UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Neurologia, Sub-área Neurociências

Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROTUBERCULOSE

Ribeirão Preto
2007

Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROTUBERCULOSE

Tese de Doutorado apresentada à pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Neurologia, sub-área Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Zucchi, Fabíola Cristina Ribeiro
Estabelecimento de um modelo experimental de neurotuberculose. Ribeirão Preto, 2007.
179p.: il.; 30cm.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo. Área de concentração: Neurologia; sub-área: Neurociências.
Orientador: Takayanagui, Osvaldo Massaiti.

1. Modelo experimental. 2. neurotuberculose.
3. meningite. 4. tuberculoma. 5. ativação glial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

Estabelecimento de um modelo experimental de neurotuberculose.

Programa de Pós-graduação em Neurologia, sub-área Neurociências da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr._____

Instituição:_____**Assinatura**_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____**Assinatura**_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____**Assinatura**_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____**Assinatura**_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____**Assinatura**_____

Aos meus pais Maria Eliza do Amaral Ribeiro e José Zucchi,

ao meu namorado Wellington Matheus Ruvieri,

à minha tia e madrinha Zélia do Amaral Ribeiro Ciani e

ao meu querido sobrinho Gabriel Alvarenga Zucchi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas e instituições que me ajudaram a desenvolver este trabalho:

Ao meu orientador Prof. Dr Osvaldo Massaiti Takayanagui (Depto Neurologia – FMRP-USP) pelos ensinamentos, pela amizade e por sempre acreditar e valorizar meu trabalho.

À Dra Adriana Pelegrini da Silva (na época Depto Farmacologia – FMRP-USP; atualmente Depto Fisiologia FOP-UNICAMP), minha co-orientadora e amiga, pela imensa colaboração desde a elaboração até a execução deste projeto.

Ao Prof. Dr. Luciano Neder Serafini (Depto Patologia – FMRP-USP) pela imensa colaboração e disponibilização de seu laboratório para a execução dos experimentos nos últimos dois anos de doutorado. À sua técnica Maria Paula Scandar (Depto Patologia – FMRP-USP), pela orientação durante os procedimentos laboratoriais, pela amizade e agradável convivência.

À Profª Dra Ana Maria Tsanaclis (Département de Pathologie - Université de Sherbrooke), minha orientadora do estágio de doutorando no exterior (PDEE-CAPES) e amiga, pelos conhecimentos transmitidos na área de agiogênese tumoral, e por todo o carinho e atenção dedicados durante os meses que passei no Canadá. À técnica Jocelyne Lapointe (Département de Pathologie - Université de Sherbrooke) pela simpatia, orientação e assistência técnica.

Ao Prof. Dr. Antonio Roberto Martins (Depto Farmacologia - FMRP-USP) pela execução dos experimentos em seu laboratório nos primeiros dois anos de doutorado, sob sua orientação, e pelas sugestões durante a elaboração do projeto de doutorado e execução dos experimentos feitos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva (Depto Bioquímica – FMRP-USP) por ceder a vacina DNA-hsp65 contra a TB e pelas valiosas discussões. Às suas técnicas: Iza e Ana Paula Masson; aos seus pós-graduandos: Eduardo, Rubens, Rogério, Fabio e Ana Paula Trombone; que me auxiliaram em questões relativas à vacina DNA-hsp65.

Aos Profs Drs Antonio Ruffino Netto (Depto Medicina Social - FMRP-USP) e Célio Lopes Silva (Depto Bioquímica – FMRP-USP) por todo o apoio, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade, durante a realização de um estágio de divulgação científica, tendo como foco a Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose (Rede-TB; realizado em 2002). Pois, deste projeto surgiu a idéia do projeto desenvolvido no doutorado.

À Dra Luciana Leite (Instituto Butantã - São Paulo) por ceder as amostras de BCG, para a realização do procedimento estereotáxico de indução de neuro-TB.

Ao Prof. Dr. Wilian Alves do Prado (Depto Farmacologia – FMRP-USP), pela utilização de seu laboratório para os precedimentos estereotáxicos. Ao seu técnico Paulo, pelo grande auxílio nos procedimentos anestésicos dos camundongos.

À Profª Dra Ana Claudia Sverzut (Depto Biomecânica – FMRP-USP) pela utilização do equipamento de contagem de células (Software QualiView-Atonus), para a quantificação da microglia ativada.

Ao Prof. Dr. César Peres (Depto Patologia – FMRP-USP) pela utilização do equipamento para captura de imagens. À técnica de seu laboratório, Deise, e ao pós-graduando Paulo, pela orientação e auxílio na utilização do equipamento.

Ao Prof. Dr. Francisco Guimarães (Depto Farmacologia – FMRP-USP), e seus pós-graduandos Fabricio e Daniele, pela orientação durante as análises iniciais da contagem de células ligantes de RCA.

Ao Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha (Depto Farmacologia – FMRP-USP), pelas discussões sobre inflamação e por ceder alguns anticorpos.

Ao Dr João Pereira Leite (Depto Neurologia – FMRP) por permitir a utilização de seu laboratório para o processamento e inclusão do tecido murino utilizado no PDEE. À sua técnica, Renata Caldo pela colaboração na execução dos procedimentos.

Ao Dr Guillaume Sébire (Université de Sherbrooke) por disponibilizar seu laboratório durante o PDEE e por ceder o anticorpo secundário utilizado nos experimentos. À técnica de seu laboratório, Annie Larouche, pela orientação e assistência técnica.

Aos membros da banca examinadora: Profª Dra Leila Chimelli (Depto Patologia - UFRJ), Prof. Dr. Francesco Langone (Depto Fisiologia e Biofísica - UNICAMP), Prof. Dr. Luciano Neder Serafini (Depto Patologia - FMRP-USP) e Prof. Dr. Célio Lopes Silva (Depto Bioquímica e Imunologia - FMRP-USP), pelas valiosas sugestões.

Ao doutorando Quintino Moura Junior (Depto Farmacologia – FMRP-USP), pela imensa colaboração na realização dos experimentos relativos ao PDEE (imunização dos camundongos com DNA-hsp65, estereotaxia para a inoculação de BCG, e sacrificio dos animais).

Às técnicas de histotecnologia, e amigas, Vani Corrêa (Depto Biologia Celular e Molecular – FMRP-USP) e Ana Maria Anselmi (Depto Patologia – FMRP-USP), pela realização dos cortes histológicos nos dois primeiros anos de doutorado, por todos os ensinamentos transmitidos nos últimos 8 anos (mestrado e doutorado) na área de histotecnologia, e principalmente pela agradável companhia.

Aos secretários: Elizabete Sartori, Vilma e Silvia (Depto Neurologia – FMRP-USP); Fátima, Sônia e Valdic (Depto Farmacologia – FMRP-USP), Samuel e Jesiane (CPG-FMRP-USP), pela colaboração e simpatia sempre que solicitados.

Ao estatístico Roberto Molina (CEMEQ - HCFMRP-USP) pela análise estatística de células ligantes de RCA.

Ao Biotério (Depto Genética - FMRP-USP) e ao técnico Júlio Siqueira pela disponibilização dos camundongos.

Aos colegas do laboratório do Dr Antonio Roberto Martins: Alina, Cesar, Bete, Roberta, Liliane, Thaís e Fabíola, pela alegria e companheirismo compartilhados no início do doutorado.

Aos colegas do Laboratório do Dr. Luciano Neder e Dra Ana Claudia Sverzut: Anabelle, Camila, Letícia, Priscila, Natália, Lúcia, Débora, Márcio e Élder, pela orientação e simpatia, nestes dois anos de convivência.

À CAPES pelo apoio financeiro: bolsa de doutorado no país e bolsa PDEE para a execução do estágio de doutorando no Canadá.

Ao meu irmão Marcelo Ribeiro Zucchi e à minha cunhada Meire Alvarenga Zucchi por terem dado à nossa família um presente tão especial, o Gabriel.

À Maria Auxiliadora Ruvieri e Guerino Ruvieri (*in memorian*) pelo carinho e acolhimento durante os últimos anos.

À Maria Leal pela amizade e bons conselhos desde o meu mestrado.

À todos os meus amigos e familiares que contribuiram com os momentos de lazer. Sem eles o trabalho seria impossível.

À Deus pela imensa proteção.

"começamos confusos e terminamos

confusos em um nível mais elevado"

(provérbio antigo)

SUMÁRIO

RESUMO..... xxi

SUMMARY..... xxiv

INTRODUÇÃO..... 27

- A tuberculose..... 28
- A tuberculose no sistema nervoso central – neuro-TB..... 32
- Populações gliais envolvidas na resposta do hospedeiro à neuro-TB..... 34
- Fatores envolvidos na contenção do patógeno e amplificação da resposta inflamatória, presentes na neuro-TB – NFκB, iNOS e VEGF..... 36
- Vacina gênica hsp65 contra a TB – aplicação neste modelo murino de neuro-TB..... 46

OBJETIVOS..... 49

MATERIAIS E MÉTODOS..... 51

1. Animais..... 52

2. Patógeno..... 52

3. Estereotaxia..... 52

3.1. Definição das coordenadas estereotáxicas de inoculação de BCG..... 52

3.2. Definição da concentração da amostra de BCG..... 55

4. Sacrifício dos animais..... 55

5. Processamento do tecido..... 56

6. Microtomia..... 57

7. Análise morfológica da formação de meningite, tuberculomas e demais alterações decorrentes da indução de neuro-TB..... 57

8. Caracterização da presença de BAAR e confirmação do diagnóstico de neuro-TB..... 59

9. Caracterização da ativação glial na neuro-TB experimental..... 59

9.1. Histoquímica..... 60

9.2. Contagen de células RCA-positivas..... 61

9.3. Análise estatística do recrutamento glial..... 61

10. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de NFκB e iNOS neste modelo murino de neuro-TB..... 62

10.1. Recuperação antigênica..... 62

10.2. Imuno-histoquímica..... 62

11. Delineamento experimental..... 64

12. Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE-CAPES)... 65

12.1. Imunização dos comundongos com a vacina DNA-hsp65..... 65

12.2. Estereotaxia..... 65

12.3. Sacrificio dos animais..... 66

12.4. Processamento do tecido..... 66

12.5. Microtomia..... 67

12.6. Diferenciação morfológica entre cerebelos de camundongos imunizados com a vacina DNA-hsp65, somente com o vetor plasmidial ou injetados com salina..... 67

12.7. Caracterização da presença de bacilos e confirmação do diagnóstico de neuro-TB em animais imunizados..... 67

12.8. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de VEGF no modelo experimental de neuro-TB em animais tratados com DNA-hsp65..... 68

12.9. Delineamento experimental..... 69

RESULTADOS..... 70

1. Estabelecimento de um modelo experimental de neuro-TB..... 71

1.1. Concentração ideal da amostra de BCG, injetada por estereotaxia intra-cerebelar..... 71

1.2. Caracterização do decurso temporal da neuro-TB nos camundongos injetados com BCG, observada por coloração Hematoxilina-eosina (HE)..... 71

1.3. Caracterização anatômica dos animais utilizados como controle. Camundongos injetados intra-cerebelo com salina e camundongos naïve, sem nenhum tratamento. Observação por coloração Hematoxilina-eosina (HE)..... 77

2. Caracterização da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e confirmação do diagnóstico de neuro-TB..... 78

3. Caracterização da participação de diferentes populações gliais no modelo experimental de neuro-TB..... 78

3.1. Contagem de células gliais com afinidade para RCA..... 82

3.2. Análise estatística..... 83

4. Caracterização da expressão imuno-histoquímica de NFκB e iNOS no modelo experimental de neuro-TB..... 84

4. 1. Recuperação antigênica..... 84

4.2. Expressão imuno-histoquímica de NFκB..... 84

4.3. Expressão imuno-histoquímica de iNOS..... 89

5. Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE-CAPES)..... 92

5.1. Caracterização morfológica de um modelo murino de neuro-TB, com prévia imunização dos animais com a vacina DNA-hsp65..... 92

5.1.1. Camundongos infectados intra-cerebelo com BCG, imunizados com DNA-hsp65, somente com o vetor plasmidial (DNA) ou injetados com salina... 92

5.1.2. Camundongos não infectados (injetados intra-cerebelo com salina), imunizados com DNA-hsp65, somente com o vetor plasmidial (DNA) ou injetados com salina..... 92

5.2. Caracterização da presença de bacilos e confirmação do diagnóstico de neuro-TB, em animais imunizados..... 93

5.3. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de VEGF no modelo experimental de neuro-TB..... 94

6. Resumo dos resultados..... 98

DISCUSSÃO..... 100

CONCLUSÕES..... 115

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 117

ANEXOS..... 136

I. Análise exploratória..... 137

II. Contrastes para comparação entre médias segundo o tempo. Tratamento: BCGXSalina..... 138

III. Protocolo de processamento de encéfalo murino 139

IV. An experimental model of neurotuberculosis…….. 140

V. Expression of vascular endothelial growth factor in a model of neurotuberculosis in mice – effect of the DNA vaccine hsp65 treatment……. 144

VI. Expression of nuclear factor κB and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a murine model of neurotuberculosis…….…..... 159

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS: albumina bovina sérica.

ACC: adenoid cystic carcinoma.

AP: coordenada estereotáxica ântero-posterior.

AR: ankyrin repeats.

ATA: American Thoracic Association.

BAAR: bacilos álcool-ácido resistentes.

BCG: bacilo Calmette Guérin.

BHE: barreira hemato encefálica.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

cfu: unidades formadoras de colônias (colony forming units).

CHUS: Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke

CPT: Centro de Pesquisas em Tuberculose.

DAB: diaminobenzidina.

DIC: cadeia intermediária da dineína (dynein intermediate chain).

DNA-hsp65: vacina gênica hsp65.

EDRF: fator relaxante derivado do endotélio (endothelium-derived relaxing factor).

ESAT6: early secretory antigen.

eNOS: sintase endotelial do óxido nítrico (endothelial nitric oxide synthase; NOSIII; NOS3).

FAD: flavina adenina dinucleotídeo.

flk1: receptor de VEGF (VEGFR-2).

flt1: receptor de VEGF (VEGFR-1).

FMN: flavina mononucleotídeo.

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

GL: camada granular do córtex cerebelar.

GRR: região rica em glicina (glicin rich region).

HE: hematoxilina de Harris e eosina.

HIMF: fator mitogênico induzido por hipóxia (hypoxia-induced mitogenic factor).

hsp65: proteína de choque térmico de 65 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (heat shock protein, 65 kDa).

IL-1β: interleucina 1β.

IL-6: interleucina 6.

IL-8: interleucina 8.

INFγ: interferon gama.

iNOS: sintase induzida do óxido nítrico (inducible nitric oxide synthase; NOSII; NOS2).

$iNOS^{-/-}$: camundongos nocauteados para o gene da iNOS.

IUATLD: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.

IκB: proteína inibidora de NFκB. Outras proteínas da família IκB: Bcl-3, IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, IκBξ, p100 (NFκB2), p105 (NFκB1), MAIL.

kDa: kilodalton.

L: coordenada estereotáxica lateral.

LCR: líquido cefalorraquiano.

LLC: leucemia linfocítica crônica.

LPS: lipopolissacarídeo.

LTD: depressão de longa duração (long term depression).

LTP: potenciação de longa duração (long term potentiation).

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1.

MHC: complexo maior de histocompatibilidade (major histocompability complex).

MOL: camada molecular do córtex cerebelar.

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide.

neuro-TB: neurotuberculose.

NFκB: fator de transcrição κB (nuclear factor κB).Proteínas da família NFκB: p50, p52, p65, c-Rel, RelB.

NGF: fator de crescimento neuronal (neuronal growth factor).

NLS: sinal de localização nuclear (nuclear localization signal).

NOS: sintase neuronal do óxido nítrico (nitric oxide synthase).

nNOS: sintase neuronal do óxido nítrico (neuronal nitric oxide synthase; NOSI; NOS1).

NO: óxido nítrico (nitric oxide).

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PBS: tampão fosfato salina (phosphate buffered saline).

PCL: camada de células de Purkinje do córtex cerebelar.

PDEE: Programa de Doutorado no país com Estágio no Exterior (CAPES).

PIN/DLC: proteína inibidora da sintase neuronal do óxido nítrico/cadeia leve da dineína (protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase/dynein light chain).

PLP: paraformaldeído lisina-periodato.

PU: célula de Purkinje.

PF: paraformaldeído.

pVAX: vetor plasmidial.

pVAX-hsp65: vetor plasmidial contendo o gene que codifica a proteína micobacteriana hsp65.

RCA: *Ricinus communis* aglutinina.

Rede-TB: Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose.

Receptor D2: receptor de dopamina.

RHR: rel homology region.

RNI: intermediários reativos de nitrogênio (reactives nitrogen intermediates).

RNTA: Royal Netherlands Tuberculosis Association.

SN: sistema nervosa.

SNC: sistema nervoso central.

SNT: Serviço Nacional de Tuberculose.

TB: tuberculose.

TBM: meningite tuberculosa (tuberculous meningitis).

TNFα: fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha)

V: coordenada estereotáxica ventral.

VPF/VEGF: fator de permeabilidade vascular/fator de crescimento endotelial vascular (vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor).

WM: substância branca (white matter).

WHO: Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

ZN: Ziehl-Neelsen, coloração de bacilos álcool-ácido resistentes.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Vista superior de crânio murino (*ponto de injeção aproximado. Fonte: Paxinos e Franklin, 1997).....54

Figura 2: Esquema de secção cerebelar coronal (barra: sítio aproximado de injeção. Fonte: Paxinos e Franklin, 1997).....54

Figura 3: Esquema de corte e disposição das secções nas lâminas.....58

Figura 4: Caracterização do decurso temporal do modelo murino de neuro-TB, visto por coloração Hematoxilina-eosina (HE).....72

Figura 5: Caracterização morfológica e da presença de BAARs, neste modelo murino de neuro-TB.....73

Figura 6: Caracterização do decurso temporal do modelo murino de neuro-TB, visto por HE.....74

Figura 7: Caracterização do decurso temporal, do recrutamento da glia reativa, neste modelo de TB no cerebelo murino, pela observação de células ligantes de RCA.....79

Figura 8: Caracterização temporal, do recrutamento da microglia e de astrócitos ativados, no modelo experimental de TB no SNC, pela observação de células ligantes de RCA.....80

Figura 9: Número médio de células ligantes de RCA por área ao longo do tempo.....83

Figura 10: Expressão imuno-histoquímica de NFκB, neste modelo de TB no SNC de camundongos.....86

Figura 11: Expressão imuno-histoquímica de NFκB, neste modelo de neuro-TB experimental.....88

Figura 12: Expressão imuno-histoquímica de iNOS, no modelo experimental de neuro-TB.....91

Figura 13: Expressão imuno-histoquímica de VEGF no modelo experimetal de neuro-TB.....95

Figura 14: Expressão imuno-histoquímica de VEGF na TB cerebelar experimental.....96

Figura 15: Expressão imuno-histoquímica de VEGF na neuro-TB experimental, com imunização prévia dos camundongos com DNA-hsp65, uma nova vacina contra a TB.....97

Tabela 1: Camundongos injetados com diferentes concentrações de BCG ou com salina.....55

Tabela 2: Camundongos utilizados no decurso temporal da formação de neuro-TB experimental.....56

Tabela 3: Camundongos utilizados para a caracterização do decurso temporal da neuro-TB (HE), da presença de BAARs (Ziehl-Neelsen), do recrutamento microglial (RCA) e da expressão imuno-histoquímica de NFκB e iNOS (n).....59

Tabela 4: Grupos de acordo com o tratamento e número final de animais com material adequado para o estudo.....66

Tabela 5: Caracterização morfológica do modelo de neuro-TB experimental, induzida por BCG.....75

Tabela 6: Caracterização morfológica dos grupos experimentais 93

Tabela 7: Expressão de VEGF em animais vacinados e não-vacinados.....98

RESUMO

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública. Somente no ano de 2004, cerca de 9 milhões de pessoas desenvolveram TB ativa e mais de 2 milhões de pessoas morreram da doença. O desenvolvimento de novos modelos experimentais de TB seriam de grande utilidade para para elucidar mecanismos fisiopatológicos da doença e 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 TB.

A TB no sistema nervoso central (SNC), assim como em outros tecidos do organismo, promove a ativação de células inflamatórias. No SNC a micróglia desempenha este papel, sendo capaz de produzir ou ser influenciada por mediadores solúveis. Vários mediadores estão envolvidos nos mecanismos moleculares decorrentes da infecção e inflamação causados pela TB, entre eles: NFκB, iNOS e VEGF. A ativação do NFκB, um fator de transcrição citoplasmático que sob estímulo migra para o núcleo celular, tem íntima relação com a indução da iNOS e de VEGF. A resistência intracelular a patógenos, inclusive ao *Mycobacterium tuberculosis*, parece estar associada a expressão de iNOS em macrófagos.

O óxido nítrico (NO) tem papel importante na comunicação intercelular, estimulando a síntese de mediadores inflamatórios, como as citocinas, e regulando sua própria produção endógena. Estas citocinas por sua vez também podem induzir a atividade do NFκB e a expressão da iNOS e VEGF. O VEGF é um potente ativador de permeabilidade vascular e de angiogênese, envolvido na ruptura da barreira hemato-encefálica. Neste estudo, mostramos a caracterização morfológica e imuno-histoquímica de um modelo murino de TB no SNC, com a indução da doença pela inoculação de BCG. Com este modelo experimental obtivemos importantes resultados que podem esclarecer

mecanismos envolvidos na fisiopatologia da neuro-TB humana. A indução de meningite e tuberculomas foi possível através da inoculação de 10^4 cfu de BCG no cerebelo de camundongos, por estereotaxia, e esta indução foi dependente do tempo. A confirmação do diagnóstico foi feita pela detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), nas lesões tuberculosas. Observamos, ao longo do tempo (1 a 6 dias; 1, 2, 4 e 8 semanas) o recrutamento de diferentes populações gliais (micróglia e astrócitos) no sítio de injeção. Houve aumento de produção e ativação NFκB nas lesões tuberculosas, caracterizada pela translocação da molécula do citoplasma para o núcleo celular. Houve expressão de iNOS restrita às lesões tuberculosas, além do aumento de expressão de VEGF nestas lesões. Além disso, camundongos imunizados com a vacina gênica hsp65, contra a TB, não expressam VEGF em suas lesões. Esta vacina parece conferir um efeito protetor em nosso modelo experimental, reduzindo a expressão de VEGF, e consequentemente reduzindo seu efeito angiogênico decorrente do processo inflamatório. O recrutamento glial, e a produção de mediadores solúveis (NFκB, iNOS e VEGF) pelo hospedeiro, em resposta à invasão do patógeno no SNC, parecem estar envolvidos na fisiopatologia da neurotuberculose, como demonstrado neste modelo experimental. Nosso modelo permitirá investigar fatores possivelmente responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção de lesões tuberculosas no SNC. O objetivo final seria elucidar a fisiopatologia desta grave doença e compreender eventos moleculares envolvidos na produção de lesões. O conhecimento gerado poderá permitir o delineamento de terapias específicas e efetivas.

SUMMARY

Tuberculosis (TB) is a serious public health problem; in 2004, 9 million people developed active TB and the disease killed 2 million patients. Development of experimental models and new vaccines are essential both to elucidate physiopathological mechanisms and to control the disease. This infection in the central nervous system (CNS), as in other tissues of the organism, activates inflammatory cells. In CNS, this role is performed by the microglia, which is capable of producing or be influenced by soluble mediators. Several mediators are involved in the molecular mechanisms of the infection and inflammation by mycobacteria , such as NFκB, iNOS and VEGF. NFκB activation, a cytoplasmic transcriptional factor that migrates to the cellular nucleus under stimuli, is involved with the iNOS and VEGF induction of expression. The intracellular resistance to *Mycobacterium tuberculosis* has been associated with iNOS expression in macrophage cells.

Nitric oxide (NO) is crucial in intercellular communication, modulating the synthesis of mediators of inflammation, such as cytokines, and modulation itself. These cytokines induces NFκB activity, and induces iNOS and VEGF expression. VEGF is a potent activator of vascular permeability and of angiogenesis and it is a factor involved in the breakdown of the blood brain-barrier in tuberculous meningitis. In this study, we showed the morphologic and immunohistochemistry characterization of an experimental model of TB in the CNS, with inoculation of BCG in mice. In this model we elicited important outcome that can elucidate mechanisms involved in the physiopathology of human neuron-TB. Induction of meningitis and tuberculomas were possible with stereotaxic inoculation of 10^4 cfu of BCG in mice cerebellum, in a time-dependent way. Diagnostic was confirmed by detection of alcohol-acid resistant bacilli (BAAR), in tuberculous lesions. We observed, the time-course (1 to 6 days; 1, 2, 4 e 8 weeks) of the

recruitment of different glial populations (microglia and astrocytes) in the injection site. There was increased production and activation of NFκB in the tuberculous lesions, it was characterized by its nuclear translocation from cytoplasm. There was iNOS expression only in the tuberculous lesions, and expression increased of VEGF in these lesions. Furthermore, mice immunizated with vaccine DNA-hsp65 there was no expression of VEGF in its lesions. This vaccine seems confer a protector effect in our experimental model, reducing the expression of VEGF, and then reducing its angiogenic effect derived from inflammatory process. Glial recruitment, and the soluble mediators production (NFκB, iNOS e VEGF) by the host, producing in response to invasion of the pathogen in the CNS, has been involved in the pathophysiology of the neuro-TB, such as demonstrated in this experimental model. Our model will allow investigate possible factors responsible for the development and maintenance of tuberculous lesions in the CNS. The final aim is to elucidate the physiopathology of this serious illness and understand the molecular events involved in the production of the lesions. The knowledge created may permit to pave the way to delineate specific and effective therapies.

INTRODUÇÃO

1. A tuberculose

Após décadas de negligência, o imenso impacto da tuberculose (TB) na saúde pública é agora amplamente reconhecido (YOUNG e DYE, 2006). Somente no ano de 2004, cerca de 9 milhões de pessoas desenvolveram TB ativa e mais de 2 milhões de mortes foram atribuídas à doença (WHO, 2006). Estratégias para o combate da TB, anunciadas no "World Economic Forum" em Davos na Suíça em 2006, foram propostas no "The Global Plan to Stop TB" (Stop TB Partnership e WHO, 2006). Este plano tem 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 (YOUNG e DYE, 2006).

A TB, doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, tem sido a causa mais frequente de morte por agentes infecciosos, e é a doença que mais mata mulheres no mundo. Quase um terço da população hospeda o bacilo sem desenvolver a doença. Uma das armas 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 uso humano, desenvolvida em 1921, cujo nível de proteção varia de 0 a 75% (LOWRIE e SILVA, 2000).

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS), declarou a situação da TB como "estado de emergência". A própria instituição, se deu conta de que sozinha não conseguiria controlar a doença. Foi então criado o Programa Stop TB que reúne instituições de alto nível científico e/ou poder econômico, como: a OMS, o Banco Mundial, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC)-Atlanta, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Royal Netherlands

Tuberculosis Association (RNTA) e American Thoracic Association (ATA). A OMS assinala como principais causas para a gravidade da situação atual da TB no mundo os seguintes fatos: desigualdade social, advento da aids, envelhecimento da população e grandes movimentos migratórios. O Programa Stop TB promoveu reuniões com os 22 países onde concentram-se 80% dos casos estimados para o mundo para discutir pesquisas na área e a situação dos programas de Controle da TB nestes países. Houve países onde os principais problemas do Programa estavam na falta de recursos financeiros e humanos, em outros países os problemas eram mais ligados à resistência a múltiplas drogas dos pacientes e gerenciamento dos programas (RUFFINO-NETTO, 2002).

A TB foi introduzida no Brasil pelos portugueses e missionários jesuítas, a partir de 1500. Ruffino-Netto e Pereira (1981) apresentaram um estudo da evolução da mortalidade por TB no Rio de Janeiro, no período de 1860 a 1960, onde analisam os fatores econômicos, demográficos, sociais e as políticas de saúde aí existentes, desde a chegada da Família Real no Brasil. O Dr. Paula Cândido, presidindo a junta central de higiene da capital do império, conseguiu junto ao Parlamento que fossem adotadas novas medidas sanitárias para o início do controle da TB. A partir de 1870 foram criadas várias leis e decretos relacionados com a habitação. No início do século XIX a assistência ocorria através de organizações filantrópicas, quando um terço dos óbitos era devido à TB. No início do século XX, Oswaldo Cruz reconhece a necessidade da atenção das autoridades sanitárias em relação à TB. Ele procurou instituir um plano de ação para o combate da doença, alcançando, contudo, pequeno impacto. Com a Reforma Carlos Chagas, no final da década de 10, criou-se a Inspetoria de Profilaxia da TB. Esta 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. A partir da década de 40, começa grande alteração na tendência da mortalidade por TB em decorrência da utilização dos tuberculostáticos: estreptomicina (1948), ácido para-amino-salicílico (1949), hidrazida (1952). A partir da década de 60, começa efetivamente a utilização de esquemas terapêuticos padronizados, com a utilização de isoniazida e rifampicina (RUFFINO-NETTO e PEREIRA, 1981).

Na Europa, após a Primeira Guerra Mundial, a TB contribuiu para gerar ideais de eugenia na medicina social desta época (MURPHY e EGGER, 2002). A noção de que a etiologia de muitas doenças tem um componente social foi sistematicamente inserida pela primeira vez em países de língua alemã no período imediatamente após a Primeira Guerra Mundial. Em 1897 Adolf Gottstein publicou um livro sobre doenças infecciosas chamado *Allgemeine Epidemiologie* (Epidemiologia Geral) termo usado para cingir todos os elementos biológicos e sociais relevantes para doenças infecciosas (MURPHY e EGGER, 2002). Gottstein observou a relação entre a bacteriologia e os fatores sociais críticos. Os termos medicina social e higiene social relacionados personificaram três temas principais: primeiro a idéia de que fatores sociais foram o maior contribuinte para a propagação de muitas doenças; segundo, noções eugênicas de que a composição genética de uma população seria um importante fator na determinação da saúde da população, e que se esta composição genética pudesse degenerar gerações futuras a saúde pública estaria prejudicada; e terceiro, a crença de que serviços de saúde seriam providos pelo estado (MURPHY E EGGER, 2002). Max Mosse e Gustav Tugendreich escreveram o livro *Krankheit und Soziale Lage* (Doença e Condição Social), cuja primeira edição foi publicada em 1913. Neste livro foram mostradas as influências das circunstâncias sociais na prevenção, origem e causa das doenças. Quanto à TB especificamente os autores

abordaram a frequência da doença examinando a influência das circunstâncias sociais, e as inter-relações entre a doença e fatores que constituem o conceito de "posição social" com ênfase na ocupação, moradia e nutrição. Este livro foi um trabalho pioneiro de pesquisa das causas sociais que afetavam a saúde, e prioritariamente a TB, neste período na Alemanha (MURPHY E EGGER, 2002).

Nos últimos anos estes temas têm sido discutidos novamente, com o argumento de que o meio e fatores sociais podem ser fatores determinantes de mortalidade. O exemplo é que o estabelecimento de hospitais para o tratamento da TB foi menos efetivo na redução da mortalidade, do que o estabelecimento de um sistema de saúde, a melhoria das condições de moradia e salários. A discussão de Mosse e Tugendreich da influência das circunstâncias sociais na saúde é tão relevante atualmente, como foi em 1913 (MURPHY E EGGER, 2002).

Atualmente, temos a Rede-TB (Rede de Pesquisas em Tuberculose), uma grande aliada ao combate desta doença no Brasil. O Instituto do Milênio Rede-TB e o Centro de Pesquisas em Tuberculose (CPT) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, constituem-se em conjunto articulado de atividades e projetos que se destinam a ajudar a reduzir e controlar a TB no país, mobilizados pela pesquisa e desenvolvimento de nova vacina, terapia gênica, diagnóstico e novos fármacos e medicamentos antimicobacterianos para o controle dessa enfermidade. Esta vacina gênica, que é um dos foco de estudo da Rede-TB, apresenta-se como uma nova ferramenta de controle da doença.

2. A tuberculose no sistema nervoso central – neuro-TB

No sistema nervoso central (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 infecciosos pelo tecido ósseo do crânio e coluna vertebral, pelas meninges e pela barreira hemato-encefálica (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 (GRAY e NORDMANN, 1997).

Em países tropicais, devido a altas taxas de temperatura e umidade, infecções por bactérias são comuns. Coincidentemente, os países em desenvolvimento encontram-se nos trópicos, onde condições precárias de higiene e saúde contribuem para a disseminação de doenças infecciosas. Com o advento da aids houve agravamento do quadro com a ocorrência de inúmeras infecções oportunistas afetando pacientes imunocomprometidos. A TB no SNC geralmente deve-se a uma infecção inicial nos pulmões ou em outros órgãos, e a contaminação do SN geralmente ocorre pela circulação sanguínea. A TB de SNC é uma das muitas apresentações da doença na sua forma miliar (DOMINGUES *et al.*, 2002).

A meningite tuberculosa (TBM), a forma de infecção pelo *M. tuberculosis* mais grave em humanos, afeta crianças predominantemente e mais de 50% dos casos resultam em óbito (SINNER e TUNKEL, 2002; FLIER *et a.*, 2004). No SNC, a TB produz comumente hidrocefalia e tuberculomas. Vários outros tipos de lesões foram identificados, como: leptomeningite, infarto e abcessos (KILANI *et al.*, 2003). Em um paciente não-imunocomprometido, utilizando ressonância magnética, foram detectados múltiplos tuberculomas intracranianos, linfadenite tuberculosa e TB-pulmonar (BASOGLU *et al.*,

2002). A presença de uma única massa solitária de tuberculoma no sistema nervoso central é rara. No entanto, Sathyanarayana *et al.* (2003) detectaram e comprovaram por exame histopatológico a presença de um tumor tuberculoso cerebelopontino. Pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana ou com aids podem apresentar infecção aguda do SNC e entre os patógenos infecciosos frequentemente pode ser encontrado o *M. tuberculosis* (LI *et al.*, 2002). A TBM é atribuída a uma descarga de organismos de pequenos tubérculos nas meninges, no cérebro, na medula espinal ou no plexo coróide, os focos de Rich (RICH e McCORDOK, 1933), onde a disseminação micobacteriana ocorre através da BHE. Esta disseminação pode ser facilitada com a ativação de mecanismos inflamatórios do organismo, como a produção de TNF-α (fator de necrose tumoral-α) que parece facilitar o transporte de compostos para o encéfalo pela "abertura" da BHE (TSENOVA *et al.*, 1999). Em crianças, a TBM está associada a alta taxa de mortalidade, e muitos dos sobreviventes têm permanentes sequelas neurológicas.

Apesar da severidade da apresentação clínica, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese do comprometimento neural da TB no SNC são pouco compreendidos, de modo que pouco pode ser feito para a prevenção ou contenção deste processo patológico. O desenvolvimento de modelos experimentais de neuro-TB podem ajudar a elucidar mecanismos celulares e moleculares da doença. Grande variedade de modelos experimentais de tumores foram estabelecidos durante as últimas décadas, principalmente modelos em neuro-oncologia. No entanto, poucos modelos experimentais de neuro-TB foram descritos. O cerebelo possui uma citoarquitetura relativamente bem conhecida em seus aspectos morfológicos e celulares. Além disso, o cerebelo parece ser um sítio preferencial de instalação de tuberculomas (GRAY e NORDMANN, 1997).

Sendo assim, o cerebelo pareceu-nos uma região adequada para analisar alterações induzidas pela neuro-TB.

3. Populações gliais envolvidas na resposta do hospedeiro à neuro-TB

No SNC, a ativação de células gliais e a subsequente expressão de várias proteínas estão associadas com a indução da inflamação (GAO *et al.*, 2002), presente na neuro-TB e em outras afecções. Células microgliais são células do sistema imune residentes no SNC. A origem exata da micróglia permanece em debate. Numerosos estudos das últimas três décadas suportaram que a micróglia deriva de células precursoras mesodermais de linhagem possivelmente hematopoiética que penetra o cérebro durante o desenvolvimento embriônico e pós-natal (BARRON, 1995).

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 a mudanças em seu microambiente e torna-se ativa em resposta a infecções ou lesões. A micróglia ativada regula uma variedade de receptores de superfície, incluindo o MHC (complexo maior de histocompatibilidade) e receptores do complemento (KREUTZBERG, 1996).

Células da micróglia são infectadas preferencialmente por *M. tuberculosis*, quando comparadas com astrócitos ativados. Além disso, células microgliais expressam consideravelmente mais citocinas e quimiocinas que células da macróglia (astrócitos) ativadas, nas mesmas condições. Dexametasona suprime a produção destes fatores na

micróglia e em astrócitos, reduzindo assim, danos teciduais causados pela ativação glial (ROCK *et al.*, 2005).

Juntamente com as 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). No entanto, a maioria dos fatores produzidos pela micróglia ativada é de natureza pró-inflamatória (LIU e HONG, 2003). Uma vez ativadas, as células micrógliais podem induzir a secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas, conduzindo à neurotoxicidade. Por outro lado, a mesma secreção de citocinas e fatores tróficos locais pela glia tem sido associada a neuroproteção (HANSSON e RÖNNBÄCK, 2003). O NO parece ser capaz de controlar a expressão gênica nestas células através da modulação da atividade do fator nuclear κB (NFκB), podendo constituir-se alvo na modulação da atividade celular envolvida com processos inflamatórios e infecciosos no SNC. O recrutamento microglial, a produção de citocinas e a ativação do NFκB têm íntima relação com a atividade da iNOS (sintase induzida do óxido nítrico).

A participação da micróglia como células de defesa no SNC tem importante papel na produção de mediadores inflamatórios diante da infecção pelo *M. 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 NFκB, e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas.

