azul, bacilos no tuberculoma, em vermelho, mielina dos neurônios 32
- Figura 3 – Fotomicrografia de secção do SNC corada pelo método de Nissl, evidenciando a gliose reacional ao tuberculoma e em violeta, os neurônios 33
- Figura 4 – Fotomicrografias de secção do SNC coradas com hematoxilina-eosina, do grupo controle e do grupo submetido a injeção de BCG no ventrículo lateral 34

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BHE	Barreira Hematoencefálica
CD18	Cluster of Differentiation 18
CEPA	Comite de Ética em Pesquisas com Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GFAP	Green Flourescent Protein-A
hab	Habitantes
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hsp65	Heat shock protein 65
IgG	Imunoglobulina G
INFγ	Interferon <i>gama</i>
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
MTB	Meningite Tuberculosa
NADPH	Nicotinamida Adenina Di-nucleotídeo Fosfato Hidrogenase
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PNTC	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
RHZE	Rifampicina/Isoniazida/Pirazinamida/Etambutol
SINAM	Sistemas de Informação de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
SNT	Serviço Nacional de Tuberculose
TB	Tuberculose
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral <i>alfa</i>
UFS	Universidade Federal de Sergipe
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cfu	Unidade formadora de colônia
g	grama
kDa	kilodalton
M	Mol
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
mm	milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
α	alfa
γ	gama
μ	micro
μL	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 A TUBERCULOSE (TB).....	11
2.2 A TB NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (NEURO TB).....	13
3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
4 INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO – SCIENTIA PLENA.....	21
4.1 REGRAS PARA PUBLICAÇÃO.....	22
4.2 FOCO E ESCOPO.....	22
4.3 PERIODICIDADE.....	23
4.4 POLÍTICA DE ACESSO LIVRE.....	23
4.5 ARQUIVAMENTO.....	23
4.6 SUBMISSÕES ONLINE.....	23
4.7 DIRETRIZES PARA AUTORES.....	23
4.8 CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO.....	24
4.9 DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL.....	24
4.10 POLÍTICA DE PRIVACIDADE.....	24
4.11 TAXAS PARA AUTORES.....	25
4.12 SOBRE ESTE SISTEMA DE PUBLICAÇÃO.....	25
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4. CONCLUSÃO.....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Conhecida como a “peste branca” no século passado, a tuberculose pulmonar era uma das principais causas de morte em crianças e adultos jovens, porém com o advento do tratamento específico houve acentuada redução dessa mortalidade.

Embora passível de um efetivo tratamento, a tuberculose pulmonar permanece na atualidade como um importante problema de saúde pública mundial, principalmente pela ampla dispersão geográfica, emergência de casos multirresistentes e coinfeção com HIV.

Em 2012, foram registrados 71.230 casos novos da doença no SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação. As taxas de incidência foram de 36,7/100 mil habitantes para todas as formas de tuberculose e de 20,7/100 mil habitantes para os casos bacilíferos. As metas do milênio para tuberculose, pactuadas pela Organização das Nações Unidas, visam reduzir as taxas de incidência e de mortalidade em 50% até 2015. Apesar de o Brasil ser, ainda, um dos 22 países responsáveis por cerca de 80% dos casos de tuberculose do mundo, podemos verificar, até o ano de 2007, uma queda de 26% na incidência e de 32% na mortalidade pela doença em nosso país.

O desenvolvimento de novos modelos experimentais de tuberculose seriam de grande utilidade para elucidar mecanismos fisiopatológicos da doença e para testar esquemas terapêuticos para a prevenção e contenção da doença. Além disso, o desenvolvimento de novas vacinas torna-se indispensável como ferramenta de prevenção e controle da tuberculose.

Diante da relevância, alta morbimortalidade e escassez de estudos na literatura, o presente trabalho objetivou desenvolver um modelo experimental de neuro tuberculose para contribuir, junto a outros estudos, para a elucidação da fisiopatologia dessa doença e a compreensão dos seus eventos moleculares na produção de lesões, gerando assim, terapias mais específicas e com melhor resultado terapêutico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A TUBERCULOSE (TB)

A TB é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que usualmente afeta os pulmões (TB pulmonar), porém pode afetar outros tecidos (TB extrapulmonar). A TB é transmitida pelo ar quando o indivíduo está infectado e expele a bactéria, por exemplo, através da tosse (WHO, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), a TB permanece, ainda, como um sério problema de saúde pública e está intimamente relacionada com a pobreza, além de ser associada à exclusão social e à marginalização de parte da população, submetida a um precário sistema de moradia, condições de vida, quadros de desnutrição e dificuldade de acesso aos serviços e bens públicos. Portanto a TB figura como uma das enfermidades a serem enfrentadas pelo Brasil e pelo mundo (BRASIL, 2014a).

A organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que um grupo de 22 nações concentram, aproximadamente, 80% dos casos de TB, sendo que o Brasil faz parte desse grupo e ocupa a 16^a posição em números absolutos de casos. A Índia, China e África do Sul são os países com maior carga da doença, ou seja, apresentam o maior coeficiente de incidência – número de casos de TB por 100.000 habitantes (hab.). Estima-se que no ano de 2010 ocorreram no mundo aproximadamente 8,8 milhões de casos novos, 1,1 milhão de óbitos entre indivíduos não portadores de HIV e 400 000 óbitos entre pessoas soropositivas para HIV (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013; WHO, 2013).

No ano de 2013, o Brasil diagnosticou um total de 71.123 casos novos de TB, o que mostrava um coeficiente de incidência de 35,4/100.000 hab., destacando uma redução de 20,4% ao longo dos anos, pois em 2003 esse valor foi de 44,4/100.000 hab., sendo que nesse mesmo ano cerca de 85,7% do total de casos novos de TB apresentaram a forma clínica pulmonar e, destes, 65,2% eram bacilíferos, que são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão da doença, quando não tratados adequadamente até a cura. No ano de 2012, 70,6% dos casos de TB pulmonar bacilífera tiveram cura e 10,5% abandonaram o tratamento, sendo que a OMS recomenda a cura de pelo menos 85% dos casos de TB

pulmonar bacilífera (BRASIL, 2014a). A TB é uma das mais importantes doenças infecciosas que causam mortes pelo mundo. Cerca de 2 bilhões de indivíduos estão infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* e 8 a 12 milhões de novos casos de TB ativa ocorrem a cada ano, com cerca de 2 a 3 milhões de óbitos anuais no mundo (SANTUCCI et al., 2011).

Quase um terço da população mundial hospeda o bacilo sem desenvolver a doença. Uma das alternativas contra a doença é a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), cuja eficiência é duvidosa. A BCG é uma vacina viva baseada no *Mycobacterium bovis* atenuado para o uso em humanos, e que foi desenvolvida em 1921, cujo nível de proteção varia de 0 a 75% (ZUCCHI, 2007).

O *Mycobacterium tuberculosis*, após penetrar no indivíduo pela via respiratória, pode se alojar em qualquer órgão, não necessariamente nos pulmões. Essa capacidade de se disseminar e se instalar em qualquer órgão pode se dar durante a primoinfecção, quando a imunidade específica ainda não está desenvolvida, ou após esta, em qualquer período de tempo quando houver queda na capacidade do hospedeiro em manter o bacilo nos locais de implantação inicial. Independentemente de qual seja a forma patogênica da doença, a disseminação do bacilo pode ocorrer, também, a partir da manipulação cirúrgica ou durante manipulação diagnóstica de órgão doente (LOPES et al., 2006).

