



**COPPE/UFRJ**

ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS PARA ESTUDO MORFOLÓGICO DE  
MICOBACTÉRIAS

Clara Tereza dos Santos Lima

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientadora: Verginia Reis Crispim

Rio de Janeiro

Julho de 2009

ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS PARA ESTUDO MORFOLÓGICO DE  
MICOBACTÉRIAS

Clara Tereza dos Santos Lima

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

---

Prof<sup>ª</sup>. Verginia Reis Crispim, DSc.

---

Prof. Ademir Xavier da Silva, DSc.

---

Prof. Luis Antonio Rosa, DSc.

---

Prof. Rafael Duarte da Silva, DSc.

---

Prof<sup>ª</sup>. Eliana Flavia Camporese Sérvulo, DSc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JULHO DE 2009

Lima, Clara Tereza dos Santos

Ensaio Neutronográfico para Estudo Morfológico de Micobactérias/Clara Tereza dos Santos Lima. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XV, 87 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Verginia Reis Crispim

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2009.

Referencias Bibliográficas: p. 77-87.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Neutronografia. I. Crispim, Verginia Reis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear III. Título.

*Dedico esse trabalho ao meu marido, meus filhos, meus pais e aos meus irmãos,  
minhas razões de viver.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/ UFRJ pela oportunidade na realização desse sonho e, principalmente, pela aprendizagem proporcionada.*

*Ao CNPq e a CAPES pelo fomento dessa pesquisa.*

*A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Verginia Reis Crispim pela confiança, orientação e empenho na obtenção de todos os recursos necessários para esta pesquisa.*

*Ao Laboratório de Micobactéria/IMPPG/CCS/UFRJ, a Prof<sup>ra</sup>. Leila de Souza Fonseca e ao Prof. Rafael Silva Duarte que, gentilmente, disponibilizaram os recursos técnicos e científicos do laboratório para a realização desse trabalho e, em especial, ao biólogo Marlei Gomes da Silva, pelas sugestões, discussões e por ter me guiado nesse fantástico mundo das micobactérias.*

*Ao Prof. Gilberto Weissmuller do Laboratório de Física Biológica/IBCCF/CCS/UFRJ por disponibilizar o Microscópio de Força Atômica e ao colega Alexandre Bernardino Pinto Jorge pela operação do equipamento.*

*Ao Prof. Marcio Nogueira de Souza do Laboratório de Instrumentação Biomédica/COPPE/UFRJ, que gentilmente permitiu o uso da Câmara de Eletroporação e a mestranda Mariana Dias da Silva pela ajuda dispensada.*

*Ao Instituto de Engenharia Nuclear/CNEN, na pessoa do senhor Carlos A. C. Renke e a equipe de operação do Reator Argonauta, principalmente, aos colegas Francisco Ferreira, André Luiz, Marco Aurélio e Flávio.*

*Aos colegas do Programa de Engenharia Nuclear/COPPE/ UFRJ.*

*A Tânia R.M. Moraes, Josevalda L. Noronha, Liliane, Reginaldo, Washington e Susana, funcionários do corpo administrativo do PEN/COPPE/UFRJ.*

*Finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS PARA ESTUDO MORFOLÓGICO DE MICOBACTÉRIAS

Clara Tereza dos Santos Lima

Julho/2009

Orientadora: Verginia Reis Crispim

Programa: Engenharia Nuclear

Com base nos dados alarmantes sobre a disseminação da tuberculose, divulgados pela Organização Mundial de Saúde, esta pesquisa visou à caracterização morfológica e a quantificação de bacilos em amostras cultivadas e clínicas (secreções), por meio de imagens neutronográficas de bactérias do gênero *Mycobacterium*, em especial da *Mycobacterium tuberculosis*, num menor tempo de diagnóstico, em relação ao requerido pelas técnicas de baciloscopia e de cultura, utilizadas em laboratórios de análises clínicas. As amostras foram dopadas com boro-10, depositadas sobre lâminas do detector de traços nucleares, CR-39, que foram expostas ao feixe de nêutrons térmicos provenientes do canal de irradiação J-9 do reator Argonauta, IEN/CNEN. Posteriormente, os detectores foram revelados em solução de NaOH. Acredita-se que questões relacionadas à aderência e/ou à inserção do boro-10 nos microrganismos não permitiram a obtenção de imagens neutronográficas conclusivas. Entretanto, o uso de novos compostos de boro, que atuem como carreadores para o bacilo, poderá resolver essa questão.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

NEUTRON RADIOGRAPHICS ASSAYS FOR MORPHOLOGICAL STUDY OF  
MYCOBACTERIA

Clara Tereza dos Santos Lima

July/2009

Advisors: Verginia Reis Crispim

Department: Nuclear Engineering

The World Health Organization has divulgated alarming data on the spread of tuberculosis. This research aimed at characterizing and quantifying bacilli in cultivated and clinical (secretion) samples through neutron radiographic images of bacteria of the genus *Mycobacterium*, especially *Mycobacterium tuberculosis* in a shorter time diagnosis in relation to the culture and sputum smear techniques commonly used in clinical analysis laboratories. The samples were doped with boron-10, deposited on CR-39 solid stage nuclear track detectors and then exposed to thermal neutron flux from J-9 irradiation channel of Argonaut nuclear reactor of Nuclear Engineering Institute (IEN) of the National Commission of Nuclear Energy (CNEN). Afterwards, the detectors were etched in NaOH solution. It seems that adherence and/or insertion of boron-10 in the microorganisms did not allow conclusive neutron radiographic image acquisition. Nevertheless, boron compounds that act as bacilli carriers may be used to solve this issue.

# SUMÁRIO

<b>Capítulo I - Introdução</b>	01
I.1 – Generalidades .....	01
I.1.1 – Aspectos da Neutronografia.....	01
I.1.2 – Aspectos da Microbiologia.....	02
I.2 – Motivação.....	03
I.3 – Objetivos e relevância do trabalho .....	04
I.3.1 – Objetivos específicos da pesquisa.....	05
I.4 – Desenvolvimento Histórico.....	06
I.4.1 – Neutronografia .....	06
I.4.2 – Detectores em estado sólido de traços nucleares.....	08
I.4.3– Carreadores de boro-10 .....	10
I.4.4 – Eletroporação ou Eletropermeabilização .....	11
I.4.5 – Tuberculose: origem num passado remoto.....	11
<b>Capítulo II - Fundamentos Teóricos</b>	19
II.1 – O nêutron .....	19
II.1.1 – Energia dos nêutrons.....	19
II.1.2 – Interação dos nêutrons com a matéria .....	20
II.2 – Neutronografia (NR) – Considerações Gerais.....	22
II.2.1 – Fontes de nêutrons para Neutronografia .....	22
II.2.2 – Conversor de nêutrons .....	24
II.2.3 – Técnicas de exposição neutronográfica .....	25
II.3 – Detectores em estado sólido de traços nucleares.....	26



II.3.1 – Formação dos traços.....	27
II.3.2 – Processo de revelação dos traços nucleares.....	28
II.3.3 – O ângulo crítico de revelação do traço .....	30
II.4 – Micobactérias .....	31
II.4.1 – Taxonomia e principais características das micobactérias.....	31
II.4.2 – Estrutura celular das micobactérias.....	33
II.4.3 – Característica tintorial das micobactérias.....	37
II.4.4 – Crescimento e curva de crescimento micobacteriano .....	38
II.4.4.1 – Crescimento de culturas micobacteriana .....	38
II.4.4.2 – Curva de crescimento .....	38
II.5 – Métodos Convencionais de Diagnósticos .....	39
II.6 – Tuberculose.....	41
II.6.1–Transmissão da doença .....	41
 <b>Capítulo III - Metodologia</b>	 45
III.1 – Cultura micobacteriana e armazenamento .....	45
III.2 – Quantificação do número de bacilos e diluições decimais .....	46
III.3 – Método de esterilização .....	46
III.4 – Conversor de nêutrons e dopagem com boro-10.....	47
III.5 – Arranjos neutrongráficos e condições de irradiação.....	48
III.6 – Revelação dos traços latentes .....	50
III.7 – Visualização das imagens no detector SSNTD.....	50
III.8 – Procedimentos para coloração pelo método de Ziehl-Neelsen e Kinyoun...	50
III.9 – Procedimentos para uso de suspensões com fucsina fenicada e boro-10.....	52
III.10 – Preparação da suspensão de micobactérias com tween-80.....	52