4. Fatores envolvidos na contenção do patógeno e amplificação da resposta inflamatória, presentes na neuro-TB – NFκB, iNOS e VEGF

O NFκB é um fator de transcrição que pré-existe como um complexo latente no citoplasma de células não estimuladas, com importante função em um grande número de processos celulares. Entre estes processos, a resposta imune e inflamação, o desenvolvimento celular e diferenciação, e a morte celular programada (apoptose) são importantes funções reguladas pelo NFκB (HENGARTNER, 2000). NFκB é uma família de diferentes membros, p50, p65, p52, c-Rel, RelB; com alta homologia na região N-terminal. A região de homologia entre os diferentes membros desta família é conhecida como "Rel homology region" (RHR) e é responsável por importantes funções: ligação ao DNA, formação de dímeros, localização nuclear e ligação ao IκB. A manutenção da forma dimérica do NFκB é regulada por proteínas inibidoras IκB: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, p105 (NFκB1), p100 (NFκB2), Bcl-3, IκBξ, MAIL (MOORTHY e GOSH, 2002).

A modulação de NFκB está relacionada, entre outros fatores, com a plasticidade do citoesqueleto. A retenção citosólica de NFκB é mediada por uma família de proteínas inibitórias IκB. IκBs possuem motivos responsáveis pela associação ao NFκB e ao citoesqueleto, promovendo sua retenção citoplasmática e temporária inativação. A proteína IκBα associa-se fisicamente com a cadeia leve da dineína (DLC). A dineína (um motor molecular) liga-se a microtúbulos promovendo a retenção citoplasmática de NFκB e consequente inibição da ligação ao DNA (CRÉPIEUX *et al.*, 1997). O PIN (proteína inibidora da sintase neuronal do óxido nítrico, nNOS) de SNC humano apresenta 100% de homologia com a DLC humana (JAFFREY e SNYDER, 1996; TOCHIO *et al.*, 1998). PIN/DLC foi detectada em cerebelo humano de 11 semanas gestacionais a 98 anos de

idade (ZUCCHI, 2002; ZUCCHI *et al.*, 2001-a e b; ZUCCHI *et al.*, 2002). No entanto, não é conhecido o papel de PIN/DLC na modulação da resposta promovida por NF-κB.

Comumente NFκB permanece inativo como um complexo com IκB. Em resposta a uma variedade de sinais extracelulares o IκB é fosforilado pelas IκB-quinases, este passo leva à ubiquitinação e subsequente degradação de IκB pela maquinaria proteossômica celular. Acreditava-se que todas as proteínas IκB inibissem NFκB pelo mascaramento do sinal de localização nuclear (NLS), presente em NFκB, e promovendo a retenção citoplasmática. No entanto, recentes estudos indicaram que as proteínas IκBs diferem em relação à regulação da localização subcelular de NFκB. p105 e p100 são os precursores de subunidades de NFκB, p50 e p52, respectivamente, as quais estão localizadas em seu N-terminal. Ambas proteínas, p105 e p100, têm organização estrutural similar. A porção central dessas moléculas (GRR) é rica em glicina, com papel crítico no processamento do precursor. A porção C-terminal é semelhante a outras moléculas IκB com "ankyrin repeats" (AR). Os sítios de fosforilação das IκB-quinases estão localizados próximos a uma região chamada "destruction box" (MOORTHY e GOSH, 2002).

O fator de transcrição NFκB tem papel crítico no funcionamento neuronal e glial. NFκB é especialmente qualificado para transmitir ao núcleo sinais provenientes de interações célula-célula pela sua ativação através da degradação de IκBs, ou de sua ativação constitutiva em alguns subtipos de neurônios. Em células granulares cerebelares, NFκB pode ser ativado via receptores ionotrópicos de glutamato e despolarização (GUERRINI *et al.*, 1995; KALTSCHMIDT *et al.*, 1995a). NFκB apresenta-se como um neuro-protetor ou como um neuro-degenerador em diferentes circunstâncias. A ativação de NFκB com fator de crescimento 1 insulina símile induz neuro-proteção, enquanto que a

ativação de NFκB com haloperidol leva a neurodegeneração (POST *et al.*, 1998). Kaltschmidt e Kaltschmidt (2000) observaram que em co-culturas de neurônios e astrócitos hipocampais de embriões de ratos, a atividade de NFκB em neurônios é inibida. Nestas co-culturas, NFκB não deve estar sendo ativado via kainato ou glutamato. Em culturas separadas de neurônios ou glia houve um aumento da atividade neuronal de NFκB dependente do tempo. Nestas culturas separadas a ativação de NFκB por kainato ou glutamato foi eficaz, mas foi inibida quando as culturas foram reagrupadas e estimuladas, sugerindo que a interação neurônio-glia possa regular a expressão gênica via NFκB (KALTSCHMIDT e KALTSCHMIDT, 2000).

A regulação trans-sináptica da expressão gênica é crítica para o desenvolvimento neuronal e para mudanças adaptativas no SN maduro. Diferentes genes contendo sítios NFκB nas suas regiões regulatórias podem ser ativados ou reprimidos, dependendo da afinidade de cada sítio particular κB para dímeros diferentes. A perda de ativação de NFκB por estímulo glutamatérgico em camundongos adultos sugere uma diferença fundamental na cascata de eventos intracelulares respondendo à ativação de receptores sinápticos de glutamato entre o cerebelo em desenvolvimento e adulto (GUERRINI *et al.*, 1997). A atividade transcricional de NFκB foi observada no neocórtex, bulbo olfatório, amigdala e órgãos do sistema imunológico de camundongo. O NFκB tem importante papel fisiológico na sobrevivência neuronal no SNC (BHAKAR, *et al*., 2002).

A secreção de IL-8 por monócitos humanos induzida por BCG (Bacillus Calmette-Guerrin) de *M. bovis* parece ser dependente da presença de cálcio intracelular, e da expressão de NFκB. A produção de IL-8 em resposta à BCG pode contribuir para a resposta inflamatória inicial, local e sistêmica na TB humana (MENDEZ-SAMPERIO *et al.*, 2001). A produção de outras interleucinas também parece estar associada a infecção

por *M. tuberculosis*. Mazzolla *et al.* (2002) mostraram aumento na quantidade de RNAm para IL-1β, IL-6 em cérebros de camundongos infectados com BCG. Em monócitos de pacientes tuberculosos existe uma constitutiva degradação de IκBα, o maior inibidor citoplasmático da ativação do NFκB, que não está presente em pacientes não tuberculosos (TOOSSI *et al.*, 1997). Assim, a ativação do NFκB pode ter papel fundamental na regulação da expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas. Estes produtos por sua vez também podem induzir a atividade do NFκB, constituindo-se assim num mecanismo de retroalimentação favorecendo a perpetuação de um processo patológico.

NFκB está relacionado com o controle da transcrição da iNOS. Esta atividade é controlada pelo NO intra- e intercelular produzido pela nNOS. O NO sintetizado pela nNOS na glia inibe intercelularmente a ativação do NFκB em neurônios. Além disso, o NO endógeno inibe a atividade neuronal de NFκB. Assim, o NO pode regular NFκB através de sinais intra e intercelulares (TOGASHI *et al.*, 1997).

O aumento na geração de NO por macrófagos alveolares de pacientes tuberculosos pode participar da amplificação da síntese de citocinas pró-inflamatórias e pode também ter um papel importante na resistência ao *M. tuberculosis* (WANG e KUO, 2001). A rifampicina que é um dos principais antibióticos usados na terapia de TB-pulmonar, tem potencial de bloquear a ativação de NFκB por TNF-α (PAHLEVAN *et al.*, 2002). Esta atividade imunossupressora é particularmente relevante em pacientes com aids podendo ser responsável pela frequente recorrência da doença nestes pacientes, indicando que mecanismos imunes podem contribuir para o controle da patologia. Assim, embora mediadores como o TNF pareçam estar envolvidos na disseminação da TB, especialmente pela BHE (TSENOVA *et al.*, 1998; 1999; 2002 e 2005), a integridade do sistema imunológico, como esperado, é essencial para o combate à doença.

O NO é um radical livre altamente reativo presente nos sistemas imune, nervoso e vascular. Inicialmente, o NO foi identificado no sistema vascular como EDRF (fator relaxante derivado do endotélio), liberado por células endoteliais em resposta a acetilcolina, bradicinina e histamina (FURCHGOTT e ZWADZKI, 1980). No sistema imune a produção de NO pelos macrófagos é induzida principalmente por componentes da parede celular de bactérias, os lipopolissacarídeos (LPS), além de citocinas inflamatórias e agentes infecciosos (NATHAN e HIBBS, 1991). O NO é detectado em abundância no SNC e periférico (BREDT e SNYDER, 1994). No SNC, o NO age como um neurotransmissor/neuromodulador e participa de processos como: memória, aprendizado, plasticidade sináptica [potencialização de longa duração, no hipocampo (LTP; McBAIN *et al.*, 1999); e depressão de longa duração, no cerebelo (LTD; DANIEL *et al.*, 1998)], sinaptogênese (YAN e RIBAK, 1997), controle do fluxo sanguíneo cerebral (IADECOLA *et al.*, 1993), controle da enxaqueca (BREDT *et al.*, 1990), e liberação de neurotransmissores (OHKUMA e KATSURA, 2001).

As sintases do óxido nítrico (NOS; L-arginina, NADPH: oxigênio oxidoredutases formadoras de óxido nítrico; E.C. 1.14.13.39) são enzimas que atuam convertendo a L-arginina em citrulina liberando desta reação o NO (MARLETTA, 1994). Três isoformas de NOS foram identificadas. A iNOS (NOS induzida; NOS2) é induzida por citocinas inflamatórias, LPS e agentes infecciosos. Esta ativação é independente dos níveis de cálcio/calmodulina (XIE *et al.*, 1982; FÖRSTERMANN *et al.*, 1998). A nNOS (NOS neuronal; NOS1) é a isoforma constitutiva da NOS expressa em subpopulações neuronais. A eNOS (NOS endotelial; NOS3) é a isoforma constitutiva da NOS expressa em células endoteliais. As NOS, neuronal e endotelial são ativadas rapidamente pelo aumento dos níveis de cálcio intracelulares, via calmodulina (BREDT e SNYDER, 1994). A nNOS foi

detectada por imuno-histoquímica no citoplasma e núcleo de diferentes células do cerebelo humano, e apresentou padrão desenvolvimento-dependente, sendo que da infância a idade adulta a expressão permaneceu relativamente estável (ZUCCHI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002). As NOS podem ser caracterizadas como hemeproteínas citocromo P-450-símile. De modo geral, apresentam um domínio redutase C-terminal e um oxidativo ou heme-ligante N-terminal. As estruturas primárias das isoformas de NOS compartilham seqüências consenso de sítios de ligação para calmodulina, NADPH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), bem como sítios para fosforilação. Cada isoforma catalisa a síntese de NO como uma proteína dimérica (MARLETTA, 1994; BREDT e SNYDER, 1994; FÖRSTERMANN *et al.*, 1998).

Sob condições de infecção bacteriana, especialmente organismos gram-negativos, ocorre aumento na produção de NO. Este aumento é atribuído à indução, mediada por citocinas, da iNOS (PARRATT, 1998), sendo a ativação desta enzima, independente dos níveis celulares de cálcio/calmodulina (XIE *et al.*, 1982; FÖRSTERMANN *et al.*, 1998).

A produção de intermediários reativos de oxigênio a partir do NO pode promover efeitos deletérios do NO. O radical livre NO reage com o superóxido (O_2^-), metais de transição e oxigênio (O_2). Cada produto dessas reações: peroxinitrito ($OONO^-$), adutos de metal-NO, e NO_2, respectivamente, podem promover reações com ácidos desoxirribonucleicos e modificações covalentes de resíduos de tirosina, ambos mecanismos potencialmente tóxicos (STAMLER, 1994).

No sistema imune o NO exerce papel benéfico como mensageiro e molécula de defesa do hospedeiro liberada por células inflamatórias, como por exemplo macrófagos, sendo que a produção excessiva ou deficiente de NO pode levar a estados patológicos. Macrófagos humanos podem matar *M. tuberculosis* via NO, sugerindo que o NO, direta ou

indiretamente, tem um papel antimicobacteriano na TB humana (Chan *et al.*, 2001). No entanto, o aumento de NO produzido pela iNOS está muitas vezes associada a lesões decorrentes do processo inflamatório (XIONG *et al.*, 1999).

Em indivíduos imunocompetentes as respostas do sistema imune inata e adaptativa são relativamente eficientes em conter e matar *M. tuberculosis.* Foi estimado que em 100 pessoas infectadas, apenas cerca de 5-10 indivíduos desenvolvem TB (TOOSSI e ELLNER, 2000). O mecanismo de defesa do hospedeiro, considerado relativamente efetivo contra patógenos bacterianos é a alta expressão de NO em resposta a citocinas ou a moléculas derivadas do patógeno, e a consequente produção de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) pelas células de defesa (macrófagos, micróglia, células dendríticas, linfócitos T; CHAN *et al.*, 2001).

Muitos estudos têm sido realizados no intuito de elucidar o papel do NO nas doenças inflamatórias. O NO pode influenciar muitos aspectos da resposta inflamatória, desde a regulação de sua própria expressão até o recrutamento de células inflamatórias para a região afetada (LAROUX *et al.*, 2001). A iNOS é expressa na grande maioria de macrófagos alveolares em pacientes com TB pulmonar (NICHOLSON *et al.,* 1996); é expressa também em células gigantes, histiócitos e macrófagos em tuberculomas pulmonares humanos (ARRUDA *et al.*, 1997). Esta atividade antimicrobiana do NO pode ser devida à modulação da atividade de células específicas, como linfócitos T (SCIORATI *et al.*, 1999) ou ser decorrente da produção de intermediários reativos de oxigênio, que podem ser tóxicos aos microrganismos e também às células do hospedeiro.

Em monócitos de pacientes tuberculosos existe uma degradação constitutiva de IκBα, o principal inibidor citoplasmático da ativação do NFκB, que não ocorre em pacientes não tuberculosos (TOOSSI *et al.*, 1997). Em cultura de macrófagos de pacientes

tuberculosos, há aumento da passagem para o núcleo de NFκB. Este transporte nuclear do NFκB é inibido pelo inibidor da NOS (WANG e KUO, 2001). Nesta mesma cultura, a inibição da ativação do NFκB atenua a produção de IL-1β e TNF-α, confirmando a importância deste fator na síntese destas citocinas. Assim, a presença de NO em macrófagos de pacientes tuberculosos pode desempenhar papel autorregulatório na amplificação da síntese de citocinas pró-inflamatórias, provavelmente via NFκB. Estas citocinas por sua vez também podem induzir a atividade do NFκB e a expressão da iNOS (CHAN *et al.*, 2001), constituindo assim um mecanismo de retroalimentação, favorecendo a perpetuação do processo inflamatório decorrente da patologia (COLASANTI e PERSICHINI, 2000).

Embora o NO participe da ativação de NFκB, ele também tem sido associado a um efeito inibitório sobre a atividade deste fator de transcrição e sua subsequente modulação da expressão gênica, inibindo a interação entre NFκB e seu sítio de ligação no DNA (LAROUX *et al.,* 2001). A capacidade de inibição ou ativação deste fator pode estar associada ao tipo de célula envolvida no processo. Embora a produção do NO frequentemente acompanhe processos inflamatórios, não está claro se o NO promove, inibe ou tem ambos efeitos sobre a evolução destes processos.

Angiogênese, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, é um evento patofisiológico essencial que ocorre no crescimento de tumores, metástase, e processos infecciosos, como na neuro-TB. Este processo é rigorosamente regulado pela ação de citocinas angiogênicas liberadas por células tumorais, de um modo parácrino como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; ZHANG *et al.*, 2005).

O fator de permeabilidade vascular (VPF, vascular permeability factor; SENGER *et al.*, 1983; SENGER *et al.*, 1986; SENGER *et al.*, 1990) também denominado fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, vascular endothelial growth factor; DVORAK *et al.*, 1991) é um importante fator indutor do aumento de permeabilidade da BHE e de angiogênese em tumores inclusive os do SNC e em processos inflamatórios (FLIER *et al.*, 2004). VPF/VEGF é uma glicoproteína homodimérica, com peso molecular de 34 a 42 kDa, originalmente purificada com base em sua atividade de aumento da permeabilidade vascular e subsequentemente mostrou-se um potente mitógeno para células endoteliais (SENGER *et al.*, 1990; FERRARA *et al.*, 1989; CONNOLLY *et al.*, 1989). "Splicings" diferenciais de um mesmo transcrito gênico formam 5 mRNAs, e assim, 5 isoformas diferentes de proteínas de 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos (HOUCK *et al.*, 1992).

VEGF tem papel fundamental na angiogênese e age, principalmente, através de dois receptores tirosina kinase, flt-1 (VEGFR-1) e flk-1 (VEGFR-2). Flk-1 é expresso no endotélio vascular e, é o primeiro marcador conhecido de endotélio e precursores endoteliais (FLAMME *et al.*, 1995). Fatores importantes no aumento da expressão de VEGF são: hipóxia e inflamação. O fator mitogênico induzido por hipóxia (HIMF) é uma proteína originalmente descoberta em um modelo murino de hipertensão pulmonar induzida por hipóxia. Estudos subsequentes mostraram que HIMF é um fator de crescimento específico do pulmão, que participa da proliferação celular e modulação do crescimento compensatório do pulmão (LI *et al.*, 2005). Tong *et al.* (2006) concluíram que HIMF aumenta a produção de VEGF em células epiteliais do pulmão de camundongos de um modo dependente do caminho de sinalização PI-3K/Akt- NFκB, e pode ter um papel crítico na angiogênese pulmonar.

O aumento de expressão imuno-histoquímica de VEGF foi visto em tumores malignos humanos (BROWN *et al.*, 1994; BOOCOCK *et al.*, 1995; OLSON *et al.*, 1996). Matsuyama *et al*. (2000) e Alatas *et al*. (2004) observaram altos níveis séricos de VEGF em pacientes com TB pulmonar ativa. Além disto, altos níveis séricos de VEGF também foram detectados em pacientes com TBM (MATSUYAMA *et al.*, 2001); estes níveis foram mais altos do que os observados em pacientes com meningites de outras causas. Estes mesmos autores observaram reação imuno-histoquímica positiva para VEGF em células inflamatórias mononucleares, na reação fibrosa do espaço subaracnoideo e ao redor de vasculite em cérebros de autópsias de pacientes com TBM.

Flier *et al.* (2004) detectaram níveis significantemente altos de VEGF no líquido céfalo-raquiano (LCR) de crianças com TBM e este aumento de produção contribui para a ruptura da BHE nestes pacientes. Brown *et al.* (2003) observaram que meios de cultura glia-condicionado podem induzir propriedades em células endoteliais da microvasculatura cerebral bovina e proteger contra a ruptura da BHE induzida por hipóxia. O tratamento de células endoteliais da microvasculatura cerebral bovina com o meio C6-condicionado para glioma, por 1 ou 3 dias, protege contra aumento de permeabilidade induzido por hipóxia. E este efeito protetor pode ser mediado por caminhos de transdução de sinais terminando na transcrição de NFκB.

Niveis séricos elevados de VEGF foram observados em estágios avançados de leucemia linfocítica crônica (LLC); as células linfocíticas tumorais produzem e secretam VEGF. A administração de CD154 (fator produzido por células T ativadas e estimulador da produção de VEGF) em cultura de linfócitos isolados de pacientes com LLC resultou em aumento da produção de VEGF com o envolvimento de NFκB neste processo (FARAHANI *et al.*, 2005).

Níveis não tóxicos do neurotransmissor dopamina inibem intensa e seletivamente as atividades do VEGF. A dopamina age através do receptor D2 induzindo endocitose e daí a inibiçao do receptor 2 do VEGF, o qual é crítico para a promoção da angiogênese. Inibe-se assim, a ligação ao receptor, e os subsequentes passos da via de sinalização. A ação da dopamina é específica para VEGF e não afeta outros mediadores da permeabilidade microvascular ou a proliferação de células endoteliais. Estes resultados revelaram uma nova ligação entre SN e angiogênese e indica que a dopamina e outros receptores D2, podem ser potencialmente usados em terapia anti-angiogênica (BASU *et al.*, 2001).

Em resumo, na infecção tuberculosa do SNC, assim como nos demais tecidos do organismo, ocorre ativação de citocinas inflamatórias e outros mediadores da resposta imune. Dentre estes, o VEGF parece desempenhar papel importante na fisiopatologia da neuro-TB.

5. Vacina gênica hsp65 contra a TB – aplicação neste modelo murino de neuro-TB

As vacinas de organismos vivos atenuados, como a vacina BCG (*M. bovis*, atenuado), embora funcionem muito bem para certas doenças, oferecem certa margem de risco de que o paciente seja infectado pelo patógeno a que se pretende prevenir. Seu uso pode comprometer o diagnóstico de TB pelo teste tuberculínico. Além disso, sua eficácia varia de 0 a 80%. Com a vacina de DNA estes problemas não acontecem, sendo hoje a maior esperança para o combate a doenças infecciosas como a TB (ZAUITH, 2002).

A vacina de DNA é baseada em um fragmento do código genético do agente causador da doença, o *M. tuberculosis.* Administrado por via intramuscular, demonstrou-se que esse DNA pode criar condições para a produção da proteína antigênica a partir da maquinaria celular do indivíduo infectado (LOWRIE e*t al.*, 1999).

A observação inicial de que a vacinação com um único antígeno bacteriano (hsp65) poderia conferir alguma proteção a camundongos, contra posterior desafio com *M. tuberculosis* (LOWRIE *et al.*, 1994), confirmou-se em vários laboratórios (TASCON *et al.*, 1996; LOWRIE *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 1997; LOZES *et al.*, 1997; BALDWIN *et al.*, 1998). Desde que o desenvolvimento do componente citotóxico bactericida da resposta imune parece ser mais favorecido pela vacinação com DNA, que pela infecção micobacteriana (BONATO *et al.*, 1998), foi questionado se a vacinação com DNA seria benéfica em uma infecção tuberculosa já estabelecida (LOWRIE e*t al.*, 1999; LOWRIE e SILVA, 2000).

O desenvolvimento de uma infecção em camundongos, iniciada pela injeção intravenosa de *M. 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" (hsp70) ou 6 kDa "early secretory antigen" (ESAT6)], paralelo à menor eficácia destes antígenos na vacinação de DNA profilática (LOWRIE *et al.*, 1997-a).

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 INFγ, com citotoxicidade antígeno-específica (LOWRIE et al., 1997-b), lisando macrófagos infectados. A vacina de DNA-hsp65 parece ser um excelente modo de gerar estas células e pode ser capaz de promover proteção duradoura (LOWRIE et al.,

1997-c). Existem evidências crescentes de que a combinação de vacinas de DNA com drogas quimioterápicas proporciona um melhor resultado em camundongos infectados com TB (SILVA *et al.*, 2005). A avaliação da vacina DNA-hsp65 como adjuvante à quimioterapia em testes clínicos com humanos pode não ser uma perspectiva distante (LOWRIE, 2006).

O uso de modelos experimentais de neuro-TB, com animais imunizados (profilática ou terapeuticamente) com a vacina DNA-hsp65 contra a TB, possibilita o estudo da expressão de fatores envolvidos na fisiopatologia da TB de SNC, permitindo identificar riscos individuais na exacerbação da patologia e sugerir maneiras de se prevenir complicações sérias que podem acompanhar a TB, como a degeneração neuronal.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolvimento de um modelo experimental de neuro-TB.

Objetivos específicos

1. Estabelecimento de um modelo murino de neuro-TB, pela análise histológica e confirmação do diagnóstico pela identificação de BAAR.
2. Avaliação da ativação glial, pela observação da micróglia e de astrócitos ligantes de *Ricinus communis* aglutinina (RCA).
3. Análise da expressão de fatores envolvidos na infecção e inflamação decorrentes da injeção do BAAR (NFκB e iNOS).
4. Estudo da expressão de VEGF em animais imunizados com a vacina DNA-hsp65contra a TB.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais.

Para o estabelecimento deste modelo experimental de neuro-TB utilizamos 224 camundongos C57BL6 machos adultos, com 45 dias de vida e cerca de 30g (linhagem com microbiota controlada, Biotério Genética – FMRP-USP).

2. Patógeno.

Para a indução de neuro-TB nos camundongos utilizamos Bacilo Calmette Guérin (BCG – *M. bovis* atenuado). A amostra de BCG estava inicialmente a uma concentração de 10^6 ou 10^9 cfu. Para testar a concentração ideal de inoculação diluímos as amostras de BCG a 10^2, 10^3 e 10^4 cfu. Para o estabelecimento do modelo experimental de neuro-TB a concentração de BCG utilizada foi 10^4cfu.

3. Estereotaxia.

3.1. Definição das coordenadas estereotáxicas de inoculação de BCG.

Posicionamos camundongos anestesiados em aparelho estereotáxico. Para a microinjeção, utilizamos agulha de insulina com o bisel cortado num ângulo de 30° para aumentar a precisão do sítio de liberação de BCG e minimizar a lesão tecidual. Após o corte do bisel, confeccionamos agulhas para penetrar apenas 2mm no cerebelo. O crânio foi exposto com bisturi e então injetamos corante na linha média do cerebelo murino. Sacrificamos o animal por perfusão intra-cardíaca, imediatamente após a injeção, para que não houvesse solubilização do corante no tecido, impossibilitando assim a localização do trajeto da agulha e a identificação da solução injetada no tecido. A profundidade de

inserção da agulha foi determinada de modo que o ventrículo fosse evitado e o parênquima cerebelar fosse atingido. O objetivo era a indução de meningite, tuberculomas e/ou recrutamento microglial no parênquima cerebelar, e não apenas a indução de meningite pela inoculação de BCG no líquor.

Após a perfusão extraímos o cerebelo e o congelamos em meio de montagem O.C.T. (Tissue Tek). Seccionamos o cerebelo congelado em criótomo Microm tipo 500 (HEIDELBERG) e analisamos as secções em microscópio óptico modelo BX60F3 (OLYMPUS). Ao exame, a injeção do corante foi satisfatória em profundidade, no entanto, durante o procedimento esterotáxico observamos que houve extravasamento excessivo de sangue, por atingirmos a artéria cerebelar média. O sangue em excesso no sítio de injeção, poderia provocar lesão adicional do tecido, além da lesão esperada em consequência da inoculação de BCG. Para evitar o problema, deslocamos as coordenadas estereotáxicas para o hemisfério cerebelar direito. Com este procedimento, além de evitarmos a artéria, tornou-se possível, utilizarmos o hemisfério contra-lateral como controle interno.

As coordenadas estereotáxicas determinadas após tentativas foram (mm): AP +2,5; L –0,5; V –2,0. O ponto central (zero) foi considerado o encontro da sutura lambdóide com a sutura sagital (lambda) (Figuras 1 e 2).

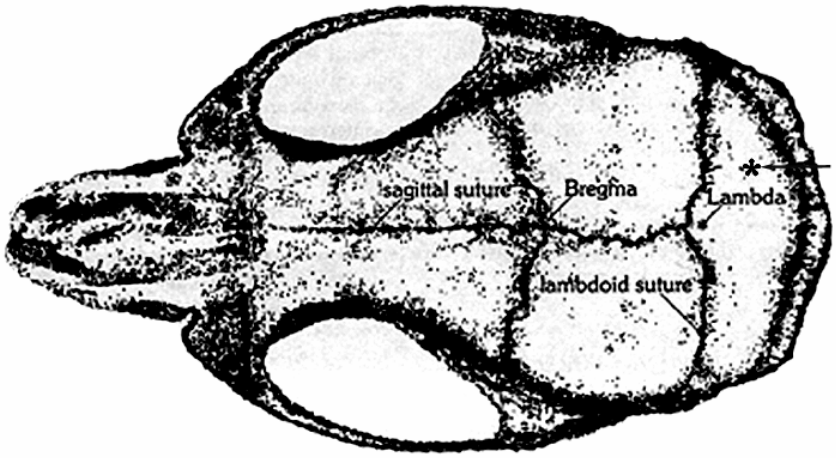

Figura 1. Vista superior de crânio murino (* ponto de injeção aproximado. Fonte: Paxinos e Franklin, 1997).

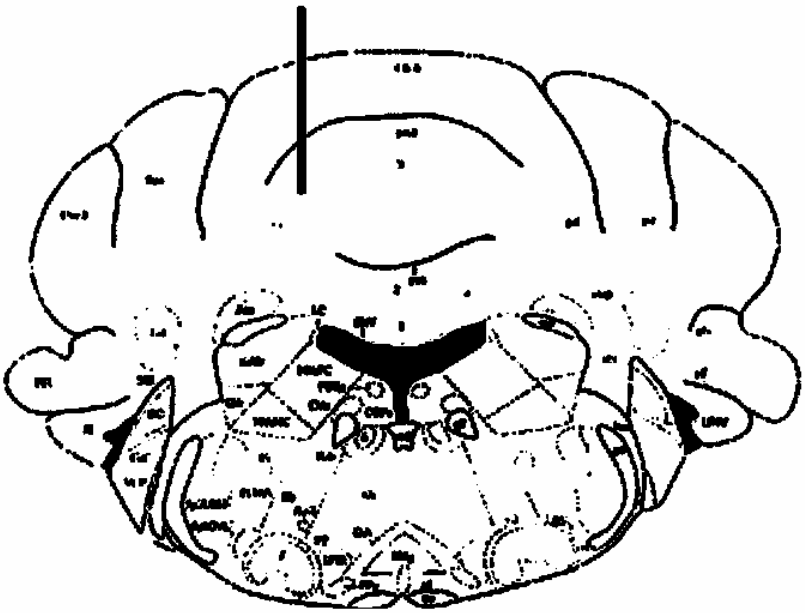

Figura 2. Esquema de secção cerebelar coronal (barra: sítio aproximado de injeção. Fonte: Paxinos e Franklin, 1997).

3.2. Definição da concentração da amostra de BCG.

De acordo com a bibliografia consultada (MAZZOLLA *et al.*, 2002 e TSENOVA *et al.*, 1999) a concentração ideal de amostra a ser injetada seria 10^5 cfu de BCG. No entanto, em testes preliminares, tivemos dificuldades em injetar esta diluição devido à viscosidade da amostra. Então, iniciamos os testes com a diluição de 10^4 cfu de BCG e depois utilizamos 10^3 e10^2 cfu/0,25 µl de solução de BCG em salina, para determinar a mínima diluição capaz de induzir lesões tuberculosas e/ou o recrutamento microglial (Tabela 1). Nos grupos contrôle injetamos salina para observarmos o efeito da injeção no tecido, ou não fizemos nenhuma injeção (naïve).

Tabela 1: Camundongos injetados com diferentes concentrações de BCG ou com salina

	Tratamento: estereotaxia			
Sacrifício	10^4 cfu de BCG	10^3 cfu de BCG	10^2 cfu de BCG	Salina
1 semana	5/10	5/7	5/7	5/7
2 semanas	5/7	5/10	5/10	5/6
4 semanas	5/10	5/7	5/10	5/6
8 semanas	5/7	5/7	5/7	5/6

n/N - N: número total de camundongos utilizados; n: número final de camundongos analisados.

Após analisarmos as secções, concluímos que a melhor diluição da amostra para a indução de neurotuberculose neste modelo experimental seria 10^4 cfu/0,25 µl de solução de BCG em salina (Tabela 2).

4. Sacrifício dos animais.

Para determinarmos o decurso temporal da formação de meningite, dos tuberculomas e do recrutamento microglial, os animais foram sacrificados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias; 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção intracerebelar de BCG ou salina.

Os camundongos foram anestesiados e sacrificados por perfusão intra-cardíaca. Inicialmente, para eliminar as hemáceas dos vasos sanguíneos utilizamos tampão fosfato salina (PBS). Em seguida, administramos aproximadamente 40ml de solução de paraformaldeído (4%) lisina-periodato (PLP) em tampão PBS.

Os camundongos foram divididos em grupos de acordo com o tempo de sacrifício (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2. Camundongos utilizados no estudo do decurso temporal da formação de neuro-TB experimental

	Tratamento: estereotaxia	
Sacrifício	10^4 cfu de BCG	Salina
1 dia	5/5	4/5
2 dias	5/5	3/5
3 dias	5/5	4/5
4 dias	4/5	3/5
5 dias	2/5	3/5
6 dias	4/5	3/5
1 semana	5/10	5/7
2 semanas	5/7	5/6
4 semanas	5/10	5/6
8 semanas	5/7	5/6
	5/7 Naïve (sem tratamento)	

n/N - N: número total de camundongos utilizados; n: número final de camundongos analisados.

5. Processamento do tecido.

Após dissecção, os cerebelos murinos foram pós-fixados por 4 horas sob agitação, à temperatura ambiente, na mesma solução fixadora (PLP 4%). A seguir, os tecidos fixados foram desidratados em diferentes concentrações de etanol, diafanizados em xileno e, emblocados em parafina, de acordo com protocolo de processamento de tecido animal de rotina da FMRP-USP (Anexo III).

6. Microtomia.

Seccionamos os cerebelos coronalmente a 8μm de espessura em micrótomo histológico modelo RM 2065 (Leica). Determinamos o ponto de corte de acordo com as coordenadas estereotáxicas utilizadas no procedimento de microinjeção e, orientados pelo atlas de cérebro murino Paxinos e Franklin (1997 – No Atlas, as coordenadas foram aproximadamente: interaural 1,88; ponto correspondente aproximado, ao utilizado para injeção: ânteroposterior +2,5 em relação ao Lambda). Fizemos secções seriadas coletando a primeira secção rostralmente ao ponto de injeção. Para cada animal utilizamos 10 ou 20 lâminas silanizadas para aumentar a aderência do tecido, onde colocamos, de maneira sucessiva, primeiramente a primeira secção do bloco, portanto, há 10 ou 20 primeiras secções; depois a segunda secção, a qual corresponde a 11ª ou a 21ª secção, em cada lâmina e assim, até a terceira ou quarta secção. Deste modo, em uma mesma lâmina temos uma amostragem de 240 a 320μm de tecido cerebelar aproximadamente, com uma distância de 80 a 160μm entre as secções de uma lâmina (Figura 3). Isto permitiu avaliar a expressão de diferentes marcadores nas mesmas lesões.

7. Análise morfológica da formação de meningite, tuberculomas e demais alterações decorrentes da indução de neuro-TB.

Para avaliarmos o efeito da injeção de BCG ou salina, analisamos a morfologia das secções cerebelares seriadas com a coloração de hematoxilina de Harris e Eosina (HE; Tabela 3), segundo técnica de rotina para processamento e coloração de tecidos biológicos. Observamos as secções coradas com HE por microscopia optica.

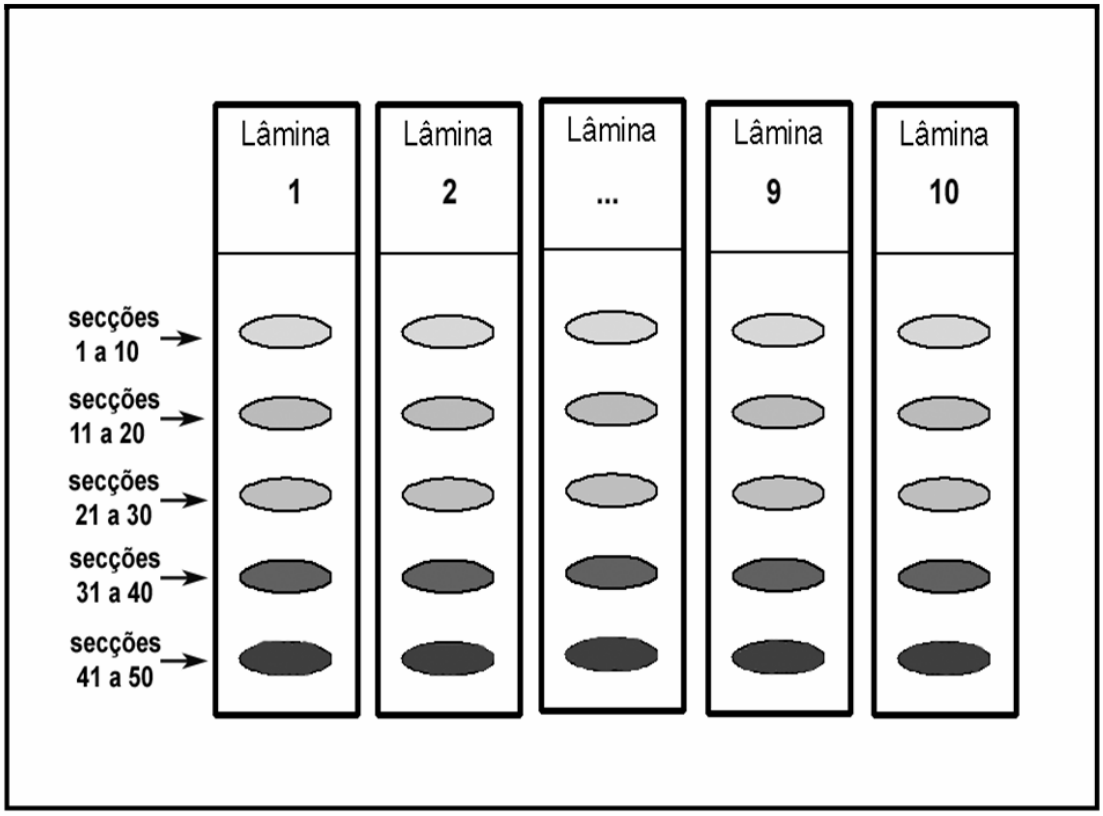

Figura 3. Esquema de corte e disposição das secções nas lâminas.