A história nos mostra que no início do século XX, no Brasil, Oswaldo Cruz reconhece que é necessário a atenção das autoridades sanitárias para o assunto TB e suas consequências sociais e econômicas. Ele procurou instituir um plano de ação para o combate da doença, porém, de pequeno impacto. É, então, instituída, no final da década de 10, a Reforma Carlos Chagas, na qual criou-se a Inspetoria de Profilaxia da TB, que preconizava o diagnóstico e tratamento dos casos de TB. Em 1927, Arlindo de Assis aplica pela primeira vez a vacina BCG oral em recém-nascidos. Em 1941, foi criado o Serviço Nacional de Tuberculose (SNT) com a função de estudar os problemas relativos a doença e ao desenvolvimento de meios de ação profilática e assistencial. Com a utilização de tuberculostáticos, como Estreptomina (1948), Ácido Para-Amino-Salicílico (1949), Hidrazida (1952), começa uma maior modificação na dinâmica da mortalidade por TB, sendo que na década de 60, começa efetivamente a utilização de esquemas terapêuticos padronizados, com a utilização de Isoniazida e Rifampicina (ZUCCHI, 2007).

No ano de 2009, o Ministério da Saúde (MS), por meio do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), redefiniu critérios para o estabelecimento de municípios

prioritários para a intensificação das ações de controle da tuberculose, sendo que o principal foco das ações foi o alcance das Metas de Desenvolvimento do Milênio. Neste sentido, foi pactuada para 2015 a redução de 50%, em relação a 1990, dos coeficientes de incidência e de mortalidade por tuberculose (BRASIL, 2014b).

Desde 1979 o PNCT/MS recomenda para o de tratamento da TB um conjunto de fármacos composto por: Rifampicina (R), Isoniazida (H) e Pirazinamida (Z). Atualmente este esquema de tratamento está sendo modificado e as principais mudanças são: Introdução de um quarto fármaco, o Etambutol (E), na fase de ataque (o esquema básico para tratamento da TB, idade ≥ 10 anos, será com quatro medicamentos nos dois primeiros meses e com dois medicamentos nos quatro meses subsequentes – 2RHZE/4RH); adotar a associação dos fármacos em forma de comprimidos, com doses fixas combinadas 4 em 1 (RHZE), para a fase de tratamento intensivo e 2 em 1 (RH), para fase de continuação; utilizar formulações de comprimidos em substituição às cápsulas anteriormente disponíveis; adequar as doses de H e Z em adultos para 300 mg/dia e 1.600 mg/dia, respectivamente (CONDE et al., 2009).

Ainda que passível de um efetivo tratamento, a TB permanece na atualidade como um importante problema de saúde pública mundial, em virtude da ampla dispersão geográfica, emergência de casos multirresistentes e coinfeção com HIV. Estudos recentes sugerem que as modificações nas estimativas nacionais de incidência da tuberculose estão mais associadas às mudanças nos índices socioeconômicos e estado geral de saúde da população do que ao desempenho de programas de controle desse agravo (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013).

2.2 A TB NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (NEURO TB)

As formas extrapulmonares da TB acontecem em órgãos sem condições ótimas de crescimento bacilar, com instalação insidiosa e evolução lenta, quase sempre. As formas mais frequentes, invariavelmente, são: pleural, linfática, osteoarticular, geniturinária e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença (LOPES et al., 2006).

É bem conhecido o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) pela tuberculose, sendo que tal comprometimento é resultado da disseminação hematogênica de

focos infecciosos distantes de *Mycobacterium tuberculosis* (PIMENTEL et al., 2000).

Cerca de 5 a 15% dos casos de TB extrapulmonar são identificados como de TB do SNC, que é reconhecidamente a forma de maior potencial de letalidade. A TB do SNC pode ser classificada em três categorias clínicas: meningoencefalite tuberculosa ou, como é mais conhecida, meningite tuberculosa (MTB), tuberculoma cerebral e aracnoidite espinhal. Estudos apontam taxas de MTB que variam de 5 a 12% do total de casos de TB nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Na Índia, lesões intracerebrais que ocupam espaço, mantêm incidência de 20 a 30%, enquanto que no Brasil a MTB corresponde a 5% dos casos notificados de TB (BARROSO et al., 2002).

A MTB é uma das manifestações mais devastadoras da tuberculose extrapulmonar, com uma mortalidade estimada de 1,5% na população da Índia. O diagnóstico precoce e o tratamento imediato são os pilares de uma gestão eficaz da doença (HALDAR et al., 2012).

A TB do SNC ocorre principalmente na infância, porém aumenta significativamente nos adultos imunossuprimidos, sendo que estes quadros de infecção estão associados com morbidez e mortalidade consideráveis (KINGKAEW et al., 2009; SHARMA; MOHAN; KADHIRAVAN, 2005). A patogênese da TB no SNC é iniciada como uma infecção secundária durante disseminação hematogênica de infecção pulmonar para o parênquima cerebral (DONALD; SCHAAF; SCHOEMAN, 2005).

A forma mais grave de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, em humanos, é a MTB, a qual afeta predominantemente crianças, sendo que mais de 50% dos casos resultam em óbito (SINNER; TUNKEL, 2002; VAN DER FLIER et al., 2004).

Para se diagnosticar a MTB, é necessário o exame do liquor, que na maioria das vezes apresenta hipertensão liquórica associada, aspecto cristalino e limpidez, com pleocitose em torno de 300 a 500 células/mL e predomínio de mononucleares. O teor de proteínas está sempre elevado, sendo acompanhado por glicorraquia baixa (LOPES et al., 2006).

Já os tuberculomas podem ser intraparenquimatosos ou meníngeos, e são, frequentemente, encontrados como lesões solitárias, embora possam ser múltiplos em 15% a 34% dos casos. Os tuberculomas maiores podem produzir sintomas semelhantes aos de um processo expansivo, porém muitos não são acompanhados de sinais e sintomas de lesão cerebral focal. O diagnóstico diferencial se faz com toxoplasmose, criptococose, sífilis, linfoma primário do SNC e abscessos piogênicos (DE CASTRO et al., 1995; SALGADO et al., 1989).

Estudos propõem que o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* pode atravessar a barreira hematoencefálica e invadir o SNC como bacilo livre, apesar das propriedades neuroprotetoras conhecidas (JAIN et al., 2006). Entretanto, os mecanismos associados à subtração das propriedades protetoras da barreira hematoencefálica às bactérias, incluindo o *Micobacterium tuberculosis*, permanecem, basicamente, indefinidos. Eventos iniciais em TB do SNC são caracterizadas pela infecção das meninges, o estabelecimento de focos de infecção localizada, e a liberação de bacilos para o espaço subaracnoide (RANDALL et al., 2014).

Diversos estudos têm investigado e relatado diferentes tipos de células que são alvo para a invasão de bacilos *Micobacterium tuberculosis* (GARCÍA-PÉREZ; MONDRAGÓN-FLORES; LUNA-HERRERA, 2003; MUÑOZ; RIVAS-SANTIAGO; ENCISO, 2009; TEITELBAUM et al., 1999; WOLF et al., 2007). Entre estas células que são alvo da invasão estão os macrófagos, que são descritos como células hospedeiras preferidas, apesar da sua função protetora primária em resposta imune inata. O desenvolvimento evolutivo de mecanismos específicos de invasão permite ao *Micobacterium tuberculosis* existir dentro do que é essencialmente um ambiente hostil. Os estudos também indicaram que mais que os macrófagos, outras células, tais como células dendríticas, estão infectadas por *Micobacterium tuberculosis*, a uma taxa mais elevada do que se pensava anteriormente (WOLF et al., 2007).

Experimentos, com camundongos *knockout* para *CD18*, mostraram que micobactérias podem entrar no SNC carregadas pelo sangue e secreções, e que os monócitos/neutrófilos podem não ser necessários para este tipo de transporte (WU et al., 2000). Estudos *in vitro* demonstraram que o *Micobacterium tuberculosis*, quando livre, pode invadir células endoteliais (BERMUDEZ et al., 2002; BIRKNESS et al., 1999).

O diagnóstico de neuro tuberculose implica a instituição imediata de tratamento tuberculostático com ao menos 4 drogas, pelo período de 12 a 30 meses, mesmo após o desaparecimento dos sintomas. Faz parte da terapia coadjuvante o uso de corticosteroides durante 4 a 8 semanas, observando-se melhora do quadro clínico naqueles pacientes que desenvolvem hipertensão intracraniana ou cuja lesão apresenta importante efeito de massa. A melhora clínica ocorre mesmo antes do desaparecimento das lesões radiológicas. O aparecimento de novas lesões ou o crescimento daquelas já existentes não significa resistência medicamentosa (PIMENTEL et al., 2000).