III.11 – Procedimento para o uso da D-cicloserina.....	53
III.12– Procedimento para o cultivo da <i>M. massiliense</i> sobre a lâmina de CR-39..	53
<b>Capítulo IV - Resultado e Discussão</b>	<b>54</b>
IV.1 – Esterilização.....	55
IV.2 – Uso da fucsina fenicada e boro-10.....	57
IV.3 – Emprego do tween -80 na suspensão de micobactérias.....	57
IV.4 – Emprego da D-cicloserina na suspensão de micobactérias.....	58
IV.5 – Uso do xilol na suspensão de micobactérias.....	59
IV.6 – Traços versus tempo de revelação.....	60
IV.7 – Aderência dos bacilos nas lâminas e a interferência do hipoclorito de sódio	62
IV.8 – Procedimentos alternativos para a adesão bacilo ao CR-39	63
IV.9 – Aderência e transporte do boro-10 no bacilo	65
IV.10 – Dopagem do bacilo com borofenilalanina (BPA)	68
IV.11 – Eletroporação de <i>M. fortuitum</i> para inserção do boro-10	70
<b>Capítulo V - Conclusões</b>	<b>74</b>
<b>Referência Bibliográfica</b>	<b>77</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>xv</b>

## Índice de Figuras

- Figura II.1** – Principais componentes de uma NR obtida pelo método direto de exposição 22
- Figura II.2** – Gráfico da seção de choque (b) versus energia dos nêutrons (eV) para o isótopo  $^{10}\text{B}$  25
- Figura II.3** – Imagem de SSNTD, do tipo CR-39, sem registro de traços nucleares 26
- Figura II.4** Vista lateral de um traço revelado, onde o princípio de Huygens é aplicado para descrever a formação de cones 28
- Figura II.5** – Visão lateral da geometria de um traço revelado: (a) forma cônica para  $V_t > V_g$  para partículas com incidência oblíqua e normal a superfície do detector; (b) forma cilíndrica para  $V_t \gg V_g$  para partículas com incidência oblíqua e normal a superfície do detector 29
- Figura II.6** – Imagens de traços de partículas alfa no detector CR-39 PM355, após o processo químico de revelação: a) traços isolados e traços sobrepostos com incidência normal a superfície; b) traço com incidência oblíqua em relação à superfície, nas condições de tempo de revelação de 60 minutos e temperatura de revelação  $90^\circ\text{C}$  29
- Figura II.7** – Condições geométricas de revelação de um traço nuclear: a) se  $\phi < \phi_c$  :  $V_g > V_t \sin\phi$ , o traço não é revelado; b) se  $\phi = \phi_c$  :  $V_g = V_t \sin\phi$ , o traço não é revelado; c) se  $\phi > \phi_c$  :  $V_g < V_t \sin\phi$ ; o traço é revelado 30
- Figura II.8** – Esquema da estrutura celular de uma micobactéria 33
- Figura II.9** – a) símbolo do fosfolipídio b) membrana citoplasmática conforme o modelo de mosaico semi-fluido 35

<b>Figura II.10</b> – Parede celular de uma micobactéria com base no modelo proposto por Minniko, em 1982 (NIEDERWEIS, 2008).	36
<b>Figura II.11</b> – Esfregação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> submetida a Coloração de Ziehl-Neelsen (rosa forte)	37
<b>Figura II. 12</b> – Curva de crescimento bacteriano típico	39
<b>Figura II.13</b> – Cultura bacteriana em meio de cultura LJ, mostrando colônias de <i>M. tuberculosis</i>	41
<b>Figura II.14</b> – Esquema de transmissão da tuberculose	42
<b>Figura II.15</b> – Morfologia de uma lesão granulomatosa	43
<b>Figura III.1</b> – Diagrama representativo do método da diluições decimais.	46
<b>Figura III.2</b> – Esquema da montagem experimental do conjunto amostrador e da irradiação	48
<b>Figura III.3</b> – Desenho esquemático mostrando a montagem do chassi radiográfico e da irradiação	48
<b>Figura III.4</b> – Esquema da coluna térmica externa situada na parte frontal do reator Argonauta	49
<b>Figura IV.1</b> – Imagens da superfície das lâminas do detector CR-39: a) danos ou defeitos presentes na superfície de uma lâmina; b) traços de partículas alfa resultantes da reação $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ registrados na lâmina de CR-39	54
<b>Figura IV.2</b> – Imagem dos traços revelados de partículas alfa sobre o CR-39 provenientes da reação nuclear $^{10}\text{B}(n,\alpha)\text{L}^7$ obtida com um microscópio de força atômica (MFA)	55
<b>Figura IV.3</b> – a) Imagem neutrongráfica obtida com a amostra contendo a <i>M. avium</i> esterilizada com hipoclorito de sódio b) Imagem neutrongráfica obtida com a amostra contendo <i>M. tuberculosis</i> esterilizada por autoclavagem	56
<b>Figura IV.4</b> – a) Imagem neutrongráfica obtida com amostras de <i>M. fortuitum</i>	57

obtida adicionando-se primeiramente a fucsina e, depois o  $^{10}\text{B}$ ; b) imagem de um traço isolado (destacado pela circunferência) e traços sobrepostos de partículas alfa de cor lilás

**Figura IV.5** – Imagem neutrongráfica obtida com amostra contendo *M. fortuitum*, com fucsina e tween-80 adicionadas à suspensão depositada sobre o detector CR-39 58

**Figura IV.6** – Imagem neutrongráfica de amostra preparada com a *M. fortuitum*, crescida no meio Middlebrook 7H9 com tween-80 durante 7 dias, sendo, posteriormente, adicionada D-cicloserina e deixado incubar por 24 horas 58

**Figura IV.7** – Esquema das fases presentes na suspensão, após a adição do xilol 59

**Figura IV.8** – Imagens neutrongráficas observadas na amostra com a espécie *M. fortuitum*, depois de tratadas com xilol, dopadas com  $^{10}\text{B}$  e irradiadas com um feixe de nêutrons térmicos 60

**Figura IV.9** – Imagens neutrongráficas mostrando a evolução das dimensões dos traços de partículas  $\alpha$ , em função do tempo de revelação do CR-39. Todas as imagens foram capturadas com lentes ocular de 10x e objetiva de 40x, e com um zoom da câmara digital Coolpix da Nikon de 1x 61

**Figura IV.10** – Baciloscopia de escarro *in natura*, com coloração ZN: a) esfregaço sobre lâminas de CR-39 pré-tratada com hidróxido de sódio e b) esfregaço sobre lâminas de vidro. As setas azuis indicam a posição de alguns bacilos 64

**Figura IV.11** – Imagem de uma massa de *M. smegmatis* obtida com um detector de traços nucleares e uma folha conversora de boro 66

**Figura IV.12** – Imagens de um esfregaço sobre lâmina de CR-39, utilizando como conversor uma folha de boro 66

**Figura IV.13** – Imagem obtidas com a espécie *M. massiliense* sobre o detector, a) antes da irradiação e da revelação e b) depois da irradiação e da revelação 67

**Figura IV.14** - (a) imagem do corte de tecido da pata de um camundongo Balb/C dopado com BPA antes da irradiação e da revelação e (b) mesma amostra com imagem obtida depois da irradiação e revelação 69

**Figura IV.15** - (a) a imagem de microscopia óptica de uma região do esfregaço de escarro positivo para tuberculose e (b) imagem da borda de uma gota contendo *M. bovis* (BCG), ambas dopadas com BPA, irradiadas com nêutrons térmicos e reveladas em solução de NaOH a 6,25N 70

**Figura IV.16** - Imagem de microscopia óptica de uma região do esfregaço *M. fortuitum* ATCC 6841 depois da eletroporação e da coloração ZN 72

## Índice de Tabelas

Tabela II. 1 – Classificação dos nêutrons quanto à energia	19
Tabela II. 2 – Características das fontes de nêutrons	23
Tabela IV.1 – Calibração do eletroporador para a eletroporação das amostras	71
Tabela IV. 2: Valores calibrados para a eletroporação da <i>M. fortuitum</i>	72

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

### I.1 – GENERALIDADES

#### I.1.1– Aspectos da Neutronografia

A Neutronografia é uma técnica de obtenção de imagens que utiliza o nêutron como partícula incidente. Descoberta por Kuhn e Kallmann, em 1935, nos últimos 40 anos foi efetivamente reconhecida como uma poderosa ferramenta para a realização de Ensaios Não-Destrutivos, em situações em que a Radiografia e a Gamagrafia não apresentam resultados satisfatórios. Ela faz parte de um ramo da Física, denominada Física Nuclear, surgida no início do século passado, através das pesquisas de renomados cientistas, entre eles James Chadwick, descobridor dos nêutrons (1932) e o casal francês Irène Curie e Frédéric Joliot, que, em 1934, descobriu a radioatividade artificial ou induzida, bombardeando boro e alumínio com partículas alfas e observando que os produtos dessas transformações nucleares induzidas eram radioativos. Trabalhos posteriores mostraram que reações nucleares induzidas por prótons, nêutrons, fótons e dêuterons também resultavam em produtos radioativos sendo os nêutrons muito efetivos para produzir essas transformações, porque interagem diretamente com os núcleos (KAPLAN, 1978).