Tabela 3: Camundongos utilizados para a caracterização do decurso temporal da neuro-TB (HE), da presença de BAARs (Ziehl-Neelsen), do recrutamento micróglial (RCA) e da expressão imuno-histoquímica de NFκB e iNOS (n)

Sacrifício	HE	RCA	Ziehl-Neelsen	NFκB	iNOS
1dia	5	5	-	5	-
2 dias	5	5	-	5	-
3 dias	5	5	-	5	-
4 dias	5	5	-	5	-
5 dias	5	5	-	5	-
6 dias	5	5	-	5	-
1 semana	5	5	2	5	2
2 semanas	5	5	2	5	2
4 semanas	5	5	2	5	2
8 semanas	5	5	2	5	2

8. Caracterização da presença de BAAR e confirmação do diagnóstico de neuro-TB.

Para confirmarmos o sucesso da injeção e a infecção cerebelar com BCG, utilizamos a coloração Ziehl Neelsen para a detecção de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR; Tabela 3), de acordo com o protocolo de rotina do laboratório de patologia da FMRP-USP.

9. Caracterização da ativação glial na neuro-TB experimental.

A lectina vegetal *Ricinus communis* (RCA) é conhecida por ser um ligante de micróglia ativada, sendo assim amplamente utilizada para a detecção deste tipo celular. Também é conhecido que vasos sanguíneos são ligantes de RCA, mas esta marcação foi ignorada, já que pesquisamos ativação microglial. Além da microglia, observamos também a marcação de células da macroglia (astrócitos) ativadas, além de células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória, no local de injeção (Tabela 3).

9.1. Histoquímica.

Para detecção histoquímica de ligantes de RCA no cerebelo murino utilizamos a modificação do procedimento experimental descrito por Martins *et al.* (1999). As lâminas silanizadas contendo as secções cerebelares, foram mantidas em estufa histológica por uma noite à temperatura de 58ºC, para eliminação do excesso de parafina. Pela manhã, a desparafinização foi completada com diferentes soluções de xilol e etanol. Após, fizemos o bloqueio da peroxidase endógena em 4,5 vol. % H_2O_2 em PBS, por 15 minutos. A recuperação antigênica foi feita com tampão Tris-HCl 50mM pH 9,5, por 20 minutos, em forno microondas (Sharp Corroussel II, modelo RB-4A33). Após atingir a temperatura ambiente, as secções foram incubadas com glicina 50mM tamponada com Tris-base 0,1M, pH 7,4, por 30 minutos, para bloquear grupos aldeídos. As secções foram então incubadas em tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 , contendo 0,45M de cloreto de sódio e 0,3% de Triton X-100 (New England Nuclear – Tampão B), e 3% (p/v) de albumina sérica bovina (ABS)] por 4 horas. A seguir, as secções pré-lavadas com tampão B, foram incubadas por 15 minutos em solução avidina (DAKO), lavadas com tampão B e incubadas por mais 15 minutos em solução biotina (DAKO), e novamente lavadas com tampão B. Depois, as secções foram incubadas por toda a noite à temperatura ambiente com *R. communis* biotinilado (RCA – VECTOR), a uma diluição de 1:4000 em tampão de bloqueio. As secções foram submetidas a sucessivas lavagens com tampão B, e após, com PBS. RCA foi detectada usando o kit Elite ABC-peroxidase (VECTOR), por 60 minutos, à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas com tampão B, e em seguida com tampão Tris-HCl 50mM pH 7,6. A marcação foi feita usando H_2O_2 como substrato em presença de 0,04mg/ml de 3, 3'-diaminobenzidina (DAB). A reação foi interrompida com água Milli-Q após 10 minutos. As secções foram desidratadas em

diferentes concentrações de etanol e diafanizadas em xilol. As secções foram montadas, entre lâmina e lamínula, com Permount.

9.2. Contagem de células RCA positivas.

Para quantificar a ativação glial neste modelo experimental de neuro-TB utilizamos o Software QualiView (Atonus) para a contagem de células ligantes de RCA. Excluímos da contagem, células inflamatórias e demais células presentes nas lesões, devido ao aglomerado de células e, à impossibilidade de individualizá-las. Foram consideradas células da microglia e astrócitos ligantes de RCA, no parênquima cerebelar próximo à lesão. Escolhemos de 1 a 3 campos de tamanhos conhecidos (91860,51 μm^2), onde a densidade de células marcadas era maior. Em cada campo foram contadas todas as células ligantes de RCA.

9.3. Análise estatística do recrutamento glial.

Com o objetivo de comparar o efeito da injeção intracerebelar de BCG e salina, em camundongos, fizemos a análise estatística do aumento do número de células ligantes de RCA, ao longo do tempo.

Para isso, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) em duas vias. Para que o modelo de ANOVA seja validado, é necessário que os resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância constante. (Montgomery, 2001).

O procedimento de ANOVA foi realizado via software SAS.

10. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de NFκB e iNOS neste modelo murino de neuro-TB.

10.1. Recuperação antigênica.

Para testar o efeito da recuperação antigênica e provocar a exposição dos epitopos, nós realizamos a modificação do procedimento experimental descrito por Martins *et al.*, (1999). Utilizamos tampão Tris-HCl 50mM pH 9,5 e tampão citrato de sódio 10mM pH 6,0, em forno microondas Sharp modelo RB-4A33, em potência máxima por 20 minutos. Secções controle, não submetidas ao tratamento de microondas, permaneceram pelo mesmo tempo em solução tampão.

10.2 Imuno-histoquímica.

Após a constatação de que o tampão Tris-HCl 50mM, pH 9,5 por 20 minutos em forno de microondas recuperou a antigenicidade do tecido com maior eficácia, padronizamos este método. Assim, após a recuperação antigênica, as secções foram incubadas com glicina 50mM tamponada com Tris-base 0,1M, pH 7,4, por 30 minutos, à temperatura ambiente, para bloquear grupos aldeídos. As secções foram então incubadas em tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,4 , contendo 0,45M de cloreto de sódio e 0,3% de Triton X-100 (New England Nuclear – Tampão B), e 5% (p/v) de leite em pó desnatado e soro de jumento inativado diluído a 1:6 (v/v)] por 4 horas. Depois, as secções foram incubadas por toda a noite, à temperatura ambiente, com o anticorpo primário cabra anti-p65 (NFκB – SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), a uma diluição de 1:20, ou com anticorpo primário coelho anti-iNOS (BIOMOL), diluído a 1:200, em tampão de bloqueio (Tabela 3). As secções controle foram incubadas com tampão de

bloqueio apenas, omitindo-se o anticorpo primário. Após, as secções foram submetidas a sucessivas lavagens com tampão B. A seguir, as secções foram incubadas, por 15 minutos, em solução avidina (DAKO), lavadas com tampão B, e incubadas por mais 15 minutos em solução biotina (DAKO), e novamente lavadas com tampão B. O Anticorpo primário foi detectado pelo anticorpo secundário biotinilado coelho anti-cabra E0466 (DAKO) a 1:100, ou porco anti-coelho E0353 (DAKO) a 1:200, diluído em tampão de bloqueio, por 60 minutos, à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas com tampão B, e em seguida com tampão PBS. O kit Elite ABC-peroxidase (VECTOR) foi usado como sistema de detecção. As secções foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente e após lavadas com tampão B, e em seguida com tampão Tris-HCl 50mM pH 7,6. A marcação foi feita usando H_2O_2 como substrato em presença de 0,04mg/ml de 3, 3'-diaminobenzidina (DAB). A reação foi interrompida com água Milli-Q, após 10 minutos. As secções foram desidratadas em diferentes concentrações de etanol, diafanizadas em xilol, e montadas entre lâmina e lamínula, com Permount.

11. Delineamento experimental: Grupos de camundongos utilizados para o estabelecimento e a caracterização deste modelo de neuro-TB

- Dia 1: Sacrifício do primeiro grupo. 1 dia após injeção com BCG ou salina.
- Dia 2: Sacrifício do segundo grupo. 2 dias após injeção com BCG ou salina.
- Dia 3: Sacrifício do terceiro grupo. 3 dias após injeção com BCG ou salina.
- Dia 4: Sacrifício do quarto grupo. 4 dias após injeção com BCG ou salina.
- Dia 5: Sacrifício do quinto grupo. 5 dias após injeção com BCG ou salina.
- Dia 6: Sacrifício do sexto grupo. 6 dias após injeção com BCG ou salina.
- Semana 1: Sacrifício do sétimo grupo. 1 semana após injeção com BCG ou salina.
- Semana 2: Sacrifício do oitavo grupo. 2 semanas após injeção com BCG ou salina.
- Semana 4: Sacrifício do nono grupo. 4 semanas após injeção com BCG ou salina.
- Semana 8: Sacrifício do décimo grupo. 8 semanas após injeção com BCG ou salina.
- **Em todos os grupos, caracterizamos a morfologia, o recrutamento glial e a expressão de NFκB e iNOS.**

12. Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE-CAPES).

12.1. Imunização dos comundongos com a vacina DNA-hsp65 (etapa realizada na FMRP-USP).

Camundongos C57BL6 adultos, com 45 dias de vida e cerca de 30g, receberam quatro doses da vacina gênica DNA-hsp65 por via intra-muscular, com intervalos de 2 semanas a cada administração, e 2 semanas após a última dose. Para a imunização dos camundongos, utilizamos uma seringa de insulina, com um dispositivo adaptado para a penetração de apenas 2mm da agulha (LOWRIE *et al.*, 1999). Assim, alcançamos o quadríceps femural e não atravessamos este músculo, muito delgado no camundongo.

O vetor plasmidial contendo o gene micobacteriano (pVAX-hsp65) foi diluído em solução de sacarose 25% em salina (50µg de DNA em 50µl de solução, injetado em cada quadríceps femural; segundo comunicação pessoal com o Prof. Dr. Célio Lopes Silva), e administrado em intervalos de duas semanas. Nos dois grupos-controle injetamos, apenas pVAX sem o gene hsp65, ou apenas salina, respectivamente.

12.2. Estereotaxia (etapa realizada na FMRP-USP).

A injeção de BCG ou salina nos camundongos, foi efetuada 2 semanas após a última imunização (pVAX-hsp65, pVAX sem hsp65 ou salina). O procedimento estereotáxico e a concentração de BCG foram os mesmos utilizados no estabelecimento deste modelo experimental de neuro-TB [Coordenadas estereotáxicas (mm): AP +2,5; L –0,5; V –2,0; concentração da amostra de BCG: 10^4 cfu/0,25µl salina].

Distribuição dos grupos de acordo com a tabela 4:

Tabela 4. Grupos de acordo com o tratamento e número final de animais com material adequado para o estudo.

		Primeira etapa: imunização		
		pVAX-hsp65	pVAX	Salina
Segunda etapa: Injeção intra-cerebelar	*BCG (n/N)*	5/10	4/10	5/10
	Salina (n/N)	3/10	4/10	4/10

n: número de aimais por grupo utilizados neste estudo.
N: número inicial de animais por grupo. No entanto, houve perda de animais durante a cirurgia e processamento técnico.

12.3. Sacrificio dos animais (etapa realizada na FMRP-USP).

Durante o estabelecimento do modelo murino de neuro-TB, verificamos que a formação de meningite, lesões granulomatosas e o recrutamento da micróglia, atingiu um pico máximo após quatro semanas. Desta forma, sacrificamos os camundongos vacinados com pVAX-hsp65, pVAX ou injetados com salina, após este período.

Os camundongos foram anestesiados, e sacrificados por perfusão intra-cardíaca, com solução de paraformaldeído (PF 4%) em tampão PBS.

12.4. Processamento do tecido (etapa realizada na FMRP-USP).

Os cerebelos murinos foram pós-fixados por 4 horas sob agitação, à temperatura ambiente, na mesma solução fixadora (PF 4%). Após, utilizamos o mesmo método de processamento do tecido cerebelar utilizado para o estabelecimento deste modelo experimental (Anexo III).

12.5. Microtomia (etapa realizada no CHUS-CA).

Seccionamos os cerebelos coronalmente a 4µm de espessura em micrótomo histológico modelo RM 2065 (Leica). Utilizamos o mesmo método descrito anteriormente para determinarmos o ponto de corte das secções (PAXINOS e FRANKLIN, 1997; e coordenadas estereotáxicas: AP +2,5). Secções seriadas foram coletadas, sendo a primeira secção rostralmente ao ponto de injeção. Para cada animal utilizamos 10 lâminas silanizadas, como descrito anteriormente (M&M: 6). Deste modo, em uma mesma lâmina obtivemos uma amostragem de 160 a 200µm de tecido cerebelar aproximadamente, com uma distância de 40µm entre as secções de uma lâmina (Figura 3).

12.6. Diferenciação morfológica entre cerebelos de camundongos imunizados com a vacina DNA-hsp65, somente com o vetor plasmidial ou injetados com salina (etapa realizada no CHUS-CA).

Para avaliarmos o efeito da imunização com DNA-hsp65 em animais injetados intracerebelo com BCG ou salina, analisamos a morfologia das secções cerebelares coradas com HE, segundo técnica de rotina para processamento e coloração de tecidos biológicos. Observamos as secções coradas com HE, por microscopia de optica.

12.7. Caracterização da presença de bacilos e confirmação do diagnóstico de neuro-TB em animais imunizados (etapa realizada no CHUS-CA).

Coramos as secções por 15 minutos em Auramina, descoramos com HCl 0,5% em etanol 70%, por dois minutos, e contra-coramos com permanganato de potássio 0,5% por dois minutos. Observamos os bacilos por microscopia de fluorescência.

12.8. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de VPF/VEGF no modelo experimental de neuro-TB em animais tratados com DNA-hsp65 (etapa realizada no CHUS-CA).

Para caracterizar a expressão imuno-histoquímica de VEGF na neuro-TB experimental, utilizamos secções cerebelares adjacentes às utilizadas para a analise morfológica com HE e a detecção de bacilos pela técnica da Auramina em animais vacinados com pVAX-hsp65, apenas com pVAX ou injetados com salina,.

Cortes histológicos dos blocos parafinizados foram desparafinizados em xilol e desidratados em diferentes concentrações de etanol. A peroxidase endógena foi bloqueada com H_2O_2 5% diluída em metanol. A antigenicidade do tecido foi recuperada com tampão citrato de sódio 0,01M pH 6,0, em panela de pressão por 5 minutos. Utilizou-se anticorpo primário policlonal coelho anti-VEGF a uma diluição 1:200 ou 5µg/ml (LABVISION, Star 54, Ab-1). O anticorpo secudário utilizado foi ovelha anti-coelho conjugado com a peroxidase (SEROTEC) a uma diluição de 1:100. Os anticorpos foram diluídos em tampão PBS contendo 1% de BSA (albumina sérica bovina). Utilizamos diaminobenzidina (DAB) como cromógeno e hematoxilina de Harris como contra-coloração nuclear. As secções foram desidratadas em diferentes concentrações alcoólicas, e montadas em lamínula com meio de montagem solúvel em tolueno (protocolo do laboratório do Prof. Dr Guillaume Sébire).

12.9. Delineamento experimental: Grupos de camundongos imunizados com DNA-hsp65.

- Dia 1: Imunização: 1ª dose pVAX-hsp65, apenas pVAX ou salina.
- Semana 2: Imunização: 2ª dose pVAX-hsp65, apenas pVAX ou salina.
- Semana 4: Imunização: 3ª dose pVAX-hsp65, apenas pVAX ou salina.
- Semana 6: Imunização: 4ª dose pVAX-hsp65, apenas pVAX ou salina.
- Semana 8: Estereotaxia: injeção de BCG ou salina nos 3 grupos (1-pVAX-hsp65; 2-pVAX; 3-salina).
- Semana 12: Sacrifício dos camundongos.
- **Em todos os grupos, caracterizamos a morfologia e a expressão de VPF/VEGF.**

RESULTADOS

1. Estabelecimento de um modelo experimental de neuro-TB.

1.1. Concentração ideal da amostra de BCG injetada por estereotaxia intra-cerebelar.

A concentração da amostra de BCG ideal para a indução de meningite, tuberculomas e o recrutamento microglial foi 10^4 cfu. Com esta concentração de BCG injetada pudemos observar: **1)** infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo (meningite) em todos os animais injetados, em todos os períodos de sacrifício (1 a 6 dias; 1 , 2, 4 e 8 semanas); **2)** formação de tuberculomas em 1, 4 e 8 semanas após a injeção; **3)** o recrutamento da macro (astrócitos) e da micróglia; **4)** além de outras alterações morfológicas do cerebelo murino.

A injeção de 10^3 e10^2 cfu de BCG resultou na formação de meningite em 2 de 5 animais apenas. Desta forma, para a caracterização deste modelo murino de neuro-TB, utilizamos injeções intracerebelares à concentração de 10^4 cfu de BCG.

1.2. Caracterização do decurso temporal da neuro-TB nos camundongos injetados com BCG, observada por coloração Hematoxilina-eosina (HE).

A formação de meningite e tuberculomas foi avaliada, 1 a 6 dias, 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG 10^4 cfu no cerebelo de camundongos, utilizando-se coloração de HE em secções de 8μm.

Observamos alterações importantes da citoarquitetura cerebelar, desde o primeiro dia de sacrifício dos camundongos, após a injeção de BCG (Figs.4, 5 e 6; Tab.5). Em animais sacrificados de 1 a 6 dias (após a injeção de BCG), observamos áreas de hemorragia recente, com focos de hemossiderina, no espaço subaracnoideo e parênquima cerebelar, próximo ao sítio de injeção (Fig.4A, B e D).

Figura 4. Caracterização do decurso temporal do modelo murino de neuro-TB, visto por coloração Hematoxilina-eosina (HE). A e B. Cerebelo de camundongo sacrificado 1 dia após injeção de BCG. Note presença de áreas de hemorragia recente no parênquima cerebelar e espaço subaracnoideo. **C.** Cerebelo de camundongo sacrificado 2 dias após injeção de salina. Pequena lesão decorrente de extravasamento de sangue, causado pelo procedimento estereotáxico. **D.** Cerebelo de camundongo sacrificado 3 dias após injeção de BCG. Lesões parenquimatosas com áreas de hemorragia. **E.** Cerebelo de camundongo sacrificado 1 semana após injeção de BCG. Infiltrado linfo-mononuclear no espaço subaracnoideo (meningite). **F.** Cerebelo de camundongo sacrificado 1 semana após injeção de salina. Nota-se reação tecidual com gliose na MOL, no sítio de injeção de salina. **G e H.** Cerebelo de camundongo sacrificado 4 semanas **(G)** e 8 semanas **(H)** após injeção de BCG. Infiltrados predominantemente linfocíticos, com poucas células mononucleares no espaço subaracnoideo (meningite).

Setas: sítio de injeção aproximado.

Escalas: A, **C**, **D**, **E**, **G** e **H**: 10 µm; **B** e **F**: 50 µm.

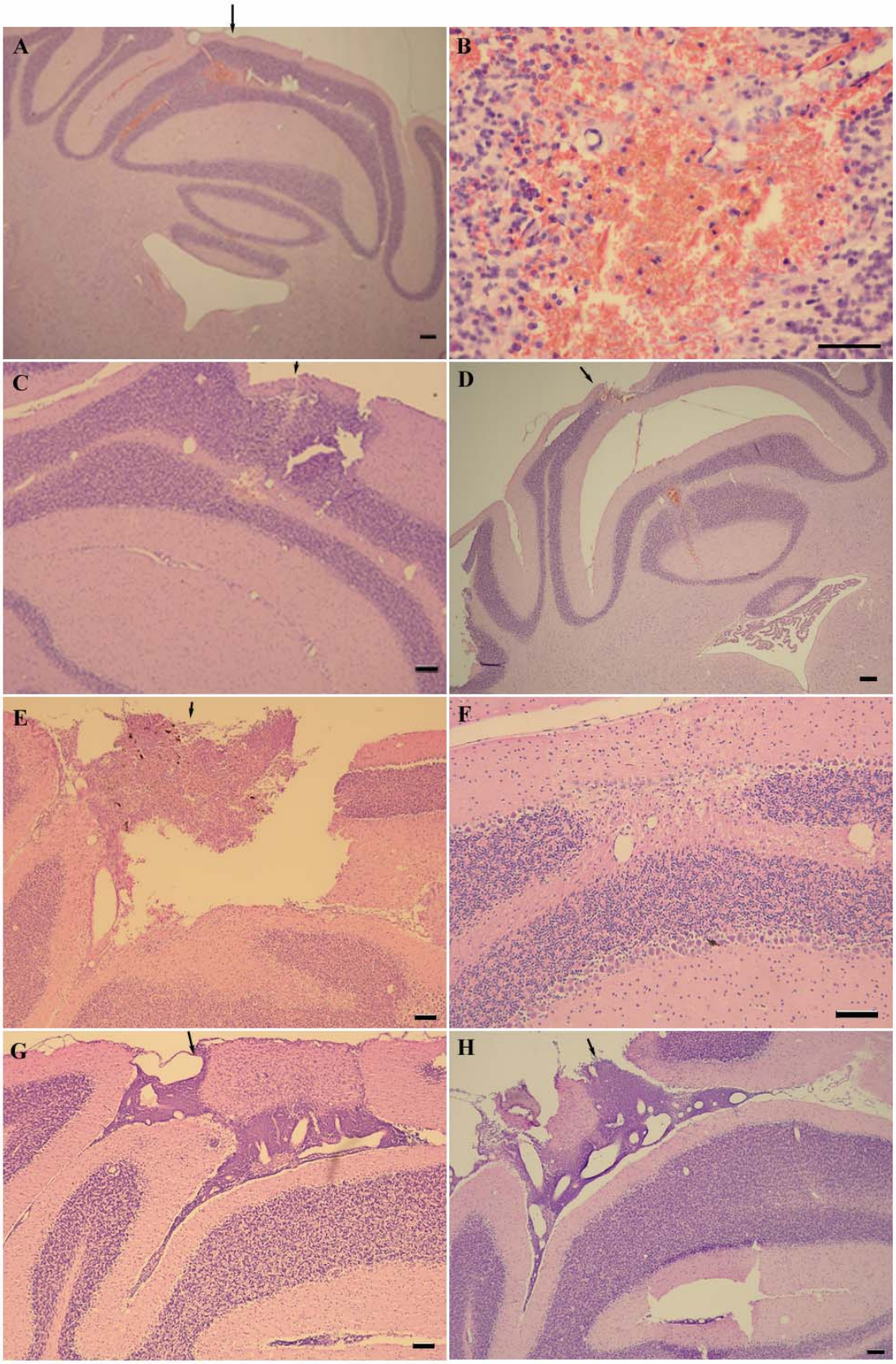

Figura 4

Figura 5. Caracterização morfológica e da presença de BAARs, neste modelo murino de neuro-TB. A e B. Tuberculoma, observado no córtex cerebelar, de um camundongo sacrificado 1 semana após injeção de BCG (entre cabeças de setas). BAARs foram detectados pela fucsina básica, no interior do tuberculoma e no infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo. **C.** Pulmão humano infectado pelo *M. tuberculosis* (setas). Controle positivo para a presença de BAAR. **D e G.** Camundongo sacrificado 4 semanas após injeção de BCG. Extenso tuberculoma, ocupando diferentes camadas do córtex cerebelar (entre cabeças de setas). Proliferação de capilares na substância branca inferior ao tuberculoma (**G** e seta em **D**). **E e H.** Outro camundongo sacrificado 4 semanas após injeção de BCG. Tuberculoma com características típicas de granuloma pulmonar tuberculoso (entre cabeças de setas). Podemos observar infiltrado de macrófagos com citoplasma espumoso, em seu interior; coroa de macrófagos epitelióides; circundada por coroa de linfócitos; neo-vasos e gliose do parênquima próximo. Nota-se focos de calcificação distrófica (*). Observamos também meningite (seta em **E**). **F e I.** Camundongo sacrificado 4 semanas após injeção de salina Lesão nodular bem delimitada (entre cabeças de setas), constituida por agregados de macrófagos, com citoplasma amplo e vacuolizado (padrão espumoso), localizado na substância branca subcortical. Observa-se a presença de vasos no interior e na periferia da lesão. Discreta proliferação de células da glia.

Coloracões: Ziehl-Neelsen em: **A**, **B** e **C**; Hematoxilina-eosina (HE) em: **D**, **E**, **F**, **G**, **H** e **I**.

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular; **WM,** substância branca.

Escalas: B, **C**, **G** e **H**: 10µm; **A**, **D**, **E**, **F** e **I**: 50 µm.

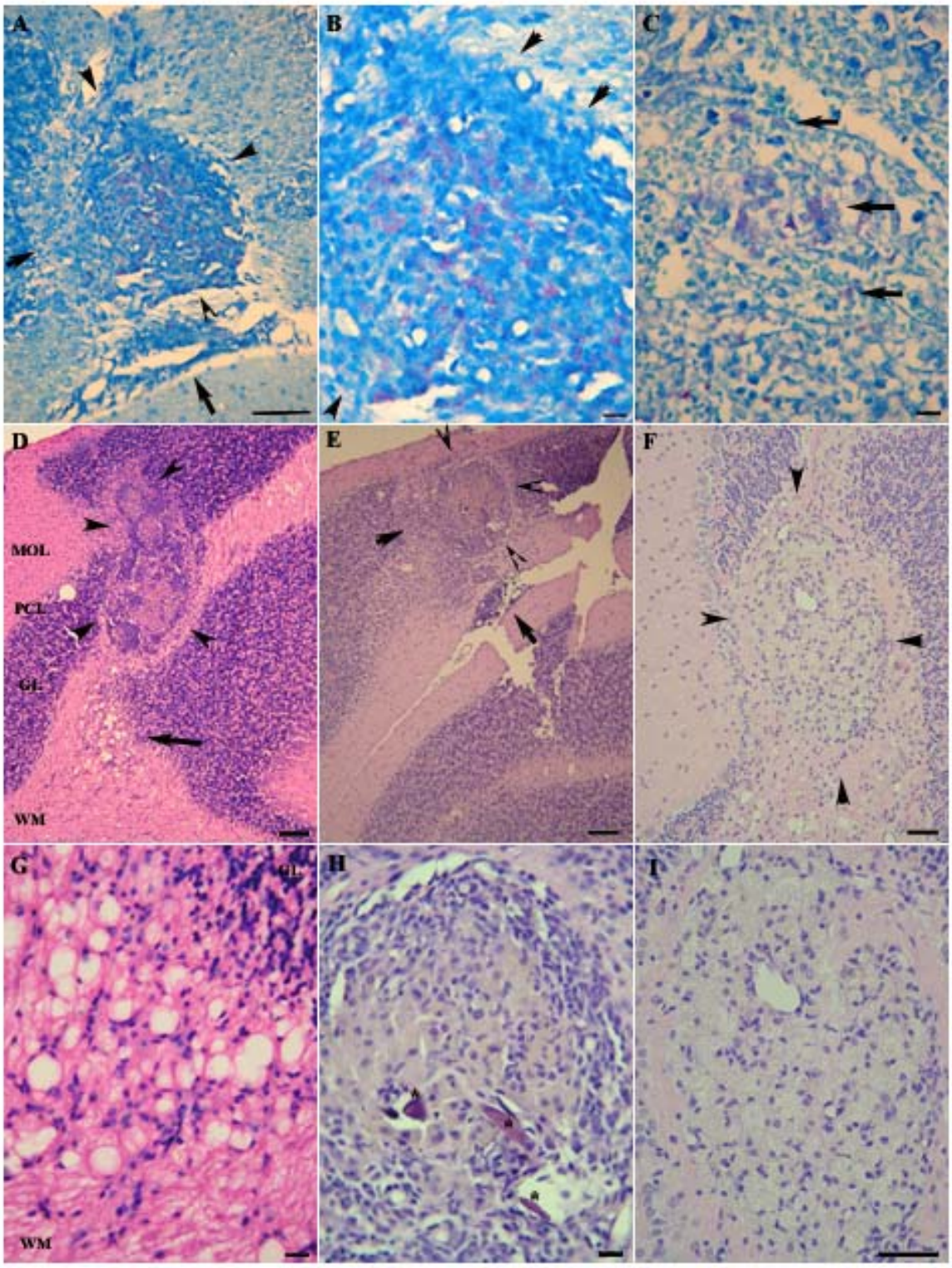

Figura 5

Figura 6. Caracterização do decurso temporal do modelo murino de neuro-TB, visto por HE. **A.** Cerebelo de camundongo naïve (sem tratamento). Citoarquitetura cerebelar preservada (como visto em atlas de cerebelo murino, Paxinos e Franklin, 1997). **B.** Infiltrado linfo-mononuclear do espaço sub-aracnoideo (meningite; Figura **4E**). Camundongo sacrificado 1 semana após injeção de BCG. **C.** Infiltrado linfo-mononuclear do espaço sub-aracnoideo (meningite; seta) com comprometimento do parênquima adjacente (gliose; cabeças de setas). Camundongo sacrificado 2 semanas após injeção de BCG. **D.** Meningite em camundongo sacrificado 4 semanas após injeção de BCG. **E e F.** Camundongo sacrificado 8 semanas após injeção de BCG. Extenso afluxo de macrófagos (citoplasma espumoso) e linfócitos. Esboços de tuberculomas com células epitelióides ainda não organizadas (**F**, cabeças de setas), presença de vasos no interior da lesão (cabeças de setas em **E**) e grande quantidade de linfócitos, tanto no interior da lesão, como no espaço subaracnoideo (seta em **E**). Nota-se focos de calcificação distrófica (*).

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular; **WM,** substância branca.

Escalas: A: 10µm; **B**, **C**, **D**, **E** e **F**: 50 µm.

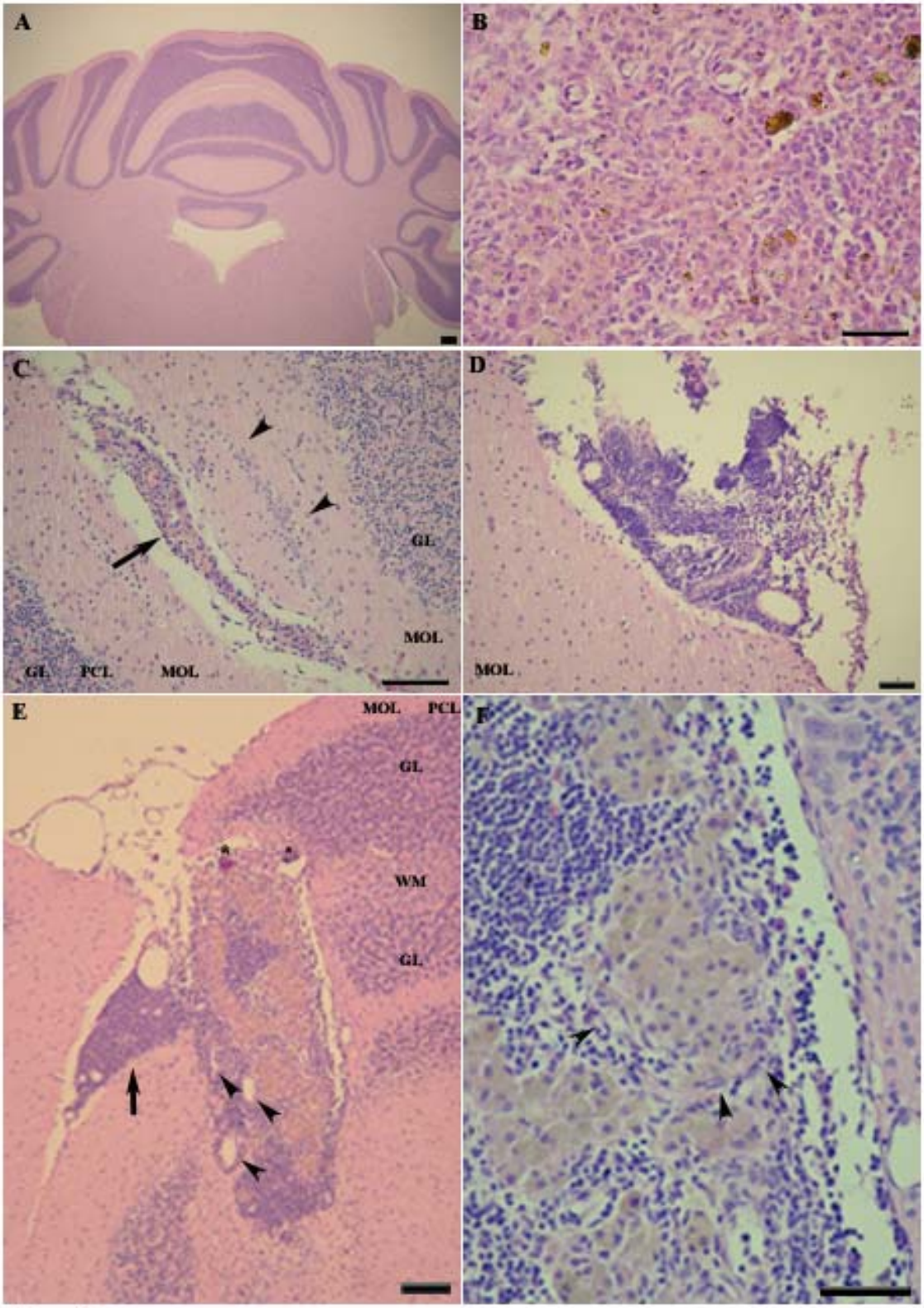

Figura 6

Após este período, observamos redução de hemorragia e hemossiderina, em camundongos sacrificados 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG. Observamos infiltrado linfocítico e mononuclear no espaço subaracnoideo (meningite; Fig.4E, G e H; Fig.5A e E; Fig.6B, C, D e E), em todos os animais sacrificados em diferentes períodos após a injeção de BCG (1 a 6 dias; 1, 2, 4 e 8 semanas). A meningite se caracteriza por um infiltrado de linfócitos, células mononucleares e epiteliódes, hemossiderina, e aumento de vascularização. A meningite ocorreu na superfície pial, e na maioria das vezes houve comprometimento do córtex adjacente (encefalite). A extensão da meningite variou de moderada (Fig.6C) a intensa (Fig.4E, G e H; Fig.6D e E) em todos os animais, nos diferentes períodos após a inoculação do patógeno, sendo mais intensa em 4 e 8 semanas de sacrífício após a injeção de BCG (Fig.4G e H, Fig. 6D e E).

Tabela 5. Caracterização morfológica do modelo de neuro-TB experimental, induzida por BCG.

Sacrifício Camundongos	Meningite (n/N)	Tuberculomas (n/N)	Alterações corticais (n/N)	Alterações vasculares (n/N)
1 dia	5/5	0/5	5/5	5/5
2 dias	5/5	0/5	5/5	5/5
3 dias	5/5	0/5	5/5	5/5
4 dias	5/5	0/5	5/5	5/5
5 dias	5/5	0/5	5/5	5/5
6 dias	5/5	0/5	5/5	5/5
1 semana	5/5	1/5	5/5	5/5
2 semanas	5/5	0/5	5/5	5/5
4 semanas	5/5	3/5 - 5/9*	5/5	5/5
8 semanas	5/5	2/5	5/5	5/5

n: número de aimais onde detectamos as alterações estruturais.
N: número total de animais analisados.
*: 5/9, considerando 2 animais que apresentaram lesão com material amorfo parcialmente calcificado no colículo cerebral, isto é, fora das coordenadas estereotáxicas.

As lesões parenquimatosas encontradas em animais sacrificados até o sexto dia após a injeção foram caracterizadas pelo infiltrado de células sanguíneas (hemáceas e

células inflamatórias; Fig.4A, B e D) sem a organização típica dos granulomas (Fig.5A, B, D, E e H).

Observamos a formação de tuberculoma em um camundongo sacrificado 1 semana após a injeção intra-cerebelar de BCG (Fig.5A e B), dentre 5 animais analisados. Não observamos tuberculomas em animais sacrificados 2 semanas após injeção de BCG, num total de 5 animais. Em 3 camundongos, dentre 5 (ou 5, dentre 9 camundongos, considerando 2 animais em que observamos lesão com material amorfo parcialmente calcificado no colículo cerebral, *Tabela 5), sacrificados 4 semanas após a injeção de BCG, detectamos granulomas típicos (Fig.5D, E e H), contendo: macrófagos com citoplasma espumoso no interior, com focos de calcificação distrófica; circundados por camada de macrófagos epitelióides, e coroa de linfócitos; neo-capilares e gliose do parênquima adjacente. Em 2 animais, dentre 5 sacrificados 8 semanas após a injeção, verificamos extensa lesão parenquimatosa, caracterizada por grande afluxo de macrófagos (citoplasma espumoso) e linfócitos, focos de calcificação distróficos e presença de vasos no interior da lesão (Fig.6E e F). Nestas lesões observamos esboços de granulomas típicos, com células epitelióides ainda sem típica organização. Os tuberculomas BAARs foram mais característicos, e mais frequentes, na quarta semana após a injeção de BCG.

Observamos, também, alterações corticais e gliose (Fig.4A, B, D, E, G e H), além de aumento de perfis vasculares próximos à lesão (Fig.5A, B, D, E, G e H) e dentro do infiltrado inflamatório do espaço subaracnoideo (Fig.4E, G e H; Fig.6B, C, D e E), na maioria dos animais injetados com BCG (como descrito na literatura, Greenfield – Neuropathology; Tabela 5).

1.3. Caracterização anatômica dos animais utilizados como controle. Camundongos injetados intra-cerebelo com salina e camundongos naïve, sem nenhum tratamento. Observação por coloração Hematoxilina-eosina (HE).