Estudos indicam que, no SNC, as células da micróglia são alvo da invasão pelo *Micobacterium tuberculosis*, o que promove intensa resposta pró-inflamatória dependente da

NADPH-oxidase e a indução de intermediários reativos de nitrogênio (RANDALL et al., 2014).

No SNC, a ativação de células gliais e a subsequente expressão de várias proteínas estão associadas com a indução da inflamação, presente na neuro-TB e em outras afecções (GAO et al., 2002). Durante a maturação cerebral, acredita-se que a micróglia seja responsável pela desobstrução de células eliminadas por apoptose. No cérebro maduro e sob condições fisiológicas a micróglia inativa adota aparência ramificada, como característica morfológica, e atua como célula de defesa do sistema imune. A micróglia, entretanto, é particularmente sensível às mudanças em seu microambiente e torna-se ativa em resposta às infecções ou lesões. A micróglia ativada regula uma variedade de receptores de superfície, incluindo o MHC (complexo maior de histocompatibilidade) e receptores do sistema complemento (KREUTZBERG, 1996).

Células microgлияis, uma vez ativadas, podem induzir a secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas, conduzindo o microambiente à neurotoxicidade. Ainda assim, a mesma secreção de citocinas e fatores tróficos locais pela glia tem sido associada a um sistema de proteção neuronal (HANSSON; RÖNNBÄCK, 2003).

Concomitante às mudanças morfológicas e regulação de moléculas de superfície, a micróglia ativada secreta fatores solúveis necessários à sobrevivência neuronal como o fator de crescimento neuronal (NGF). Entretanto, grande parte dos fatores produzidos pela micróglia ativada é de natureza pró-inflamatória (LIU; HONG, 2003).

A participação da micróglia como células de defesa no SNC tem importante papel na produção de mediadores inflamatórios diante da infecção pelo *Micobacterium tuberculosis*. Esta participação deve estar associada à fisiopatologia da doença, contribuindo para a contenção do patógeno pela produção de NO e pela modulação da resposta inflamatória pela ativação de NF κ B, e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas (ZUCCHI, 2007).

O NF κ B é um fator de transcrição que preexiste como um complexo latente no citoplasma de células não estimuladas. Este fator tem participação ativa na regulação de um grande número de processos celulares, tais como a resposta imune e inflamação, o desenvolvimento e diferenciação celular e a morte celular programada (apoptose) (HENGARTNER, 2000).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese do

comprometimento neural da TB no SNC são, ainda, pouco compreendidos, apesar da severidade da apresentação clínica da doença, de modo que pouco pode ser feito para a prevenção ou contenção deste processo patológico. O desenvolvimento de modelos experimentais de neuro tuberculose podem ajudar a elucidar tais mecanismos celulares e moleculares. Muitos modelos experimentais de tumores foram estabelecidos durante as últimas décadas, principalmente modelos em neuro-oncologia, entretanto poucos modelos experimentais de neuro tuberculose foram descritos (ZUCCHI, 2007).

Sendo assim, o desenvolvimento de um modelo murino nos pareceu adequado para o estudo de lesões provocadas pelo processo de instalação do bacilo *Micobacterium tuberculosis* no encéfalo.

3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, E. C. et al. Tuberculoma cerebral. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 1, p. 55–58, 2002.

BERMUDEZ, L. E. et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 140–6, jan. 2002.

BIRKNESS, K. A. et al. An in vitro tissue culture bilayer model to examine early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 653–8, fev. 1999.

BRASIL. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. v. 44, n. 2, 2014a.

BRASIL, M. D. S. **Panorama da tuberculose no Brasil Indicadores epidemiológicos e operacionais Panorama da tuberculose no Brasil Indicadores**, 2014b.

CONDE, M. B. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 10, p. 1018–1048, 2009.

DE CASTRO, C. C. et al. CT scans of cranial tuberculosis. **Radiologic clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 753–69, jul. 1995.

DONALD, P. R.; SCHAAF, H. S.; SCHOEMAN, J. F. Tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: the Rich focus revisited. **The Journal of infection**, v. 50, n. 3, p. 193–5, 4 abr. 2005.

GAO, F. et al. NF- κ B mediates IL-1 β -induced synthesis/release of α 2-macroglobulin in a human glial cell line. **Molecular Brain Research**, v. 105, n. 1-2, p. 108–114, 30 set. 2002.

GARCÍA-PÉREZ, B. E.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; LUNA-HERRERA, J. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 2, p. 49–55, ago. 2003.

HALDAR, S. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* GlcB or HspX Antigens or devR DNA impacts the rapid diagnosis of tuberculous meningitis in children. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44630, jan. 2012.

HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 3, p. 341–8, mar. 2003.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–6, 12

out. 2000.

JAIN, S. K. et al. Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 9, p. 1287–95, 1 maio 2006.

KINGKAEW, N. et al. HIV-associated extrapulmonary tuberculosis in Thailand: epidemiology and risk factors for death. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 722–9, 11 nov. 2009.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–8, ago. 1996.

LIU, B.; HONG, J.-S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 1–7, jan. 2003.

LOPES, A. J. et al. Quais são os desafios para o diagnóstico da tuberculose extrapulmonar? Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 4, p. 253–261, 2006.

MUÑOZ, S.; RIVAS-SANTIAGO, B.; ENCISO, J. A. Mycobacterium tuberculosis entry into mast cells through cholesterol-rich membrane microdomains. **Scandinavian journal of immunology**, v. 70, n. 3, p. 256–63, set. 2009.

PIMENTEL, M. L. V. et al. Múltiplos tuberculomas intracerebrais na vigência de terapia específica para tuberculose pulmonar: a propósito de um caso. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 2B, p. 572–577, jun. 2000.

RANDALL, P. J. et al. Neurons are host cells for Mycobacterium tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 82, n. 5, p. 1880–90, maio 2014.

SALGADO, P. et al. Intracranial tuberculoma: MR imaging. **Neuroradiology**, v. 31, n. 4, p. 299–302, jan. 1989.

SAN PEDRO, A.; OLIVEIRA, R. M. DE. [Tuberculosis and socioeconomic indicators: systematic review of the literature]. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 33, n. 4, p. 294–301, 2013.

SANTUCCI, N. et al. A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26363, jan. 2011.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A.; KADHIRAVAN, T. HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management. **The Indian journal of medical research**, v. 121, n. 4, p. 550–67, abr. 2005.

SINNER, S. W.; TUNKEL, A. R. Approach to the Diagnosis and Management of Tuberculous

Meningitis. **Current infectious disease reports**, v. 4, n. 4, p. 324–331, ago. 2002.

TEITELBAUM, R. et al. The M Cell as a Portal of Entry to the Lung for the Bacterial Pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunity**, v. 10, n. 6, p. 641–650, 6 jun. 1999.

VAN DER FLIER, M. et al. Vascular endothelial growth factor and blood-brain barrier disruption in tuberculous meningitis. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 23, n. 7, p. 608–13, jul. 2004.

WHO. Global Tuberculosis Report 2013. **World Health Organization**, p. 306, 2013.

WOLF, A. J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 4, p. 2509–19, 15 ago. 2007.

WU, H. S. et al. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. **Infection and immunity**, v. 68, n. 5, p. 2979–84, maio 2000.

ZUCCHI, F. C. R. **Estabelecimento de um modelo experimental de neurotuberculose**. 2007. Tese (Doutorado em Neurologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17140/tde-15042011-160316/>>. Acesso em: 2015-06-28.