Inicialmente, o principal campo de aplicação da técnica neutronográfica se destinava à indústria e as engenharias. Porém, os avanços alcançados ao longo dos anos possibilitaram sua utilização em outras áreas do conhecimento. Por exemplo, na Geologia, ela é empregada em pesquisas relacionadas à porosidade de rochas e camadas em solos sedimentares; na Biologia, no estudo do crescimento de raízes e irrigação do solo; na Arte, para investigação de pinturas e inspeção de objetos pertencentes a civilizações antigas. Destacamos, também, sua aplicação na área forense, onde é usada para atestar a autenticidade ou integridade de documentos, no setor de manutenção de aeronaves civis



e militares e, também, na Segurança Pública, onde a Neutrongrafia é a única técnica capaz de detectar drogas e explosivos escondidos em recipientes metálicos.

### I.1.2 – Aspectos da Microbiologia

As condições muito especiais, na Terra primitiva, que favoreceram o surgimento do primeiro ser vivo é uma das questões científicas que tem acompanhado o homem por muito tempo. Apesar de sua longa existência, somente no século XVII eles foram observados pela primeira vez, através dos trabalhos pioneiros do cientista inglês Robert Hooke, o primeiro a relatar a observação de microrganismos, usando um microscópio rudimentar, e do naturalista holandês Antoni van Leeuwenhoek, que, também utilizando microscópios rudimentares, mas com maior poder de ampliação, foi o pioneiro na descrição detalhada de organismos invisíveis a olho nu, que ele denominou “animalículos”, presentes em águas de chuvas (protozoários de vida livre), água de poço (bactérias, fungos e outros protozoários) tornando-o um dos fundadores da Microbiologia. Porém, o reconhecimento da importância desses microrganismos e, conseqüentemente, da Microbiologia como ciência, se deu na segunda metade do século XIX, com a comprovação de que os microrganismos originaram-se de pais iguais a eles próprios sendo os responsáveis pelo processo de fermentação do suco de uva e, também, que um tipo de microrganismo específico era o agente de uma doença específica (PELCZAR *et al*, 2008).

Muitos desses seres microscópicos desempenham um papel crucial para o bem estar do homem e da vida no planeta; por exemplo, os decompositores transformam a matéria orgânica de organismos mortos em matéria inorgânica, disponibilizando de forma contínua os elementos químicos necessários a outros seres vivos, enquanto os fotossintetizantes e os quimiossintetizantes são indispensáveis no processo de geração de alimentos e energia em ecossistemas terrestres e aquáticos. Alguns são responsáveis pela digestão e síntese de vitaminas K e algumas do complexo B no intestino; há aqueles que são utilizados para melhorar a produção de alimentos, exploração de minérios e outros usados como biorremediadores na recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados. Além do mais, com o advento da engenharia genética, as bactérias têm sido manipuladas para produzirem substâncias terapêuticas, como, por exemplo, a insulina e o hormônio do crescimento. Por outro lado, existem aqueles que são nocivos; causam

doenças que podem levar ao óbito, quando não são identificados e combatidos em tempo hábil (TORTORA *et al*, 2005, PELCZAR *et al*, 2008, TRABULSI *et al*, 2008).

Nessa pesquisa, o microrganismo de interesse é a espécie *Mycobacterium tuberculosis*, (MTB), ou bacilo de Koch, agente etiológico da tuberculose (TB), doença infecciosa de evolução lenta que apesar de totalmente curável, é responsável pelo óbito de milhões de pessoas no mundo, a cada ano. Resultados de sequenciamento de DNA em uma amostra de osso de bisão, datada de 17.000 anos, confirmaram a presença de uma patologia compatível com a tuberculose. Da mesma forma, patologia similar foi encontrada em ossos de *bovids* (mamíferos da família bovidae) que habitavam a América do Norte no Pleistoceno, sugerindo que essa doença já existia no continente, desde os seus primórdios e que esses animais foram os vetores que transportaram os microrganismos primitivos (ROTHSCHILD *et al.*, 2001, DONOGHUE *et al.*, 2005).

Apesar da redução mundial dos índices epidemiológicos da doença entre as décadas de 50 e 80 do século XX, principalmente nos países de Primeiro Mundo, em consequência do uso de drogas eficazes e melhoria global na infra-estrutura sanitária, fatores como: o fluxo migratório entre países e continentes de indivíduos infectados pelo bacilo de Koch, abandono do tratamento pelo paciente, o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida, AIDS (sigla em inglês), nos anos 80 e a resistência desse microrganismo aos antibióticos específicos, favoreceram o ressurgimento da tuberculose nas últimas décadas (SILVA e BOËCHAT, 2004). Os grandes avanços tecnológicos ocorridos no final do século XX e início do século XXI, principalmente, aqueles para fins de diagnóstico, não permitem a realização de exames mais específicos com recursos financeiros mínimos, dificultando acesso dessas novas tecnologias pela maioria dos laboratórios de análises clínicas, que continuam utilizando os métodos tradicionais, como a baciloscopia e o cultivo da micobactéria em meios de cultura adequados, necessitando de um tempo para o diagnóstico de várias semanas.

## I.2 – Motivação

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), mais de 2 bilhões de indivíduos (33,3 % da população mundial) está infectada com o *M. tuberculosis* (MTB) e 1 em cada 10 desses indivíduos vão desenvolver a tuberculose em algum momento da

vida. Ela é a principal causa de morte por doença infecciosa, sendo responsável por 2,9 milhões de óbitos, anualmente. Apesar de ser uma pandemia mundial, segundo os dados publicados no *WHO Report 2008 Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing*, a maior concentração de indivíduos doentes ocorre no Sudeste Asiático e África sub-Saariana, mantendo a estatística de Relatórios anteriores. Segundo o Relatório de 2008, 9,24 milhões de casos novos e 1,7 milhões de óbitos por TB ocorreram em 2006, em todo o mundo (WHO, 2008).

Esse mesmo relatório, com base nas estimativas do número de casos de incidências, em 2006, (para todas as formas de TB) classifica o Brasil em 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Além disso, assinala uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 4000 óbitos ocorrendo anualmente. Embora a doença ocorra em todas as regiões do Brasil, as capitais com maior taxa de incidência são o Rio de Janeiro, Manaus e Recife, devido a concentração de pessoas doentes nas comunidades carentes, conjugado a ação inadequada dos serviços de saúde pública e baixa adesão ao tratamento.

Dentre os fatores que contribuem para o aumento global, em grande escala, da tuberculose, pode-se citar o crescimento da pobreza e as condições sub-humanas nas periferias das grandes metrópoles, nos campos de refugiados e nos presídios; razão de cunho sócio-econômico, em virtude da desestruturação de antigas potências mundiais, como, por exemplo, a URSS (TOUNGOUSSOVA *et al*, 2006); a infecção pelo HIV, pois esse vírus reduz a eficácia do sistema imunológico do indivíduo favorecendo a disseminação do bacilo da tuberculose pelo seu corpo, e, por fim, a crescente resistência da MTB aos medicamentos (MARTIN e PORTAELS, 2007, PALMERO, 2007).

### I.3 – Objetivo e relevância do trabalho

Os dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde sobre a situação da Tuberculose em âmbito mundial e, a demanda de procedimentos diagnósticos rápidos, motivou essa pesquisa, que tem por objetivo a obtenção de imagens neutronográficas da espécie *Mycobacterium tuberculosis* dopadas com boro e depositadas sobre detectores em estado sólido de traços nucleares e, a partir dessas imagens, desenvolver um protocolo que viabilizasse sua identificação em escarro de indivíduos com suspeita de tuber-

culose, em tempo inferior ao necessário na baciloscopia e na cultura. Uma vez que a imagem de microscopia óptica desses bacilos submetidos à coloração específica para a espécie (Ziehl-Neelsen ou Kinyoun) e ampliado de 1000x é muito pequena, a expectativa é que a metodologia desenvolvida nessa pesquisa proporcione imagens maiores dos bacilos, já que o processo de revelação do detector de traços nucleares proporciona uma ampliação adicional de 1000x, e, portanto, venha facilitar a análise semi-quantitativa das amostras em questão, e possivelmente, de outras doenças micobacterianas que infectam a população mundial, como, por exemplo, a hanseníase, cujo agente etiológico é a *Mycobacterium leprae*, e doenças que acometem mamíferos ruminantes domésticos e silvestres, tal como, a paratuberculose, também conhecida por doença de Johne, causada pela *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map), que traz sérios prejuízos à pecuária nacional (GOMES *et al.*, 2002). Independentemente do custo para a implementação da metodologia, a disponibilidade de outro método de diagnóstico é perfeitamente justificada dado às estatísticas publicadas sobre a disseminação da TB no mundo.