Avaliamos a morfologia cerebelar de animais injetados com salina, e sacrificados nos mesmos períodos que os animais injetados com BCG (1 a 6 dias, 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção; (Fig.4C e F; Fig.5F e I) e animais naïve (Fig.6A), sem nenhum tratamento, utilizando coloração HE em secções de 8μm.

Quando comparamos animais injetados com salina aos injetados com BCG, observamos, que nos animais injetados com salina predominou a formação de gliose, desorganização da laminação cortical e aumento de vascularização (Fig.4C e F; Fig.5F e I). Observamos lesões nodulares, caracterizadas pela presença de agregados de macrófagos com citoplasma amplo e vacuolizado (padrão espumoso), localizadas na substância branca subcortical do sítio de injeção, com vasos no interior e periferia das lesões, e discreta proliferação de células da glia. Estas lesões nodulares foram observadas em um animal sacrificado 2 semanas e em outro sacrificado 4 semanas (Fig.5F e I) após a injeção de salina. Houve predomínio de monócitos provavelmente recrutados do sangue para eliminar tecido necrótico provocado pelo influxo de sangue no sítio de injeção de salina (Fig.5F e I). Em alguns animais pudemos observar o trajeto da agulha sem processo inflamatório (Fig.4C). Nos animais naïve observamos a citoarquitetura cerebelar do camundongo preservada (Fig.6A), como é observada em atlas de camundongo (PAXINOS e FRANKLIN, 1997).

2. Caracterização da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e confirmação do diagnóstico de neuro-TB.

A presença de BAARs foi detectada pela técnica Ziehl-Neelsen, 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG 10^4 cfu no cerebelo de camundongos, utilizando-se secções de 8µm adjacentes às utilizadas para a coloração HE. Observamos aglomerados de bacilos nas lesões meníngeas (meningite) e parenquimatosas (tuberculomas; Fig.5A e B). Analisamos secção de pulmão humano tuberculoso, corado pelo mesmo método, utilizando-a como controle positivo para a presença de BAARs (Fig.5C).

3. Caracterização da participação de diferentes populações gliais no modelo experimental de neuro-TB.

Para caracterizarmos o recrutamento glial no modelo de neuro-TB experimental, utilizamos *Ricinus communis*, uma lectina vegetal (RCA-biotinilado, VECTOR) largamente utilizada, para a detecção da micróglia ativada. A ativação glial foi avaliada, 1 a 6 dias; 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG 10^4 ou salina, em secções de 8µm adjacentes às utilizadas para a caracterização anatômica deste modelo experimental, com a coloração HE (Figs.7 e 8).

Observamos, por análise semi-quantitativa, células com afinidade por RCA, desde o primeiro dia, até a oitava semana de sacrifício dos animais após a injeção de BCG, **1)** no infiltrado inflamatório do espaço subaracnoideo (meningite), **2)** nos tuberculomas e **3)** no parênquima cerebelar circunvizinho (Figs.7 e 8). O espalhamento de células da micróglia e de astrócitos ligantes de RCA no parênquima cerebelar foi mais evidente à partir da segunda semana de sacrifício (Fig.8D). Ocorreu intensa marcação positiva para RCA nos tuberculomas (Fig.8B, E e G) e no infiltrado inflamatório meníngeo (Fig.8D, E, G e H).

Figura 7. Caracterização do decurso temporal do recrutamento glia reativa, neste modelo de TB no cerebelo murino, pela observação de células ligantes de RCA. Cerebelos de camundongos sacrificados: 1 (**A**), 2 (**C**), 3 (**D**, **I** e **L**), 4 (**E**), 5 (**H**) e 6 (**K**) dias, após injeção de BCG; 1 (**B**), 2 (**F**), 4 (**G**) e 5 (**J**) dias após injeção de salina. Cerebelo de camundongo naïve, sem nenhum tratamento: **M**. Vasos sanguíneos, por sua afinidade por RCA, foram subtraídos da análise. **A.** Poucas células ligantes de RCA no sítio de injeção de BCG. **B.** Poucas células ligantes de RCA no sítio de injeção de salina. **C.** Células ligantes de RCA, na lesão parenquimatosa contendo hemorragia, no sítio de injeção de BCG. **D.** Extenso recrutamento de células da micróglia e de astrócitos, no sítio de injeção de BCG. **E.** Recrutamento de células gliais, ligantes de RCA, próximo à fissura pré-culminata do cerebelo murino, injetado com BCG. **F.** Células ligantes de RCA, no sítio de injeção de salina. **G.** Células ligantes de RCA no sítio de injeção de salina. **H.** Células ligantes de RCA, no sítio de injeção de BCG. **I.** Células microgliais amebóides, ligantes de RCA, próximo à lesão parenquimatosa observada em **D**. **J.** Células ligantes de RCA no sítio de injeção de salina. **K.** Células ligantes de RCA no sítio de injeção de BCG. **L.** Astrócito ativado, ligante de RCA (seta), na camada molecular. Ausência de marcação neuronal de RCA (cabeças de setas). Interneurônios na MOL, células de Purkinje na PCL e células granulares na GL negativas para RCA (cabeças de setas). **M.** Vasos sanguíneos, ligantes de RCA, seccionados longitudinalmente (setas) e trasversalmente (cabeças de setas), na camada molecular do cerebelo de um camundongo naïve. Não observamos células da macro ou da micróglia ligantes de RCA.

Em camundongos injetados com salina observamos células ligantes de RCA mais restritas ao trajeto da agulha. Já em camundongos injetados com BCG observamos uma área maior, com células ligantes de RCA com aparência de células microgliais ativadas.

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular.

Escalas: em **I**, **L** e **M** 10µm; **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **J** e **K** 50µm.

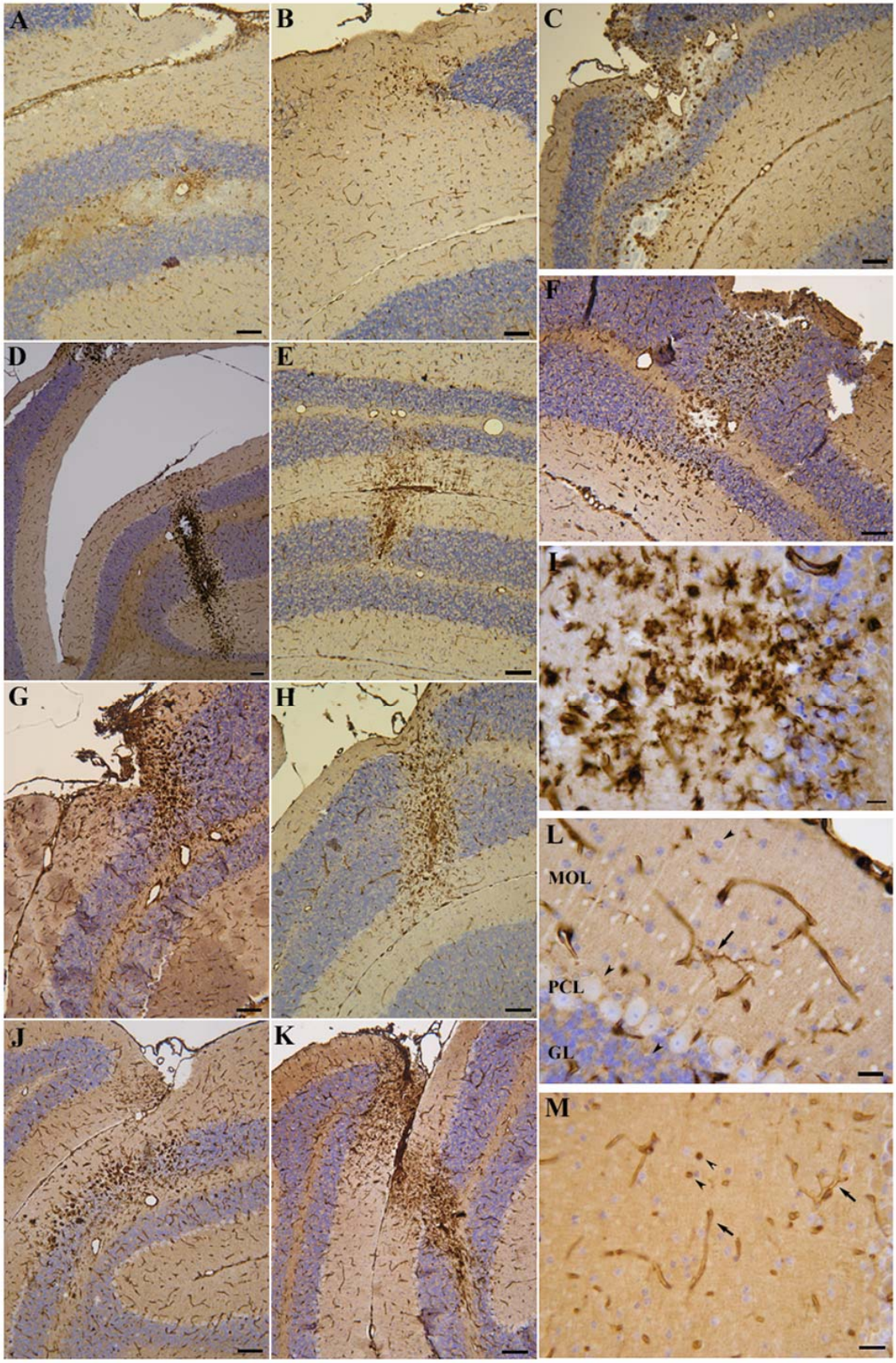

Figura 7

Figura 8. Caracterização temporal, do recrutamento da micróglia e de astrócitos ativados, no modelo experimental de TB no SNC, pela observação de células ligantes de RCA. Cerebelo de camundongo naïve (sem tratamento): **A**. Cerebelos de camundongos sacrificados: 1 (**B**), 2 (**D**), 4 (**E**) e 8 (**G** e **H**) semanas após injeção de BCG; 1 (**C**), 4 (**F**) e 8 (**I** e **J**) semanas após injeção de salina. **A.** Camundongo naïve. Observação do hemisfério cerebelar, correspondente ao sítio de injeção, nos grupos tratados com BCG ou salina. Podemos observar apenas vasos ligantes de RCA (cabeças de setas), sem células gliais marcadas. **B.** Tuberculoma (entre cabeças de setas) no sítio de injeção de BCG (seta), com células ligantes de RCA no seu interior e no parênquima circunvizinho.**C.** Recrutamento de células ligantes de RCA, no lóbulo à esquerda do lóbulo injetado com salina (ente cabeças de setas), formando gliose. Provavelmente, células inflamatórias foram recrutadas, devido ao extravasamento de sangue no sítio de injeção de salina. **D.** Infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo (meningite), com células ligantes de RCA no seu interior (entre cabeças de setas), com comprometimento do tecido cerebelar adjacente (encefalite). Extenso recrutamento micróglial no parênquima cerebelar. **E.** Podemos observar o início de um tuberculoma no sítio de injeção (seta) e meningite (entre cabeças de setas), com células ligantes de RCA. Estenso espalhamento de células microgliais reativas no parênquima cerebelar. **F.** Lesão nodular, caracterizada pela presença de agregados de macrófagos com citoplasma amplo e vacuolizado (padrão espumoso), localizada na substância branca subcortical do sítio de injeção de salina (entre cabeças de setas), com recrutamento de grandes células na substância branca, além de células gliais ativadas. **G.** Extensa lesão parenquimatosa (entre cabeças de setas), caracterizada por grande afluxo de macrófagos (citoplasma espumoso) e linfócitos, focos de calcificação distrófica (*), presença de vasos e células ligantes de RCA em seu interior.. Observamos esboços de granulomas típicos, com células epitelióides ainda sem típica organização. Meningite adjacente (seta). **H.** Extensa meningite com predominância de linfócitos (entre cabeças de setas) no sítio de injeção de BCG. Estenso recrutamento microglial no parênquima adjacente. **I.** Células ligantes de RCA restritas ao sítio de injeção de salina (cabeças de setas). **J.** Trajeto da injeção de salina (seta), sem recrutamento de células ligantes de RCA. **Escala:** 50µm.

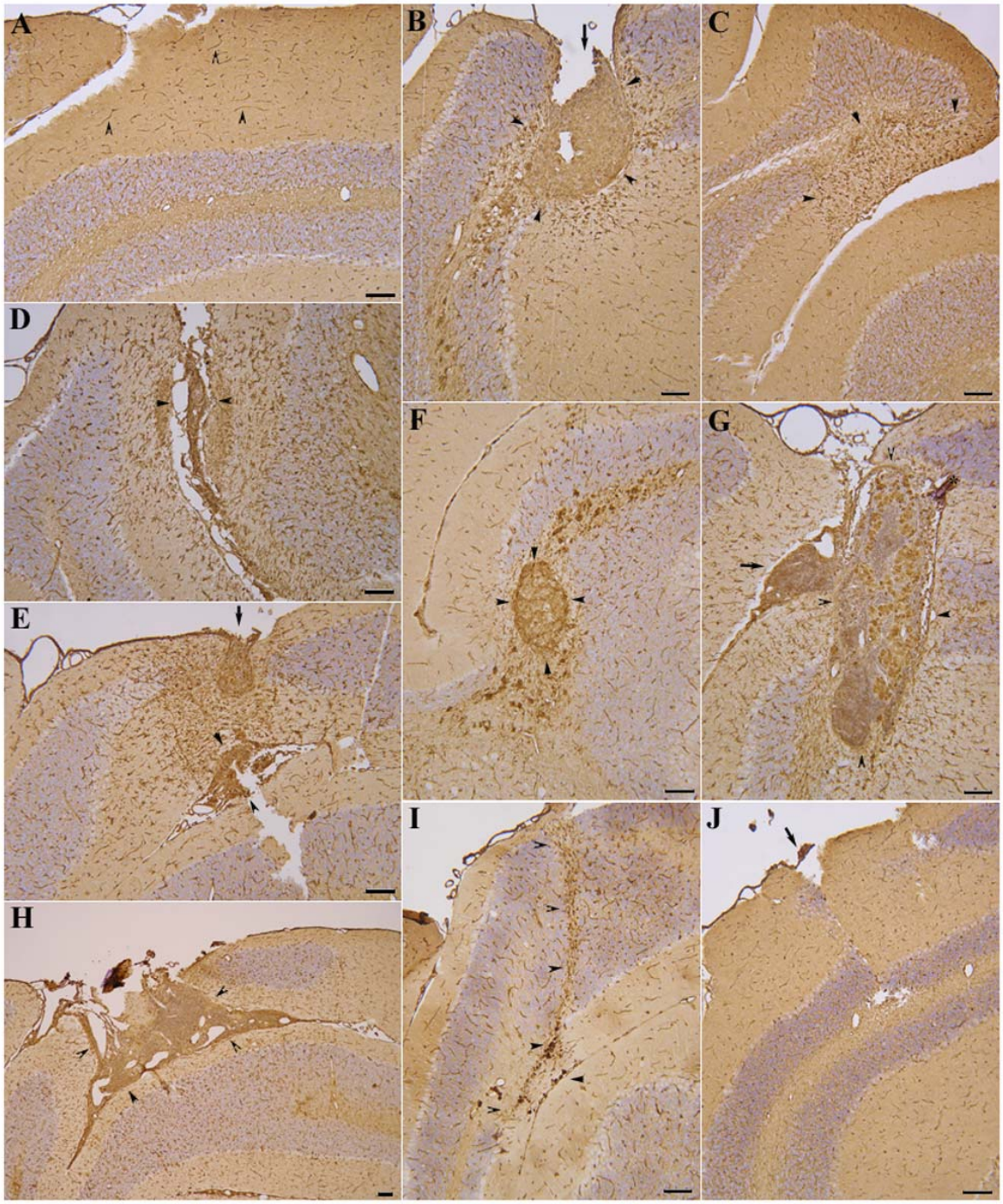

Figura 8

Não houve afinidade de neurônios à RCA (observável em todas as imagens das figuras 7 e 8, porém mais evidente na Fig.7L). Foi difícil individualizar as células com afinidade para RCA, devido ao aglomerado celular observado (Fig.7D). Observamos células da micróglia amebóides (Fig.7I); astrócitos (Fig.7L), dentre estes, astrócitos gemitocísticos, de origem fibrosa e protoplasmática; e processos das células em cesto ao redor das células de Purkinje, com afinidade para RCA; além de células inflamatórias, provavelmente recrutadas do sangue para conter a infecção, como: células granuloadiposas (monócitos), células gigantes de Langhans (fusão de vários monócitos formando uma grande célula multinucleada) e linfócitos.

Nos animais injetados com salina observamos células ligantes de RCA mais concentradas no trajeto da agulha, desde o primeiro dia até a oitava semana de sacrifício após a injeção (Fig.7B, F, G e J; Fig.8F e I). Detectamos poucas células ligantes de RCA espalhadas no parênquima, próximo ao sítio de injeção. Observamos a marcação de células inflamatórias no sítio de injeção, provavelmente devido ao extravasamento sanguíneo provocado pelo procedimento estereotáxico (Fig.7B, F, G e J; Fig.8F e I). Em um camundongo, sacrificado 1 semana após injeção de salina, observamos extensa gliose no lóbulo à esquerda do lóbulo injetado, com grande densidade de células ligantes de RCA, provavelmente células da macróglia formando cicatriz glial (gliose; Fig.8C). Em 1 animal sacrificado 4 semanas após a injeção de salina, observamos células microgliais e células inflamatórias (provavelmente macrófagos) reativas, em uma lesão nodular parenquimatosa e ao seu redor (Fig.8F). Em animais sacrificados 8 semanas após injeção de salina observamos gliose, com células ligantes de RCA no trajeto da agulha (Fig.8I), ou alterações corticais apenas, sem recrutamento de células ligantes de RCA (Fig.8J).

Animais injetados com salina apresentaram aumento de marcação positiva para RCA, mais restrita ao trajeto da agulha . E animais injetados com BCG apresentaram aumento de marcação de ligantes de RCA, em uma área mais extensa ao redor do sítio de injeção.

Houve recrutamento de células gliais em animais tratados com BCG ou salina. No entanto, animais tratados com BCG apresentaram maior número de células marcadas e em uma área mais extensa.

Nos animais naïve (sem tratamento) observamos marcação de vasos (Fig.7M; Fig.8A), núcleos do tronco encefálico e plexo coróide; marcação observada em todos os grupos experimentais. Vasos sanguíneos, assim como a micróglia tem afinidade conhecida para *R. communis* (MANNOJI *et al.*, 1986). Desta forma, ignoramos esta marcação, já que não foi este o objetivo do trabalho.

3.1. Contagem de células gliais com afinidade para RCA.

Para quantificar a ativação glial neste modelo experimental de neuro-TB utilizamos o Software QualiView (Atonus) para a contagem de células da micróglia e astrócitos ligantes de RCA no parênquima cerebelar próximo à lesão. A densidade de células ligantes de RCA, por área pré determinada (91860,51μm^2), foi maior nos animais injetados com BCG em relação aos injetados com salina, em todos os períodos observados (1 a 6 dias; 1, 2, 4 e 8 semanas). O aumento de células com afinidade para RCA está representado na Figura 9.

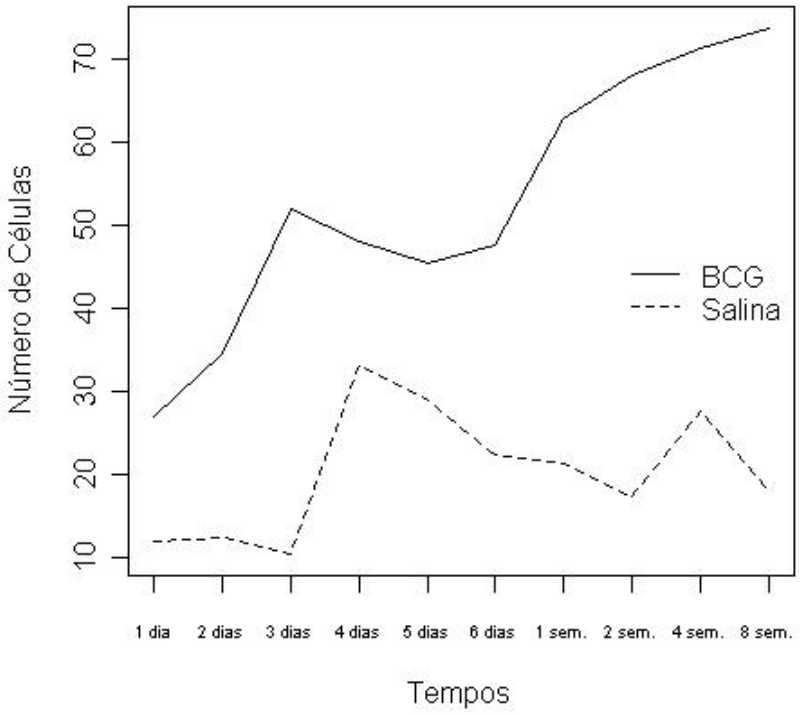

Figura 9. Número médio de células ligantes de RCA por área ao longo do tempo. Tratamentos: injeção intra-cerebelar de BCG ou salina. Área=91860,51μm^2. Tempos de sacrifício após a injeção: 1 a 6 dias; 1, 2, 4 e 8 semanas.

3.2. Análise estatística.

Ao nível de 0,05 (P<0,05) de significância, existem evidências de diferença entre as médias de células gliais ligantes de RCA, nos grupos BCG e salina, nos dias 3 e 6, e a partir da primeira semana (1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG ou salina). Nos dias 1, 2, 4 e 5 não houve evidências de diferença, ao nível de significância de 0,05, entre as médias do número de células gliais ligantes de RCA, nos grupos tratados com BCG ou injetados com salina, apesar do grupo BCG ter apresentado sempre maior número de células ligantes de RCA (Anexos I e II).

4. Caracterização da expressão imuno-histoquímica de NFκB e iNOS no modelo experimental de neuro-TB.

4. 1. Recuperação antigênica.

Utilizando tampão Tris-HCl 50mM pH 9,5, obtivemos maior imunorreatividade das secções. Desta forma, utilizamos este método de recuperação antigênica para caracterizar a expressão imuno-histoquímica de NFκB e iNOS no modelo experimental de neuro-TB. Sem o tratamento por microondas não houve recuperação da antigenicidade e a intensidade de marcação foi muito fraca. Utilizando tratamento por microondas em tampão citrato de sódio 10mM pH 6,0, a marcação foi mais intensa que nas secções não tratadas em microondas, mas ainda assim não foi satisfatória.

4.2. Expressão imuno-histoquímica de NFκB.

A imunorreatividade para NFκB foi detectada, 1 a 6 dias, 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG 10^4 cfu no cerebelo de camundongos, utilizando-se secções de 8μm adjacentes às utilizadas para a coloração HE e histoquímica para a detecção de ligantes de RCA.

Nos camundongos injetados com BCG, houve intensa imunorreatividade para NFκB: **1)** no infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo (meningite); **2)** nas lesões parenquimatosas (tuberculomas);. **3)** nos linfócitos, e outras células inflamatórias detectadas no hemisfério cerebelar injetado. Todos os tipos celulares cerebelares foram imuno-marcados no citoplasma, no entanto, com fraca marcação, exceto próximo às lesões onde houve intensa marcação nuclear e citoplasmática. Vasos aparecem imunorreativos, principalmente no interior das lesões, ou próximos a elas. Interneurônios e fibras da

camada molecular (MOL) aparecem imunorreativos com mais intensidade próximo às lesões. Na MOL, observamos marcação puntata das fibras em toda a extensão do cerebelo, nos três grupos analisados (1- camundongos injetados com BCG; 2- camundongos injetados com salina; 3- camundongos naïve, sem nenhum tratamento). Na camada de células de Purkinje (PCL), estas células apresentaram imuno-marcação citoplasmática e dendrítica diferencial (células com imunorreatividade positiva ou negativa); a glia de Bergmamm mostrou intensa imunorreatividade no corpo celular (citoplasma) e processos; além de intensa marcação puntata dos plexos ganglionares. A camada granular (GL) exibiu imunorreatividade em manchas ("patch"), com reatividade alternada de suas células, aparentemente no citoplasma. Observamos células da substância branca imunorreativas no citoplasma celular.

Nos primeiros dias de sacrifício após a injeção de BCG, observamos: **1)** células imunorreativas no núcleo e citoplasma, no infiltrado inflamatório do espaço subaracnoideo (Fig.10B e I); **2)** alterações vasculares no hemisfério injetado (Fig.10E), com comprometimento do parênquima adjacente (encefalite), comparado com o hemisfério contra-lateral, onde encontramos vascularização típica do cerebelo normal (Fig.10F); **3)** intensa marcação de todas as camadas cerebelares, no sítio de injeção: interneurônios e outras células esparsas próximas à lesão (MOL), células de Purkinje e plexos ganglionares (PCL), células granulares (GL), células da substância branca (WM; Fig.10G); **4)** intensa imunorreatividade das células de Purkinje, e células da glia de Bergmamm (Fig.10H e J); **5)** vasos sanguíneos intensamente imunorreativos (Fig.10K); **6)** marcação em manchas ("patch") na camada granular (Fig.10L), aparentemente apenas no citoplasma celular.

Figura 10. Expressão imuno-histoquímica de NFκB, neste modelo de TB no SNC de camundongos. Cerebelos de camundongos sacrificados: 1 (**B**, **E** e **F**), 2 (**G** e **H**), 3 (**I**), 4 (**J**), 5 (**K**) e 6 (**L**) dias após injeção de BCG; 1 dia após injeção de salina (**C**). Cerebelo de camundongo naïve (sem tratamento): **A** e **D**. **A.** Controle, com omissão do anticorpo primário. Nenhuma marcação foi observada. **B.** Infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo com vasos (cabeças de setas) e células (núcleos) imunorreativos (setas). **C.** Células imunorreativas na substância branca (seta) em animal injetado com salina. No entanto, não observamos resposta inflamatória no sítio de injeção. **D.** Imunorreatividade basal de NFκB em animal naïve. **E.** Aumento de vascularização, com aumento de imunorreatividade, em vasos do hemisfério cerebelar injetado com BCG, quando comparado com o hemisfério contra-lateral em **F** (setas em **E** e **F**). Podemos observar lesão parenquimatosa (**E**, cabeça de seta) no hemisfério injetado com BCG. **G.** Sítio de injeção com aumento de reatividade. **H.** Marcação aumentada próximo ao sítio de injeção, principalmente na camada de células de Purkinje (PCL) e fibras da camada molecular (MOL). **I.** Meningite, com aumento de imunorreatividade em suas células, algumas com núcleos imunorreativos (cabeças de setas indicam o limite com a MOL). **J.** Cone apical imunorreativo, de uma célula de Purkinje (seta), e de uma outra célula (possivelmente, uma célula da glia de Bergmamm – cabeça de seta), além de processos destas células na MOL. **K.** Vaso imunorreativo na substância branca, do hemisfério injetado com BCG. **L.** Podemos observar imunorreatividade em manchas ("patch") da camada granular.

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular; **WM,** substância branca.

Escalas: B, **H**, **I**, **J** e **K:** 10μm; **A**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G** e **L:** 50 μm.

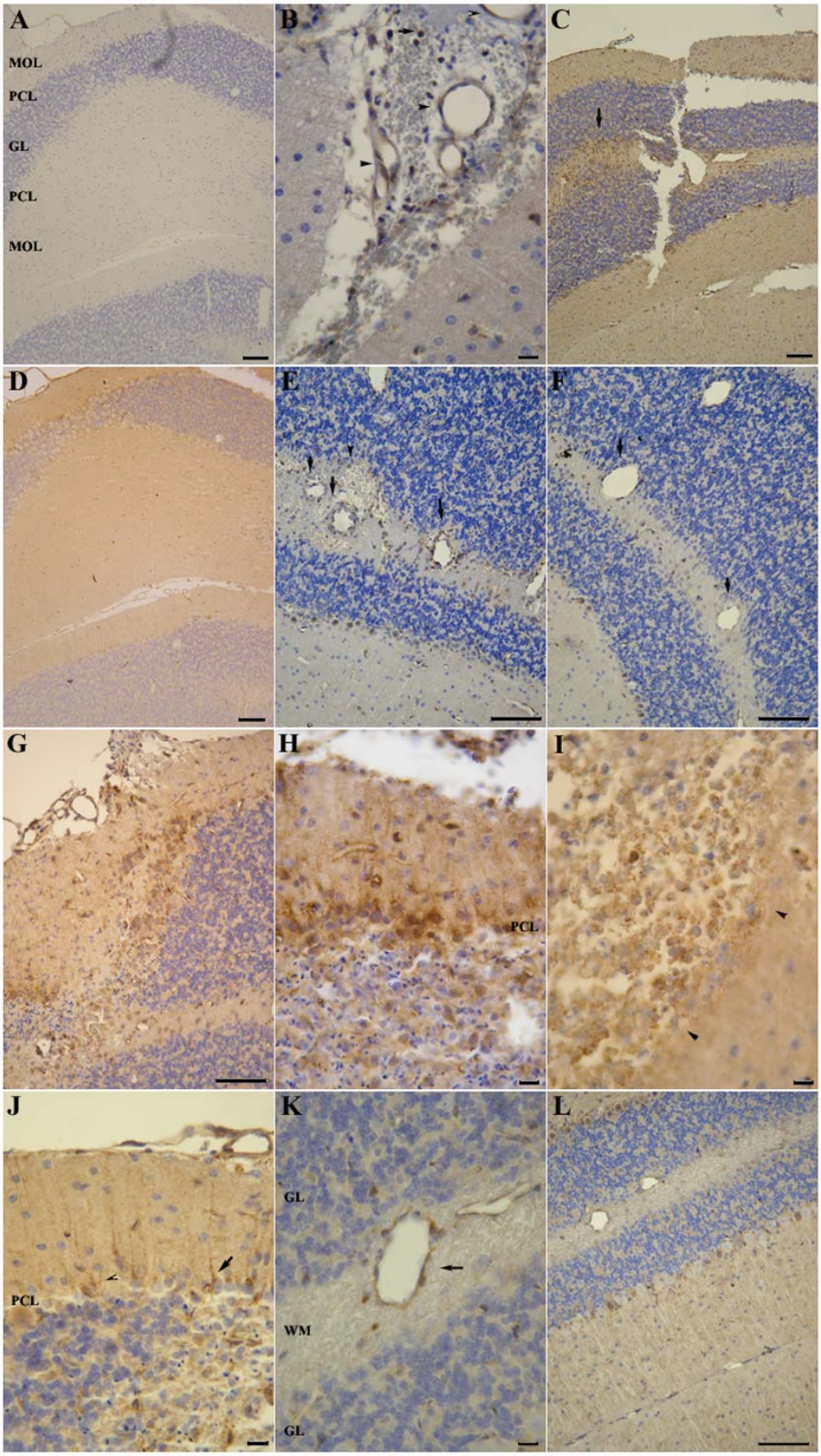

Figura 10

Em um camundongo, sacrificado 1 semana após a injeção de BCG, observamos um tuberculoma e infiltrado inflamatório meníngeo, no local da injeção, com células e vasos imunorreativos no núcleo e citoplasma (Fig.11A). Detectamos pequenos perfis vasculares imunorreativos na substância branca adjacente (Fig.11B). Houve marcação ao redor das células de Purkinje, provavelmente prolongamentos das células em cesto e células da glia de Bergmamm. Observamos, alguns vasos na substância branca com células perivasculares bem marcadas no núcleo e citoplasma, aparentemente linfócitos. Em camundongos sacrificados 2 semanas após a injeção de BCG, observamos fina camada de meningite intensamente imunorreativa, espalhada por todo o cerebelo (Fig.11C). Em camundongos sacrificados 4 semanas após a injeção, observamos extensa meningite com células intensamente imunorreatividade no núcleo e citoplasma (Fig.11G). Observamos tuberculomas, com células intensamente imunorreativas, no núcleo e citoplasma, em diferentes animais (Fig.11E e F). No trajeto da agulha, e parênquima adjacente, pudemos observar células imunorreativas. Em camundongos sacrificados 8 semanas após a injeção de BCG, observamos extensa meningite com células intensamente marcadas, no núcleo e citoplasma (Fig.11H). Assim como, células esparsas no parênquima adjacente intensamente marcadas, principalmente no núcleo. Observamos esboços de múltiplos granulomas com intensa imunorreatividade e destruição do parênquima cerebelar em dois animais (Fig.11J). No hemisfério injetado, pudemos observar células imunorreativas, no núcleo e citoplasma, na camada granular e substância branca (Fig.11K e L). Por análise semi-quantitativa, não observamos diferenças significantes na expressão de NFκB nos diferentes períodos analisados.

Figura 11. Expressão imuno-histoquímica de NFκB, neste modelo de neuro-TB experimental. Cerebelos de camundongos sacrificados: 1 (**A** e **B**), 2 (**C**), 4 (**E**, **F** e **G**) e 8 (**H**, **J**, **K** e **L**) semanas, após injeção de BCG; 1 (**D**) e 8 (**I**) semanas, após injeção de salina. **A, E, F e J.** Tuberculomas [ou esboços de múltiplos tuberculomas em **J** (entre cabeças de setas)] com intensa imunorreatividade de células (núcleo e citoplasma) e vasos. Meningite com intensa imunorreatividade de suas células, no núcleo e citoplasma (setas). **B.** Perfis vasculares, delgados (cabeças de setas) e mais espessos (setas), imunorreativos. **C, G e H.** Meningite com células imunorreativas no núcleo e citoplasma (entre cabeças de setas). **D.** Lesão parenquimatosa não linfocítica, observada em animal injetado com salina. Não houve aumento considerável da imunorreatividade. Aparentemente, as células com imunorreatividade aumentada, apresentaram marcação citoplasmática. **I.** Trajeto da agulha de injeção de salina (seta) sem aumento de imunorreatividade do tecido próximo. **K.** Células imunorreativas (entre cabeças de setas) abaixo de uma lesão tuberculosa (seta). **L.** Células da camada granular, imunorreativas no núcleo e citoplasma, no sítio de injeção (cabeças de setas).

Escalas: B e **L** 10µm; **A**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J** e **K** 50 µm.

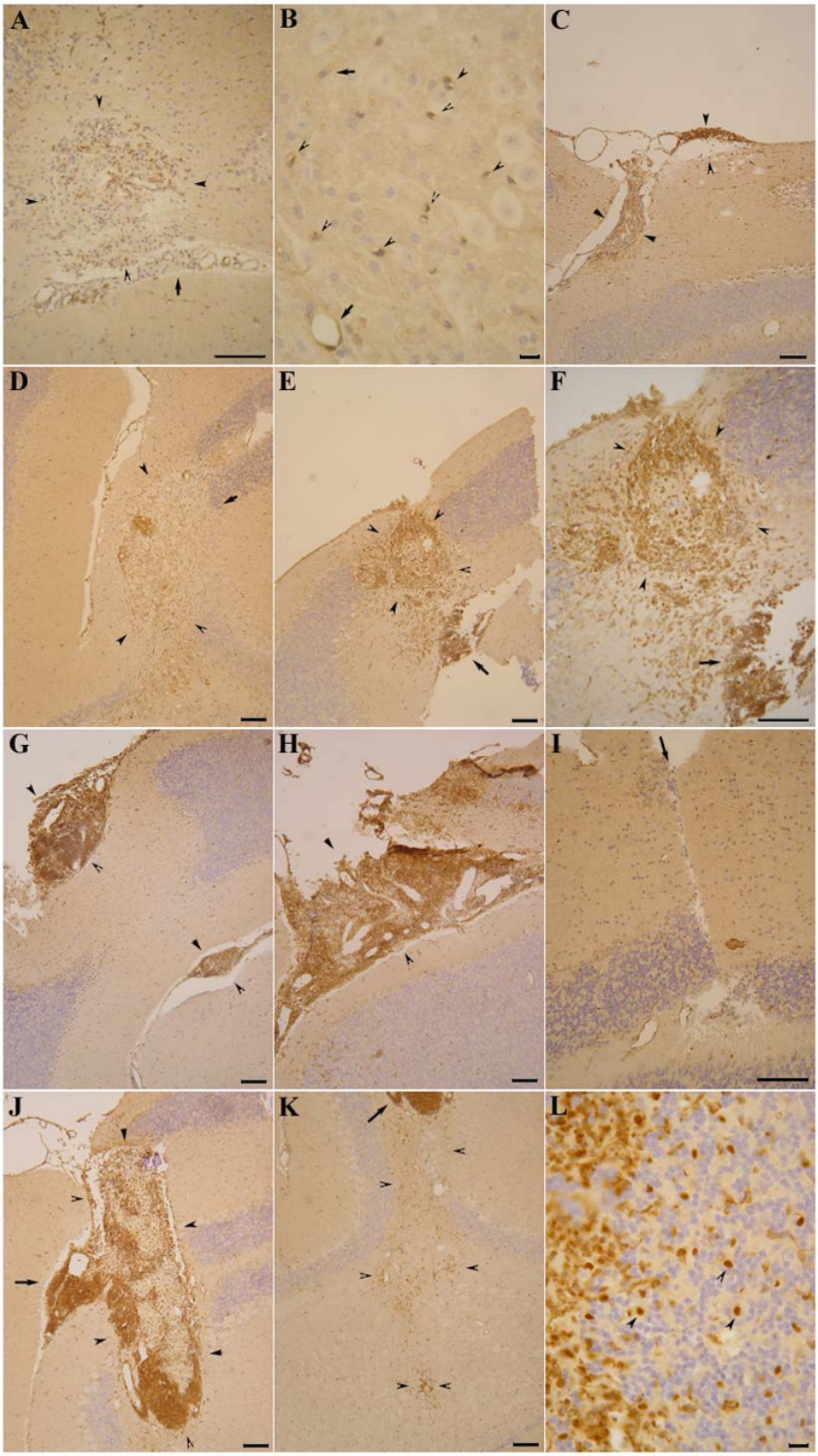

Figura 11

No grupo de camundongos tratados com injeção intracerebelar de salina, observamos: **1)** nos primeiros dias após a injeção de salina, observamos aumento de imunorreatividade no sítio de injeção, aparentemente maior no citoplasma, sem processo inflamatório evidente (Fig.10C); **2)** imunorreatividade moderada ao redor de lesões nodulares parenquimatosas, e ausência de marcação das células inflamatórias contidas nas lesões, em um camundongo sacrificado 1 semana (Fig.11D) e outro 4 semanas após a injeção de salina; **3)** alterações corticais em todos os períodos observados após a injeção de salina; **4)** aumento de imunorreatividade nos plexos ganglionares no local da injeção, em camundongos sacrificados 4 semanas após a injeção de salina; **5)** o trajeto da agulha foi visível, em um camundongo sacrificado 8 semanas após a injeção de salina, no entanto, não houve aumento de imunorreatividade (Fig.11I), exceto por uma marcação em grânulos na PCL próximo ao trajeto.