4 INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO – *SCIENTIA PLENA*

Scientia Plena

Contato Principal

Ana F. Maia/André M.C. de Souza/ Adriana Bocchiglieri
Universidade Federal de Sergipe
Telefone: +557921056848
E-mail: scientiaplena@gmail.com

Contato para Suporte Técnico

Ana F. Maia/André M.C. de Souza/ Edilson D. de Araújo
Telefone: +557921056848
E-mail: scientiaplena@gmail.com

4.1 REGRAS PARA PUBLICAÇÃO

Scientia Plena é uma publicação científica mensal, editada pela Associação Sergipana de Ciências, dedicada a ajudar e incentivar o desenvolvimento da ciência.

Scientia Plena visa atingir um público amplo, composto de toda a comunidade científica envolvida na pesquisa e no desenvolvimento em todos os níveis.

Scientia Plena publica artigos de conteúdo original e resultados significativos em todas as áreas da ciência. Os artigos podem ser escritos em Português ou Inglês e devem ser enviadas para o Editor por meio de submissão eletrônica.

4.2 FOCO E ESCOPO

Primeiro, servir aos pesquisadores através da publicação imediata de avanços importantes em qualquer campo da ciência e promover um espaço de discussão e divulgação de assuntos referentes a ciência.

Segundo, assegurar que os resultados dos trabalhos científicos sejam rapidamente disseminados para o público em geral de uma forma que expresse sua importância para o conhecimento, a cultura e a vida diária.

Qualquer trabalho que atenda os objetivos acima e que não tenha sido publicado ou aceito para publicação em outro lugar será considerado para publicação em Scientia Plena.

Artigos de revisão não serão aceitos para publicação.

4.3 PERIODICIDADE

Scientia Plena é uma revista de periodicidade mensal

4.4 POLÍTICA DE ACESSO LIVRE

Esta revista oferece acesso livre imediato ao seu conteúdo, seguindo o princípio de que disponibilizar gratuitamente o conhecimento científico ao público proporciona maior democratização mundial do conhecimento.

4.5 ARQUIVAMENTO

Esta revista utiliza o sistema LOCKSS para criar um sistema de arquivo distribuído entre as bibliotecas participantes e permite às mesmas criar arquivos permanentes da revista para a preservação e restauração.

4.6 SUBMISSÕES ONLINE

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

4.7 DIRETRIZES PARA AUTORES

Os artigos devem ser preparados de acordo com o modelo que consta no artigo-exemplo: (http://scientiaplenu.org.br/public/journals/1/Modelo_Artigo_2011.docx)

No ato de envio do artigo o autor deve:

1) Indicar obrigatoriamente a área do conhecimento, de acordo com a lista a seguir, e uma subárea, de preenchimento livre.

Grandes áreas do conhecimento:

Ciências Agrárias

Ciências Biológicas

Ciências da Saúde

Ciências Exatas e da Terra

Ciências Humanas, Letras e Artes

Ciências Sociais Aplicadas

Engenharias e Computação

Multidisciplinar

2) Indicar 3 possíveis nomes de avaliadores do trabalho (nome completo, e-mail e instituição em que trabalha).

4.8 CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)
3. Os artigos estão preparados de acordo com o modelo que consta no artigo-exemplo: (http://scientiaplena.org.br/public/journals/1/Modelo_Artigo_2011.docx)
4. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
5. Indicar, no campo de Comentários ao Editor, área e subárea do conhecimento do trabalho.
6. Indicar, no campo de Comentários ao Editor, 3 possíveis nomes de avaliadores do trabalho (nome completo, e-mail e instituição em que trabalha).

4.9 DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Declaro que o presente artigo é original, não tendo sido submetido à publicação em qualquer outro periódico nacional ou internacional, quer seja em parte ou em sua totalidade. Declaro, ainda, que uma vez publicado na revista Scientia Plena, editada pela Associação Sergipana de Ciência, o mesmo jamais será submetido por mim ou por qualquer um dos demais co-autores a qualquer outro periódico. Através deste instrumento, em meu nome e em nome dos demais co-autores, porventura existentes, cedo os direitos autorais do referido artigo à Associação Sergipana de Ciência, que está autorizada a publicá-lo em meio impresso, digital, ou outro existente, sem retribuição financeira para os autores. Em virtude de aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

4.10 POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

4.11 TAXAS PARA AUTORES

Este periódico cobra as seguintes taxas aos autores.

Publicação de artigo: 200,00 (BRL)

Caso este documento seja aceito para publicação, será necessário o pagamento de uma *Taxa de Publicação de Artigo* para auxiliar nos custos de publicação.

4.12 SOBRE ESTE SISTEMA DE PUBLICAÇÃO

A revista usa o Open Journal Systems (OJS 2.4.6.0), sistema de código livre gratuito para a administração e a publicação de revistas, desenvolvido com suporte e distribuição pelo Public Knowledge Project, sob a licença GNU General Public License.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Lesões Teciduais e Ativação Microglial no Sistema Nervoso Central Provocados Pelo Bacillus Calmette-Guérin

J. E. Hasman¹; T. F. Oliveira¹; W. Lucca Jr¹

¹Departamento de Morfologia/Laboratório de Neurofisiologia/Universidade Federal de Sergipe, CEP-49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

daice@bol.com.br

(Recebido em dia de mes de ano; aceito em dia de mes de ano)

Resumo.

Introdução: Cerca de um terço da população mundial está infectada pelo agente etiológico da tuberculose (TB), aproximadamente 1,6 milhão de mortes em 2005. A meningite tuberculosa é uma das formas mais graves de comprometimento do sistema nervoso central (SNC) pela TB, afetando crianças, principalmente, com taxas de óbitos em torno de 50%. Apesar da gravidade da apresentação clínica, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese do comprometimento da TB no SNC são, ainda, pouco compreendidos. **Objetivo:** Desenvolver um modelo murino para a elucidação da fisiopatologia da TB no SNC e compreensão dos eventos moleculares na produção de lesões, gerando assim, terapias mais específicas e com melhor resultado terapêutico. **Materiais e Métodos:** Utilizou-se camundongos *swiss*, divididos em dois experimentos. No experimento I padronizou-se a posição da cânula no ventrículo lateral do SNC, com o auxílio de coordenadas estereotáxicas, no experimento II padronizou-se a carga bacteriana a ser injetada no ventrículo lateral. Após, realizou-se procedimento cirúrgico de perfusão intracardíaca, crio proteção do cérebro, montagem de séries de lâminas com secções dos cérebros, que foram submetidas às colorações por Ziehl-Neelsen, Nissl e hematoxilina-eosina. **Resultados e Discussão:** As coordenadas estereotáxicas selecionadas para serem utilizadas na implantação das cânulas no ventrículo lateral são: 0,25 mm posterior ao bregma, 0,5 mm látero-lateral e 2 mm dorsoventral a partir da calota óssea. Encontramos tuberculomas espalhados por todo o SNC apenas nos animais que receberam a dose de 10^5 cfu/ μ L. **Conclusão:** Injeção intracerebroventricular de BCG provoca a formação de tuberculomas que podem ser caracterizados por métodos histoquímicos.

Palavras-chave: Tuberculose, Lesões Teciduais, Bacillus Calmette-Guérin.

Tissue Injury and Activation Microglial the Central Nervous System Caused by Bacillus Calmette-Guérin.

Summary.

Introduction: About a third part third population is infected by the etiological agent of tuberculosis (TB), approximately 1.6 million deaths in 2005. The tuberculous meningitis is one of the most severe forms of the central nervous system (CNS) involvement by TB affecting children, especially, with death rates around 50%. Despite the severity of the clinical presentation, the molecular and cellular mechanisms involved in the pathogenesis of TB commitment in the CNS are still poorly understood. **Purpose:** To develop a murine model to elucidate the pathophysiology of TB in the CNS and understanding of the molecular events in the production of injury, thus generating more targeted therapies and better therapeutic result. **Materials and Methods:** We used swiss mice were divided into two experiments. In experiment I was standardized position of the cannula into the lateral ventricle of the CNS, with the aid of stereotactic coordinates in the second experiment was standardized bacterial charge to be injected into the lateral ventricle. After, there was surgery for intracardiac infusion create brain protection, blades series assembly with sections of the brains, which were submitted to staining by Ziehl-Neelsen, Nissl and hematoxylin-eosin. **Results and Discussion:** The stereotactic coordinates selected for use in the implementation of the cannula into the lateral ventricle are: 0.25 mm posterior to the bregma, 0.5 mm lateral-lateral and 2 mm dorsoventral from bone cap. Tuberculomas found scattered throughout the CNS only in the animals who received a dose of 10^5 cfu/ μ L. **Conclusion:** BCG intracerebroventricular injection causes the formation of tubers that can be characterized by histochemical methods.