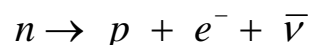
### I.3.1 – Objetivos específicos da pesquisa

A pesquisa tem por objetivo desenvolver uma metodologia que:

1. propicie a caracterização morfológica da *Mycobacterium tuberculosis* através de imagens obtidas com a Neutronografia;
2. possibilite a realização de baciloscopia de secreções para bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) sobre lâminas de detectores em estado sólido de traços nucleares;
3. seja uma metodologia complementar a baciloscopia convencional, principalmente para o diagnóstico de pacientes paucibacilares.

## I.4 – Desenvolvimento Histórico

O nêutron é uma das partículas que compõe o núcleo atômico, mantendo-se estável, somente quando nele confinado. Como partícula livre, ele apresenta um tempo de vida de 12,8 minutos, decaindo, posteriormente, em um próton, com emissão de um elétron e um antineutrino. A equação do decaimento é:



Ele foi descoberto pelo físico inglês James Chadwick, em 1932, no Laboratório Cavendish, tendo como base as pesquisas de Walther Bothe, em 1930, que, ao bombardear um alvo de berílio com partículas alfas, observou a presença de uma radiação desconhecida e altamente penetrante. Chadwick provou que a radiação, observada por Bothe, consistia na verdade de um fluxo de partículas de massa igual a 1,008664904(14) unidade de massa atômica (u.m.a.), e, portanto, muito próxima à do próton sendo, entretanto, eletricamente neutra. A essa partícula foi cunhado o nome “*nêutron*” (GAMOW, 1963). Em 1934, o físico Enrico Fermi foi o primeiro pesquisador a usar nêutrons como projéteis nucleares.

### I.4.1 – Neutronografia

Três anos após a descoberta dos nêutrons, os alemães Kallman e Kuhn usando uma fonte de radio e berílio (Ra-Be) e um pequeno gerador de nêutrons iniciaram uma nova técnica de obtenção de imagens, denominada Neutronografia (FISCHER, 1992). A qualidade das imagens obtidas não foi satisfatória, pois o feixe neutrônico utilizado era de baixa intensidade e mal definido, exigindo horas de exposição. Em 1944, o alemão Peter, O. obteve neutronografias de melhor qualidade, com menor tempo de exposição, utilizando um acelerador mais potente (DOMANUS, 1992).

Com o desenvolvimento dos reatores nucleares, ocorrido durante e após a Segunda Guerra Mundial, a intensidade dos feixes neutrônicos apropriados a ensaios experimentais aumentou em muitas ordens de grandeza, sendo atribuído a Thewlis e Derbyshire, após 1956, a primeira utilização de um feixe de nêutrons proveniente do reator BEPO de 6 MW moderado a grafite, para realizar uma Neutronografia. Entretanto, so-

mente a partir de 1960, teve início o desenvolvimento de um extenso programa para a construção de reatores de pesquisa com alto fluxo neutrônico, o que propiciou a construção de novas unidades neutrongráficas em todo mundo.

Em 1962, o *Argonne Nacional Laboratory* (ANL) desenvolveu um método para inspeção não destrutiva de elementos combustíveis irradiados de reatores nucleares; em 1963, Berger determinou experimentalmente a capacidade dos métodos diretos e indiretos de detecção de imagens neutrongráficas.

Em 1970, tanto nos Estados Unidos, como em alguns países europeus, a maioria dos institutos de pesquisa com reatores nucleares possuía unidades e indivíduos capacitados para realizar Neutronografias de objetos e interpretar as imagens obtidas. Para facilitar o progresso da técnica, trabalhos coordenados e normas de padronização tornaram-se necessárias e pesquisas relacionadas a esses tópicos foram organizadas em Birmingham, Inglaterra, em 1973, e em Gaithersburg, Estados Unidos, em 1975. Nesse mesmo ano, Tyuyakov e Shtan publicaram um livro sobre os princípios básicos da Neutronografia (DOMANUS, 1992).

Em 1979, deu-se a formação do Grupo de Trabalho sobre Neutronografia, sob a tutela da Comissão das Comunidades Européias. O encontro inaugural foi realizado em Riso, na Dinamarca, e os encontros anuais subseqüentes ocorreram em sucessivos Centros de Pesquisa da Comunidade Européia. Em 1981, o Grupo publicou um Manual da Radiografia de Nêutrons e, em 1984, um Atlas sobre a detecção de defeitos em elemento combustível de reatores nucleares, contendo Neutronografias de pinos de combustível de reatores de potência ilustrando os defeitos detectados e classificando-os pelo tipo. Harms e Wyman publicaram, em 1986, um livro sobre os fundamentos matemáticos e físicos da Neutronografia. Domanus publicou dois livros: um, versando sobre colimadores para neutronografias térmicas (1987) e o outro (1992) sobre os fundamentos da neutronografia (DOMANUS, 1992).

Na década de 80, foram realizadas três Conferências Mundiais sobre Neutronografia. A primeira foi realizada em San Diego, USA em 1981, com a apresentação de cerca de 124 trabalhos; a segunda foi realizada em Paris, 1986 e a terceira em Osaka, Japão, em 1989 (DOMANUS, 1992).

Na quarta Conferencia Mundial sobre Neutronografia realizada nos Estados Unidos, em 1992 e a quinta, na Alemanha, em 1996, foram apresentados, entre outros, trabalhos relacionados às áreas de: reatores e instalações nucleares; fontes de nêutrons de pequeno porte; detectores de nêutrons; métodos com filmes radiográficos; processamento de imagens; neutronografias em tempo real; aplicações nucleares; aplicações industriais; aplicações biológicas e em ciências médicas; aplicações aeroespaciais; tomografia; dimensionamento de objetos; e padronização.

Apesar de ter surgido há mais de 70 anos, somente nos últimos 50 anos, a Neutronografia, tem se firmado, como uma técnica de Ensaio Não Destrutivo (END), mundialmente reconhecida, sendo utilizada em situações específicas onde os raios-X e os raios gama não produzem resultados satisfatórios ou não possam ser aplicados. Um grande passo nesse sentido foi o desenvolvimento da Neutronografia com nêutrons térmicos, pelo método de transferência, que possibilitou seu uso para objetos radioativos que, até então, não podiam ser radiografados com raios-X ou com raios gama, devido à intensidade da radiação eletromagnética decorrente das instabilidades nucleares, que interfere na imagem (ruído).

#### I.4.2 – Detectores em estado sólido de traços nucleares - Histórico

A ciência dos detectores em estado sólido de traços nucleares (SSNDT) teve início, em 1958, com o químico inglês David Young, pesquisador da *General Electric Research Laboratory*, ao observar com um microscópio óptico a presença de traços superficiais registrados em um cristal de fluoreto de lítio (LiF) colocado em contato com uma folha de urânio, irradiado com feixe de nêutrons térmicos e submetidos a um ataque químico. Os nêutrons térmicos induziram a fissão dos núcleos de urânio originando fragmentos de fissão que bombardearam o cristal de fluoreto de lítio, gerando regiões danificadas, chamadas traços (NIKEZIC e YU, 2004).

No ano seguinte, Silk e Barnes, trabalhando no mesmo laboratório e usando um microscópio eletrônico de transmissão (MET), observaram o registro de traços deixados por partículas carregadas em mica muscovita natural e, quando cobertas por lâminas de urânio e expostas a um feixe neutrônico provindo de um reator nuclear. A observação

dos traços era instantânea, pois eles iam desaparecendo e se perdiam no feixe de elétrons do MET (SILK e BARNES, 1959, FLEISCHER, 1998).

Em 1962, Price e Walker confirmaram os resultados de Silk e Barnes, porém, descobriram que, em micas sintéticas, desenvolvidas por Louis Navias no laboratório da GE, os traços registrados mantinham-se ativos e estáveis. Mostraram, também, que o uso de um ataque químico apropriado, por um tempo mais prolongado, propiciava uma ampliação das dimensões dos traços que os tornavam visíveis em microscópio óptico (FLEISCHER, 1998). Em 1963, Walker, Price e Fleischer demonstram a possibilidade do uso dos detectores em estado sólido de traços nucleares (SSNTD) para dosimetria de nêutrons (WALKER *et al.*, 1963) e, em 1966, Becker relatou que reações de recuo e reações nucleares do tipo  $(n,\alpha)$  poderiam ser usadas com a mesma finalidade (BECKER, 1967).