A maior parte dos camundongos injetados com salina não apresentou aumento de imunorreatividade, mostrando uma marcação basal próxima à do animal naïve. Animais naïve apresentaram imunorreatividade semelhante à observada nos locais distantes de lesões em animais injetados com BCG ou salina.

4.3. Expressão imuno-histoquímica de iNOS.

A imunorreatividade para iNOS foi detectada 1, 2, 4 e 8 semanas após a injeção de BCG 10^4 cfu no cerebelo de camundongos, utilizando-se secções de 8μm adjacentes às utilizadas para a coloração HE e histoquímica para a detecção de ligantes de RCA.

A imunorreatividade para iNOS foi intensa e restrita às lesões linfocíticas parenquimatosas (tuberculomas; Fig.12G) e do espaço subaracnoideo (meningite; Fig.12A, D e E) em animais injetados com BCG. Exceto por uma marcação diferencial,

aparentemente basal, observada por análise semi-quantitativa, de: **1)** núcleos de células de Purkinje (Fig.12J); **2)** núcleo celular de células dos núcleos cerebelares (Fig.12L); **3)** núcleo de células ganglionares da ponte; **4)** plexo coróide; e **5)** células ependimais. Esta marcação foi observada em animais injetados com BCG (Fig.12A, D, E, G, J, K e L) ou salina (Fig.12B, C, F e H) e em animais naïve (Fig.12I).

Observamos uma célula inflamatória (provavelmente um macrófago) intensamente imunorreativo para iNOS atravessando um vaso sanguíneo na camada granular do córtex cerebelar (Fig.12K).

Aparentemente, a imunorreatividade é mais extensa e intensa à partir da quarta semana após a injeção de BCG (Fig.12D e E). No entanto, a imunorreatividade foi observada à partir da primeira semana após a injeção (Fig.12A).

Nos animais injetados com salina observamos o trajeto da agulha (Fig.12B, F e H) e lesões nodulares parenquimatosas (Fig.12C), onde não houve imunorreatividade para iNOS.

Figura 12. Expressão imuno-histoquímica de iNOS, no modelo experimental de neuro-TB. A. Meningite iNOS imunorreativa no sítio de injeção de BCG (entre setas). **B.** Ausência de imunorreatividade para iNOS no sítio de injeção de salina (seta: trajeto aproximado da agulha). **C.** Lesão nodular, caracterizada pela presença de agregados de macrófagos com citoplasma amplo e vacuolizado (padrão espumoso), com ausência de marcação para iNOS (seta) em camundongo injetado com salina. **D e E.** Extensa meningite iNOS imunorreativa (entre setas), em camundongo injetado com BCG. **F.** Trajeto da agulha evidente (seta), com ausência de marcação para iNOS, em animal injetado com salina. **G.** Secção adjacente a extensa lesão tuberculosa induzida por BCG (observado por HE), mostrando lesão intensamente iNOS imunorreativa (entre setas). **H.** Alterações corticais com ausência de imunorreatividade (seta: trajeto da agulha de injeção de salina). **I.** Camundongo naïve (sem tratamento). Marcação basal para iNOS. **J.** Camada de células de Purkinje. Marcação basal para iNOS no núcleo das células de Purkinje, em camundongo injetado com BCG. **K.** Aparentemente, uma célula inflamatória iNOS imunorreativa (macrófago recrutado do sangue), atravessando um vaso sanguíneo (seta). Animal injetado com BCG **L.** Células ganglionares dos núcleos cerebelares iNOS imunorreativas no núcleo celular, em camundongo injetado com BCG.

Camundongos sacrificados: 1 semana após a injeção de BCG (**A**); 1 semana após a injeção de salina (**B**); 2 semanas após injeção de salina (**C**); 4 semanas após a injeção de BCG (**D**, **E**, **J** e **L**); 4 semanas após a injeção de salina (**F**); 8 semanas após a injeção de BCG (**G** e **K**); 8 semanas após injeção de salina (**H**).

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular.

Escalas: 50µm em **A**, **B**, **C**, **E**, **F**, **G**, **H** e **I**; 10µm em **D**, **J**, **K** e **L**.

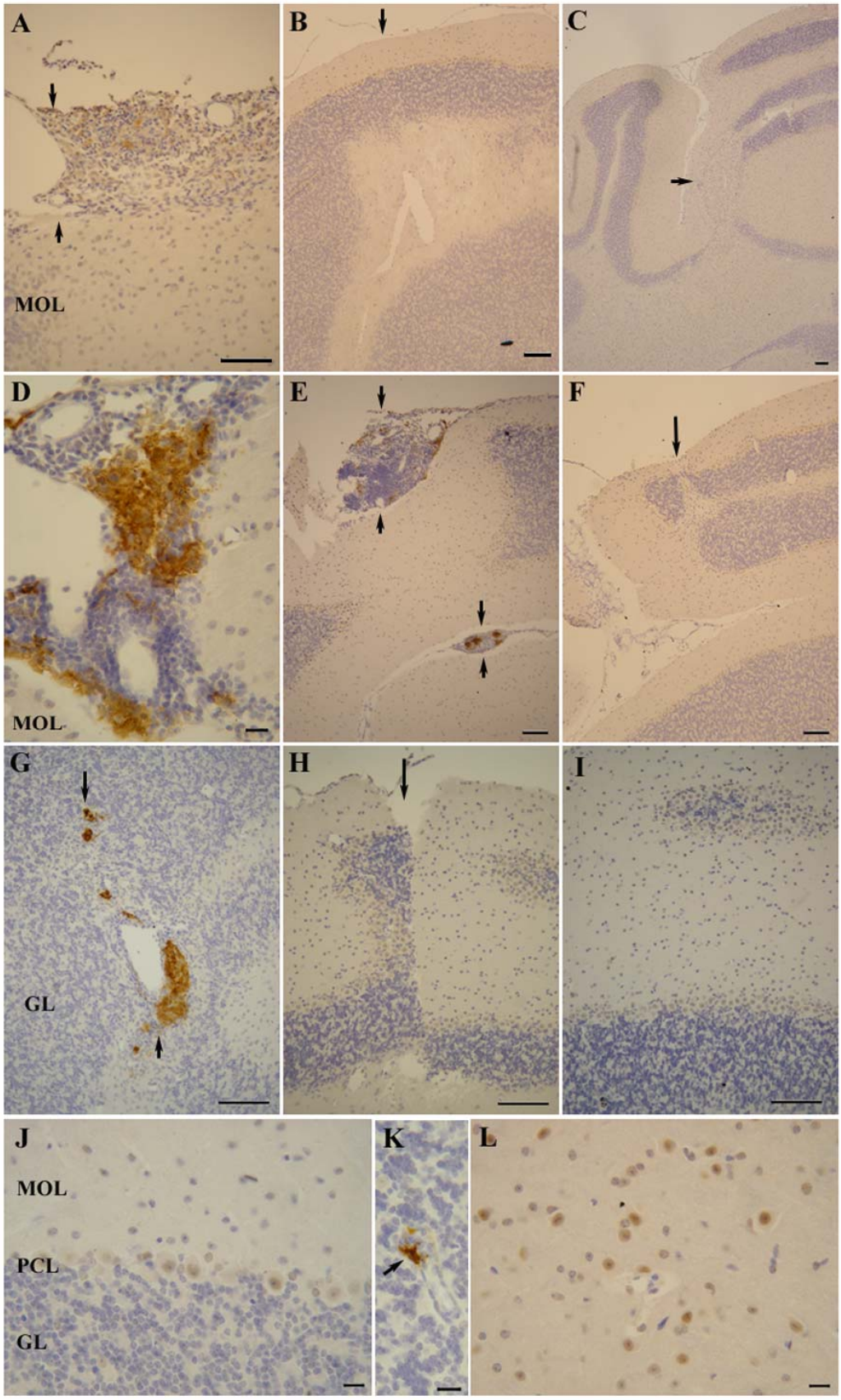

Figura 12

5. Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE-CAPES).

5.1. Caracterização morfológica de um modelo murino de neuroTB, com prévia imunização dos animais com a vacina DNA-hsp65.

5.1.1. Camundongos infectados intra-cerebelo com BCG, imunizados com DNA-hsp65, somente com o vetor plasmidial (DNA) ou injetados com salina.

Três de cinco camundongos vacinados com a vacina DNA-hsp65 e infectados com BCG 10^4 cfu apresentaram meningite linfocítica com a presença de bacilos. Caracterizamos meningite por um infiltrado de linfócitos e a presença de macrófagos com hemossiderina no espaço subaracnoideo; no parênquima adjacente foi observada astrocitose.

Os cinco animais não vacinados (administração de salina), e infectados com BCG não desenvolveram alterações significativas. Houve suspeita de lesão parenquimatosa em dois animais, mas artefatos técnicos impossibilitaram um diagnóstico preciso. Dois de quatro animais infectados com BCG e vacinados somente com o vetor (DNA) apresentaram meningite leve a moderada. Observamos aumento de perfis vasculares (capilares) e formação de gliose no parênquima adjacente, além de alterações da citoarquitetura cortical no sítio de injeção. Em um animal, artefatos no local da injeção impossibilitaram o diagnóstico exato.

5.1.2. Camundongos não infectados (injetados intra-cerebelo com salina), imunizados com DNA-hsp65, somente com o vetor plasmidial (DNA) ou injetados com salina.

Alguns animais não infectados, mas injetados com salina no cerebelo, desenvolveram lesões caracterizadas por perda de tecido cerebral (trauma) e presença de

macrófagos, alguns com hemossiderina. Onze animais foram injetados com salina no cerebelo. Dentre estes, três foram vacinados com DNA-hsp65, quatro injetados apenas com o vetor (DNA) e quatro com salina. Um animal não-vacinado (salina) desenvolveu uma lesão extensa no parênquima cerebelar. Os outros animais não-vacinados (salina), os injetados com o vetor e os só vacinados (sem a injeção intra-cerebelar de BCG), não apresentaram alterações exceto por um aparente aumento de vascularização no trajeto da agulha de injeção estereotáxica. Os dados estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6. Caracterização morfológica dos grupos experimentais.

Tratamentos	Total (n)	Meningite linfocítica (n)	Lesão não meningítica (n)
BCG + DNA-hsp65	5	3	-
BCG + DNA	4	2	-
BCG + salina	5	2	-
Salina + DNA-hsp65	3	-	1
Salina +DNA	4	-	-
Salina + Salina	4	-	-

5.2. Caracterização da presença de bacilos e confirmação do diagnóstico de neuro-TB, em animais imunizados

A presença de bacilos foi detectada pela técnica da Auramina em camundongos imunizados com DNA-hsp65 e injetados no cerebelo com BCG 10^4 cfu. Utilizamos secções de 4µm adjacentes às utilizadas para a coloração HE. Observamos, em microscópio de fluorescência, aglomerados de bacilos no infiltrado inflamatório e, em menor densidade, dispersos pelo parênquima cerebelar (dados não documentados).

5.3. Caracterização imuno-histoquímica da expressão de VEGF no modelo experimental de neuro-TB

As seguintes estruturas foram VEGF imunorreativas em animais injetados com BCG: **1)** lesões inflamatórias intra-parenquimatosas (Fig.13A; Fig.14A e B) e **2)** vasos adjacentes à lesão (Fig.13B); **3)** infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo (meningite; Fig.13A; Fig.14E e F) e do parênquima adjacente (encefalite); e **4)** alguns vasos esparsos no cerebelo (Fig.14H) e na ponte.

Os seguintes tipos celulares foram VEGF imunorreativos em animais injetados com BCG: **1)** células de Purkinje (Fig.13C e Fig.15A; principalmente o citoplasma, a base dos dendritos e o "hillock" – pinçô); **2)** células dos núcleos do cerebelo (citoplasma) (Fig.14C) e **3)** da ponte (Fig.13D; Fig.14C e D; e Fig.15F); **4)** interneurônios da MOL (Fig.13C e Fig.15A; citoplasma); **5)** células granulares da GL (Fig.15B; citoplasma); **6)** células da substância branca cerebelar (citoplasma); **7)** células endoteliais vasculares; **8)** células inflamatórias presentes nas lesões e na meningite (Fig.13A e B; Fig.14A, B e F); além de fibras **9)** da substância branca cerebelar (Fig.15A) e **10)** da ponte (Fig.13D e Fig.15F).

Por análise semi-quantitativa vimos que a expressão imuno-histoquímica de VEGF foi mais intensa próximo às lesões; nos animais vacinados com DNA-hsp65 esta expressão foi menos intensa do que a observada em animais não vacinados. Paradoxalmente, no mesmo animal não-vacinado, foi possível observar meningite sem imunorreatividade para VEGF (Fig.14G). Vasos próximos das lesões também apresentaram-se mais imunorreativos, com algumas exceções, pois observamos reação em vasos na ponte.

Nos animais imunizados com a vacina DNA-hsp65 não houve expressão imuno-histoquímica de VEGF nas lesões meningíticas (Fig.15C e D). A imunorreatividade como um todo foi menos intensa que em animais não vacinados (Tabela 7).

Figura 13. Expressão imuno-histoquímica de VEGF no modelo experimetal de neuroTB. A. Lesão tuberculosa intraparenquimatosa (seta), VEGF imunorreativa. Meningite VEGF imunorreativa (cabeça de seta). Aumento: 20X. **B.** Vaso marcado (seta) próximo à lesão mostrada em **A**. Vasos pequenos com imunorreatividade fraca ou ausente (cabeças de setas); 40X. **C.** Expressão diferencial de VEGF na camada de células de Purkinje. Células imunorreativas (setas) e células sem imunorreatividade (cabeças de setas); 60X. **D.** Neurônios da ponte; 60X.

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular; **P,** ponte.

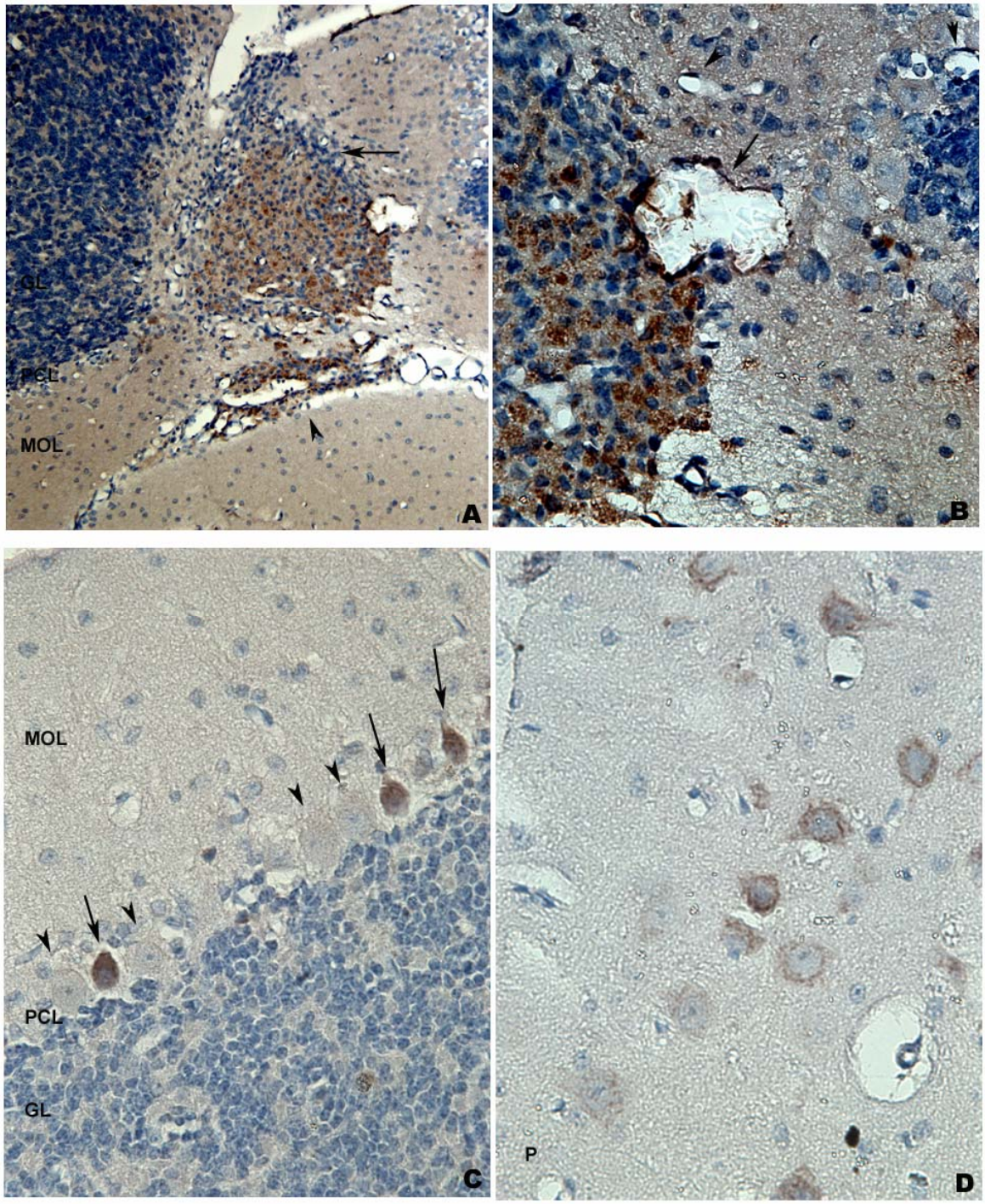

Figura 13

Figura 14. Expressão imuno-histoquímica de VEGF na TB cerebelar experimental. A. Lesão tuberculosa intraparenquimatosa imunorreativa (seta). Aumento: 10X. **B.** Mesma lesão mostrada em **A** (seta), em aumento maior: 60X. **C.** Neurônios VEGF imunorreativos nos núcleos cerebelares e na ponte respectivamente (setas); 10X. **D.** Neurônios VEGF imunorreativos da ponte (idem **C**, aumento maior: 60X). **E.** Meningite com células VEGF marcadas (setas). 10X. **F.** Meningite (idem **E**, aumento maior: 20X). **G,** Infiltrado linfocítico não imunorreativo em um vaso (seta); 40X. **H,** Vaso VEGF imunorreativo (seta); 40X.

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular; **WM,** substância branca; **M,** meningite; **CN,** núcleos cerebelares; **P,** ponte.

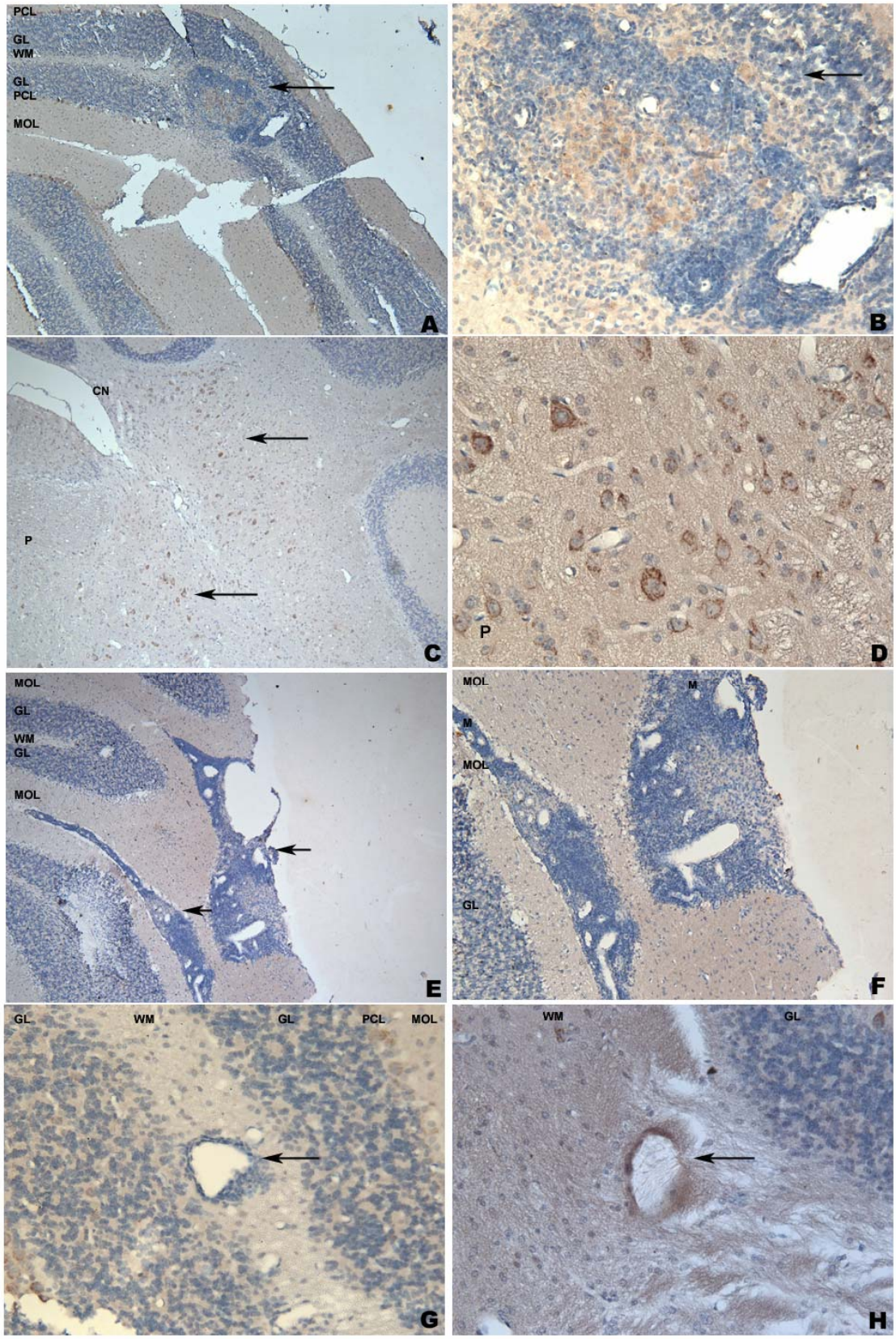
PCL
GL
WM
GL
PCL
MOL
A
B
CN
P
C
P
D
MOL
GL
WM
GL
MOL
E
MOL
M
M
MOL
GL
F
GL
WM
GL
PCL
MOL
G
WM
GL
H

Figura 14

Figura 15. Expressão imuno-histoquímica de VEGF na neuro-TB experimental, com imunização prévia dos camundongos com DNA-hsp65, uma nova vacina contra a TB. A. Córtex cerebelar. Expressão de VEGF mais evidente nas células de Purkinje, ausente na camada granular e fraca na camada molecular. Fibras imunorreativas na substância branca. Aumento: 20X. **B.** Aumento da imunorreatividade de VEGF na camada granular próxima do ponto de inserção da agulha de injeção de BCG (seta). 60X. **C.** Meningite linfocítica, sem imunorreatividade para VEGF entre dois lóbulos cerebelares (seta). 20X. **D.** Meningite (seta - idem **C**, aumento maior: 60X). **E.** Pequenos vasos (cabeças de setas) na camada molecular próxima à meningite mostrada em **C** e **D**; **F.** Neurônios VEGF imunorreativos na ponte.

Abreviaturas: MOL, camada molecular; **PCL,** camada de células de Purkinje; **GL,** camada granular; **WM,** substância branca; **P,** ponte.

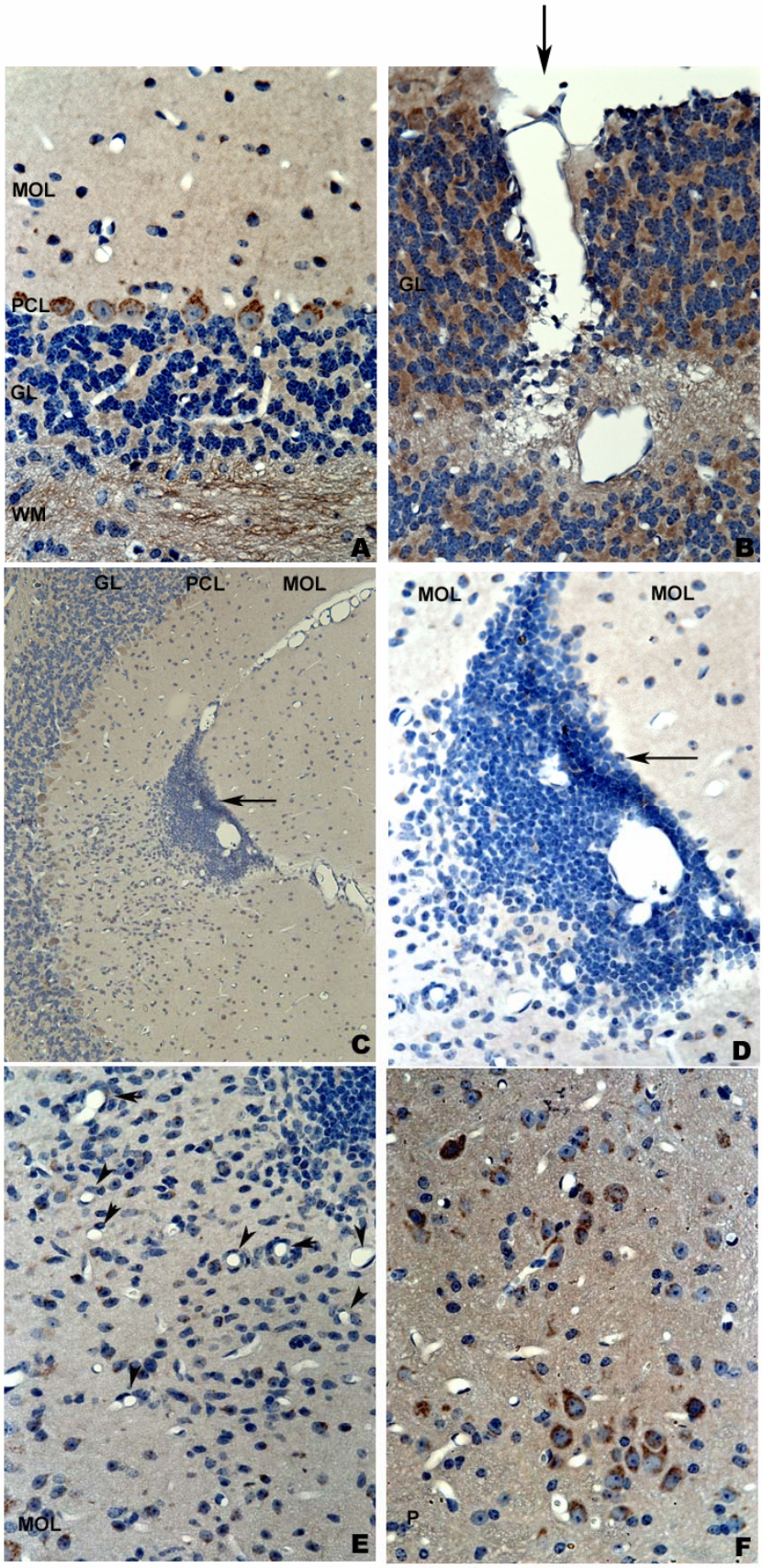

Figura 15

Tabela 7. Expressão de VEGF em animais vacinados e não-vacinados.

Tratamento	VEGF total	VEGF lesão
BCG	++	++
BCG + DNA-hsp65	+	-

- : ausência de imunorreatividade.
+ : pouca imunorreatividade.
++: moderada imunorreatividade.

6. Resumo dos resultados.

1. Estabelecimento de um modelo murino de neuro-TB:

1.1. Foi possível induzir neuro-TB em camundongos, por injeção intra-cerebelar de 10^4 cfu de BCG.

1.2. Obtivemos a formação de meningite e tuberculomas no cerebelo murino, com confirmação do diagnóstico de TB pela detecção de BAARs.

1.3. O pico de indução da TB foi em 4 semanas após a injeção de BCG, onde observamos a formação de meningite e tuberculomas em um número maior de camundongos.

2. Avaliação da ativação glial:

2.1. Neste modelo murino de neuro-TB houve o recrutamento de diferentes populações gliais. Este recrutamento foi observado pela afinidade de células, da microglia e de astrócitos, à lectina *Ricinus communis* (RCA).

2.2. Houve maior número de células gliais ligantes de RCA em animais injetados com BCG que em animais injetados com salina, em todos os períodos observados.

2.3. Ao nível de 0,05 ($P<0,05$) de significância, houve diferença entre as médias de células gliais ligantes de RCA, nos grupos BCG e salina, nos dias 3 e 6, e a partir da

primeira semana (1, 2, 4 e 8 semanas) de sacrifício dos animais, após o injeção intra-cerebelar.

3. Análise da expressão de fatores envolvidos na infecção e inflamação decorrentes da inoculação de BCG (NFκB e iNOS):

3.1. Neste modelo de TB cerebelar em camundongos, houve aumento de expressão e ativação de NFκB, nas lesões tuberculosas meníngeas e parenquimatosas.

3.2. A ativação de NFκB pode estar envolvida na expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória do hospedeiro. Já que NFκB participa, entre outras coisas, da cascata de sinalização da produção de: iNOS e VEGF.

3.3. Houve expressão de iNOS restrita às lesões tuberculosas (meníngeas e parenquimatosas) de animais injetados com BCG.

3.4. Esta isoforma da NOS é induzida sob estímulo, e deve estar sendo expressa nas lesões tuberculosas para conter o patógeno, diretamente pelo NO, ou indiretamente, via sinalização por NO.

3.5. Obtivemos amplificação da imunorreatividade de NFκB e iNOS, pelo método de recuperação antigênica, submetendo as secções histológicas à tampão Tris-HCl 50mM, em forno de microondas, por 20 minutos.

4. Estudo da expressão de VPF/VEGF em animais vacinados com DNA-hsp65:

4.1. Animais vacinados com a vacina DNA-hsp65 contra a TB, e posteriormente infectados intra-cerebelarmente com BCG, expressaram menos VPF/VEGF em suas lesões, do que animais não vacinados.

4.2. Aparentemente, a vacina preveniu a formação de tuberculomas no parênquima cerebelar.

DISCUSSÃO

No presente estudo desenvolvemos um modelo experimental de TB no SNC, com a indução da doença pela inoculação de BCG no cerebelo de camundongos C57BL6. O modelo foi caracterizado morfologicamente por HE e o diagnóstico de TB foi confirmado pela presença de BAARs, analisada por coloração Ziehl Neelsen. Adicionalmente, obtivemos importantes resultados que podem ajudar a elucidar mecanismos envolvidos na fisiopatologia da neuro-TB humana. Primeiro, verificamos que a indução de meningite e tuberculomas foi possível através da inoculação de 10^4 cfu de BCG, por estereotaxia. Segundo, que ocorre o recrutamento de diferentes populações gliais no sítio de injeção. Estas células foram caracterizadas por células microgliais amebóides e células reativas da macroglia (astrócitos). Terceiro, que ocorre aumento de produção e ativação de fatores envolvidos na resposta do hospedeiro ao patógeno. Observamos o aumento de expressão imuno-histoquímica de: 1) NFκB, 2) iNOS e 3) VEGF. Houve ativação de NFκB nas lesões tuberculosas, caracterizada pela translocação da molécula do citoplasma para o núcleo celular, observada por imuno-histoquímica.

Quando inoculamos 10^2 ou 10^3 cfu de BCG, não observamos a formação de tuberculomas, apenas meningite em alguns animais. Provavelmente, nestas concentrações, não houve quantidade suficiente de bacilos para provocar a resposta tecidual de isolamento do patógeno (a formação de tuberculomas) e a indução de meningite em todos os animais, como observado quando utilizamos 10^4 cfu de BCG.

Durante o decurso temporal da evolução de neuro-TB, observamos que o pico de indução da doença ocorreu quatro semanas após a injeção de BCG (Fig.4G; Fig.5D, E, G e H; Fig. 6D). Neste período observamos um número maior de camundongos com lesões tuberculosas parenquimatosas (tuberculomas) e extensas lesões meníngeas (infiltrado linfocítico do espaço subaracnoideo - meningite), embora tenhamos já observado

meningite na primeira semana (Fig. 4E; Fig.5A; Fig.6B) e tuberculomas após uma semana (Fig.5A e B).

Na neuro-TB, assim como em outras enfermidades do SNC, ocorrem complicações causadas pela reação inflamatória do tecido nervoso (GAO *et al.*, 2002). O principal componente inflamatório local é a ativação de células gliais, subsequente produção de citocinas inflamatórias e ativação de linfóciotos T.

As células da micróglia são consideradas os macrófagos residentes no SNC (BARRON, 1995). A ativação da micróglia está relacionada com diversas doenças neurodegenerativas, como: doença de Alzheimer, doença de Creutzfeld-Jacob, demência decorrente da aids, esclerose múltipla e neuro-TB (DASGUPTA *et al.*, 2003). Ativada, a micróglia produz e secreta uma variedade de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, incluindo IL-1β, IL-1α, TNFα e IL-6 (DASGUPTA *et al.*, 2003; LIU e HONG, 2002). Lipopolissacarídeos (LPS), presentes na parede celular de bactérias, são potentes indutores da ativação microglial, com grande relevância na resposta inflamatória presente na neuro-TB (KREUTZBERG, 1996).

Células microgliais estão distribuídas pelo SNC como uma rede de células imunocompetentes inativadas, derivadas de linhagem monocitária durante o desenvolvimento embrionário. Vários fatores endógenos e exógenos induzem a sua ativação e migração após lesão do tecido nervoso. Ativadas, as células microgliais adquirem aparência amebóide (ROCK *et al.*, 2004). Observamos células microgliais amebóides ligantes de RCA, no sítio de injeção de BCG (Fig. 7I), e em extensa área ao redor, no parênquima adjacente às lesões tuberculosas parenquimatosas (tuberculomas; Fig.8B, E e G) e aos infiltrados linfocíticos do espaço subaracnoideo (meningite; Fig.7A, E e K; Fig.8D, E, G e H). Observamos também astrócitos reativos ligantes de RCA (Fig. 7L).

Em camundongos injetados com salina, observamos micróglia e astrócitos ativados, restritos ao sítio de injeção (Fig.7B, F, G e J; Fig.8C, F, I e J). Este recrutamento glial, provavelmente deve-se à resposta inflamatória local, provocada pelo extravasamento de sangue no sítio de injeção de salina. Assim, micróglia e astrócitos foram recrutados, possivelmente, para reparo tecidual e eliminação de células necrosadas. Em camundongos naïve (sem tratamento algum) não observamos glia reativa (Fig.7M; Fig.8A).

R. communis (RCA; MANNOJI *et al.*, 1986), o marcador utilizado para identificar células gliais ativadas, tem afinidade por vasos sanguíneos, além de sua afinidade por células gliais ativadas. Desta forma, desconsideramos a marcação vascular (Fig.7M; Fig.8A) e focamos nossa atenção às células da micróglia e astrócitos ligantes de RCA. A contagem destas células ligantes de RCA foi feita utilizando o programa QualiView (Atonus). As médias destas células em camundongos injetados com BCG foram maiores que em camundongos injetados com salina, em todos os períodos observados (Fig.9; Anexo I). No entanto, houve evidência de diferença entre as médias, ao nível de significância de 0,05 ($P<0,05$), nos dias 3 e 6, e a partir da primeira semana (1, 2, 4 e 8 semanas) de sacrifício dos camundongos após a injeção de BCG ou salina (Anexo II).

Rock *et al.* (2005) infectaram com *M. tuberculosis* H37RV astrócitos e micróglia humanos. A expressão de citocinas e quimiocinas foi examinada com e sem tratamento com dexametasona. Células da micróglia foram as principais células infectadas pelo bacilo (76% da micróglia infectada, contra 15% de astrócitos infectados), com robustas quantias de várias citocinas e quimiocinas expressas. A infecção foi associada com a resposta da micróglia, no aumento de produção de citocinas e quimiocinas (TNF-α, IL-6, IL-1β, CCL2, CCL5 e CXCL10, de um modo dependente do tempo). Em contraste, os astrócitos produziram apenas moderadas quantias de uma única citocina (CXCL10). O tratamento

com dexametasona suprimiu fortemente a produção destes mediadores. Este fenômeno corrobora o conceito de que a micróglia tem um papel importante na neuropatogênese da TB, e de que a dexametasona pode operar via modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, por estes macrófagos cerebrais (ROCK *et al.*, 2005). Aqui, no presente estudo, obtivemos resultados compatíveis com Rock *et al.* (2005), já que observamos imunorreatividade aumentada de NFκB e iNOS (envolvidos na sinalização da produção de citocinas), e VEGF (citocina pró-angiogênica) coincidente com o recrutamento de diferentes populações gliais, observado por marcação com RCA.