Keywords: Tuberculosis, Tissue Injury, Bacillus Calmette-Guérin.

1. INTRODUÇÃO

A doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* é uma das mais importantes doenças infecciosas e oportunistas no mundo, responsável por 8,8 milhões de novos casos de tuberculose (TB) em 2005 e cerca de 1,6 milhão de mortes a cada ano, inclusive em pacientes coinfectados com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (1). Estratégias para o combate da TB têm por objetivo reduzir à metade a prevalência de TB e a taxa de mortalidade pela doença, isto é, reduzir a taxa anual mundial de mortes por TB para menos de um milhão até o ano 2015. Este será um grande passo para a eliminação da TB no mundo (definido como um caso por um milhão de habitantes) em 2050 (2).

Uma das armas contra a doença é a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), cuja eficiência é duvidosa. A BCG é uma vacina viva baseada no *Mycobacterium bovis* atenuado para uso humano, desenvolvida em 1921, cujo nível de proteção varia de 0 a 75% (3). Embora a vacina BCG funcione muito bem para certas doenças, ela apresenta algumas limitações. Ela pode, com certa margem de risco, provocar a infecção do paciente pelo patógeno a que se pretende prevenir. Sua eficácia varia de 0 a 75% e seu uso pode comprometer o diagnóstico de TB pelo teste tuberculínico. Essas limitações não ocorrem com a vacina de DNA, além de ela despontar nos dias atuais com um considerável potencial terapêutico no combate a doenças infecciosas como a TB (4).

A vacina de DNA, desenvolvida pelo Dr. Célio Lopes Silva (FMRP-USP), *heat shock protein 65* (*hsp65*) é baseada em um fragmento do código genético do agente causador da doença, o *Micobacterium tuberculosis*. Administrado por via intramuscular, demonstrou-se que esse gene pode criar condições para a produção da proteína antigênica a partir da maquinaria celular do indivíduo infectado (5). Em 2000, o *hsp65* foi patenteado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) como agente terapêutico gênico (4).

A observação inicial de que a vacinação com um único antígeno bacteriano (*hsp65*) poderia conferir alguma proteção a camundongos, contra posterior desafio com *Micobacterium tuberculosis* (6), confirmou-se em vários laboratórios (7–13). A característica essencial é a origem endógena do antígeno em células de camundongos transfectadas, que favorecem o desenvolvimento de linfócitos T (*CD8* e *CD44hi*) produzindo *interferon-γ* (INF γ), com citotoxicidade antígeno específica (9), promovendo lise em macrófagos infectados. A vacina *DNA-hsp65* parece ser um excelente modo de gerar estas células e pode ser capaz de promover proteção duradoura (10).

Desde que o desenvolvimento do componente citotóxico bactericida da resposta imune parece ser mais favorecido pela vacinação com *DNA-hsp65*, que pela infecção micobacteriana (14), foi questionado se a vacinação com *DNA-hsp65* seria benéfica em uma infecção tuberculosa já estabelecida (3).

O desenvolvimento de uma infecção em camundongos, iniciada pela injeção intravenosa de *Micobacterium tuberculosis* H37Rv, foi monitorado por oito semanas. Durante este período, o número de bacilos nos órgãos internos aumentou cerca de quatro vezes. Então os camundongos foram submetidos a 4 doses intramusculares de DNA plasmidial (contendo o gene *hsp65*), em intervalos de 2 semanas. O número de bacilos vivos nos órgãos internos, rapidamente declinou 2 e 5 meses após a primeira dose de *DNA-hsp65*. Efeitos menos significativos foram obtidos com plasmídeos expressando outros genes micobacterianos [70 kDa “*heat shock protein 70*” (*hsp70*) ou 6 kDa “*early secretory antigen*” (*ESAT6*)], paralelo à menor eficácia destes antígenos na vacinação de *DNA-hsp65* profilática (8).

Acrescenta-se a esses efeitos terapêuticos da *DNA-hsp65*, evidências de uma elevação da sua eficácia ao ser associada às drogas quimioterápicas em testes utilizando camundongos infectados com TB. Por isso, a avaliação da vacina de *DNA-hsp65* como adjuvante à quimioterapia em testes clínicos com humanos pode não ser uma perspectiva distante (15).

Contudo, para modelos de TB que infectem o sistema nervoso central (SNC) não há estudos que descrevam a ação de vacinas e de antibióticos. No SNC, infecções bacterianas são processos dinâmicos influenciados por múltiplas interações entre microrganismos e o sistema de defesa do hospedeiro. O cérebro e a medula espinal são relativamente bem protegidos de agentes que desencadeiam processos infecciosos, pelo tecido ósseo do crânio e coluna vertebral, pelas meninges e pela barreira hematoencefálica (BHE). Assim, bactérias requerem fatores

especiais de virulência para invadir o SNC e provocar a doença. Além disso, quando o patógeno penetra o SNC, mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados para controlar a infecção (16). A TB no SNC geralmente deve-se a uma infecção inicial nos pulmões ou em outros órgãos, e a contaminação do SNC geralmente ocorre pela circulação sanguínea.

A meningite tuberculosa (MTB), a forma de infecção pelo *Micobacterium tuberculosis* mais grave em humanos, afeta crianças, predominantemente, e mais de 50% dos casos resultam em óbito e muitos dos sobreviventes têm permanentes sequelas neurológicas (17,18). No SNC, a TB produz comumente hidrocefalia e tuberculomas. Pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana ou portadores da AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) podem apresentar infecção aguda do SNC e entre os patógenos infecciosos frequentemente pode ser encontrado o *Micobacterium tuberculosis* (19). A MTB é atribuída a uma descarga de organismos de pequenos tubérculos nas meninges, no cérebro, na medula espinal ou no plexo coroide, os focos de Rich (20), onde a disseminação micobacteriana ocorre através da BHE, possivelmente via plexo coroide (21). Esta disseminação pode ser facilitada com a ativação de mecanismos inflamatórios do organismo como a produção de *TNF- α* que parece facilitar o transporte de compostos para o encéfalo pela “abertura” da BHE (22).

Apesar da gravidade da apresentação clínica, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese do comprometimento da TB no SNC são pouco compreendidos. Sendo assim, o desenvolvimento de um modelo experimental de neuro-TB, possibilitará o estudo da expressão de fatores envolvidos na fisiopatologia da doença no SNC, permitindo a avaliação de mecanismos celulares e moleculares da doença como a identificação de riscos para um possível modelo de tratamento para a neuro-TB.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEPA/UFS: 04/2010).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados fêmeas de camundongos *swiss* pesando entre 20 e 25 gramas (entre 9 e 12 semanas de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Esses animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe durante uma semana para aclimação em um ciclo claro-escuro de 12:00 h / 12:00 h (claro das 6:00 h às 18:00 h), à temperatura de 21 °C \pm 1 °C e acesso livre à ração balanceada e água. Os animais foram mantidos em ambiente apropriado para evitar contaminação inespecífica.

Protocolo experimental

Experimento I – Padronização da posição da cânula no ventrículo lateral:

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (1 mL/100 g de peso corporal) de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluídas em salina isotônica (NaCl 0,15 M), receberam uma dose de analgésico via subcutânea [Banamine® pet injetável (flunixinina-meglumina) – 1,1 mg/kg – *Schering*] e foram posicionados no aparelho estereotáxico para a implantação de uma cânula permanente no ventrículo lateral.