Em 1978, Cartwright, Shirk e Price descobriram que o polímero CR-39 (Columbia Resina), um plástico resultante da polimerização do monômero Líquido Carbonato de Diglicol Alílico, desenvolvido, em 1933, para a fabricação de lentes, era muito eficiente para detectar partículas carregadas (CARTWRIGHT *et al.*, 1978). Nos anos que se seguiram, as pesquisas voltadas ao estudo das propriedades do CR-39 como material detector revelaram que ele apresentava uma alta sensibilidade para detectar nêutrons com energia entre 100 keV a 18 MeV (HENSHAW, 1982). A nitidez com que os traços gravados apareciam sobre a superfície do detector possibilitou o desenvolvimento de sistemas automáticos de contagem de traços, compostos por microscópio, monitor de TV, câmera fotográfica e analisador de imagem. Essa capacidade tornou os detectores CR-39 bastante populares nos meios científicos. Atualmente, o tipo de CR-39 mais utilizado na técnica de detecção de traços é o PM355 SUPERGRADE, uma versão melhorada do CR-39, fabricado pela empresa Page Mouldings Ltda (Pershore), apresentando menos defeitos inerentes ao processo de fabricação do que os CR-39 usados na fabricação de lentes de óculos e que parece ser o mais adequado para detectar íons leves num intervalo de energia de 0,1 MeV a dezenas de MeV, além de serem os mais sensíveis à prótons e deutérios em baixa e alta energias, (70-300 keV) e maior do que 1,7 MeV, respectivamente (SZYDLOWSKI *et al.*, 2005). O notável desenvolvimento da técnica de detecção de traços nucleares em detectores sólidos propiciou sua aplicação nas áreas de Geologia, Ciências Espaciais, Dosimetria das Radiações, Física das Altas Energias,



Radiobiologia, Neutronografia, Alfagrafia, Metalurgia, Exploração de Urânio, dentre outras.

#### I.4.3 – Carreadores de boro-10 – Histórico

Quatro anos após a descoberta do nêutron por Chadwick, em 1932, o biofísico americano Gordon Locher, do Franklin Institute in Swarthmore, USA descreveu os conceitos básicos para a utilização terapêutica dos nêutrons no tratamento do câncer, a partir da interação de nêutrons de 0,025 eV de energia, chamados nêutrons térmicos, com o radioisótopo boro-10, que apresenta uma das mais altas seção de choque de microscópica de absorção para nêutrons nessa faixa de energia . O fundamento da Terapia de Captação de Nêutrons por Boro (BNCT, sigla em inglês), consiste na incorporação do boro-10 pelo tumor, que ao ser irradiado por nêutrons térmicos, desencadeia uma reação nuclear do tipo  $^{10}\text{B}(n,\alpha)\text{Li}^7$ . As partículas alfa e os íons de  $^7\text{Li}$ , produto da reação nuclear, depositam sua energia *in situ* destruindo-o, já que o alcance das partículas alfas e do  $^7\text{Li}$  no interior das células cancerígenas é muito próximo as suas dimensões, aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. O sucesso da terapia depende da aquisição seletiva do boro-10 no interior do tumor, não permitindo que células saudáveis que circundam o tecido tumoral sejam irradiadas. Como a estrutura química dos compostos borados não interfere nas suas propriedades nucleares, o boro pode se apresentar na forma iônica, cristalina, metálica, de moléculas inorgânicas ou orgânicas (GASPAR, 1994, SOLOWAY, 1998, CODERRE *et al*, 2003, YOKOYAMA *et al*, 2006).

Logo após a proposição de Locher, uma série de compostos começaram a ser testados como candidatos a carreadores de boro-10. O foco inicial da pesquisa foi a descoberta de compostos borados que fossem incorporados por tumores cerebrais do tipo Glioblastomas Multiformes. Os compostos de primeira geração utilizados foram o ácido bórico e seus derivados, logo abandonados por sua baixa seletividade e alta toxicidade para o organismo.

Os principais compostos de segunda geração surgiram nos anos 60 e são eles: o p- borofenilalanina, (BPA) e o borocaptado de sódio, (BSH). Eles apresentam menor grau de toxicidade e maior seletividade pelos tecidos cancerígenos. O BPA é utilizado,

principalmente na terapia de BNCT das células melanoma maligno e o BSH para células malignas cerebrais.

Os compostos de terceira geração surgiram nos anos 80, a partir do desenvolvimento de técnicas que permitem a inserção ou o acoplamento de cristais de boro à macromoléculas orgânicas ou em biomoléculas com atividades biológicas. Nessa categoria encontram-se os nucleosídeos, os aminoácidos, as enzimas, as porfirinas (BOPP), lipoproteínas de baixa densidade, lipossomos.

#### I.4.4 – Eletroporação ou Eletropermeabilização - Histórico

A Eletroporação ou Eletropermeabilização é o fenômeno da desestabilização da membrana celular quando submetida a pulsos elétricos de alta voltagem por curto intervalo de tempo, promovendo a formação de poros transitórios na matriz lipídica, permitindo a migração não seletiva de íons e moléculas através da molécula. Ela surgiu entre as décadas de 60 e 70 do século passado baseada em pesquisas teóricas e experimentais com a dupla camada das membranas celulares, porém seu uso só se popularizou durante os anos de 80 com os trabalhos pioneiros de Wong e Neumann relacionados a transferência genética em células de mamíferos. Atualmente é uma técnica rotineira, utilizada em Biologia Celular e na área de Biotecnologia para transferência genética de DNA para região interna de bactérias, leveduras e células de animais e de plantas; hibridação de células e inserção de moléculas em células. Na Medicina é usada no transporte de quimioterápicos para o tratamento de câncer e em terapias genéticas (XIE e TSONG, 1992, MIR, 2000).

Os mecanismos responsáveis pelo fenômeno da eletroporação da membrana não são bem entendidos e os modelos teóricos propostos não explicam todos os resultados experimentais obtidos (XIE e TSONG, 1992, ROLS e TEISSIÉ, 1998, MIR, 2000, KOTNIK *et al.*, 2003, MATSUMI *et al.*, 2008).

#### I.4.5 – Tuberculose: origem no passado remoto

Segundo as técnicas modernas de genética molecular e seqüenciamento genético, por exemplo, a reação em cadeia de polimerase, (em inglês, *Polymerase Chain Re-*

*action* - PCR) as espécies do gênero *Mycobacterium* tiveram sua origem num passado bastante remoto, há cerca de 150 milhões de anos, na Gondwana (DANIEL, 2006). Kapur, Whittam e Musser estimaram que a espécie *M. tuberculosis* originou-se entre 20.400 e 15.300 anos atrás, períodos em que os pesquisadores acreditam ter ocorrido duas grandes migrações do homem saindo da Sibéria em direção as Américas pelo Alasca (DANIEL, 2000).

Gutierrez *et al* (2005) sugerem a presença de um progenitor primitivo da *M. tuberculosis*, no leste da África, há cerca de 3 milhões de anos e que eles poderia ter infectado ancestrais hominídeos. Esse e outros grupos voltados para essa linha de pesquisa têm admitido que: 1) todos os **membros** modernos do complexo *M. tuberculosis* (constituído pela *M. tuberculosis* e seus variantes africanos *M. africanum* e *M. canettii*, mais a *M. bovis*) tiveram um ancestral africano comum entre 35.000 e 15.000 anos atrás; 2) **descendentes** modernos são originários de um ancestral comum a cerca de 20.000 e 15.000 anos; e 3) muito da **diversidade** presente entre esses descendentes originaram-se entre 250 e 1.000 anos atrás. Talvez, o surgimento da tuberculose tenha resultado do encontro dos ancestrais da *M. tuberculosis* com os ancestrais do homem, no leste da África, e tenha se espalhado por todo o planeta, ao longo de milênios, em consequência da migração desses povos africanos para as regiões européias e asiáticas, e através do Estreito de Bering para as Américas.

A descoberta da tuberculose na América do Sul se deve às pesquisas realizadas em múmias encontradas no deserto do Peru e do norte do Chile. Na América do Norte, os principais sítios foram a região central dos Estados Unidos e o Lago Ontário, no Canadá. Os dados arqueológicos provam a presença da doença nas Américas a cerca de dois milênio (PRAT e SOUZA, 2003).

A presença da tuberculose no Egito, a mais de 5.000 anos, foi confirmada, a partir de estudos realizados em tecidos de múmias e através de descrições encontradas na arte egípcia (CAVE, 1939). Da mesma forma, existem textos indianos e chineses com mais de 3.300 anos e 2.300 anos, respectivamente, descrevendo a doença nessas regiões.