A ativação de NFκB por citocinas ou stress oxidativo, requer a degradação de seu inibidor citoplasmático, IκB, ou a clivagem de p105 (MOORTHY e GHOSH, 2002). Dímeros de NFκB livres, translocam-se para o núcleo e regulam a expressão de vários genes que codificam citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, e algumas enzimas. A expressão gênica destes fatores tem um papel fundamental no desenvolvimento embriônico, na diferenciação linfóide, na apoptose, nas respostas imune e inflamatória, e no desenvolvimento do câncer (BLACKWELL e CHRISTMAN, 1997; SIEBENLIST, *et al.*, 1994; LESSARD *et al.*, 1994; HELBIG *et al.*, 2003). A ativação de NFκB também regula vários genes cruciais no processo angiogênico, como iNOS, cicloxigenase-2, IL-6, IL-8, ativador plasminogênico tipo uroquinase, e VEGF, o qual tem sítios ligantes de κB em suas regiões promotoras (SURH, *et al.*, 2002). A rifampicina, que é um dos principais antibióticos usados na terapia de TB-pulmonar, tem potencial de bloquear a ativação de NFκB por TNFα (PAHLEVAN *et al.*, 2002).

Observamos NFκB imunorreativo no núcleo e citoplasma de células contidas nas lesões tuberculosas [meníngeas (Fig.10B e I; Fig.11A, C, E, F, G, H, J, K e L), ou parenquimatosas (Fig.11A, E, F e J)], e no parênquima adjacente (Fig.11K e L). A

localização sub-celular de NFκB indica seu estado de ativação (localização nuclear) ou latência (localização citoplasmática). Além do aumento de expressão imuno-histoquímica de NFκB nas lesões tuberculosas, observamos NFκB imunorreativo: na camada molecular (MOL), na camada de células de Purkinje (PCL), na camada granular (GL) e na substância branca (WM). Na PCL, as células de Purkinje apresentaram imuno-marcação citoplasmática e dendrítica, a glia de Bergmamm mostrou intensa imunorreatividade no corpo celular e processos (Fig.10H e J), além de intensa marcação puntata dos plexos ganglionares. Este padrão de imunorreatividade dos plexos ganglionares também foi observado em cerebelo humano utilizando anti-PIN, anti-DIC e anti-nNOS (ZUCCHI, 2002; ZUCCHI *et al.*, 2003). A GL exibiu imunorreatividade em manchas ("patch"; Fig. 6L), marcação esta, típica nesta camada cerebelar para várias outras moléculas, como a nNOS, (ZUCCHI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002), PIN (ZUCCHI *et al.*, 2001-a e b) e DLC (ZUCCHI *et al.*, 2001-b), observados em cerebelos humanos. Na MOL e na WM observamos marcação puntata de fibras. Este padrão de marcação imuno-histoquímica foi observado nos três grupos experimentais (BCG, salina e naïve), em locais não lesionados, demonstrando a marcação basal de NFκB no cerebelo murino (Figs.10 e 11).

A resistência intracelular a patógenos, inclusive ao *M. tuberculosis*, parece estar associada a expressão de iNOS em macrófagos, sugerindo que o NO, direta ou indiretamente, tenha um papel antimicobacteriano na TB humana (MOMBAERTS *et al.*, 1993; LAROUX *et al.*, 2001). No entanto, o NO muitas vezes está também associado ao agravamento de processos inflamatórios e lesão celular (XIONG *et al.*, 1999).

O NO tem papel importante na comunicação intercelular, estimulando a síntese de mediadores inflamatórios, como as citocinas, e regulando sua própria produção endógena. A produção constitutiva de NO pela nNOS (NOS-1) pode inibir a atividade de NFκB e a

expressão de iNOS (NOS-II) em astrócitos (TOGASHI *et al.*, 1997), evidenciando assim, um sistema de regulação autócrino de células gliais (COLASANTI e PERSICHINI, 2000). Interessantemente, o glutamato também inibe a ligação de NFκB ao DNA em astrócitos (LIN e MURPHY, 1997). Ainda não foi determinado, se este efeito ocorre através de um aumento da síntese NO, derivado da nNOS ativada por glutamato, mas certamente, evidências suportam esta possibilidade (COLASANTI e PERSICHINI, 2000). Wang e Kuo (2001) observaram que em cultura de macrófagos obtidos do lavado pulmonar de pacientes tuberculosos há aumento da liberação de interleucina (IL)-1β e TNF-α, sendo este aumento bloqueado pela presença do inibidor da NOS no meio de cultura. Estas citocinas por sua vez também podem induzir a atividade do NFκB e a expressão da iNOS. Enquanto que a produção do NO frequentemente acompanha processos inflamatórios, não está claro se o NO promove, inibe ou tem ambos efeitos sobre a evolução destes processos. A participação do NO na atividade do sistema imunológico durante a TB e sua potencial atividade anti-microbiana e neurotóxica tornam importante o estudo do envolvimento deste mediador na progressão ou modulação desta patologia (WANG e KUO, 2001).

Neste modelo experimental de neuro-TB, observamos intensa imunorreatividade para iNOS, restrita às lesões linfocíticas do espaço subaracnoideo (meningite; Fig.12A, D e E) e lesões tuberculosas intra-parenquimatosas (tuberculomas; Fig.12G) de camundongos injetados com BCG em todos os períodos analisados. Em lesões nodulares, encontradas em camundongos injetados com salina (Fig.12C) não houve reatividade para iNOS. Observamos uma célula inflamatória (provavelmente um macrófago) intensamente iNOS imunorreativa, atravessando um vaso sanguíneo na camada granular do córtex cerebelar (Fig.12K).

Observamos fraca imunorreatividade para iNOS, aparentemente caracterizando uma marcação constitutiva, em: 1) núcleos de células de Purkinje (Fig.12J), 2) núcleos de células dos núcleos cerebelares (Fig.12L), 3) núcleos de células ganglionares da ponte, 4) plexo coróide, 5) células ependimarias. Esta marcação foi observada em animais injetados com BCG (Fig.12A, D, E, G, J, K e L) ou salina (Fig.12B, C, F e H) e em animais naïve (Fig.12I). Shin *et al.* (2000) analisaram a expressão imuno-histoquímica de iNOS em cabras com listeriose natural, e utilizaram cabras normais como controle. Estes autores sugeriram que iNOS pode ser expressa constitutivamente no cérebro de cabras normais, já que observaram algumas células neuronais e gliais iNOS imunorreativas. Estas observações coincidem com nossos achados, pois observamos algumas células com imunorreatividade para iNOS em camundongos naïve, camundongos injetados com salina, e em sítios distantes da injecão, em camundongos BCG-tratados.

Camundongos geneticamente modificados, nocauteados para iNOS ($iNOS^{-/-}$) têm um alto risco de disseminação e mortalidade por infecção intravenosa de TB (McMICKING *et al.*, 1997). *In vitro*, o NO tem um papel essencial na morte ou como um agente limitante do crescimento de *M. tuberculosis* em fagócitos mononucleares de camundongos (FANG, 1999). O NO pode matar o bacilo da TB *in vitro* com uma potência molar comparável a da quimioterapia.

A exposição ao NO em baixas concentrações é capaz de eliminar mais de 99% de *M. tuberculosis* em cultura (LONG *et al.*, 1999). NO e outros RNI podem modificar o DNA bacteriano, proteínas, e lipídios da superfície microbiano. Outro potencial mecanismo de morte do *M. tuberculosis* pelo NO inclui a interação com alvos acessórios de proteínas, como grupos de metais sulfurosos, grupos heme, tióis, resíduos aromáticos ou fenólicos, radicais tirosil, e aminas, resultando em inativação enzimática ou outras mal-

funções protéicas. Peroxinitrito ($ONOO^-$) também pode mediar a nitrosilação de resíduos de tirosina, podendo assim interromper caminhos de sinalização dependentes da fosforilação da tirosina. A apoptose de macrófagos infectados por *M. tuberculosis,* induzida pelo NO, é considerada outra maneira de eliminar o microrganismo (CHAN *et al.*, 2001). O NO parece ser essencial na formação do granuloma em modelos animais. Choi *et al.* (2002) analisaram a expressão imuno-histoquímica da nitrotirosina e das isoformas da NOS em TB pulmonar humana e verificaram que as NOS e o NO estão presentes em áreas especializadas de granulomas tuberculosos. Entretanto, o papel preciso do NO na TB ainda não foi claramente definido.

Xiong *et al.* (1999) observaram que animais *knockouts* para a iNOS apresentam menor grau de inflamação alérgica nas vias respiratórias, indicando participação da iNOS na exacerbação deste processo inflamatório. Em contraste, Ferreira *et al.* (2002) detectaram maior número de eosinófilos iNOS-positivos em indivíduos normais que em pacientes com rinite alérgica. Além disso, a inibição da iNOS pode aumentar a lesão em certas condições inflamatórias, indicando que o NO derivado da atividade da iNOS pode também exercer papel protetor (LAROUX *et al.*, 2001). A presença de agentes infecciosos ativa o sistema de defesa do organismo que visa conter a disseminação do patógeno e minimizar a lesão tecidual. Evidências recentes, indicam que o aumento de expressão de NFκB e iNOS são os componentes fundamentais da cascata angiogênica, os quais contribuem para a angiogênese através da regulação de VEGF em muitos tumores (ZHANG *et al.*, 2005).

O VPF/VEGF (fator de permeabilidade vascular/fator de crescimento vascular endotelial) é um potente fator de permeabilidade vascular e mediador do edema cerebral. A resposta inflamatória do hospedeiro é um importante fator tanto na patogênese como na deterioração clínica observada em complicações neurológicas originadas por diversas

afecções (FLIER *et al.*, 2004). Matsuyama *et al.* (2001) detectaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF em células inflamatórias mononucleares no tecido conjuntivo do espaço subaracnoideo de casos de necrópsia de TBM, além de níveis aumentados de VEGF no LCR de 28 pacientes com TBM ativa; estes níveis foram reduzidos após a terapia com corticosteróides. Foi sugerido que a expressão aumentada de VEGF pode estar associada com a patogênese da TBM. O tratamento com corticosteróides reduz o edema cerebral vasogênico pela ação antagonista do corticosteréoide ao VEGF. Em outro trabalho detectou-se a produção aumentada de VEGF no LCR de crianças com TBM, que também foi contida por terapia com corticosteróides. Foi demonstrado que: células inflamatórias secretam VEGF durante a TBM; VEGF presente no LCR está associado com os efeitos secundários da TBM; e a inibição de VEGF pode explicar parte do efeito clínico da terapia adjuvante com corticosteróides na TBM (FLIER *et al.*, 2004). Níveis aumentados de VEGF foram detectados também no soro de pacientes com TB pulmonar (ALATAS *et al.*, 2004; MATSUYAMA *et al.*, 2000).

Em nosso modelo experimental de neuro-TB observamos expressão imuno-histoquímica aumentada de VEGF em lesões do parênquima cerebelar [tuberculomas (Fig.13A; Fig.14A e B)] e no infiltrado inflamatório do espaço subaracnoideo [meningite (Fig.13A; Fig.14E e F)]; além disto, observamos expressão imuno-histoquímica de VEGF na parede de vasos sanguíneos [(Fig.13B; Fig.14B), expressão coincidente de NFκB, discutida anteriormente] e no citoplasma de vários tipos celulares do cerebelo e da ponte. Observamos também que o VEGF está ausente nas lesões meníngeas de animais imunizados com a vacina DNA-hsp65 (Fig.15C e D); entretanto houve marcação para os mesmos tipos celulares que em animais não imunizados. Como observamos imunorreatividade reduzida em animais imunizados com a vacina DNA-hsp65, pode ser

que a contenção de antígenos micobacterianos, decorrente da imunização possa estar associada com a diminuição da expressão de VEGF. Talvez a vacina DNA-hsp65 esteja atuando de forma protetora antagonizando a produção de VEGF.

A produção de VEGF é contida pela inibição da translocação nuclear de NFκB, um importante fator de transcrição, que regula a expressão de vários genes envolvidos na resposta inflamatória, inclusive a expressão de VEGF (DEEPAK e SALIMATH, 2006). Deepak e Salimath (2006) identificaram uma nova glicoproteína de *Urginea indica* com potente ação anti-tumoral, via inibição angiogênica e ação pró-apoptótica. Foi demonstrado que esta atividade anti-angiogênica de *U. indica* é devida à inibição da translocação nuclear de NFκB resultando na diminuição da expressão de VEGF. Em nosso modelo experimental, observamos a expressão imuno-histoquímica aumentada de NFκB, coincidente com a expressão aumentada de VEGF (dados discutidos anteriormente), sugerindo que NFκB esteja modulando a expressão gênica de VEGF.

Matsuyama *et al.* (2001) observaram reação imuno-histoquímica positiva para VEGF em células inflamatórias mononucleares, na reação fibrosa do espaço subaracnoideo e ao redor de vasculite em cérebros de autópsias de pacientes com TBM. Coincidentemente, em nosso trabalho, infiltrados inflamatórios do espaço subaracnoideo expressaram VEGF. Esta expressão é co-localizada com a expressão aumentada de NFκB em nosso modelo.

A densidade de microvasos tem correlação significante com a expressão de NFκB, iNOS e VEGF em "adenoid cystic carcinoma" (ACC) de glândulas salivares humanas (ZHANG *et al.*, 2005). Aqui, neste modelo murino de neuro-TB, observamos aumento de perfis vasculares próximo às lesões onde houve aumento de imunorreatividade para NFκB e VEGF.

No presente estudo, comparamos a expressão de NFκB, iNOS e VEGF no cerebelo de camundongos injetados com BCG, ou salina, e de camundongos naïve (sem tratamento algum). Encontramos na literatura apenas um trabalho correlacionando estas três moléculas, em ACC de glândulas salivares humanas (ZHANG *et al.*, 2005). Estes autores relataram o mesmo perfil de expressão destas moléculas, caracterizado neste modelo experimental: **1)** localização nuclear de NFκB nas células ACCs (encontramos marcação celular nuclear, em lesões de camundongos injetados com BCG), **2)** aumento de expressão de iNOS e VEGF em células ACCs, quando comparadas com células de glândulas salivares de pacientes normais (encontramos aumento de expressão de iNOS e VEGF em lesões tuberculosas de camundongos injetados com BCG, quando comparados com camundongos injetados com salina e camundongos naïve), **3)** significante aumento na densidade de microvasos (fizemos a mesma observação, no parênquima cerebelar adjacente às lesões). Segundo Zhang *et al.* (2005) estas moléculas podem contribuir para a angiogênese tumoral. E segundo nossos dados, NFκB, iNOS e VEGF são fatores importantes e correlacinados, envolvidos não apenas na angiogênese tumoral, mas também na angiogênese associada à neuro-TB. Além disso, estes fatores podem estar contribuindo para a progressão da TB de SNC, para a contenção do patógeno e ocasionando danos teciduais, desempenhando assim, papéis antagônicos, não só na TB, como em outras enfermidades que acometem diferentes órgãos.

Stifter (2006) hipotetizou que NFκB ativado poderia ser a molécula chave para a indução de angiogênese por mielomas. Desde que os inibidores de angiogênese são heterogêneos em origem e potência, e a progressão da angiogênese inclui muitos fatores com funções diferentes, isto facilita a determinação de uma molécula-chave produzida por "plasma cells" transformadas, as quais estimulam o microambiente da medula óssea, para

produzir e secretar diferentes citocinas como VEGF, IL-6 e MCP-1 (quimioquina pró-angiogênica). Esta molécula poderia ser NFκB. Confirmou-se que células de mieloma expressam NFκB, pois com seu bloqueio a produção de MCP-1 é reduzida em 60%. Com isso, a produção de VEGF e IL-6 também deve ser reduzida, já que MCP-1 regula a produção destas moléculas. Sendo assim, existem fortes evidências de que NFκB seja realmente esta molécula-chave, modulando todos estes eventos, e corroborando a hipótese de Stifter (2006).

Além disso, células microgliais são alvo de VEGF, que induz a sua migração e proliferação (FORSTREUTER *et al.*, 2002). Observamos o recrutamento de células microgliais ativadas, por marcação com RCA-120, nos mesmos locais onde observamos a expressão imuno-histoquímica aumentada de VEGF, NFκB e iNOS. Assim, o VEGF não apenas contribui para a angiogênese na lesão cerebral, como também para a ativação microglial (FORSTREUTER *et al.*, 2002).

No estágio PDEE, desenvolvido no Canadá, utilizamos um grupo experimental previamente tratado no Brasil (FMRP-USP) com a vacina DNA-hsp65 contra a TB. Este grupo experimental foi sub-dividido em grupos, como descrito em Materiais e Métodos (Tabela 4). Dentre estes animais, não obtivemos uma caracterização morfológica satisfatória do grupo controle, não imunizado, e infectado no cerebelo com BCG. Uma resposta para a ausência de lesões indicativas da neuroinfecção, em animais não vacinados e injetados com BCG no cerebelo, seria a inviabilidade da amostra de BCG utilizada. No entanto, observamos intensa fluorescência para os bacilos, pelo método da Auramina, no infiltrado inflamatório do espaço subaracnoideo (meningite), e em menor densidade, em sítios distantes da injeção, em camundongos vacinados. Provavelmente, devido a problemas metodológicos, não observamos a indução de meningite e tuberculomas nos

animais não vacinados. Sendo assim, comparamos a expressão imuno-histoquímica de VEGF entre animais imunizados (pVAX-hsp65, ou apenas pVAX) e apenas injetados com BCG no cerebelo, utilizados para o estabelecimento do modelo experimental de neuro-TB. A comparação entre indivíduos de grupos experimentais diferentes foi possível, já que cada camundongo é uma amostragem independente dos demais. Após o procedimento estereotáxico de injeção de BCG ou salina, os animais terão uma evolução particular e dependente apenas do tempo de sacrifício após o procedimento estereotáxico. O tempo de sacrifício para esta fase do estudo foi de quatro semanas após a injeção de BCG no cerebelo. Este período foi determinado de acordo com o pico de indução da doença (formação de meningite e granulomas) observado durante a evolução da neuro-TB e caracterizado neste modelo experimental.

Outra possibilidade para a ausência de lesões seria a resistência individual de camundongos ao patógeno. Pouco se sabe quanto à resistência individual do camundongo ao *M. tuberculosis.* A correlação genética e imunológica da progressão da TB não está bem estabelecida no homem. Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de modelos murinos para elucidar mecanismos imunes protetores, essenciais para o controle da infecção pelo *M. tuberculosis*. Em experimentos de sobrevivência ao *M. tuberculosis* com diferentes linhagens de camundongos, duas linhagens foram identificadas como mais resistentes ao bacilo, C57BL6 e BALB/c, respectivamente. Além disso, estes animais não apresentaram sinais de reativação da infecção (BEAMER e TURNER, 2005). C57BL6 foi a linhagem utilizada em nossos estudos, o que talvez possa explicar o fato de animais não vacinados não terem desenvolvido a doença. Estes mecanismos, esclarecidos em conjunto, poderão ser aplicáveis em estudos com seres humanos e poderiam ajudar na detecção

precoce de indivíduos vulneráveis à reativação da TB (BEAMER e TURNER, 2005), bem como auxiliar na compreensão da fisiopatogênese da doença.

Em resumo, no estágio PDEE-CAPES, desenvolvido no Canadá, observamos expressão reduzida de VEGF em camundongos imunizados previamente com a vacina DNA-hsp65 contra a TB. Além disso, não observamos a formação de tuberculomas, apenas meningite com reduzida expressão de VEGF, nos animais imunizados.

Incertezas e dúvidas dominam todos os aspectos da TBM. A variabilidade da história natural da doença acompanhada pelas característica clínicas dificultam o diagnóstico. A baixa sensibilidade do método de Ziehl Neelsen e o tempo prolongado de espera dos resultados de testes de cultura, dificultam o diagnóstico. Novos diagnósticos mais rápidos não foram completamente avaliados, além disso, não são adequados para países em desenvolvimento. A duração da quimioterapia para TBM não está bem definida (3 drogas administradas por 9 meses no Brasil, e 4 drogas administradas por 12 meses na Inglaterra) e o benefício do uso de adjuvantes corticosteróides permanece controverso. A única infeliz certeza é a consequência fatal do atraso no diagnóstico e tratamento da TBM (THWAITES *et al.*, 2000; THWAITES e HIEN, 2005). O desenvolvimento de modelos experimentais de neuro-TB pode ajudar a elucidar alguns mecanismos fisiopatológicos da neuro-TB, além de testar e sugerir esquemas terapêuticos, novas drogas e vacinas. No futuro, o modelo murino de neuro-TB que estamos propondo permitirá investigar fatores possivelmente responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção de lesões tuberculosas no SNC, além de sua aplicação em testes com novas drogas e vacinas. O objetivo final seria elucidar a fisiopatologia desta grave doença e compreender eventos moleculares envolvidos na produção de lesões. O conhecimento gerado poderá permitir o delineamento de terapias específicas e efetivas.

CONCLUSÕES

1. Estabelecemos um novo modelo experimental de neuro-TB em cerebelo de camundongos, com a formação de meningite e tuberculomas, com a detecção de BAARs, onde o pico de indução da doença foi em 4 semanas após a injeção.

2. Neste modelo experimental, houve o recrutamento de diferentes populações gliais nas lesões tuberculosas, principalmente microglia e astrócitos, observado pela afinidade por *Ricinus communis* aglutinina (RCA).

3. Neste modelo de TB cerebelar em camundongos, houve aumento de expressão e ativação de NFκB nas lesões tuberculosas.

4. Houve expressão de iNOS restrita às lesões, meníngeas e parenquimatosas, em camundongos injetados com BCG.

5. Houve aumento de expressão de VEGF nas lesões tuberculosas (meningite e tuberculomas).

6. Em camundongos vacinados com a vacina DNA-hsp65 contra a TB, e posteriormente infectados com BCG, houve expressão reduzida de VEGF nas lesões tuberculosas, quando comparados aos camundongos não vacinados. Além disso, aparentemente a vacina preveniu a formação de tuberculomas no parênquima cerebelar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATAS, F.; ALATAS, Ö.; METINTAS, M.; ÖZARSLAN, A.; ERGINEL, S. and YILDIRIM, H. Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis. **CHEST**, v. 124, p. 2156-9, 2004.

ARRUDA, S.; FIGUEIREDO, F.; BARRAL-NETO, M.; CHALHOUB, M.; ZANGRANDE, A. M.; MARTINS, A. R. Expressão da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), fator de necrose tumoral (TNF)-α e interferon-γ em granulomas da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 33, p. 16, 1997.

BALDWIN, S. L.; DSOUZA, C.; ROBERTS, A. D.; *et al.*Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. **Infect Immun**, v. 66, p. 2951-9, 1998.

BASU, S.; NAGY, J. A.; PAL, S.; VASILE, E.; ECKEKHOEFER, I. A.; BLISS, S.; MANSEAU, E.J.; DASGUPTA, P. S.; DVORAK, H. F. and MUKHOPADHYAY, D. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 569-74, 2001.

BHAKAR, A. L.; TANNIS, L-L.; ZEINDLER, C.; RUSSO, M. P.; JOBIN, C.; PARK, D. S.; MAcPHERSON, S.; BARKER, P. A. Constitutive Nuclear Factor-κB activity is required for central neuron survival. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8466-8475, 2002.

BARRON, K. D. The microglial cell. A historical review. **J. Neurol. Sci**. v. 134, p. 57-68, 1995.

BASOGLU, Ö. K.; SAVAS, R.; KITIS, Ö. Conventional and diffusion-weighted MR imaging of intracranial tuberculomas. **Acta Radiologica**, v. 43, p. 560-562, 2002.

BEAMER, G. L. and TURNER, J. Murine models of susceptibility to tuberculosis. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 53, p. 469-483, 2005.

BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 5-6, p. 883-888, 2002.

BLACKWELL, T. S. and CHRISTMAN, J. W.; The role of nuclear factor-κB in cytokine gene regulation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 17, p. 3-9, 1997.

BONATO, V. L. D.; LIMA, V. M. F.; TASCON, R. E.; LOWRIE, D. B. and SILVA, C. L. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. **Infect Immun**, v. 66, p. 169-75, 1998.

BOOCOCK, C. A.; CHARNOCK-JONES, D. S.; SHARKEY, A. M.; McLAREN, J.; BARKER, P. J.; WRIGHT, K. A.; TWENTYMAN, P. R. and SMITH, S. K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. **J Nat Cancer Inst**, v. 87, n. 7, p. 506-16, 1995.

BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v.347, p.768-770, 1990.

BREDT, D.S. AND SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann. Rev. Biochem.** v.63, p.175-195, 1994.

BROWN, L. F.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; TOGNAZZI, K.; GUIDI, A. J.; DVORAK, H. F.; SENGER, D. R.; CONNOLLY, J. L. and SCHNITT, S. J. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. **Human Pathology**, v. 26, n. 1, p. 86-91, 1995.

BROWN, R. C.; MARK, K. S.; EGLETON, R. D.; HUBER, J. D.; BURROUGHS, A. R. and DAVIS, T. P. Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier

permeability: role of tight junction proteins and NFκB. **J Cell Sci**, v.116, p. 693-700, 2003.

CHAN, E. D.; CHAN, J.; SCHLUGER, N. W. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**. v. 25, p. 606-612, 2001.

CHOI, H-S.; RAI, P. R.; CHU, H. W.; COOL, C.; CHAN, E. D. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 166, p. 178-186, 2002.

COLASANTI, M. and PERSICHINI, T. Nitric oxide: an inhibitor of NF-κB/Rel system in glial cells. **Brain Res Bull**, v. 52, n. 3, p. 155-161, 2000.

CONNOLLY, D. T.; HEUVELMAN, D. M.; NELSON, R. *et al.* Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. **J Clin Invest**, v. 84, p. 1470-8, 1989.

CRÉPIEUX, P.; KWON, H.; LECLERC, N.; SPENCER, W.; RICHARD, S.; LIN, R.; HISCOTT, J. IκBα physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. **Molecular and Cellular Biology**, v.17, n.12, p.7375-7385, 1997.

DANIEL, H., LEVENES, C. AND CRÉPEL, F. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. **Trends Neurosci.**, v.21, p.401-407, 1998.

DASGUPTA, S.; JANA, M.; LIU, X. and PAHAN, K. Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22424-31, 2003.

DEEPAK, A. V. and SALIMATH, B. P. Antiogenic and proapoptotic activity of a novel glycoprotein from *U. indica* is mediated by NF-κB and caspase activated DNase in ascites tumor model. **Biochimie**, v. 88, p. 297-307, 2006.

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. 149-153, 2002.

DVORAK, H. F.; SIOUSSAT, T. M.; BROWN, L. F.; BERSE, B.; NAGY, J. A.; SORREL, A.; MANSEAU, E. J.; VAN DE WALTER, L. and SENGER, D. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. **J Exp Med**, v. 174, p. 1275-8, 1991.

FANG, F. C. An overview of nitric oxide in infection. In: F. C. Fang, editor. Nitric oxide and infection. **New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers**; p. 3-9, 1999.

FARAHANI, M.; TREWEEKE, A. T.; TOH, C. H.; TILL, K. J.; HARRIS, R. J.; CAWLEY, J. C.; ZUZEL, M. and CHEN, H. Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. **Leukemia**, v. 19, p. 524-30, 2005.

FERRARA, N. and HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 161, p. 851-8, 1989.

FERREIRA, H. H. A.; LODO, M. L. S.; MARTINS, A. R.; KANDRATAVICIUS, L.; SALAROLI, A. F.; CONRAN, N.; ANTUNES, E.; De NUCCI, G. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. **European Journal of Pharmacology**, v. 442, p. 155-162, 2002.

FLAMME, I.; BREIER, G. and RISAU, W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receotor 2(flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embrio. **Dev Biol**, v. 169, p. 699-712, 1995.

FLIER, M. VAN DER; HOPPENREIJS, S.; RENSBURG, A. J. VAN; RUYKEN, M.; KOLK, A. H. J.; SPRINGER, P.; HOEPELMAN, A. I. M.; GEELEN, S. P.M.; KIMPEN, J. L. L. and SCHOEMAN, J.F. Vascular endothelial growth factor and blood-brain barrier disruption in tuberculous meningitis. The Pediatric Infectious Disease Journal, vol. 23, n. 7, p. 608-613, 2004.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J.**, v.12, p.773-788, 1998.

FORSTREUTER, F.; LUCIUS, R. and MENTLEIN, R. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. **J Neuroimunology**, v. 132, p. 93-98, 2002. Lino, A. M.; Hirata, M. T.; Baeta, A. M.; Tsanaclis, A. M.; Scaff, M.; Marchiori, P. E. Intravenous therapy with methylprednisolone and cyclosphosphamide in vasculitis of peripheral nervous system. Evaluation of 8 patients. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 56, n. 2, p. 274-80, 1998.

FURCHGOTT, R.F. AND ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p.373-376, 1980.

GAO, F.; BALES, K. R.; DODEL R. C.; LIU, J.; CHEN, X.; HAMPLE, H.; FARLOW, M. R.; PAUL, S. M.; DU, Y. NF-kappaB mediates IL-beta-induced synthesis/release of alpha (2)-macroglobulin in a human glial cell line. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 105, n. 1-2, p. 108-114, 2002.

GOEDE, V.; BROGELLI, L.; ZICHE, M. and AUGUSTIN, H. G. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. **Int J Cancer**, v. 82, n. 5, p. 765-70, 1999.

GRAY, F.; NORDMANN, P. Bacterial infections. Chapter 3, v. 2, p. 113-152. **Greenfield's Neuropathology**. Sixth Edition. Volume 1 and 2. Edited by DAVID I GRAHAM and PETER L LANTOS. (Vol 1 pp 1230, Vol 2 pp 989). Published by Arnold, London, 1997.

GUERRINI, L.; BLASI, F.; DENIS, D. S. Sinaptic activation of NF-κB by glutamate in cerebelar granule neurons *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 9077-9081, 1995.

GUERRINI, L.; MOLTENI, A.; WIRTH, T.; KISTLER, B.; BLASI, F. Glutamate-dependent activation of NF-κB during mouse cerebellum development. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 16, p. 6057-6063, 1997.

HANSSON, E. and RÖNNBÄCK, L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB J.** v. 17, n. 3, p. 341-348, 2003.

HEE HONG, K.; RYU, J. and HOON HAN, K. Monocytechemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascularendothelial growth factor-A. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1405-7, 2005.

HELBIG, G.; CHRISTOPHERSON, K. W.; BHAT-NAKSHATRI, P.; *et al.* NF-κB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. **J Biol Chem**, v. 278, p. 21631-8, 2003.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HOUCK, K. A.; LEUNG, D. W.; ROWLAND, A. M. *et al.* Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. **J Biol Chem**, v. 267, p. 26031-7, 1992.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; Xu, X. Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. **Am J Physiol.**, v.264, n.4, p.738-746, 1993.

JAFFREY, S.R. AND SNYDER, S.H. PIN: An Associated Protein Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase. **Science**, v.274, p.774-777, 1996.

KALTSCHMIDT, C.; KALTSCHMIDT, B.; BAUERLE, P. A. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-κB in primary neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 9618-9622, 1995.

KALTSCHMIDT, B AND KALTSCHMIDT, C. Constitutive NF-κB activity is modulated via neuron-astroglia interaction. **Exp Brain Res**, v. 130, p. 100-104, 2000.

KILANI, B.; AMMARI, L.; TIOUIRI, H.; GOUBONTINI, A.; KANOUN, F.; ZOUITEN, F.; CHAABENE, T. B. Neuroradiologic manifestations of central nervous system tuberculosis in 122 adults. Abstrat. **Rev Med Interne**, v. 24, n. 2, p. 86-96, 2003.

KREUTZBERG, G. W. Micrloglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. v. 19, p. 312-318, 1996.

LAROUX, F. S.; PAVLICK, K. P.; HINES, I. N.; KAWACHI, S.; HARADA, H.; BHARWANI, S.; HOFFMAN, J. M.; GRISHAM, M. B. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta Physiol Scand**, v. 173, p. 113-118, 2001.

LESSARD, L.; MES-MASSON, A-M.; LAMARRE, L.; WALL, L.; LATTOUF, J-B. and SAAD, F. NF-κB nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. **BJU Int**, v. 91, p. 417-20, 2003.

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**, v. 35, n. 3, p. 195-198, 2002.

LI, D.; FERNANDEZ, L. G.; DODD-O, G.; LANGER, J.; WANG, D. and LAUBCH, V. E. Upregulation of hipoxia-induced mitogenic factor in compensatory lung growth after pneumonectomy. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 32, p. 185-91, 2005.

LIN, H. L. and MURPHY,S. Regulation of astrocyte nitric oxide synthase type II expression by ATP and glutamate involves loss of transcription factor binding to DNA. **J Neurochem**, v. 69, p. 612-6, 1997.

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, 2003.

LONG, R.; LIGHT, B.; TALBOT, A. Micobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. **Antimicrobiol. Agents.Chemo**. v. 43, p. 403-405, 1999.

LOWRIE, D. B.; TASCON, R. E.; COLSTON; M. J. and SILVA, C. L. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine**, v. 12, p. 1537-40, 1994.

LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L.; COLSTON, M. J.; RAGNO, S. and TASCON, R. E. Protection against tuberculosis by plasmid DNA vaccine. **Vaccine**, v. 15, p. 834-8, 1997-a.

LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L. and TASCON, R. E. DNA vaccines against tuberculosis. **Immunol Cell Biol**, v. 75, n. 6, p. 591-4, 1997-b.

LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L. and TASCON, R. E. Genetic vaccination against tuberculosis. **Springer Semin Immunopathol**, v. 19, n. 2, p. 161-73, 1997-c.

LOWRIE, D. B.; TASCON, R. E.; BONATO, V. L. D.; LIMA, V. M. F.; FACCIOLI, L. H.; STAVROPOULOS, E.; COLSTON, M. J.; HEWINSON, R. G.; MOELLING, K. AND SILVA, C. L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v.400, n.15, p.269-271, 1999.

LOWRIE, D. B. and SILVA, C. L. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. **Vaccine**, v. 18, p. 1712-6, 2000.

LOWRIE, D. B. DNA vaccines for therapy of tuberculosis. Where are we now? **Vaccine**, v. 24, p. 1983-9, 2006.

LOZES, E.; HUYGEN, K.; CONTENT, J.; *et al.* Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. **Vaccine**, v. 15, p. 830-3, 1997.

MANNOJI, H., YEGER, H. and BECKER, L. A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. **Acta Neuropathol (Berl)**, v. 71, n. 3-4, p. 341-3, 1986.

MARLETTA, M.A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. **Cell**, v.78, p.927-930, 1994.

MARTINS, A.R.; DIAS, M.M.; VASCONCELOS, T.M.; CALDO, H.; COSTA, M.C.R.; CHIMELLI, L.; LARSON R.E Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. J. **Neurosci. Methods.**, v.92, p.25-29, 1999.

MATSUYAMA, W.; HASHIGUCHI, T.; MATSUMURO, K.; IWAMI, F. HIROTSU, Y.; KUWABATA, M.; ARIMURA, K. and OSAME, M. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 162, p. 1120-2, 2000.

MATSUYAMA, W.; HASHIGUCHI, T.; UMEHARA, F.; MATSUURA, E.; KAWABATA, M.; ARIMURA, K.; MARUYAMA, I.; OSAME, M. Expression of vascular endothelial growth factor in turberculous meningitis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 186, p. 75-79, 2001.

MAZZOLLA, R.; PULITI, M.; BARLUZZI,R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BARBOLINI, G.; BLASI, E. Differential microbial clearance and immunoresponse of Balb/c (Nramp1 suscetible) and DBA2 (Nramp1 resistant) mice intracerebrally infected with *ycobacterium bovis* BCG (BCG). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 149-158, 2002.

McBAIN, C.J., FREUND, T.F. AND MODY, I. Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. **Trends Neurosci.,** v.22, p.228-235, 1999.

McMICKING, J. D.; NORTH, R. J.; LaCOURSE, R.; MUDGETT, J. S.; SHAH,S. K.; NATHAN, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 94, p. 5243-5248, 1997.

MENDEZ-SAMPERIO, P.; PALMA, J.; VAZQUEZ, A. Roles of intracellular calcium and NF-κB in the Bacillus Calmette-Guerin-induced secretion of interleukin-8 from human monocytes. **Cell Immunol**, v. 211, n. 2, p. 113-122, 2001.

MOMBAERTS, P.; ARNOLDI, J.; RUSS, F.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S. H. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. **Nature**. Sep 2;365(6441):53-56, 1993.

MONTGOMERY, D. C. (2001). Design and Analysis of Experiments. Wiley, New York.

SAS/STAT® User's Guide, Version 9, Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2002-2003.

MOORTHY, A. K. AND GHOSH, G. p105.Ikappa Bgamma and prototypical Ikappa Bs use a similar mechanism to bind but a different mechanism to regulate the subcelular localization of NFκB. **JBC**, v. 278, n. 1, p.556-566, 2003.

MURPHY, S. and EGGER, M. Studies of the social causes of tuberculosis in Germany before the First World War: extracts from Mosse and Tugendreich's landmark book. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, p.742-749, 2002.

NATHAN, C. F. and HIBBS, J. B. Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol**, v. 3, n. 1, p. 65-70, 1991.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, Mda D.; LAPA e SILVA, J. R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R. WEIDNER, J. R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W. and HO, J. L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J Exp Med**, v. 183, n. 5, p. 2293-302, 1996.

OHKUMA, S.; KATSURA, M. Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CSN. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 97-108, 2001.

OLIVEIRA, A. O.; ZANELLA, C. B.; ZUCCHI, F. C. R.; NEDER, L. S.; HO, P. L.; OLIVEIRA, M. L.; DeNUCCI, G.; CHIMELLI, L. M. C.; MARTINS, A. R. Immunohistochemical detection of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human nervous tissue and PC12 cells culture.. In: XXXI Reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular., 2002, Caxambú, MG.