Várias coordenadas estereotáxicas foram utilizadas para a implantação da cânula para determinar a coordenada correta para acessar o ventrículo lateral dos camundongos. Após as cirurgias, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,1 mL) profilática de antibiótico (pentabiótico veterinário – 24000 unidades de Penicilina e 10 mg de Estreptomicina e Dihidroestreptomicina por camundongo – Wyeth) e permaneceram isolados em temperatura ambiente (25 °C) até a recuperação da anestesia para posteriormente serem levados às gaiolas individuais no Biotério de manutenção animal do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Durante as 48 horas seguintes à cirurgia, os animais receberam uma injeção de 1,1 mg/kg de Banamine (flunixinina-meglumina) a cada 12 horas, totalizando 5 injeções (a primeira durante a cirurgia e as outras 4 após a cirurgia).

Após uma semana de recuperação, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (1 mL/100 g de peso corporal) de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluídas em salina isotônica (NaCl 0,15 M) e submetidos à microinjeção intracerebroventricular de 1 µL de corante Azul de Evans. Passados 10 minutos, os animais foram perfundidos, seus cérebros foram coletados, pós-fixados, crio protegidos, seccionados em criostato e corados para identificação da posição da cânula.

Experimento II – Padronização da carga bacteriana injetada no sistema nervoso central de camundongos:

Camundongos foram anestesiados e posicionados no estereotáxico, como descrito no experimento I, para microinjeção intracerebroventricular de BCG em várias concentrações (10^3 ; 10^4 e 10^5 cfu/µL) para a indução de meningite tuberculosa, tuberculomas e do recrutamento glial. Animais do grupo controle foram injetados no ventrículo lateral apenas com PBS.

Quatro semanas após a infecção intracerebelar com BCG, os animais foram sacrificados por perfusão, o cérebro extraído, fixado, crioprotetido e armazenado a -20 °C.

Perfusão intracardiaca

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (1 mL/100 g) de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) diluídas em salina isotônica (NaCl 0,15 M).

A perfusão foi realizada por meio de infusão intracardiaca (8 mL/minuto) com salina tamponada (pH 7,4) com fosfato de sódio 100 mM (PBS) por 10 minutos seguida pela infusão de paraformaldeído 4 % em tampão (pH 7,4) e de fosfato de sódio (100 mM) por 40 minutos.

Crioproteção

Após a perfusão, os cérebros foram removidos, pós fixados por 4 horas em paraformaldeído 4% e imersos em solução de sacarose 30 % com tampão fosfato (100 mM) até a saturação do tecido (por volta de 48 horas). Em seguida, os cérebros foram congelados à -20 °C.

Montagem das séries de lâminas

Os cérebros congelados a -20 °C foram levados ao criostato, cuja temperatura interna é -20 °C, para obtenção de seis séries de secções com 20 µm montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Depois de montadas, as lâminas foram novamente armazenadas a -20 °C para posteriores colorações. A primeira série de lâminas foi utilizada para a coloração de Ziehl-Neelsen, a segunda série foi utilizada para a coloração por Nissl, a terceira por Hematoxilina-Eosina e a quarta, quinta e sexta séries foram armazenadas para imunofluorescências contra Fos, GFAP, NfκB e fluoro-Jade.

Coloração de Ziehl-Neelsen

Inicialmente foi aplicado o corante fucsina fenicada de Ziehl e em seguida as lâminas foram aquecidas para permitir a passagem da fucsina fenicada através da parede lipídica e do citoplasma. Esta etapa ocorre através do aquecimento à chama do bico de Bunsen, em tempo suficiente para se dar a emissão de vapores (em torno de 5 min). Após a aplicação deste corante primário, foi observado que todas as células apareciam coradas de vermelho.

Passados 15 minutos, as lâminas foram descoradas com o álcool-ácido, aplicando esse reagente gota a gota sobre a lâmina. Durante este processo o corante primário fica retido e as bactérias mantêm-se coradas de vermelho. Nas bactérias não álcool-ácido resistentes o corante primário é facilmente removido durante a descoloração deixando as células incolores.

Depois de lavadas, as lâminas foram expostas a água corrente e ao azul de metileno (corante de contraste) por um minuto. Como foram as bactérias não álcool-ácido resistentes que descoraram, elas podem agora absorver o corante de contraste e ficar coradas de azul, enquanto as bactérias álcool-ácido resistentes mantêm a cor vermelha do corante primário. Com a coloração pronta, as lâminas foram novamente colocadas em água corrente de modo inclinado, secadas com folhas de papel de filtro e montadas em Entellan-Merck®.

Coloração por Nissl

Os cortes foram hidratados por meio de mergulhos subsequentes em uma série de álcool, todas com duração de 2 min (álcool 100%, álcool 95%, álcool 70% e álcool 50%), terminando em água destilada por também 2 min. Na coloração, os cortes foram expostos ao cresil violeta 0,5% por 5 min. Em seguida os cortes foram lavados em uma bateria de álcool, passando do mais hidratado (álcool 50%) para o anidro (álcool 100%), terminando no xilol para clareamento e finalmente a montagem com Entellan-Merck®.

Coloração por Hematoxilina-Eosina

Os cortes foram hidratados por meio de mergulhos subsequentes em uma série de álcool, todas com duração de 2 min (álcool 100% II, álcool 95%, álcool 70% e álcool 50%), terminando em água destilada por, também, 2 min. Na coloração, os cortes foram expostos à hematoxilina (0,6%) e eosina (0,6%) por 5 minutos. Em seguida os cortes foram lavados em uma bateria de álcool passando do mais hidratado (álcool 50%) para o anidro (álcool 100%), terminando no xilol para clareamento e finalmente a montagem com Entellan-Merck®.

Imunofluorescência

Na marcação imunofluorescente para Fos, GFAP, NfκB, todas as secções cerebrais foram processadas à temperatura ambiente (25 °C) e lavadas (cinco vezes por 5 min cada lavagem, em constante agitação) em PBS após cada etapa de exposição aos reagentes.

A exposição aos reagentes começou com glicina 0,01 M diluída em PBS por dez minutos para reduzir a autofluorescência do tecido, provocada pela exposição ao paraformaldeído 4%. Em seguida, as ligações para gamaglobulina foram bloqueadas com albumina bovina 1% em PBS por 30 minutos.

Após a realização dessas etapas para bloqueio de reações inespecíficas, seguiu-se as incubações com os anticorpos primários e secundários.

As secções cerebrais foram incubadas com o anticorpo monoclonal, produzido em camundongo, específico contra a proteína GFAP diluído 1/200 (Santa Cruz Biotechnologies – USA), anticorpo policlonal produzido em cabra, específico contra NFκB (Santa Cruz Biotechnologies – USA) e anticorpo policlonal produzido em coelho, específico contra Fos (Santa Cruz Biotechnologies – USA).

Em seguida, os cortes foram expostos ao segundo anticorpo diluído 1/1000 por uma hora em PBS. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-IgG de coelho produzido em jumento e conjugado com Alexa Flúor-594, anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em jumento e conjugado com Alexa Flúor-350 e anticorpo anti-IgG de cabra produzido em jumento e conjugado com Alexa Flúor-488. Em seguida os cortes foram corados com fluoro-Jade.

Utilizando-se o protocolo citado, o controle de especificidade do anticorpo secundário foi realizado, omitindo-se o anticorpo primário da reação imunofluorescente.

Coloração com fluoro-Jade.

Como a degeneração neuronal é detectada por fluoro-Jade, relacionamos os neurônios em processo de morte celular com as regiões cerebrais infectadas pelo BCG porque o fluoro-Jade emite fluorescência com comprimento de onda entre 480 e 490 nm. Após a realização das imunofluorescências para NFκB e GFAP, as lâminas foram expostas ao permanganato de potássio 0,06% por 15 minutos, lavados e expostos ao fluoro-Jade 0,09% em ácido acético por 30 minutos e secadas por 30 minutos na proteção da luz, montados com fluoromount-G (Eletron microscopy science – USA) e vedados com tinta esmalte.