Na Grécia clássica, a doença era denominada *Phthisis* (Tísica) ou *Consumption* (Consumpção) e seu conhecimento se deve às descrições feitas por Hipócrates (400 a.C), em sua obra, *Book I, Of the Epidemics*, na qual, dentre outras coisas, escreveu: “A consumpção foi a mais importante das doenças que prevaleceram e a única que se mostrou fatal a muitas pessoas”.

No século II da era cristã, Clarissimus Galen, o mais destacado médico, depois de Hipócrates, definiu a tísica como uma ulceração dos pulmões, tórax ou garganta acompanhado de tosse, febre baixa e debilidade do corpo devido ao pus. Recomendava ar fresco, leite e viagens marítimas para seu tratamento (PEASE, 1940, LEÃO e PORTA-ELS, 2007). Ele suspeitava da sua natureza contagiosa e rejeitava a idéia da doença ser hereditária; sendo assim, recomendava as pessoas que fossem cuidadosas ao manter contato íntimo com os consumptivos (tuberculosos) (HERZOG, 1998).

Uma das mais notáveis descrições da doença foi feita pelo médico romano do século V d.C, Caelius Aurelianus, que revelou um conhecimento clínico surpreendente para a época: “Os pacientes sofrem de uma febre latente que começa à noite e desaparece outra vez no nascer do dia. É acompanhada de tosse violenta, expelindo escarro levemente purulento. O paciente fala com uma voz rouca, respira com dificuldade e tem a face ruborizada pela febre. A pele no restante do corpo é pálida e os olhos têm uma expressão cansada. O paciente é frágil na aparência, mas às vezes mostra surpreendente atividade física ou mental. Em muitos casos, uma respiração ofegante pode ser ouvida no peito, e quando a doença se espalha, suores são vistos na parte superior do peito. Os pacientes perdem o apetite ou sofrem de forte dor da fome. Eles são às vezes, também, muito sedentos. As extremidades dos dedos incham e as unhas curvam-se muito” (HERZOG, 1998).

Na Renascença, o italiano Fracastorius de Verona (Girolamo Fracastoro 1478–1553), em sua obra *De contagione et contagiosis morbis*, de 1546, postulou pela primeira vez que a tuberculose era transmitida por um “vírus” invisível que poderia sobreviver por 2 anos nas roupas dos consumptivos. Segundo Fracastorius “a doença origina-se de uma ulcera pulmonar adquirida, do qual o pus é descarregado”.

No século XIV, iniciaram-se as investigações sobre as bases patoanatômicas da doença e, no século XVI, desenvolveram-se as técnicas de exames *post-mortem* que permitiram relacionar os resultados das autópsias aos sintomas. Porém, somente no século XVII, surgiram vários trabalhos com a descrição patoanatômica mais detalhada da consumpção. Sylvius de la Boë, de Amsterdã, em seu trabalho *Opera Medica* (1679), além de mencionar, pela primeira vez, que os tubérculos eram lesões características, nos pulmões e outros órgãos dos consumptivos, descreveu detalhadamente as cavidades e os nódulos linfáticos tuberculosos. Segundo a teoria de Sylvius, essas pequenas protuberâncias no pulmão surgiam das glândulas linfáticas desse órgão, e, portanto, a doença tinha sua origem, a partir de uma espécie de degeneração linfática. Ele escreveu: “Eu observei diversas vezes no pulmão protuberâncias glandulares menores ou maiores, que - como manifestado pela secção – tem um conteúdo purulento. Estes tubérculos gradualmente supurante, incluído em uma membrana fina, são - em minha opinião - úlceras e a *phthisis* - como eu vejo – origina-se exatamente destes”. Porém, em seu trabalho intitulado *Phthisiologia*, de 1689, Sylvius escreveu que essas protuberâncias eram, às vezes, a causa da doença. No curso de pesquisas posteriores, a idéia de uma origem glandular para os tubérculos foi, definitivamente, descartada (HERZOG, 1998, MAGYAR, 1999).

O inglês Richard Morton, que também viveu no século XVII, foi o primeiro a declarar que esses tubérculos eram a condição preliminar e necessária da consumpção pulmonar. Morton acreditava que a enfermidade apresentava três estágios: 1) formação do tubérculo, devido a uma inflamação inicial; 2) progressão para úlcera e 3) finalmente, a tísica (MAGYAR, 1999). Tanto de la Boë quanto Morton acreditavam que a doença possuía um caráter hereditário, ainda que Morton não rejeitasse a transmissão por contato íntimo (HERZOG, 1998)

Em 1720, o médico inglês Benjamim Marten divulgou, pela primeira vez, no seu livro *A new Theory of Consumptions, More Especially of a Phthisis or Consumption of the Lung*, que a doença deveria ser causada por pequenos seres vivos que, ao invadir o corpo, poderia produzir as lesões e os sintomas da tísica. Essas afirmações fundamentavam-se na descoberta do microscópio e isso, provavelmente, o conduziu à idéia de que pequenos protozoários e outros organismos visualizados em gotículas de água pelos primeiras análises microscópicas pudessem ser os responsáveis pela tuberculose. Mar-

ten teve uma percepção epidemiológica verdadeiramente espantosa, para a época ao escrever: “Frequentemente, comer e beber com um tísico ou conversar com ele a uma distância tão curta que parte do seu ar expirado possa entrar nos pulmões de uma pessoa sadia, deve produzir a doença nesta pessoa”. Apesar de publicado em 1720, o livro de Marten só se tornou bem conhecido por volta de 1870 (HERZOG, 1998).

Somente a partir do início do século XIX, pode-se falar em pesquisas sobre tuberculose, no sentido estrito da palavra. É também a partir dessa época, que dados mais consolidados sobre a *phthisis* pulmonar puderam ser encontrados. O ponto de partida para a descoberta da causa da doença começou com a discussão sobre a infecciosidade e a natureza da enfermidade. O anatomista francês René Théophile Hyacinthe Laënnec, em seu livro *D’Auscultation Mediate* (1812), além de descrever de forma objetiva os aspectos patológicos da doença, também a classificou de duas formas distintas: tuberculose pulmonar e tuberculose extrapulmonar. Um dos fatores que contribuiu significativamente para o desenvolvimento de sua pesquisa foi a experiência adquirida com as autópsias realizadas em pessoas que chegaram ao óbito em consequência da tuberculose, no Hospital Necker, em Paris, durante a epidemia que assolou a Europa nesse período (DANIEL, 2006).

A comprovação experimental da transmissibilidade da doença se deve a vários pesquisadores, entre eles, Phillips Klencke, Friedrich Gustav Jakob Henle, Jean Antoine Villemin. Em 1843, Klencke demonstrou pela primeira vez, que um coelho morreu de tuberculose disseminada ao ser inoculado com material de um tubérculo, porém, considerava a enfermidade de origem tumoral. Henle foi um médico alemão, pioneiro no campo da anatomia e patologia microscópica e defendia uma origem microbiana para as doenças. Em 1844, ele estabeleceu três postulados para provar a infecciosidade delas: 1) o agente causador deve ser encontrado em todos os casos da doença; 2) ele não pode ocorrer em outras doenças e 3) sua aplicação deve sempre provocar a mesma doença. Porém, deve-se ao cirurgião militar francês Villemin, a comprovação científica da origem infecciosa da tuberculose, em 1865. Inicialmente, ele inoculou alguns coelhos com uma pequena quantidade de líquido purulento retirado de uma cavidade tuberculosa de um indivíduo, por autópsia. Depois de três meses, apesar do animal se mostrar aparentemente sadio (parece que os coelhos são bastante resistentes à tuberculose), ele o sacrificou e, finalmente, observou que o animal estava tuberculoso. Além disso, Villemin foi

o primeiro a sugerir que a doença é provocada por um microrganismo específico presente no ar, observando que soldados sadios desenvolviam a enfermidade, ao compartilharem o mesmo local (barracas em acampamento militar) com soldados doentes (HERZOG, 1998, DANIEL, 2006).

Em 1877, Theodor Klebs conseguiu manter pela primeira vez o agente causador da tuberculose vivo em proteínas, por cultivo *in vitro*, podendo, então, utilizá-los para produzir a doença em animais de laboratório. Entretanto, mesmo assim, ele não foi capaz de identificar o organismo (HERZOG, 1998).