OLSON, T. A.; MOHANRAJ, D. and RAMAKRISHNAN, S. *In vivo* neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF)

inhibits ovarian carcinoma-associated ascites formation and tumor growth. **Intern J Oncology**, v. 8, p. 505-11, 1996.

PAHLEVAN, A. A.; WRIGHT, D. J. M.; BRADLEY, L.; SMITH, C.; FOXWELL, B. M. J. Potential of rifamides to inhibit TNF-induced NF-κB activation. **J Antimicrobial Chemother**, v. 49, p. 531-534, 2002.

PARRATT, J. R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **J Antimicrob Chemother**. Jan;41 Suppl A:31-39, 1998.

PAXINOS, G. and FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Second edition, 1997.

POST, A.; HOLSBOER, F.; BEHL, C. Induction of NF-κB activity during haloperidol-induced oxidative toxity in clonal hippocampal cells: suppression of NF- kappa B and neuroprotection by antioxidants. **J. Neurosci**, v. 18, p. 8236-82-46, 1998.

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

ROCK, R. B.; GEKKER, G.; HU, S.; *et al.* Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, p. 942-64, 2004.

ROCK, R. B.; HU, S.; GEKKER, G.; SHENG, W. S.; MAY, B.; KAPUR, V. and PETERSON, P. K. *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine and chemokine expression by human microglia and astrocytes: effects of dexamethasone. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 15 December, p. 2054-58, 2005.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, n.1, Uberaba Jan./Feb. 2002.

RUFFINO-NETTO, A.; PEREIRA, J. C. Mortalidade por tuberculose e condições de vida: o caso Rio de Janeiro. **Revista Saúde em Debate**, v.12, p.27-34, 1981.

SATHYANARAYANA, S.; BASKAYA, M. K.; FOWLER, M.; ROBERTS, R.; NANDA, A. Solitary tuberculoma of the cerebellopontine angle: a rare presentation. **J Clin Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 120-122, 2003.

SCIORATI, C.; ROVERE, P.; FARRARINI, M.; HELTAI, S.; VAIANI, R.; CLEMENTI, E. And MANFREDI, A. A. Generation of nitric oxide by inducible nitric oxide synthase protects gamma delta T cells from *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis. **J Immunol**, v. 163, n. 3, p. 1570-6, 1999.

SENGER, D. R.; GALLI, S. J.; DVORAK, A. M.; PERRUZZI, C. A.; HARVEY, V. S. and DVORAK, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 25, n. 219 (4587), p. 983-5, 1983.

SENGER, D. R.; PERRUZZI, C. A.; FEDER, J. and DVORAK, H. F. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. **Cancer Res**, v. 46, p. 5629-32, 1986.

SENGER, D. R.; CONNOLLY, D. T.; VAN DE WATER, L.; FEDER, J. and DVORAK, H. F. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res**, v. 15: 50 (6), p. 1774-8, 1990.

SENGUL, S.; ZWIZINSKI, C.; SIMON, E.E.; KAPASI, A.; SINGHAL, P. C. and BATUMAN, V. Endocytosis of light chains induces cytokines through activation of NFκB in human proximal tubule cells. **Kidney Int**, v. 62, n. 6, p. 1977-88, 2002.

SEO, K. H.; KO, H-M.; CHOI, J. H.; JUNG, H. H.; CHUN, Y. H.; CHOI, I-W.; LEE, H-K. and IM, S-Y. Essential role for platelet-activating factor-induced NFκB activation in macrophage-derived angiogenesis. **Eur J Immunol**, v. 34, p. 2129-37, 2004.

SHI, S.R.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval imunohistochemistrty: past, present and future. **J. Histochem. Cytochem.**, v.45, p.327-43, 1997.

SHIN, T.;WEINSTOCK, D.; CASTRO, M. D.; ACLAND, H.; WALTER, M.; KIM, H.Y. and PURCHASE, H. G. Immunohistochemical study of constitutive neuronal and inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of goat with natural listeriosis. **J Vet Sci**, vol. 1, n. 2, p. 77-80, 2000.

SIEBENLIST, U.; FRANZONO, G. and BROWN, K. Structure, regulation, and function of NF-κB. **Annu Rev Cell Biol**, v. 10, p. 405-455, 1994.

SILVA, C. L.; BONATO, V. L.; COELHO-CASTELO, A. A.; DeSOUZA, A. O.; SANTOS, S. A.; LIMA, K. M.; FACCIOLI, L. H. e RODRIGUES, J. M. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. **Gene Ther.**, v. 12, n. 3, p. 281-287, 2005.

SINNER, S. W. and TUNKEL, A. R. Approach to the diagnosis and management os tuberculosis meningitis. **Curr Infect Dis Rep**, v. 4, p. 324-31, 2002.

SOARES, T.J.; COIMBRA, T.M.; MARTINS, A.R.; PEREIRA, A.G.F.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G.S.; ALBUQUERQUE-ARAUJO, W.I.C.; NUCCI, G. DE; FAVARETTO, A.L.V.; GUTKOWSKA, J.; MCCANN, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Atrial Natriuretic Peptide and Oxytocin Induce Natriuresis by Release of Cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v.96, p.278-283, 1999.

STAMLER, J.S. Redox Sinaling: Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide. **Cell**, v.78, p.931-936, 1994.

STIFTER, S. The role of nuclear factor κB on angiogenesis regulation through monocyte chemotatic protein-1 in myeloma. **Medical Hypotheses**, v. 66, p. 384-386, 2006.

Stop TB Partnership and WHO (World Health Organization). The Global Plan to Stop TB, 2006-2015, WHO/HTM/STB/2006.362 (Geneva: World Helth Organization), 2006.

TASCON, R. E.; COLSTON, M. J. RAGNO, S.; STAVROPOULOS, E.; GREGORY, D. and LOWRIE, D. B. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. **Nature** Medicine, v. 2, p. 888-92, 1996.

TOCHIO, H.; OHKI, S.; ZHANG, Q.; LI, M.; ZHANG, M. Solution structure of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Nat. Struct. Biol.**, v.5, n.11, p.965-969, 1998.

TOGASHI, H.; SASAKI, M.; FROHMAN, E.; TAIRA, E.; RATAN, R.R.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor κB activity and imunologic (tipeII) nitric oxide synthase expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.2676-2680, 1997.

TONG, Q.; ZHENG, L.; LIN, L.; LI, B.; WANG, D.; HUANG, C. and LI, D. VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF κB signaling pathway. **Respiratory Research**, v, 7, n. 37 (March 2006), 14p, 2006.

TOOSSI, Z.; HAMILTON, B. D.; PHILLIPS, M. H.; AVERILL, L. E.; ELLNER, J. J.; SALVEKAR, A. Regulation of nuclear factor-kappa B and its inhibitor I kappa B-alpha/MAD-3 in monocytes by *Mycobacterium tuberculosis* and during human tuberculosis. **J Immunol**, v. 159, n. 8, p. 4109-4116, 1997.

TOOSSI, Z.; ELLNER, J. J. Pathogenesis of tuberculosis. In: **Tuberculosis: Current Concepts and Tratament.** L. N. Friedman, editor. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 19-47, 2000.

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, p. 1563-72, 1998.

TSENOVA, L.; BERGTOLD, A.; FREEDMAN, V. H.; YOUNG, R. A.; 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**. v. 96, p. 5657-5662, 1999.

TSENOVA, L.; MANGALISO, B.; MULLER, G.; CHEN, Y.; FREEDMAN, V. H.; STIRLING, D. and 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, 2002.

TSENOVA, L.; ELLISON, E.; HARBACHEUSKY, R.; MOREIRA, A. L.; KUREPINA, N.; REED, M.B.; MATHEMA, B.; BARRY III, C. E.; KAPLAN, G. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipidio produced by the bacilli. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 98-106, 2005.

THWAITES, G.; CHAU, T. T. H.; MAI, N. T. H.; DROBNIEWSKI, F.; McADAM, K. and FARRAR, J. Tuberculous meningitis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 68, p. 289-99, 2000.

THWAITES, G. E. and HIEN, T. T.. Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. **Lancet Neurology**, v. 4, p. 160-70, 2005.

WANG, C-H AND KUO, H-P. Nitric oxide modulates interleukin-1β and tumor necrosis factor-α synthesis, and disease regression by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. **Respirology**, v. 6, p. 79-84, 2001.

WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing, WHO/HTM/STB/2006.362 (Geneva: World Helth Organization), 2006.

XIE, Q.W.; CHO, H.J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v.256, p.225-228, 1982.

XIONG, Y.; KARUPIAH, G.; HOGAN, S. P.; FOSTER, P. S.; RAMSAY, A. J. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. **The Journal of Immunology**, p. 445-479, 1999.

YAN, X. X.; RIBAK, C. E. Prenatal development of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Diaphorase activity in the human hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 7, p. 215-231, 1997.

YOUNG, D. and DYE, C. The development and impact of tuberculosis vaccines. **Cell**, v. 124, p. 683-687, 2006.

ZAUITH, G. Frente de combate à tuberculose. **Pesquisa FAPESP**, v.74, p.22-24, abril/2002.

ZHANG, J.; PENG, B.; and XINMING, C. Expressions of nuclear factor κB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. **Clin Cancer Res**, vol. 11, n. 20, p. 7334-43, 2005.

ZHU, X. J.; VENKATAPRASAD, N.; THANGARAJ, H. S.; *et al.* Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, v. 158, p. 5921-6, 1997.

ZUCCHI, F. C. R.; NEDER, L. S.; CHIMELLI, L.; MARTINS, A. R. Expression of the protein inhibitor (PIN) of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the developing and aging human cerebellum. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001-a, Caxambú, MG.

ZUCCHI, F. C. R.; NEDER, L. S.; CHIMELLI, L. M. C.; ESPÍNDOLA, F. S.; MARTINS, A. R. Expression of the protein inhibitor (PIN) of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and of dynein light chain (DLC) in the developing human cerebellum.. In: What the developing cerebral cortex tells about the adult cortex (and vice versa)? (Congresso Internacional realizado em 2001 na UFRJ), 2001-b, Rio de Janeiro, RJ.

ZUCCHI, F. C. R. Expressão do inibidor proteico da sintase neuronal do óxido nítrico (PIN) e moléculas relacionadas, da ontogênese ao envelhecimento do cerebelo humano. 2002. 138 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

ZUCCHI, FCR ; NEDER, L. S.; CHIMELLI, L. M. C.; PEIXOTO, P. M. V.; ESPÍNDOLA, F. S.; MARTINS, A. R.. Expression of the protein inhibitor (PIN) of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and of dynein light chain (DLC) in the developing human cerebellum.. In: XXXI Reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular., 2002, Caxambú, MG.

ZUCCHI, F. C. R.; NEDER, L. S.; CHIMELLI, L. M. C.; ANSELMI, A. M.; GRAEF, M.; ESPÍNDOLA, F. S.; MARTINS, A. R. Expression of the protein inhibitor (PIN) of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), dynein intermediate chain (DIC) and nNOS in varicosities of recurrent collaterals of Purkinje cells in the adult human. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003. Caxambú, MG.

ANEXOS

Anexo I. Análise exploratória.

Tratamento	Tempo (Dias)	N	Média	D. P.	Variância	C. V. (%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
BCG	1	7	27,00	16,54	273,67	61,27	7,00	12,00	23,00	47,00	49,00
	2	5	34,60	7,64	58,30	22,07	29,00	31,00	32,00	33,00	48,00
	3	5	52,00	16,58	275,00	31,89	24,00	53,00	55,00	61,00	67,00
	4	8	48,00	13,69	187,43	28,52	30,00	36,50	46,50	60,00	68,00
	5	4	45,50	9,26	85,67	20,34	32,00	40,00	48,50	51,00	53,00
	6	7	47,57	20,53	421,29	43,15	11,00	36,00	51,00	57,00	78,00
	7	13	62,92	13,62	185,58	21,65	46,00	54,00	61,00	71,00	95,00
	14	6	68,17	21,58	465,77	31,66	30,00	58,00	76,00	77,00	92,00
	28	8	71,38	19,40	376,55	27,19	54,00	58,50	69,50	72,50	116,00
	56	11	73,82	19,29	372,16	26,13	42,00	61,00	81,00	87,00	99,00
Salina	1	4	12,00	12,19	148,67	101,61	1,00	1,50	11,50	22,50	24,00
	2	3	12,33	12,10	146,33	98,08	3,00	3,00	8,00	26,00	26,00
	3	5	10,40	11,01	121,30	105,90	3,00	4,00	4,00	12,00	29,00
	4	3	33,33	1,53	2,33	4,58	32,00	32,00	33,00	35,00	35,00
	5	2	29,00	38,18	1458,00	131,67	2,00	2,00	29,00	56,00	56,00
	6	4	22,50	11,12	123,67	49,42	7,00	15,00	25,00	30,00	33,00
	7	5	21,20	17,02	289,70	80,29	3,00	4,00	25,00	34,00	40,00
	14	7	17,29	20,08	403,24	116,17	2,00	3,00	4,00	37,00	52,00
	28	5	27,60	22,67	513,80	82,13	3,00	3,00	41,00	42,00	49,00
	56	4	18,00	17,45	304,67	96,97	3,00	4,00	14,50	32,00	40,00

Anexo II. Contrastes para comparação entre médias segundo o tempo. Tratamento: BCGXSalina.

Tempo	Média	D. P.	Média	D. P.	P-valor
1	27,00	16,54	12,00	12,19	0,16
2	34,60	7,64	12,33	12,10	0,08
3	52,00	16,58	10,40	11,01	<0,01
4	48,00	13,69	33,33	1,53	0,20
5	45,50	9,26	29,00	38,18	0,26
6	47,57	20,53	22,50	11,12	0,02
7	62,92	13,62	21,20	17,02	<0,01
14	68,17	21,58	17,29	20,08	<0,01
28	71,38	19,40	27,60	22,67	<0,01
56	73,82	19,29	18,00	17,45	<0,01

Anexo III. Protocolo de processamento de encéfalo murino.

Após 4 horas de pós-fixação sob agitação, mergulhar os encéfalos em:

1. Etanol hidratado - 50% - 30 minutos

- 70% - "over-night"

- 80% - 30 minutos

- 90% - 30 minutos

- 95% - 30 minutos

2. Etanol absoluto - I - 30 minutos

- **II-** 45 minutos

- **III-** 45 minutos

- **IV-** 45 minutos

3. Mistura etanol absoluto + benzol 1:1 - 1 hora

4. Benzol - I - 30 minutos

- **II-** 45 minutos

- **III-** 45 minutos

- **IV-** 45 minutos

5. Parafina (Merk) - I- 1 hora

- **II-** 2 horas

- **III-** 1 hora

Anexo IV.

The Lancet - correspondence

An experimental model of neurotuberculosis

[1]Zucchi, FCR; [2]Pelegrini-da-Silva, A; [3]Neder, LS; [4]Silva, CL; [1]Takayanagui, OM

Depts of [1]Neurology, [2]Pharmacology, [3]Pathology and [4]Biochemistry - FMRP-USP

Corresponding author:

Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi

Dept of Neurology Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Av. Bandeirantes, 3900

Monte Alegre – Ribeirão Preto – SP – Brasil

CEP 14049-900

Fax 55-16-3602-2548

zfabiola@yahoo.com

Neurotuberculosis is a severe form of tuberculosis (TB) (Beek, March 6, p. 203)[1] whose pathophysiology is poorly understood (Thwaites, Jan 68, p. 289)[2] due to a lack of viable experimental models. We developed an experimental model of neuro-TB and were able to characterize the temporal development of meningitis and tuberculomas and of microglial cell recruitment in mouse cerebella.

C57BL6 mice were injected with 10^2, 10^3 or 10^4cfu of attenuated *Mycobacterium bovis* (BCG) in the cerebellum (0.5mm lateral and 2mm posterior from lambda; 2mm ventral from the skull); they were sacrificed one to seven days or two, four or eight weeks later. Sections (8µm) of paraffin-embedded cerebellum were stained with hematoxilin-eosin (HE) or Ziehl-Neelsen for morphology and infection analysis, respectively. Tissues were also incubated with biotinylated-RCA (*Ricinus communis* lectin) to evaluate glial cell recruitment. RCA-positive cells were counted using the software QualiView (Atonus). Significant differences ($P \leq 0.05$) in the number of RCA-positive cells over time and between treatment groups were analyzed by ANOVA using SAS software.

Cerebellar inoculation of 10^4cfu BCG produced tuberculomas in 3 out 5 mice and meningitis in all, detected 4 weeks after injection, as observed in representative HE-sections (Figures A and B). Tuberculomas presented a caseous center, surrounded by a granulomatous reaction, and the meningitis showed typical epithelioid granuloma and marked vascular changes. Ziehl-Neelsen-positive reaction confirmed BCG infection (Figure C). BCG at 10^2 or 10^3cfu induced meningitis in 2 of 5 mice and did not produce tuberculomas; consequently 10^4cfu BCG was used to analyze cerebellar microglial recruitment. Microglial recruitment was apparent at the BCG injection site, evidenced by positive RCA-staining (Figure D). There was a significant increase in RCA-positive cell number in the BCG group (Figure E) at 3 and 6 days and 1, 2, 4 and 8 weeks after injection, with no detectable RCA-staining in control mice.

We were able to demonstrate temporal development of meningitis, tuberculomas and an increase in microglial cell recruitment in cerebella of mice injected with BCG. Murine models are important tools for elucidation of immune mechanisms (Beamer and Turner, Dec 53, 469)[3] that are essential for controlling *M. tuberculosis* infection. In neuro-

TB, the host inflammatory response is an important factor in clinical deterioration (Tsenova, July 192, 98)[4]. Our murine experimental model of TB in the CNS opens new perspectives for the study of factors involved in the progression of this disease.

1. BEEK, D. van de. Brain teasing effect of dexamethasone. The Lancet Neurology, 2007; 6: 203-204.

2. THWAITES, G.; CHAU, T. T. H.; MAI, N. T. H.; DROBNIEWSKI, F.; McADAM, K. and FARRAR, J. Tuberculous meningitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000; 68: 289-99.

3. BEAMER, G. L. and TURNER, J. Murine models of susceptibility to tuberculosis. Arch Immunol Ther Exp, 2005; 53: 469-483.

4. TSENOVA, L.; ELLISON, E.; HARBACHEUSKY, R.; MOREIRA, A. L.; KUREPINA, N.; REED, M.B.; MATHEMA, B.; BARRY III, C. E.; KAPLAN, G. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. J Infect Dis, 2005; 192: 98-106.

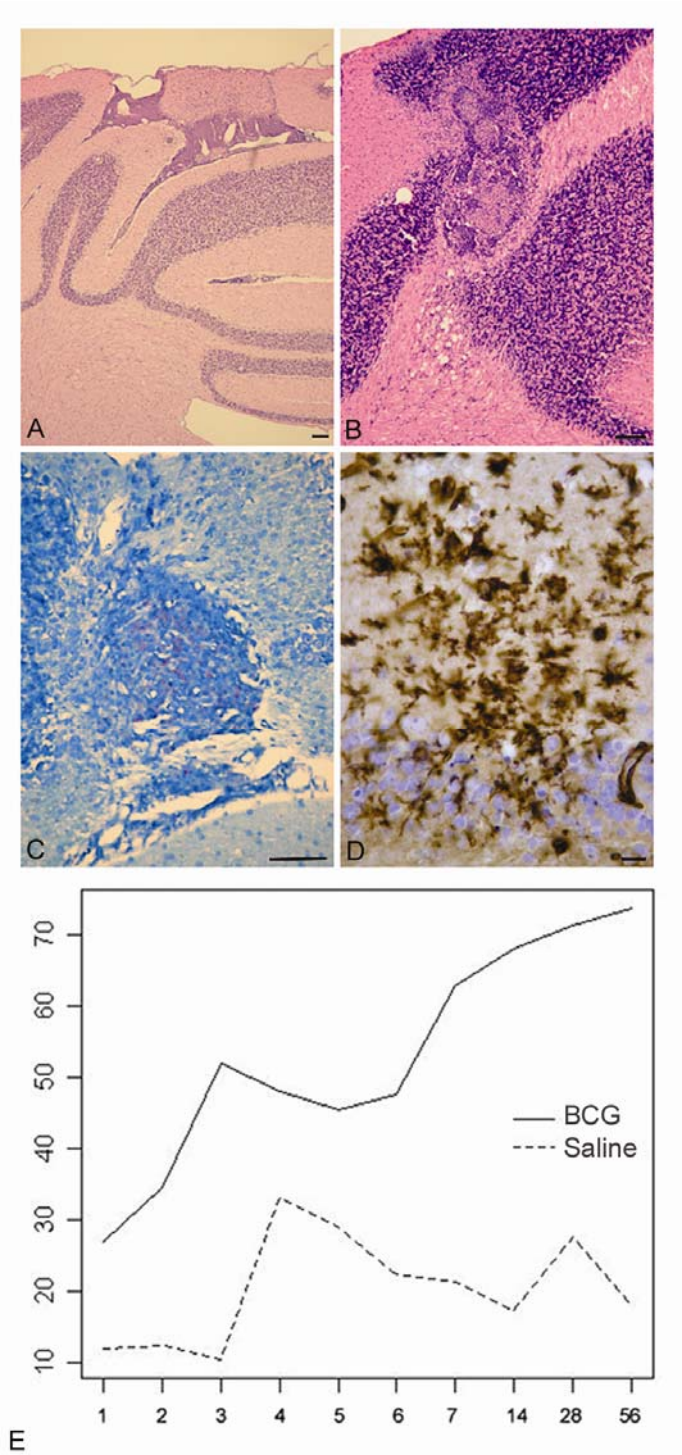

Figure 1: A, Meningitis in a mouse cerebellum. **B,** Tuberculoma. **C,** Tuberculoma with bacilli. **D,** RCA-positive microglial cells. **E,** Time-course of mean number of RCA-positive cells treated with attenuated *Mycobacterium bovis* or saline (x: time in days; y: mean numbers of RCA+ cells). HE stained: **A** and **B**. Ziehl Neelsen stained: **C**. RCA stained: **D**. Bars: 50µm **A**, **B** and **C**; 10µm **D**.

Anexo V

Brain Pathology

Expression of vascular endothelial growth factor in a model of neurotuberculosis in mice – effect of the DNA vaccine hsp65 treatment

Abstract

Tuberculosis (TB) is a serious public health problem. Development of experimental models and vaccines are essential to elucidate physiopathological mechanisms and to control the disease. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent activator of vascular permeability and angiogenesis. The VEGF seems to participate in the breakdown of the blood brain-barrier in tuberculous meningitis, contributing to the worsening of the disease. Therefore, the objective here was to extent the characterization of our model of mice neuro-TB by describing the VEGF participation in the Central Nervous System (CNS) disease. Plasmid encoding DNA protein antigen hsp65 has been described as a protector against *Mycobacterium tuberculosis* infection and was used here to test its effectiveness in the prevention of VEGF production and TB disease. Mice C57BL6 received one intramuscular injection of 50μg DNA-hsp65 or saline in alternated weeks completing four vaccines. Then mice were injected with 10^4 cfu BCG in cerebellum. Four weeks after BCG injection, mice were perfused and brains were paraffin-embedded. Sections (4μm) were incubated with anti-VEGF and peroxidase conjugated second antibody, which was detected using diaminobenzidine. We observed VEGF immunohistochemical expression in meningitis and tuberculomas, in this model of neuro-

TB in non-vaccinated mice. The hsp65 treatment blocked the expression of VEGF in mice tuberculous meningitis (TBM). Therefore, our model of neuro-TB indicated the VEGF participation in the physiopathology of neuro-TB and the potential prevention of the hsp65 in the disease progression.

Introduction

Bacterial infections of the central nervous system (CNS) are dynamic process influenced by multiple interactions between micro-organisms and host defenses. The brain and spinal cord are relatively well protected from infective agents by the bone of the skull and vertebral column, the meninges and by the blood brain barrier (BBB). Thus bacterial species require special virulence factor to enhance invasiveness and produce disease. However, once the bacterial pathogen enters the CNS host defense mechanisms are suboptimal to control the infection (12).

After decades of neglect, the immense public health impact of tuberculosis (TB) is now widely recognized (29). In 2004 alone, around 9 million people developed active TB, with up to 2 million deaths attributable to the disease (28). The most severe form of TB is that involving the CNS; it is always secondary to disease elsewhere in the body and its frequency is therefore related to the incidence of TB in a given population. Reactivation of *M. tuberculosis* infection tends to be an early complication and HIV-infected patients with TB, which are at increased risk of meningitis. Meningitis and tuberculomas are the most common signals of the disease in the CNS (12).

Angiogenesis is a critical occurrence for tumor growth, metastasis and infectious process, such as neuro-TB. The angiogenesis is a process tightly regulated by the actions of

angiogenic mediators, as the endothelial growth factor (VEGF), released by inflammatory cells (30).

VEGF is a heparin-binding dimeric polypeptide growth factor originally purified on the basis of its vascular permeability-enhancing activity and shown to be a potent mitogen for endothelial cells (3, 8, 13, 22). It induces breakdown of the BBB and subsequent increase in the vascular permeability (7, 10, 22, 23, 24). VEGF plays a pivotal role in angiogenesis and acts mainly through two tyrosine kinase receptors, flt-1 (VEGFR-1) and flk-1 (VEGFR-2). Flk-1 is expressed in the vascular endothelium and is the earliest known marker for endothelium (9).

Increased levels of VEGF are detected in serum of patients with active pulmonary TB (1, 20) and tuberculous meningitis (21), which also presents VEGF increase in the cerebrospinal fluid (CSF) (10). Therefore, the increase in vascular permeability and angiogenesis ascribed to the VEGF production might have essential role in the progression and/or dissemination of the TB disease.

The current vaccine against TB infection - BCG (bacilli Calmette-Guérin) - is widely used in many parts of the world (although not in the United States) to protect against severe childhood forms of TB but is unreliable against the highly infectious pulmonary form of TB characteristically found in adults. There is a pressing need for new and better vaccines to fight TB (29). More recently, it has been tested the experimental efficacious of a DNA vaccination, composed by a single mycobacterial antigen (hsp65). This vaccine has been shown to confer some protection to mice against subsequent challenge with virulent *M. tuberculosis* (2, 14-19, 25, 31) by activation of a specific T cells population, CD8+/CD4-/CD44hi IFN-γ, expressing cytotoxic phenotype.

The analysis of the VEGF expression and experimental development of neuro-TB (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations), associated or not to hsp65 immunization, could help to establish a relationship in the VEGF increment with the TB progression and to evaluate the impact of the hsp65 treatment on the biochemical and morphological compromising in the neuro-TB development.

Therefore, our objective here was to extent the characterization of our mice neuro-TB model by evaluating the relationship between VEGF expression and TB disease. We also appraised the impact of hsp65 vaccine treatment on the VEGF expression and TB development.

Materials and Methods

Animals

Male C57BL6 mice weighing 40g were from Department of Genetics (FMRP-USP). Mice were housed in temperature-controlled rooms (22-25°C) and received water and food until use in the Department of Pharmacology (FMRP-USP).

Immunization

Mice were given a series of four doses of plasmid DNA intramuscularly [50µg of the plasmid (pVAX) encoding DNA-vaccine (hsp65), diluted in solution saline with 25% of sacarose in each femural quadríceps] at 2-week intervals (LOWRIE *et al.*, 1999). Control group was saline injected.

Pathogen

Attenuated *Mycobacterium bovis* (BCG) diluted in saline, at the concentration of 10^4 colony-forming units (cfu).

Stereotaxic procedures

Intracerebellar inoculations were performed on anesthetized mice, two weeks after the last immunization. Briefly, mice received the inoculums (25µl of BCG or saline) into the cerebellum, 0.5 mm lateral and 2mm posterior from the lambda and 2mm ventral from the skull.

Sacrifice and diagnosis of neuro TB

Four weeks after intra-cerebellar injection, mice were intracardiac perfused with paraphormaldeide solution (PF 4%) in phosphate saline buffer (PBS) and cerebella were processed and paraffin-embedded.

To confirm the diagnostic of tuberculosis we used Auramine technique. Sections (4µm) were stained with Auramine for 15 minutes, immersed in HCl 0.5% in ethanol 70%, for 2 minutes, and immersed in potassium permanganate 0.5% for 2 minutes. We observed the pathogens by fluorescence microscopy.

Immunohistochemistry

Sections (4µm) were de-waxed in xylene, and hydrated through graded ethanol/water mixtures. Endogenous peroxidase activity was then blocked by incubating the sections with 5% H_2O_2 in methanol for 10 minutes. VEGF-like immunoreactivity was enhanced by boiling the sections in 10mM sodium citrate buffer, pH 6.0, in pressure

cooker for 5 minutes. After cooling, sections were rinsed and incubated in primary antibody.

VEGF expression was detected using primary antibody rabbit anti-VEGF (Labvision, Star 54, Ab-1) diluted 1:200 (v/v) in solution of 1% of bovine serous albumin (BSA) in phosphate saline buffer (PBS) incubated for 2 hours in steam camera. Sections were then rinsed in PBS and incubated with second antibody, sheep anti-rabbit peroxydase conjugated (Serotec) diluted 1:100 (v/v) in solution of 1% of BSA in PBS for 45 minutes in steam camera. Sections were rinsed in PBS and diaminobenzidine (DAB) were used as chromogen. Cellular nuclei were counterstained with Harris-Hematoxilin. Sections were dehydrated with graded ethanol/water mixtures, cleared with xylene and coverslipped with Permount (Fisher).

Results

VEGF expression in the experimental model of neuro-TB (in vaccinated or non-vaccinated DNA-hsp65 mice).

In the beginning of a series of the experiments, the infection had confirmed by the Auramine detection of the bacilli in BCG injected mice. Analysis was performed in fluorescence microscopy, where we observed clusters of bacilli in the tuberculous lesions and, few bacilli spread in the cerebellar parenchyma (not shown).

Structures VEGF immunoreactive in BCG injected mice: **1)** inflammatory lesions in cerebellar parenchyma (Fig.13A; Fig.14A and B) and **2)** blood vessels adjacent to the lesion (Fig.13B); **3)** infiltrate of lynphocytes into sub-arachnoid space (meningitis; Fig.13A; Fig.14E and F) and of the adjacent parenchyma (encephalitis); and **4)** some blood vessels spread in the cerebellum (Fig.14H) and in the pons.

Cells VEGF stained in BCG treated mice: **1)** Purkinje cells (Fig.13C and Fig.15A; more intense in cytoplasm, base of dendrites and hillock); **2)** cells of the cerebellar nucleus (cytoplasm) (Fig. 14C) and **3)** pons (Fig.13D; Fig.14C and D; and Fig.15F); **4)** interneurons of the molecular layer (MOL; Fig.13C and Fig.15A; cytoplasm); **5)** granular cells of the granular layer (GL; Fig.15B; cytoplasm); **6)** cerebellar white matter (WM) cells (cytoplasm); **7)** vascular endothelial cells; **8)** inflammatory cells in the tuberculomas and meningitis (Fig.13A and B; Fig.14A, B and F); apart from fibers **9)** of cerebellar WM (Fig.15A) and **10)** of pons (Fig.13D and Fig.15F).

By semi-quantitative analysis, we observed that the VEGF immunohistochemistry expression was more intense closer to the lesions. In vaccinated mice the VEGF expression was lower than non-vaccinated mice in all cerebellum. Blood vessels closer to the lesions also showed more intense immunoreactivity in non-vaccinated mice. Paradoxaly, in one non-vaccinated mouse was possible to observe meningitis without VEGF immunoreactivity (Fig.14G).

In hsp65 vaccinated mice there was not VEGF immunohistochemical expression in the meningitis (Fig.15C and D). Total immunoreactivity was lower in vaccinated mice than non-vaccinated as can bee seem summarized in Table 1.

Table 1. Expression of VEGF in the experimental model of neuron-TB.

Treatment	VEGF total	VEGF in the lesion
BCG	++	++
BCG + DNA-hsp65	+	-

By semi-quantitative analysis:
- : without immunoreactivity.
+ : few immunoreactivity.
++: moderate immunoreactivity.

Figure 13 (Resultados pag. 95). Immunohistochemistry VEGF expression in the experimetal model of neuro-TB. A. Tuberculous lesion intra-parenchyma (arrow), VEGF stained. VEGF immunoreactive meningitis (arrow head). Magnitude: 20X. **B.** Stained blood vessel (arrow) near lesion showed in **A**. Small blood vessels with low or absent VEGF immunoreactivity (arrow heads); 40X. **C.** Differential VEGF expression in the Purkinje cell layer. Purkinje cells stained (arrows) and non-stained (arrow heads); 60X. **D.** Neuron of pons; 60X. **Abreviatures: MOL,** molecular layer; **PCL,** Purkinje cell layer; **GL,** granular layer; **P,** pons.

Figure 14 (Resultados pag. 96). Immunohistochemistry VEGF expression in experimental cerebellar TB. A. Tuberculous lesion intra-parenchyma (arrow), VEGF stained. Magnitude: 10X. **B.** The same lesion showed in **A** (arrow; 60X). **C.** Neurons VEGF immunoreactive in cerebellar nuclei and pons, respectively (arrows); 10X. **D.** Neurons VEGF immunoreactive in the pons (idem **C;** 60X). **E.** Meningitis with VEGF stained cells (arrows). 10X. **F.** Meningitis (idem **E**; 20X). **G,** Infiltrate of lymphocytes without VEGF stain in a blood vessel (arrow); 40X. **H,** Blood vessel VEGF stained (arrow); 40X. **Abreviatures: MOL,** molecular layer; **PCL,** Purkinje cell layer; **GL,** granular layer; **WM,** white matter; **M,** meningitis; **CN,** cerebellar nuclei; **P,** pons.

Figure 15 (Resultados pag. 97). Immunohistochemistry VEGF expression in the experimental neuro-TB, with previous DNA-hsp65 immunization of mice, a new vaccine against TB. A. Cerebellar cortex. VEGF expression more evident in Purkinje cells, absent in granular layer and low in molecular layer. Immunoreactive fibers in white matter. Magnitude: 20X. **B.** VEGF immunoreactivity increased in the granular layer closer to the needle BCG injection route (arrow). 60X. **C.** Lymphocytic meningitis without VEGF stain between cerebellar lobes (arrow). 20X. **D.** Meningitis (arrow - idem **C**; 60X). **E.** Small blood vessels (arrow heads) in the molecular layer near to meningitis showed in **C** and **D**; **F.** Neurons VEGF stained in the pons. **Abreviatures: MOL,** molecular layer; **PCL,** Purkinje cell layer; **GL,** granular layer.

Discussion

The present study showed that BCG infection in mice cerebellum elicits increase in VEGF immunostaining in the infectious meningitis, tuberculomas and blood vessels in the challenged region. We also demonstrated that the VEGF increment dependent on BCG infection was abolished by the hsp65 pre-treatment in TBM lesions. These results extended the characterization of our mice neuro-TB model and provided additional insights to the pathogenesis of CNS tuberculosis by evidencing a positive relationship in the VEGF increment with the TB progression and by the potential preventive effectiveness of the hsp65 treatment on the neuro-TB development.

Immunohistochemical staining of autopsied tuberculous meningitis (TBM) brains demonstrated the presence of VEGF in inflammatory mononuclear cells of dense fibroconnective tissue both in the subarachnoid space and surrounding the vasculitis lesion (21). Increased levels of VEGF were also detected in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with active TBM and, these levels were decreased after corticosteroid therapy (10, 21) what indicates a pathological link between disease progression and VEGF concentration. Therefore, the inhibition of VEGF production can explain part of clinical effect of adjuvant TBM corticosteroid therapy (10). Increased VEGF levels were also detected in the serum of patients with pulmonary tuberculosis (1, 20).

In our exprerimental model of neuro-TB (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations) we observed increased immunohistochemical expression of VEGF in lesions of the parenchyma [tuberculomas (Fig.13A; Fig.14A and B)] and in the subaracnoid space [meningitis (Fig.13A; Fig.14E and F)] of mice cerebellum. We also observed VEGF staining in the

wall of blood vessels (Fig.13B; Fig.14B), cytoplasm of several cell types in cerebellum and pons.

In brain, receptors for VEGF have been localized to vascular endothelium, neurons, and glia. VEGF is upregulated after hypoxic injury to the brain and has been implicated in the blood-brain barrier breakdown associated with these conditions (4). Given its recently-described role as an inflammatory mediator, VEGF could also contribute to the cerebral inflammatory responses. In fact, the breakdown of the blood-brain barrier, leukocyte extravasation, and extracellular matrix deposition occur before vascular proliferation. Furthermore, administration of low doses of VEGF induces permeability and inflammation without appreciable vascular proliferation (5).

In mice immunized with hsp65 injections we observe the blocked of tuberculomas formation. The VEGF staining was also absent in the meningeal lesions in these animals (Fig.15C and D). However, there was not decrease in the VEGF staining in some cerebellar cells as Purkinje, glanglionar cells of nuclei of cerebellum and pons, and in the BCG injection site; in relation to non immunized mice. Therefore, the observed protective effect of the hsp65 vaccination in mycobacterial infection in mice cerebellum might be dependent on the reduction of VEGF expression in meningeal region.

Recently, it was identified a novel glycoprotein from *Urginea indica* bulbs which exerts a potent *in vivo* antitumor activity via antiangiogenic and proapoptotic action. The antiangiogenic activity of *U. indica* has been attributed to the decrease in VEGF expression (6), which agrees with our suggestion that VEGF has important participation in the disease progression, including tuberculosis, by its inflammatory and angiogenic response. Hence, the reduction in VEGF expression induced by hsp65 could be counteracting the

progression of the neuro-TB by preventing the increase in meningeal permeability observed in the BCG infection.