Aquisição das imagens

As secções cerebrais contendo neurônios marcados positivamente para Fos, NFκB e para GFAP no cérebro foram fotografadas, utilizando-se um microscópio de fluorescência com câmera digital (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Germany).

Análise das imagens

O maior número possível de fotomicrografias foi adquirida para analisar a marcação para Fos, GFAP, NFκB e fluoro-Jade. Foram analisadas as regiões marcadas para GFAP, NFκB e fluoro-Jade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados do experimento I:

Inicialmente padronizamos a microinjeção intracerebroventricular. Para confirmar que a cânula estava sendo implantada no ventrículo lateral, foi injetado 5 µL de azul de metileno na cânula e logo após o animal foi sacrificado com sobre dose de anestesia (ketamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg), o cérebro foi retirado, congelado e cortado para ser observado e fotografado no microscópio (Figura 1).

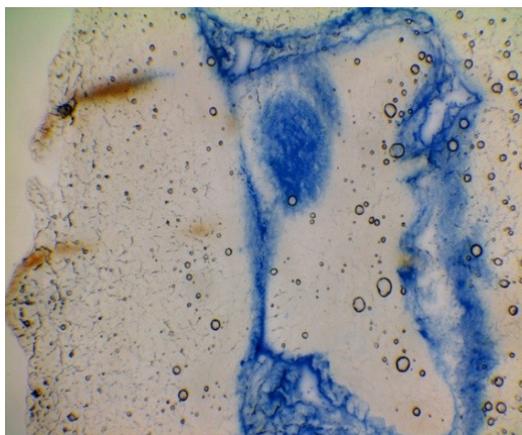


Figura 1: Fotomicrografia de secção do SNC sem coloração tecidual, evidenciando a presença do corante Azul de Evans injetado no ventrículo lateral.

O corante observado na parede do ventrículo lateral indicou o correto posicionamento da cânula implantada no sistema nervoso central.

Dentre as diversas coordenadas testadas, as seguintes coordenadas estereotáticas foram selecionadas para serem utilizadas na implantação das cânulas no ventrículo lateral dos camundongos: 0,25 mm posterior ao bregma, 0,5 mm látero-lateral e 2 mm dorsoventral a partir da calota óssea.

Resultados do experimento II:

Os camundongos foram submetidos à microinjeção intracerebroventricular de BCG em diversas concentrações (10^3 ; 10^4 ; e 10^5 cfu/µL) através das cânulas implantadas por cirurgia estereotática e permaneceram em observação por 4 semanas.

Encontramos os tuberculomas espalhados por todo o sistema nervoso central apenas nos animais que receberam a dose de 10^5 cfu/µL, principalmente nas porções próximas aos ventrículos cerebrais.

Na figura 2 temos a fotomicrografia da secção cerebral de camundongo, corada pelo método de Ziehl-Neelsen, que evidencia pelas setas os bacilos, em azul, no tuberculoma e a mielina dos neurônios em vermelho.

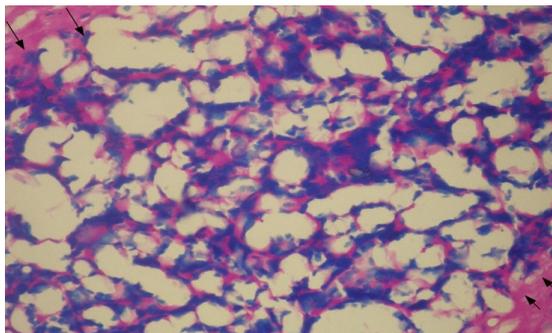


Figura 2: Fotomicrografia da secção cerebral de camundongo corada pelo método de Ziehl-Neelsen após injeção (10^5 cfu/ μ l) intracerebroventricular de BCG. As setas apontam os bacilos em azul no tuberculoma. Em vermelho, mielina dos neurônios.

Na figura 3, a fotomicrografia da secção cerebral de camundongo corada pelo método de Nissl mostra a gliose reacional ao tuberculoma em violeta apontado pelas setas.

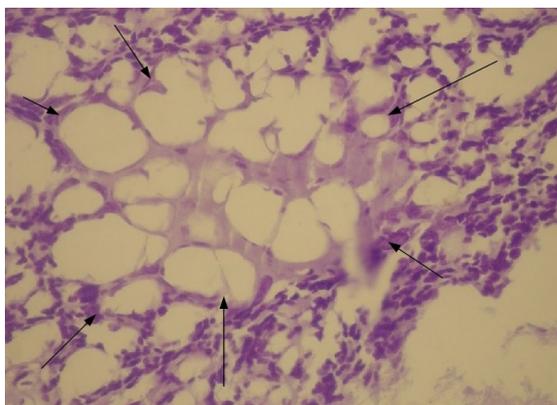


Figura 3: Fotomicrografia da secção cerebral de camundongo corada pelo método de Nissl após injeção (10^5 cfu/ μ L) intracerebroventricular de BCG. As setas apontam a gliose reacional ao tuberculoma. Em violeta, os neurônios.

Os tuberculomas apareceram de maneira mais evidente nas colorações com Hematoxilina-eosina (Figura 4) das secções cerebrais dos camundongos. É possível notar o aglomerado celular caracterizando o tuberculoma.

As formações de tuberculomas no sistema nervoso central de camundongos também foi realizada anteriormente por nossa equipe e publicado na tese de doutorado defendida na Universidade de São Paulo, pela aluna Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi. Nessa tese, a injeção de BCG ocorreu no tecido cerebelar e foram encontrados tuberculomas semelhantes ao que encontramos no presente projeto. Entretanto, tendo em vista que a neuro tuberculose acessa o sistema nervoso central através do plexo coróide e instala-se entre as meninges, no líquido cefalorraquidiano e no tecido nervoso próximo aos ventrículos, nossa equipe decidiu iniciar o desenvolvimento desse novo modelo apresentado no presente trabalho, no qual a injeção de BCG ocorre diretamente nos ventrículos laterais.

O sistema nervoso central e o sistema imune comunicam-se constantemente. A resposta inflamatória no sistema nervoso central emite sinais que recrutam leucócitos e provocam a liberação de citocina pró-inflamatória. As células, do sistema imune, ativadas por essas sinalizações compreendem os monócitos, linfócitos e os macrófagos. Essas células atravessam a

barreira hematoencefálica e se estabelecem no local de desenvolvimento da resposta inflamatória. O sistema nervoso central também responde ao processo inflamatório por meio das células gliais, principalmente através da multiplicação dos astrócitos. Assim, o sistema nervoso central em conjunto com o sistema imune atuam sinergicamente para promover uma resposta de defesa neuro imunológica (MICHAEL D.LUMPKIN). É por isso que é fundamental padronizar as imunofluorescências contra os marcadores da resposta imunológica e gliais no sistema nervoso central para caracterizar a formação dos tuberculomas provocados pelas injeções com BCG em nosso modelo experimental.