Em 24 de março de 1882, Hermann Heinrich Robert Koch, que fora aluno de Henle, em uma palestra proferida para a Sociedade Fisiológica de Berlim, no Hospital Charité, intitulada *Die Ätiologie der Tuberkulose*, demonstrou a existência do bacilo da tuberculose. Koch era um talentoso microscopista e produziu evidências irrefutáveis de que esse microrganismo era o causador da tuberculose, desenvolvendo metodologias para obtenção do meio de cultura sólido, recipientes para incubação, métodos de desinfecção e técnica especial de coloração que permitia a visualização de bastões finos incrustados em tecidos tuberculosos, com o objetivo de preencher os pré-requisitos necessários à definição de doenças contagiosas estabelecidos por Henle (HERZOG, 1998, KAUFMANN e SCHAIBLE, 2005). Ele também desenvolveu a microfotografia como ferramenta para documentar suas descobertas, independentemente de testemunhas (KAUFMANN e SCHAIBLE, 2005). Segundo Leão, (LEÃO e PORTAELS, 2007) “Koch levou seus microscópios, tubos de teste, frascos pequenos com a cultura e lâminas com tecidos (humano e animal) preservados no álcool, para esta apresentação. Ele queria provar ao público que as bactérias estavam sempre presentes em infecções tuberculosas e podiam ser cultivadas em soro solidificado, com as primeiras colônias tornando-se visível a olho nu, a partir da segunda semana. Então, mostrou que, os porcos-daguiné inoculados com o material tuberculoso retirado de pulmões, intestinos, escrúfula ou cérebros de pessoas e de gados que morreram de TB, desenvolviam a mesma doença. Koch provou que, qualquer que fosse a dose e/ou a rotina que ele usasse, não importando que espécie de animal ele inoculasse, os resultados eram sempre os mesmos. Os animais desenvolviam, subseqüentemente, as características típicas de TB. Concluiu dizendo que ‘... os bacilos presentes em lesões tuberculosas não somente acompanham a

tuberculose, mas, precisamente, a causam. Estes bacilos são os verdadeiros agentes da tuberculose’ (KAUFMANN e SCHAIBLE, 2005)’.

Somente várias décadas após a descoberta do agente etiológico da tuberculose, surgiram os primeiros meios terapêuticos eficazes para o tratamento da doença. O primeiro antibiótico e agente bactericida utilizado, efetivamente, contra a MTB foi a estreptomicina, isolada por Selman Waksman e colaboradores, em 1944 (DANIEL, 2006). Em seguida, foram introduzidos no tratamento o ácido para-aminossalicílico (PAS), em 1949; a isoniazida (INH), em 1952; a pirazinamida (PZA), em 1954; o etambutol, em 1962 e a rifampicina (RMP), em 1963 (HERZOG, 1998, DANIEL, 2006). O uso desses fármacos propiciou uma queda acentuada nos índices epidemiológicos, principalmente, nos países desenvolvidos. No início dos anos 50, até o início dos anos 80 do século passado, verificou-se uma acentuada queda na incidência da doença nos Estados Unidos, países da Europa e em outros países desenvolvidos. Até em países pobres, como o Brasil e Índia, apresentaram uma queda significativa. Esses resultados deveram-se a implementação de melhores condições sanitárias em todo o mundo. Porém, no ano de 1985, observou-se um crescimento nos índices de prevalência da tuberculose no mundo inteiro devido, principalmente, a um maior fluxo migratório intercontinental de infectados, inclusive para os países desenvolvidos, e a pandemia da AIDS, que permitiu que pessoas infectadas por MTB, e posteriormente, pelo vírus da imunodeficiência adquirida (em inglês, Human Immunodeficiency Vírus, HIV), rapidamente adoecessem de tuberculose. Em 1995, a Organização Mundial de Saúde declarou a tuberculose como uma emergência sanitária mundial (SILVA e BOËCHAT, 2004).

O trabalho apresenta a seguinte organização:

No capítulo II os fundamentos teóricos relacionados a Neutronografia, a Microbiologia (em especial ao gênero *Mycobacterium*) e a Tuberculose são apresentados.

O capítulo III foi dedicado à descrição do sistema neutronográfico utilizado, assim como, à dos protocolos usados na preparação das amostras biológicas, além do procedimento de revelação do detector, observação microscópica das amostras, aquisição e processamento das imagens neutronográficas.



No capítulo IV são apresentados e discutidos os resultados.

No capítulo V apresentam-se as conclusões do trabalho e as propostas futuras para pesquisa.

## CAPÍTULO II

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### II.1 – O nêutron

##### II.1.1 – Energia dos nêutrons

A energia do nêutron é um fator preponderante no processo de sua interação com a matéria, pois a probabilidade de que certo tipo de interação ocorra depende dela (KNOLL, 1999). Como essas interações apresentam caráter muito específico, os nêutrons foram classificados de acordo com a sua energia, como mostra a tabela II.1.

Tabela II. 1 – Classificação dos nêutrons quanto à energia (CRISPIM, 1993).

Classe	Energia (eV)	Subclasse	Energia (eV)
Lentos	$0 < E < 10^3$	frios	$0 < E < 2 \times 10^{-3}$
		térmicos	$E \approx 0,025$
		epitérmicos	$0,1 < E < 10^3$
Intermediários	$10^2 < E < 5 \times 10^5$		
Rápidos	$10^5 < E < 5 \times 10^7$		
Muito rápidos	$10^7 < E < 2 \times 10^7$		
Relativístico	$E > 10^7$		

Nêutrons rápidos podem perder quantidades apreciáveis de energia cinética por difusão, ocasionada por colisões de espalhamento elástico e inelástico, resultando em nêutrons de menor energia, chamados nêutrons moderados. A quantidade de energia perdida pelo nêutron por colisão é função da massa do núcleo que constitui o meio e do ângulo de espalhamento. A substância que apresenta a propriedade de reduzir a velocidade dos nêutrons é denominada moderador. Nêutrons que atingem velocidades próximas àquelas do movimento térmico dos átomos ou moléculas do material moderador com quem interagiram são chamados nêutrons térmicos (KAPLAN, 1978).

## II. 1.2 – Interação dos nêutrons com a matéria

A ausência de carga elétrica possibilita ao nêutron ignorar os campos eletrostáticos produzidos pela eletrosfera e pelo núcleo atômico e interagir, diretamente, com os núcleons dos núcleos, mediante forças nucleares, ou magnéticas, uma vez que o seu momento magnético é não-nulo. O mecanismo de interação e a consequente atenuação dessas partículas dependem de sua energia e da estrutura do núcleo em questão. Os dois principais mecanismos de interação do nêutron com a matéria são o espalhamento e a absorção (CRISPIM, 1993, ANDRADE, 2002).

1º) Espalhamento Elástico ( $n,n$ ) – neste processo, o núcleo com o qual o nêutron interagiu não tem sua estrutura alterada, ocorrendo apenas uma simples transferência de energia cinética e de momento linear. Um outro nêutron reaparece e o núcleo mantém o seu estado fundamental. Essa interação é análoga a uma colisão elástica entre duas esferas rígidas.

2º) Absorção – neste processo, o núcleo captura o nêutron e sofre modificações na sua estrutura, devido a não conservação da energia cinética no processo. Uma fração dessa energia é responsável pelo estado excitado do núcleo formado, denominado núcleo composto, que, ao retornar ao seu estado fundamental, proporciona a ocorrência de vários fenômenos, sendo os principais:

- a) Espalhamento inelástico ( $n,n'$ ), ( $n,n'\gamma$ ), – o núcleo composto emite um outro nêutron e retorna ao seu estado fundamental, geralmente, com emissão de raios gamas. Para que esse mecanismo ocorra, é necessário que o nêutron incidente possua uma energia cinética superior a um limiar, cujo valor depende do núcleo com o qual ele irá interagir.
- b) Captura radioativa – o núcleo composto atinge a estabilidade, emitindo um ou mais fótons ou partículas. Reações do tipo ( $n,\gamma$ ), ( $n,2n$ ), ( $n,p$ ), ou ( $n,\alpha$ ) podem ocorrer;
- c) Fissão nuclear – o núcleo composto de um átomo pesado fragmenta-se em dois ou três núcleos mais leves, emitindo em geral dois ou três novos nêutrons, com energia média de 2 MeV (CRISPIM, 1993, ANDRADE, 2002).

O parâmetro que especifica a probabilidade de ocorrência de uma reação nuclear do tipo nêutron-núcleo de um material alvo é denominado seção de choque. Conceitualmente, a seção de choque microscópica (símbolo  $\sigma$ ) pode ser entendida, classicamente, como a medida da fração da área do núcleo atômico disponibilizado para ser atingido por uma partícula incidente e possibilitar que a reação nuclear ocorra. A unidade de medida associada à seção de choque é a *barn* (símbolo b), que equivale a  $10^{-24}$  cm<sup>2</sup>.