Microglial cells are target for VEGF, which induces its migration and proliferation (11). We have detected microglial cells in BCG infected cerebellum in related anatomical areas of VEGF staining, surrounding tuberculomas and meningitis (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations), which suggests that VEGF not only could contribute to angiogenic process in the cerebral lesion but also could participate in the associated microglial activation (11).

The variable natural history and accompanying clinical features of TBM hinders the diagnosis. Ziehl-Neelsen staining lacks sensitivity and culture results are often insufficiently timely to aid clinical judgment. New rapid diagnostic methods are incompletely evaluated, and many are not suitable for laboratories in low income countries. The duration of chemotherapy for TBM is unclear (three drugs administrated during nine months in Brazil, and four drugs administrated during twelve months in England) and the benefits of adjuvant corticosteroids remain in doubt. The only uncomfortable certainties lie in the fatal consequences of missed diagnoses and delayed treatment (26, 27). Although only further research will determine the exact nature of VEGF's role in neural-TB, our preliminary data indicate that VEGF plays a critical role in TB progression in CNS. Moreover, the neuro-TB experimental model used here could be useful to investigate mediators involved in the progression and prevention of tuberculosis infection in the CNS.

References

1. Alatas F, Alatas Ö, Metintas M, Özarslan A, Erginel S, Yilldirim H (2004) Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis. CHEST, 124:2156-2159.

2. Baldwin SL, D'Souza C, Roberts AD, Kelly BP, Frank AA, Lui MA, Ulmer JB, Huygen K, McMurray DM, Orme IM (1998) Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. Infect Immun, 66(6):2951-2959.

3. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clin Invest, 84(5):1470-1478.

4. Croll SD, Goodman JH, Scharfman HE (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. Adv Exp Med Biol, 548:57-68.

5. Croll SD, Ransohoff RM, Cai N, Zhang Q, Martin FJ, Wei T, Kasselman LJ, Kintner J, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (2004) VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. Exp Neurol, 187(2):388-402.

6. Deepak AV, Salimath BP (2006) Antiogenic and proapoptotic activity of a novel glycoprotein from *U. indica* is mediated by NF-κB and caspase activated DNase in ascites tumor model. Biochimie, 88:297-307.

7. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sorrel A, Manseau EJ, Van de Walter L, Senger D (1991) Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. J Exp Med, 174:1275-1278.

8. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 161:851-858.

9. Flamme I, Breier G, Risau W (1995) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receotor 2(flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embrio. Dev Biol, 169:699-712.

10. Flier MVan Der, Hoppenreijs S, Rensburg AJVan, Ruyken M, Kolk AHJ, Springer P, Hoepelman AIM, Geelen SPM, Kimpen JLL, Schoelman JF (2004) Vascular endothelial growth factor and blood-brain barrier disruption in tuberculous meningitis. The Ped Infect Dis J, 23(7):608-613.

11. Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R (2002) Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. J Neuroimunology, 132:93-98.

12. Gray F, Nordmann P (1997) Bacterial infections. In: Greenfield's Neuropathology, Graham DI, Lantos PL (eds.), volume 2, chapter 3, pp. 113-152, sixth edition, Arnold: London.

13. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. J Biol Chem, 267(36):26031-26037.

14. Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ, Silva CL (1994) Towards a DNA vaccine against tuberculosis. Vaccine, 12:1537-1540.

15. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE (1997-a) Protection against tuberculosis by plasmid DNA vaccine. Vaccine, 15:834-838.

16. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE (1997-b) DNA vaccines against tuberculosis. Immunol Cell Biol, 75(6):591-594.

17. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE (1997-c) Genetic vaccination against tuberculosis. Springer Semin Immunopathol, 19(2):161-173.

18. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL (1999) Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature, 400(15):269-271.

19. Lozes E, Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Vandenbussche P, Van Vooren JP, Drowart A, Ulmer JB, Liu MA (1997) Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. Vaccine, 15(8):830-833.

20. Matsuyama W, Hashigughi T, Matsumuro K, Iwami F, Hirotsu Y, Kuwabata M, Arimura K, Osame M (2000) Increased serum level of vascular endothelial growth factor in pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med, 162:1120-1122.

21. Matsuyama W, Hashigughi T, Umehara F, Matsuura E, Kawabata M, Arimura K, Maruiyama I, Osame M (2001) Expression of vascular endothelial growth factor in turberculous meningitis. J Neurol Sci, 186:75-79.

22. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF (1990) Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. Cancer Res, 15[50 (6)]:1774-1778.

23. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science, 25[219 (4587)]:983-985.

24. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. Cancer Res, 46:5629-5632.

25. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB (1996) Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nature Medicine, 2:888-892.

26. Thwaites G, Chau TTH, Mai NTH, Drobniewski F, McAdam K, Farrar J (2000) Tuberculous meningitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 68:289-299.

27. Thwaites GE, Hien TT (2005) Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. The Lancet Neurology, 4:160-170.

28. WHO (2006) Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing, WHO/HTM/STB/2006.362 (Geneva: World Helth Organization).

29. Young D, Dye C (2006) The development and impact of tuberculosis vaccines. Cell, 124:683-687.

30. Zhang J, Peng B, Xinming C (2005) Expressions of nuclear factor κB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. Clin Cancer Res, 11(20):7334-7343.

31. Zhu XJ, Venkataprasad N, Thangaraj HS, Hill M, Singh M, Ivanyi J, Vondermeier HM (1997) Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol, 158(12): 5921-5926.

AnexoVI.

J Neurosci

Expression of nuclear factor κB and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a murine model of neurotuberculosis.

Abstract

Tuberculosis (TB) is a serious illnes, which million people death each year. TB in central nervous system (CNS), as in others tissues, activates inflammatory cells, which produce or be influenced by soluble mediators. Several mediators are involved in molecular mechanisms of the infection and inflammation by mycobacteria, and the host response, such as NFκB and iNOS. NFκB is a cytoplasmic transcriptional factor migrates to cellular nucleus under stimuli. Its activation modulates iNOS expression. Macrophages *M. tuberculosis* resistance has been associated with iNOS expression. Nitric oxide (NO) is crucial in intercellular communication, modulating the synthesis of cytokines and modulation itself. Therefore, the objective here was to extent the characterization of our model of mice neuro-TB by describing the NFκB and iNOS participation in the Central Nervous System (CNS) disease. Mice C57BL6 were injected with 10^4 colony-forming units (cfu) of attenuated *Mycobacterium bovis* (BCG) in cerebellum. Naïve or saline injected mice were used as controls. One to six days; one, two, four and eigth weeks after injection, mice were perfused and brains were paraffin-embedded. Sections were incubated with goat anti-p65 (NFkB) or rabbit anti-iNOS - primary antibodies. Second antibodies used were rabbit anti-goat biotinylated and swine anti-rabbit, respectively. For detection we used an ABC kit and diaminobenzidine (DAB) as chromogen. We observed, increased production and activation of NFκB in the tuberculous lesions, and iNOS expression

restricted to tuberculous lesions. It demonstrated the involvement of these mediators in physiopathological mechanisms of TB.

keywords: NFκB, iNOS, tuberculosis, murine-model, central-nervous-system, meningitis.

Introduction

After decades of neglect, the immense public health impact of tuberculosis (TB) is now widely recognized (Young and Dye, 2006). The most severe form of TB is that involving the CNS. In TB meningitis (TBM), the host inflammatory response is an important factor in pathogenesis and clinical deterioration (Tsenova *et al.*, 1999). Reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* infection tends to be an early complication and HIV-infected patients with TB, which are at increased risk of TBM. The murine model has been a central tool for the elucidation of protective immune mechanisms that are essential for controlling *M. tuberculosis* infection (Beamer and Turner, 2005).

The NFκB family of transcription factors plays an important role in a large number of cellular process including immune response and inflammation, cellular development and differentiation. NFκB dimers are regulated by inhibitor IκB proteins. In most cells NFκB remains inactive as a complex with IκB. In response to a variety of extracellular signals, the IκB molecule is phosphorylated by IκB kinases, which leads to the ubiquitination and subsequent degradation of IκB by the proteosome machinery within the cell (Moorthy and Ghosh, 2002).

Nitric oxide (NO) subserves diverse physiologic roles in the nervous system and others organs. NO is produced from at least three different NO synthase (NOS) isoforms: immunologic NOS (iNOS), neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS)

(Furchgott and Zwadzki, 1980; Nathan and Hibbs, 1991; Bredt and Snyder, 1994; Marleta, 1994). Under bacterial infections occur increased NO production. This NO increased is attributable to cytokines mediated iNOS induction (Parratt, 1998), has been enzyme activation independent of calcio/calmodulin cellular levels (Xie *et al.*, 1982; Förstermann *et al.*, 1998). Human macrophages can kill *M. tuberculosis* by NO, suggesting that NO has direct or indirect antibacterial role in human TB (Chan *et al.*, 2001). However, increased NO production by iNOS has been associated to induction of lesions in response to inflammatory process (Xiong *et al.*, 1999). The production of reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates by innate immune cells is considered to be an effective host-defense mechanism against microbial pathogens (Chan *et al.*, 2001).

NO derived from nNOS in glia inhibits NFκB as NOS inhibitors enhance basal NFκB activation and transcriptionally regulates iNOS expression, and others NFκB regulated genes (Togashi *et al.*, 1997). In monocytes of TB patients there was a constitutive IκBα degradation that did not occur in non-TB patients (Toossi *et al.*, 1997).

The analysis of the NFκB and iNOS expression and development of a neuro-TB model (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations) could help to establish a relationship in the NFκB and iNOS increment, and NFκB activation, with the biochemical and morphological compromising in the neuro-TB development. Therefore, our objective here was to extent the characterization of our mice neuro-TB model by evaluating the relationship between NFκB and iNOS expression and TB disease.

Materials and Methods

Animals

Male C57BL6 mice weighing 40g were obtained from Department of Genetics (FMRP-USP) with 28 days old. Mice were housed in temperature-controlled rooms (22-25°C) and received water and food until use in the Department of Pharmacology (FMRP-USP).

Pathogen

Attenuated *Mycobacterium bovis* (BCG) diluted in saline, at the concentration of 10^4 colony-forming units (cfu).

Stereotaxic procedures

Briefly, anesthetized mice received the inoculums (25µl of BCG or saline) into the cerebellum, 0.5 mm lateral and 2mm posterior from the lambda and 2mm ventral from the skull.

Sacrifice

Mice were intracardiac perfused with paraphormaldeide solution (PF 4%) in phosphate saline buffer (PBS), one, two, three, four, five, six days or one, two, four and eight weeks after intra-cerebellar injection. Cerebella were processed and paraffin-embedded.

Diagnosis of neuro-TB

To confirm the diagnostic of tuberculosis we used Ziehl-Neelsen technique. Bacilli alcohol-acid resistants (BAARs) were observed by light microscopy.

Immunohistochemistry

Sections (8μm) were de-waxed in xylene, and hydrated through graded ethanol/water mixtures. Endogenous peroxidase activity was then blocked by incubating the sections with 5% H_2O_2 in PBS for 20 minutes. NFκB and iNOS immunoreactivity was enhanced by boiling the sections in 50mM Tris-HCl buffer, pH 9.5, in microwave for 10 minutes (Martins *et al.*, 1999). After cooling, sections were incubated in 50mM Tris-glycine buffer 0.1M, pH 7.4, for 30 minutes, to block aldheides groups. Then, the sections were incubated in blocking buffer [0.02M sodium phosphate buffer, pH 7.4, with 0.45M sodium chloride and Triton X-100 3% (New England Nuclear – B buffer), and dry milk no fat 5% (w/v) and inactivated donkey serum diluted 1:6 (v/v)] for 4 hours. After, sections were incubated over-night with primary antibody goat anti-p65 (NFκB – SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), diluted 1:20, or rabbit anti-iNOS (BIOMOL), diluted 1:200, in blocking buffer. Control sections were incubated with blocking buffer only, omitted primary antibody. After, sections were rinsed with B buffer. Then, sections were incubated in avidina solutions (DAKO), for 15 minutes, rinsed again in B buffer, and incubated in biotina solution (DAKO), for 15 minutes, and again rinsed in B buffer.

Primary antibodies was detected by biotinilated secondary antibody rabbit anti-goat E0466 (DAKO) diluted 1:100, or swine anti-rabbit E0353 (DAKO) diluted 1:200, in blocking buffer, for 1 hour. Sections were rinsed again in B buffer, and then in PBS. The Elite ABC-peroxydase kit (VECTOR) was used with detection system. The sections were

incubated for 1 hour and after rinsed in B buffer, and then in 50mM Tris-HCl pH 7.6 buffer. Sections were stained using H_2O_2 with 0.04mg/ml de 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Reaction was stoped after 10 minutes with Milli-Q water. Cellular nuclei were counterstained with Harris-Hematoxilin. Sections were dehidrated through graded ethanol/water mixtures, cleared in xylene and coverslipped with Permount (Fisher).

Results

1. Confirmation of neuro-TB diagnosis.

Bacilli alcohol-acid resistant (BAARs) were detected by Ziehl-Neelsen in BCG injected mice. Analysis was performed in light microscopy, where we observed clusters of BAARs in meningeal and parenchymal tuberculous lesions (not shown).

2. Expression of NF κB in the experimental model of neuro-TB.

The NFκB staining was detected one to six days, and one, two, four and eight weeks after BCG injection in mice cerebellum.

Localization of active NFκB (nuclear stain) in BCG injected mice, were: **1)** inflammatory lesions in subarachnoid space (meningitis) and **2)** parenchyma (tuberculomas); **3)** inflammatory cells in injected hemisphere closer to the lesions. The tuberculoma was characterized by large macrophages in the center's lesion surrounded by epithelioid and giant cells, lymphocytes and fibrosis of variable intensity. In the surrounding parenchyma there is usually gliosis. In meningitis, it was found typical epithelioid granuloma and marked vascular changes.

All cerebellar cellular types were NFκB stained in the cytoplasm, however, with low stain, except near to the lesions, which were strongly stained in nucleus and cytoplasm. Blood vessels were stained, mainly inside or near tuberculous lesions. Interneurons and fibers in the molecular layer (MOL) of cerebellum were more stained closer to the lesions. In the molecular

layer we observed dots stained in fibers around cerebellum, in all group studied (1-BCG injected mice; 2- saline injected mice; 3-naïve mice, without any injection). In the Purkinje cell layer (PCL), some cells were NFκB stained in cytoplasm and dendrites, but others cells did not are stain; Bergmamm cells were strongly stained in cellular body (cytoplasm) and process; apart from dots strongly stained in the ganglionar plexuses. Granular layer (GL) was stained in patch, with cells stained and cells did not stain, in cytoplasm. We observed cells stained in cytoplasm in the white matter.

In the firsties days of sacrifice after the BCG injection we observed: **1)** stained cells in cytoplasm and nucleus, in the inflammatory infiltrate of the subarachnoid space (meningitis; Fig.10B and I); **2)** vascular changes in the injected hemisphere (Fig.10E), with encephalitis in the adjacent parenchyma, when we compare with non-injected hemisphere, where we found typical normal cerebellar vascularization (Fig.10F); **3)** strong stain in the BCG injection site, in all cerebellar layers [interneurons and other cells spread surrounding the lesion (MOL), Purkinje cells and ganglionar plexuses (PCL), granular cells (GL), white matter cells (WM; Fig.10G)]; **4)** strong stain of Purkinje and Bergmamm cells (Fig.10H and J); **5)** blood vessels strongly stained (Fig.10K); **6)** patch staining in the granular layer (Fig.10L), in the cytoplasm of the granular cells.

In one mouse, sacrificed one week after BCG injection we observed one tuberculoma and meningitis adjacent in the injection site, showing cells and blood vessels stained in cellular nucleus and cytoplasm (Fig.11A) we detected stained thinny blood vessels in the adjacent white matter (Fig.11B).There were stain surrounding the Purkinje cells, probably process of basket and Bergmamm cells. We observed some blood vessels in the white matter with perivascular cells strongly stained in the nucleus and cytoplasm

(lymphocytes). In mice sacrificed two weeks after BCG injection we observed thinly layer of meningitis strongly stained spread for all cerebellum (Fig.11C). In mice sacrificed four weeks after BCG injection, we observed extensive meningitis with strongly stained cells in the nucleus and cytoplasm (Fig.11G). We observed tuberculomas, strongly stained in the nucleus and cytoplasm (Fig.11E and F). In the needle route, and adjacent parenchyma, we can observe stained cells. In mice sacrificed eight weeks after BCG injection, we observed extensive meningitis with strongly stained cells in the nucleus and cytoplasm (Fig.11H) and spread stained cells in the adjacent parenchyma. In one mouse there was an extensive infiltrate of macrophages, lymphocytes, ephithelioid cells didn't organized how typical granuloma yet, one outline of multilobular tuberculoma, with distrophic calcification focuses, BAARs and blood vessels inside the lesion (Fig.11J).In the injected hemisphere, we can observe stained cells, in the nucleus and cytoplasm, in the granular layer and white matter (Fig.11K and L). By semi-quantitative analysis we did not observe significant differences in the NFκB immunohistochemical expression in the periods studied.

In the saline injected mice group, we observed: **1)** increased staining in the injection site in the firsties days after saline injection, seemingly in the cytoplasm, without evident inflammatory process (Fig.10C); **2)** moderate staining surrounding the lesions, and without stain in these nodular lesions conteining aggregate macrophagic, with large and vacuolar cytoplasms in the subcortical white matter and BAARs did not detect, observed in one mouse sacrificed one week (Fig.11D) and other four weeks after saline injection; **3)** cortical changes in all studied periods after saline injection; **4)** increased stain of ganglionar plexuses in the site of saline injection; **5)** the route of needle was visible in one mouse sacrificed eight weeks after saline injection, however, there was not increased stain (Fig.11I), except by dots stained in the PCL near the route of needle.

The majority of saline injected mice did not show stain, only basal staining like those naïve mice. Naïve mice (without any treatment) showed similar stain that distant places of lesions in BCG or saline injected mice.

3. Expression of iNOS in the experimental model of neuro-TB.

The iNOS immunorreactivity was detected one, two, four and eight weeks after BCG injection in mice cerebellum.

The iNOS stain was strong and restrict to the tuberculous lesions in the parenchyma (tuberculomas; Fig.12G) and of the subarachnoid space (meningitis; Fig.12A, D and E) in BCG injected mice. Except by a differential stain, seemingly basal, observed by semiquantitative analysis, of: **1)** Cellular nucleus of Purkinje cells (Fig.12J); **2)** cellular nucleus of cells of cerebellar nuclei (Fig.12L); **3)** nucleus of ganglionar cells of pons; **4)** coroid plexus; **5)** ependimal cells. These stain were observed in BCG (Fig.12A, D, E, G, J, K and L) or saline (Fig.12B, C, F and H) injected mice and in naïve mice (Fig.12I).

We observed one inflammatory cell (probably one macrophage) strongly iNOS stained, crossing a blood vessel in the granular layer of the cerebellar cortex (Fig.12K).

Seemingly, iNOS immunorreactivity is more extensive and strong from fourth week after BCG injection (Fig.12D and E). However, the staining has been observing since the first week after BCG injection (Fig.12A).

In saline injected mice we observed the route of the needle (Fig.12B, F and H) and nodular lesions conteining macrophages (Fig.12C), where there not was iNOS immunorreactivity.

Figure 10. (Resultados pag. 86) Immunohistochemical NFκB expression in this CNS TB model in mice. Mice cerebella sacrificed: 1 (**B**, **E** e **F**), 2 (**G** e **H**), 3 (**I**), 4 (**J**), 5 (**K**) and 6 (**L**) days after BCG injection; 1 day after saline injection (**C**). Naïve mouse cerebellum (without treatment): **A** and **D**. **A.** Control, with primary antibody omission. Any stain was not observed. **B.** Lymphocytic infiltrate of subarachnoid space with blood vessels (arrow heads) and cells (nucleus) stained (arrows). **C.** Immunoreactive cells in the white matter (arrow) in mouse saline injected. Any inflammatory response was not observed in the site of injection. **D.** Basal NFκB immunoreactivity in naïve mouse. **E.** Increased vascularization, with increased immunoreactivity, in blood vessels of BCG injected cerebellar hemisphere, when we compare with opposite hemisphere in **F** (arrows in **E** and **F**). We can observe the lesion in the parenchyma (**E**, arrow head) in the BCG injected hemisphere. **G.** Increased stain in the injection site. **H.** Increased stain near to injection site, mainly in the Purkinje cell layer (PCL) and molecular layer (MOL) fibers. **I.** Increased stained cells in meningitis, some cellular nucleus stained (arrow heads indicate MOL limits). **J.** Purkinje cell (arrow) and other cell (probably, Bergmamm cell – arrow head) dendrites and process stained in the MOL. **K.** Blood vessel immunoreactive in the white matter of BCG injected hemisphere. **L.** We can observe granular layer patch staining.

Abreviatures: MOL, molecular layer; **PCL,** Purkinje cell layer; **GL,** granular layer; **WM,** white matter.

Bars: B, **H**, **I**, **J** and **K**: 10μm; **A**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G** and **L**: 50 μm.

Figure 11. (Resultados pag. 88) Immunohistochemical NFκB expression in this neuro-TB model. Mice cerebella sacrificed: 1 (**A** and **B**), 2 (**C**), 4 (**E**, **F** and **G**) and 8 (**H**, **J**, **K**

and **L**) weeks, after BCG injection; 1 (**D**) and 8 (**I**) weeks after saline injection. **A, E and F.** Cells intensely immunoreactive (nucleus and cytoplasm) inside and around tuberculomas and blood vessels (between arrow heads). Strong stained cells in meningitis, in the nucleus and cytoplasm (arrows). B. Thin blood vessels (arrow heads) and thick blood vessels (arrows), NFκB stained. **C, G and H.** Meningitis with stained cells in the nucleus and cytoplasm (between arrow heads). **D.** Nodular lesion in parenchyma, observed in a saline injected mouse. Any important increased stain was not observed. Seemingly, increased staining cells showed cytoplasmic stain. **I.** Saline injection route needle (arrow) without staining in the tissue adjacent. **J.** Cells intensely immunoreactive (nucleus and cytoplasm) inside and around an outline of multiple tuberculomas and blood vessels (between arrow heads). Strong stained cells in meningitis, in the nucleus and cytoplasm (arrows). **K.** Immunoreactive cells (between arrow heads) bellow the lesion showed in **J** (arrow). **L.** Cells in the granular layer, immunoreactive in the nucleus and cytoplasm, in the injection site (arrow heads).

Bars: B and **L** 10μm; **A**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J** and **K** 50 μm.

Figure 12. (Resultados pag. 81) Immunohistochemical iNOS expression in neuro-TB model. A. Meningitis iNOS stained in the BCG injection site (between arrows). **B.** Immunoreactivity absent in the saline injection site (arrow: needle route). **C.** Nodular lesion without iNOS stain (arrow), in saline injected mouse. **D and E.** Extensive iNOS stained meningitis (between arrows), in BCG injected mouse. **F.** Needle route (arrow), without iNOS stain in saline injected mouse. **G.** Adjacent section to extensive outline tuberculoma induced by BCG (observed by HE), showing lesion strongly iNOS stained (between arrows). **H.** Cortical changes without iNOS stain (arrow: saline injection needle

route). **I.** Naïve mice (without treatment). Basal iNOS stain. **J.** Purkinje cell layer. Basal iNOS stain in the nucleus of Purkinje cells, in BCG injected mice. **K.** Seemingly, one inflammatory cell iNOS stained (probably macrophage recruited of blood), crossing a blood vessel (arrow). BCG injected mouse. **L.** iNOS nucleus of ganglionar cells in cerebellar nuclei stained, in BCG injected mice.

Sacrificed mice: 1 week after BCG injection (**A**); 1 week after saline injection (**B**); 2 weeks after saline injection (**C**); 4 weeks after BCG injection (**D**, **E**, **J** and **L**); 4 weeks after saline injection (**F**); 8 weeks after BCG injection (**G** and **K**); 8 weeks after saline injection (**H**).

Abreviatures: MOL, molecular layer; **PCL,** Purkinje cell layer; **GL,** granular layer.

Bars: 50μm in **A**, **B**, **C**, **E**, **F**, **G**, **H** and **I**; 10μm in **D**, **J**, **K** and **L**.

Discussion

Here we demonstrate immunohistochemical characterization of NFκB and iNOS in an experimental model of neuro-TB. This murine model was established by presence of meningitis, tuberculomas, microglial recruitment (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations) and characterized by increased VEGF expression (Zucchi *et al.*, unpublished observations).

We observed NFκB increased expression and its activation in the site of BCG injection and iNOS expression restricted to the tuberculous lesions. These expressions were coincident with the activation of microglia and astrocytes, in the same experimental neuron-TB model (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations).

In human microglia and astrocytes infected with *M. tuberculosis* H37Rv, cytokine and chemokine expression was examined with and without dexamethasone treatment (Rock *et al.*, 2005). Microglia were the principal cells infected by tubercle bacilli (76% infected microglia against 15% infected astrocytes), which elicited robust amounts of several cytokines and chemokines. The infection has been associated with microglial response in increased cytokines and chemokines production (TNF-α, IL-6, IL-1β, CCL2, CCL5 and CXCL10, in a time-dependent manner). In marked contrast to microglia, astrocytes produce moderate amounts of only a single chemokine, CXCL10. The mediator production was suppressed by dexamethasone treatment. The results of this study support the concept that microglia play an important role in neuropathogenesis of tuberculosis and that dexamethasone could operate via modulation of the production of proinflammatory cytokines and chemokines by these brains macrophages (Rock *et al.*, 2005). Here, we observed increased NFκB and iNOS, factors involved in sinalization and production of cytokines. Increased VEGF expression also was detected (Zucchi *et al.*, unpublished observations) and microglial recruitment (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations) in others studies of our group.

NFκB activation by cytokines or oxidative stress requires IκB degradation, the cytoplasmic inhibitor of NFκB, or p105 clivage (MOORTHY AND GOSH, 2002). Free NFκB dimers translocate them to the nucleus and regulate expression of several genes encoding cytokines, chemokines, growth factors, adhesion molecules, and some enzyme. Gene expression of these factors has fundamental role in immune and inflammatory responses, cancer development, embrionic development, limphoid diferentiation and apoptosis (Blackwell and Christman, 1997; Siebenlist, *et al.*, 1994; Lessar *et al.* 1994;

Helbig *et al.*, 2003). NFκB activation also regulates several crucial genes to angiogenic process as iNOS, cicloxigenase-2, IL-6, IL-8, plasminogenic activator type urokinase, and VEGF, which contain κB ligants sites in them promoter regions (Bharti and Aggarwal, 2002). Rifampicin is an antibiotic that constitutes an essential part of pulmonary TB therapy, have the potential to block TNF-α-induced NFκB activation (Pahlevan *et al.*, 2002).

We observed NFκB stain in the nucleus and cytoplasm of cells in the tuberculous lesions [meningeal (Fig.10B and I; Fig.11A, C, E, F, G, H, J, K and L), or parenchymal (Fig.11A, E, F and J)], and in the adjacent parenchyma (Fig.11K and L) Subcellular NFκB localization indicates its activation state (nuclear localization) or latence (cytoplasmic localization). Furthermore, increased expression of NFκB in tuberculous lesions, we observed NFκB stain: in the MOL, PCL (Fig.10H and J), GL and WM. This pattern of staining was observed in the three experimental groups (BCG, saline and naïve), in non lesioned places, showing basal NFκB staining in the mice cerebellum (Fig.10 and 11).

Pathogens intracellular resistance, including *M. tuberculosis*, seems to be associated to iNOS expression in macrophages, suggest that NO, direct or indirectly, had an antimycobacterial role in human TB (Mombaerts *et al.*, 1993; Laroux *et al.*, 2001). However, NO is associated many times to enhanced inflammatory process and cellular lesion (Xiong *et al.*, 1999). NO derived from nNOS in astrocytes can inhibit NFκB activation and iNOS expression (Togashi *et al.*, 1997), evidencing then, an autocrine regulation system in glial cells (Colasanti and Persichini, 2000).

In this experimental model of neuro-TB, we observed strong iNOS stain, restricted to tuberculous lesions in the subaracnoid space (meningitis; Fig.12A, D and E) and

tuberculous lesions in the parenchyma (tuberculomas; Fig.12G) of BCG injected mice in all periods studied. In nodular lesions, found in saline injected mice (Fig.12C) there not was iNOS stain. We observed one inflammatory cell (probably one macrophage) strongly iNOS stained, crossing one blood vessel in the GL of cerebellar cortex (Fig.12K).

We observe low iNOS stain, seemingly characterizing constitutive expression, in: **1)** nucleus of Purkinje cells (Fig.12J); **2)** nucleus of cells of cerebellar nuclei (Fig.12L); **3)** cellular nucleus of ganglionar cells of pons; **4)** choroid plexus; **5)** ependymal cells. These expression were observed in BCG (Fig.12A, D, E, G, J, K and L) or saline (Fig.12B, C, F and H) injected mice and in naïve mice (Fig.12I). Shin *et al.* (2000) analysed the iNOS immunohistochemical expression in goat with natural listeriosis, and used normal goat as control. Their results suggest that iNOS is constitutively expressed in brain cells, because they found neuronal and glial cells stained in control group. These observations coincide with our results. We also observed some iNOS-stained cells in naïve mice, saline injected mice, and in sites distant of injection, in BCG injected mice.

iNOS knockout mice ($iNOS^{-}/^{-}$) play high risk of dissemination and mortality by intavenous TB infection (McMicking *et al.*, 1997). *In vitro*, NO play essential role in kill *M. tuberculosis* in mononuclear phagocytes in mice (Fang, 1999). NO can kill TB bacilli *in vitro* with high power comparable with chemotherapy.

NO exposition in low concentrations is capable to eliminate more than 99% of *M. tuberculosis* in culture (Long *et al.*, 1999). NO and other RNI (reactives nitrogem intermediates) can modify bacterial DNA, proteins and lipids of microbial surface. Other potential mechanism to kill *M. tuberculosis* by NO include its interaction with acessories proteins target, as iron sulfurous groups, heme groups, tiois, aromatic or fenol residues,

tirosil radicals, and amines, resulting in enzymatic inactivation or others protein malfunctions. Apoptosis of *M. tuberculosis* infected macrophages induced by NO is other way to eliminate the bacteria (Chan *et al.*, 2001). NO seems play an important role in granuloma formation in animal models. Choi *et al.* (2002) analyzed immunohistochemical expression of nitrotyrosine and the NOS isoforms in human pulmonary TB. This descriptive study provides evidence that in human TB the NOS isoenzymes and NO are present in specialized areas of tuberculous granulomas; their precise role in human TB remains to be determined.

Evidences indicated that increased NFκB and iNOS expression are fundamental components in the angiogenic cascade, wich contribute to angiogenic phenomenon by VEGF regulation in tumors. Microvessel density had significant correlations with NFκB, iNOS and VEGF expression in adenoide cystic carcinoma (ACC) of salivary glands (Zhang *et al.*, 2005). Here we observed increased vascular capilars near the tuberculous lesion NFκB stained, and in other study VEGF stained (F. C. R. Zucchi, A. M. C. Tsanaclis, C. L. Silva, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, W. A. Prado, Q. Moura Jr, G. Sébire, O. M. Takayanagui, unpublished observations) in this neuro-TB model.

Since angiogenesis inhibitors are heterogeneous in origin and potency, and their growing list includes many products with a different function it would be of benefit to determine the key molecule produced wich stimulate environment to produce secreting different cytokines such as VEGF, IL-6 and MCP-1. This molecule could be activated NFκB (Stifter, 2006). Furthermore, in the brain activated microglial cells play the role to secret several cytokines (Dasgupta *et al.*, 2003; Liu and Hong, 2002). We have detected microglial cells in BCG infected cerebellum in related anatomical areas of VEGF (Zucchi *et al.*, unpublished observations), NFκB and iNOS staining, and surrounding tuberculomas

and meningitis (F. C. R. Zucchi, A. Pelegrini-da-Silva, L. S. Neder, C. L. Silva, O. M. Takayanagui, unpublished observations).

Zhang *et al.* (2005) desccribed NFκB nuclear stain (indicating active NFκB) in ACC cells. We also detected active NFκB in the tuberculous lesions (meningitis and tuberculomas) and adjacent cerebellar parenchyma. This autors detected increased iNOS expression in ACC cells. We also observe strong iNOS expression in meningitis and tuberculomas. Furthermore, was detected incresead VEGF stain in ACC cells (Zhang *et al.*, 2005) and in meningitis and tuberculomas in our other study of this experimental model of TB in the CNS.

Uncertainty and doubt dominate all aspects of tuberculous meningitis. The only uncomfortable certainties lie in the fatal consequences of missed diagnoses and delayed treatment (Thwaites *et al.*, 2000; Thwaites and Hien, 2005). This study demonstrated the increased expression of NFκB (and its activation) and iNOS in mice injected with BCG as compared to the controls. Therefore, this methodology of an experimental model of TB in the CNS opens news perspectives for the study of factors involved in the progression of the disease.

References

Beamer GL, Turner J (2005) Murine models of susceptibility to tuberculosis. Arch Immunol Ther Ex 53:469-483.

Bharti AC, Aggarwal BB (2002) Nuclear factor kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. Biochem Pharmacol 64(5-6): 883-888.

Blackwell TS, Christman JW (1997) The role of nuclear factor-κB in cytokine gene regulation. Am J Resp Cell Mol Biol 17:3-9.

Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem 63:175-195.

Chan ED, Chan J, Schluger NW (2001) What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Am J Respir Cell Mol Biol 25:606-612.

Choi H-S, Rai PR, Chu HW, Cool C, Chan ED (2002) Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. Am J Resp Crit Care Med 166:178-186.

Colasanti M, Persichini T (2000) Nitric oxide: an inhibitor of NF-κB/Rel system in glial cells. Brain Res Bull 52(3):155-161.

Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K (2003) Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells. J Biol Chem 278(25):22424-22431.

Fang FC (1999) An overview of nitric oxide in infection. In: Nitric oxide and infection (Fang FC, ed), pp3-9. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). FASEB J 12:773-788.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288:373-376.

Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kummar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H (2003) NF-kappaB promotes breast cancer cell

migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. JBC 278(24):21631-21638.

Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB (2001) Role of nitric oxide in inflammation. Acta Physiol Scand 173:113-118.

Lessard L, Mes-Masson A-M, Lamarre L, Wall L, Lattouf J-B, Saad F (2003) NF-κB nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. BJU Int 91:417-420.

Liu B, Hong J-S (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. J Pharmacol Exp Ther 304(1):1-7.

Long R, Light B, Talbot A (1999) Micobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. Antimicrob Agents Ch 43:403-405.

Marletta MA (1994) Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. Cell 78:927-930.

Martins AR, Dias MM, Vasconcelos TM, Caldo H, Costa MCR, Chimelli L, Larson RE (1999) Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. J Neurosci Meth 92:25-29.

McMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF (1997) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis PNAS-USA 94:5243-5248.

Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH (1993) Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. Nature Sep 2;365(6441):53-56.

Moorthy AK, Ghosh G (2003) p105.Ikappa Bgamma and prototypical Ikappa Bs use a similar mechanism to bind but a different mechanism to regulate the subcelular localization of NF-kappaB. JBC 278(1):556-566

Nathan CF, Hibbs JB-Jr (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol 3(1):65-70.

Pahlevan AA, Wright DJM, Bradley L, Smith C, Foxwell BMJ (2002) Potential of rifamides to inhibit TNF-induced NF-κB activation. J Antimicrob Chemoth 49:531-534.

Parrat JR (1998) Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. J Antimicrob Chemoth Jan;41 Suppl A:31-39.

Rock RB, Hu S, Gekker G, Sheng WS, May B, Kapur V, Peterson PK (2005) *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine and chemokine expression by human microglia and astrocytes: effects of dexamethasone. J Infect Dis 192(15) Dec:2054-2058.

Shin T, Weinstock D, Castro MD, Acland H, Walter M, Kim HY, Purchase HG (2000) Immunohistochemical study of constitutive neuronal and inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of goat with natural listeriosis. J Vet Med Sci 1(2):77-80.

Siebenlist U, Franzono G, Brown K (1994) Structure, regulation, and function of NF-κB. Annu Rev Cell Biol 10:405-455.

Stifter S (2006) The role of nuclear factor κB on angiogenesis regulation through monocyte chemotatic protein-1 in myeloma. Med Hypotheses, 66: 384-386.

Thwaites G, Chau TTH, Mai NTH, Drobniewski F, McAdam K, Farrar J (2000) Tuberculous meningitis. J Neurol Neurosur Ps, 68: 289-299.

Thwaites GE, Hien TT (2005) Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. Lancet Neurol, 4: 160-170.

Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL (1997) Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor κB activity and imunologic (tipeII) nitric oxide synthase expression. PNAS 94:2676-2680.

Toossi Z, Hamilton BD, Phillips MH, Averill LE, Ellner JJ, Salvekar A (1997) Regulation of nuclear factor-kappa B and its inhibitor I kappa B-alpha/MAD-3 in monocytes by *Mycobacterium tuberculosis* and during human tuberculosis. J Immunol 159(8):4109-4116.

Tsenova L, Bergtold A, Freedman VH, Young RA, Kaplan G (1999) Tumor necrosis factor alpha is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. PNAS, 96: 5657-5662.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1982) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science 256:225-228.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ (1999) Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. J Immunol 162:445-452.

Young D, Dye C (2006) The development and impact of tuberculosis vaccines. Cell 124: 683-687.

Zhang J, Peng B, Xinming C (2005) Expressions of nuclear factor κB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. Clin Cancer Res 11(20): 7334-7343.