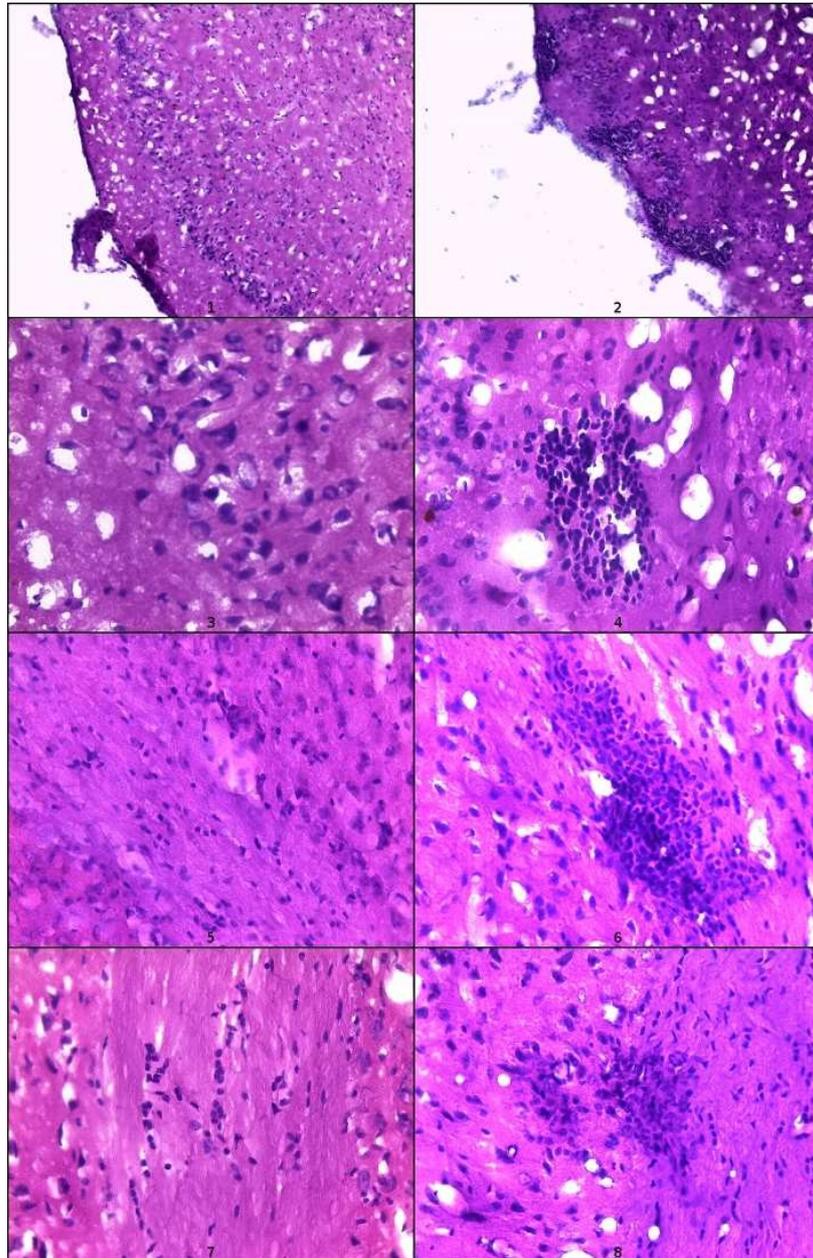


Figura 4: Fotomicrografias de cérebro de camundongos corados com hematoxilina-eosina. As fotos da coluna da esquerda (1, 3, 5 e 7) são de animais controle e as da coluna da direita (2, 4, 6 e 8) são de animais submetidos à injeção (10^5 cfu/ μ L) intracerebroventricular de BCG. As fotos 1 e 2 apresentam aumento de 100 vezes e as demais representam aumento de 400 vezes.

4. CONCLUSÃO

A injeção intracerebroventricular de BCG provoca a formação de tuberculomas que podem ser caracterizados por métodos histoquímicos como Ziehl-Neelsen, Nissl e Hematoxilina-Eosina. Entretanto, é fundamental que esse modelo seja melhor caracterizado, utilizando-se fluorescência por fluoro-Jade para verificar o desenvolvimento glial e o sofrimento neuronal, e imunofluorescência para marcadores da resposta inflamatória no sistema nervoso central, como GFAP, NfκB e Fos.

Uma vez estabelecido o modelo de infecção por BCG no sistema nervoso central através das injeções nos ventrículos laterais, iremos sondar a evolução dessa infecção, diante dos tratamentos proposto nos experimento I (efeito profilático da vacina *hsp65*) e II (efeito terapêutico da vacina *hsp65*).

Nossa expectativa é de que a vacina possa reduzir a dimensão e o número de tuberculomas e o recrutamento glial tanto para o modelo de estudo profilático quanto para o modelo terapêutico

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Who. WHO report 2007 - Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization Geneva, Switz [Internet]. 2007;277. Recuperado de: <http://www.who.int/tb/publications/2007/en/>
2. Young D, Dye C. The development and impact of tuberculosis vaccines. Cell [Internet]. 24 de fevereiro de 2006 [citado 13 de fevereiro de 2015];124(4):683–7. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497578>
3. Lowrie DB, Silva CL. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. Vaccine [Internet]. 25 de fevereiro de 2000 [citado 13 de fevereiro de 2015];18(16):1712–6. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689154>
4. Zauith G. Frente de combate à tuberculose | Revista Pesquisa FAPESP [Internet]. Revista Pesquisa FAPESP. 2002 [citado 28 de junho de 2015]. p. 22–4. Recuperado de: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2002/04/01/frente-de-combate-a-tuberculose/>
5. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature [Internet]. 15 de julho de 1999 [citado 13 de fevereiro de 2015];400(6741):269–71. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421369>
6. Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ, Silva CL. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. Vaccine [Internet]. dezembro de 1994 [citado 13 de fevereiro de 2015];12(16):1537–40. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7879421>
7. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nat Med [Internet]. agosto de 1996 [citado 13 de fevereiro de 2015];2(8):888–92. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8705858>
8. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. Vaccine [Internet]. junho de 1997 [citado 13 de fevereiro de 2015];15(8):834–8. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234527>

9. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. DNA vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* [Internet]. dezembro de 1997 [citado 13 de fevereiro de 2015];75(6):591–4. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9492198>
10. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. Genetic vaccination against tuberculosis. *Springer Semin Immunopathol* [Internet]. janeiro de 1997 [citado 13 de fevereiro de 2015];19(2):161–73. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406344>
11. Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj HS, Hill M, Singh M, Ivanyi J, et al. Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* [Internet]. 15 de junho de 1997 [citado 30 de janeiro de 2015];158(12):5921–6. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190945>
12. Lozes E, Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine* [Internet]. junho de 1997 [citado 13 de fevereiro de 2015];15(8):830–3. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234526>
13. Baldwin SL, D’Souza C, Roberts a D, Kelly BP, Frank a a, Lui M a, et al. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun* [Internet]. junho de 1998 [citado 13 de fevereiro de 2015];66(6):2951–9. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=108294&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* [Internet]. janeiro de 1998 [citado 13 de fevereiro de 2015];66(1):169–75. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=107873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Lowrie DB. DNA vaccines for therapy of tuberculosis: where are we now? *Vaccine* [Internet]. 15 de março de 2006 [citado 13 de fevereiro de 2015];24(12):1983–9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316711>
16. Gray, F.; Nordmann P. *Bacterial infections. Greenfield’s Neuropathology Sixth Edition Volume 1 and 2.* London; 1997. p. 113–52.
17. Sinner SW, Tunkel AR. Approach to the Diagnosis and Management of Tuberculous Meningitis. *Curr Infect Dis Rep* [Internet]. agosto de 2002 [citado 13 de fevereiro de 2015];4(4):324–31. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126609>
18. 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* [Internet]. julho de 2004 [citado 13 de fevereiro de 2015];43(7):853–60. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311111>

- 2015];23(7):608–13. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247597>
19. Li C-M, Lee Y-Y, Ho Y-R. Acute meningoencephalitis as initial presentation of human immunodeficiency virus infection: report of two cases. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. setembro de 2002 [citado 13 de fevereiro de 2015];35(3):195–8. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12380795>
 20. Rich, AR, McCordok HA. The pathogenesis of tuberculous meningitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* [Internet]. outubro de 1933 [citado 28 de junho de 2015];52:5–37. Recuperado de: http://www.invenzone.com/research_papers/the-pathogenesis-of-tuberculous-meningitis-rich-a-r-dot-and-mccordock-h-a-bulletin-of-johns-hopkins-hospital-1933-52-5-327562118
 21. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. abril de 1993 [citado 13 de fevereiro de 2015];6(2):118–36. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 22. Tsenova L, Bergtold A, Freedman VH, Young RA, Kaplan G. Tumor necrosis factor alpha is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 11 de maio de 1999 [citado 13 de fevereiro de 2015];96(10):5657–62. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>