A probabilidade de interação nêutron-núcleo é extremamente pequena, entretanto, quando ela ocorre, o nêutron pode ser espalhado ou absorvido. Usualmente, distingue-se a seção de choque microscópica de espalhamento ( $\sigma_s$ ) da seção de choque de absorção ( $\sigma_a$ ), sendo a seção de choque microscópica total a soma das duas parcelas, isto é:

$$\sigma_t = \sigma_s + \sigma_a \quad (1)$$

A seção de choque microscópica de absorção ( $\sigma_a$ ) é a soma das parcelas da seção de choque microscópica inelástica ( $\sigma_{in}$ ), seção de choque microscópica de captura radioativa ( $\sigma_{cr}$ ), seção de choque microscópica de fissão ( $\sigma_f$ ).

$$\sigma_a = \sigma_{in} + \sigma_{cr} + \sigma_f \quad (2)$$

Os processos interativos competem entre si. Assim, a fração de colisões que resulta numa reação particular dependerá da seção de choque relativa para a reação envolvida. No entanto, para certas energias, algumas das interações não ocorrem ou são desprezíveis, não colaborando para a seção de choque total (BECKURTS e WIRTZ, 1964).

O produto da seção de choque microscópica,  $\sigma$ , pelo número de núcleos atômicos idênticos contidos em um volume de 1cm<sup>3</sup> de um material,  $N$ , é denominado seção de choque macroscópica,  $\Sigma$

$$\Sigma = \sigma N \quad (3)$$

Analogamente, à seção de choque microscópica total, a seção de choque macroscópica total será dada por:

$$\Sigma_t = \Sigma_s + \Sigma_a \quad (4)$$

Fisicamente, interpreta-se  $\Sigma_t$  como a probabilidade, por unidade de caminho percorrido, que algum tipo de interação ocorra, quando um nêutron, com velocidade  $v$ , interage com o material.

## II.2 – Neutronografia (NR) – Considerações Gerais

Os três principais componentes envolvidos na obtenção de Neutronografia de objeto são: a) um feixe de nêutrons apropriado; b) o objeto a ser inspecionado e c) um dispositivo para registrar, prontamente ou por decaimento radioativo, a informação trazida pela radiação gerada em função do fluxo neutrônico transmitido através do objeto, conforme ilustra a Figura II.1 (DOMANUS, 1992).

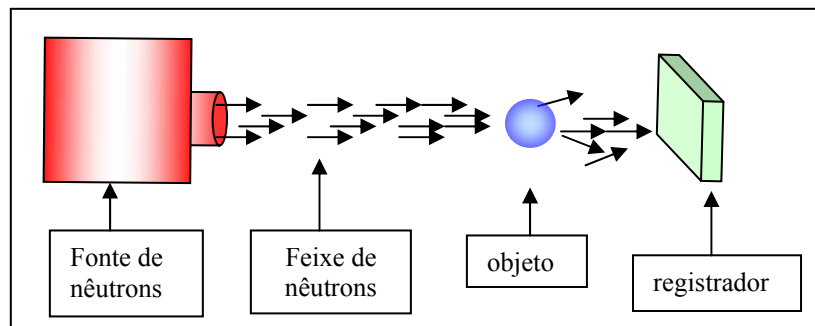


Figura II. 1 – Principais componentes de uma NR obtida pelo método direto de exposição.

### II. 2.1 – Fontes de nêutrons para Neutronografia

As fontes de nêutrons mais utilizadas em Neutronografia são os reatores nucleares, os aceleradores e as fontes radioisotópicas. A intensidade da fonte e o espectro de energia dos nêutrons afetam diretamente o tempo de exposição e a eficiência de formação da imagem; as fontes estão, também, indiretamente relacionadas com a colimação do feixe, que afeta a definição da imagem. Assim, para uma determinada aplicação neu-

trongráfica, a escolha da fonte vai depender principalmente das características desejadas do feixe neutrônico. Todavia, fatores, tais como: custo, complexidade, portabilidade, problemas de blindagens, devem também ser considerados. A tabela II.2 dispõe algumas características das fontes de nêutrons térmicos (CRISPIM, 1993).

Tabela II. 2 – Características das fontes de nêutrons

Tipo de Fonte	Fluxo Típico [n.cm <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ]	Resolução Radiográfica	Tempo de Exposição	Características
Reator Nuclear	10 <sup>5</sup> a 10 <sup>8</sup>	Excelente	Curto	Operação complexa e estável, investimento entre médio e alto, não portátil.
Acelerador de partículas	10 <sup>3</sup> a 10 <sup>6</sup>	Média	Médio	Operação liga-desliga, custo de investimento médio, portabilidade possível.
Radioisótopo	10 <sup>1</sup> a 10 <sup>4</sup>	Baixa a Média	Longo	Operação fácil e estável, investimento médio, portátil.

Os aceleradores de partículas geram nêutrons por meio de reações nucleares entre partículas aceleradas (alfa, próton, deutério, fótons gama) e núcleos-alvo leves (deutério, trítio, lítio ou berílio). No processo, a partícula é acelerada por meio de um campo eletromagnético, interage com o núcleo alvo, resultando em um núcleo composto, que emite nêutrons.

Nos reatores nucleares, o mecanismo de geração dos nêutrons é a fissão nuclear. Um nêutron de baixa energia quando absorvido pelo núcleo do <sup>235</sup>Urânio, gera o núcleo composto <sup>236</sup>U. Esse núcleo composto, altamente instável, se divide formando núcleos mais leves e emitindo de dois a três nêutrons de alta energia. Esses nêutrons gerados pela fissão podem atingir núcleos de <sup>238</sup>Urânio, ou, depois de termalizados, núcleos de <sup>235</sup>Urânio, dando origem a uma reação em cadeia. Num reator nuclear todas essas etapas

são controladas por barras de controles, constituídas de materiais absorvedores de nêutrons.

As fontes radioisotópicas de nêutrons são compostas de um radioisótopo e um material alvo. A produção de nêutrons a partir dessas fontes se dá através de uma reação nuclear induzida que ocorre no material alvo devido à incidência da radiação emitida pelo radioisótopo. As reações nucleares mais importantes para a geração dos nêutrons são as do tipo ( $\alpha, n$ ) e ( $\gamma, n$ ). São exemplos de emissores alfas os radioisótopos  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{238}\text{Pu}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$  e entre os elementos usados como material alvo, pode-se citar  $^{10}\text{B}$ ,  $^9\text{Be}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^7\text{Li}$  (KNOLL, 1999).

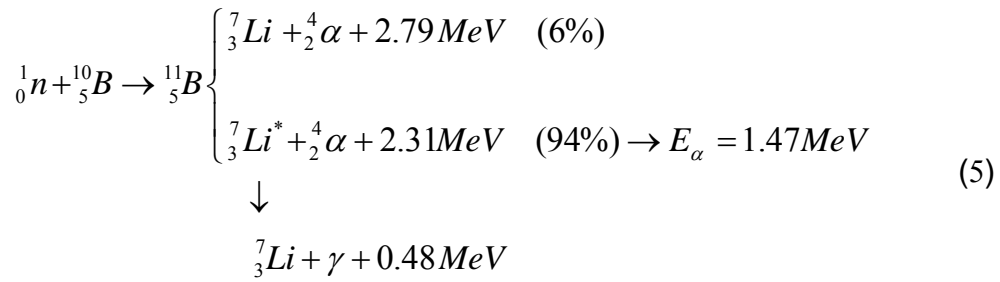
## II. 2. 2 – Conversores de nêutrons

A não interação do nêutron com nuvem eletrônica dos átomos, mas sim diretamente com os núcleos exige o uso de um material com alta seção de choque de absorção, denominado material conversor de nêutrons, para obtenção de uma Neutronografia. Os conversores de nêutrons são materiais com alta seção de choque de absorção para nêutrons, cuja função é absorver os nêutrons incidentes e, em seguida, como resultado da reação nuclear nêutron-material conversor, emitir uma radiação ionizante secundária, tais como partículas carregadas ou fótons, capazes de sensibilizar um material registrador. Existem dois tipos de materiais conversores:

1) Pronta emissão – a radiação secundária é emitida imediatamente após a absorção dos nêutrons. Estão incluídos nessa categoria os elementos lítio, boro, cádmio.

2) Potencialmente radioativos – tornam-se radioativos ao serem irradiados e permanecem ativos, após a irradiação. Desse grupo, os elementos mais usados, devido ao alto potencial de ativação são Dy, Rh, In e Au.

O isótopo estável  $^{10}\text{B}$  é o mais utilizado como conversor de nêutrons térmicos, devido a sua alta seção de absorção,  $\sigma_a = 3837$  barns, para nêutrons incidentes com energia de 25 meV. A reação nuclear que ocorre, quando um nêutron térmico interage com um núcleo desse conversor, é dada pelas seguintes equações 5 (MARASHI, 2000):



A seção de choque de absorção ( $\sigma_a$ ) do  $^{11}\text{B}$ , para nêutrons com energia de 25 meV, é de 0,005 barns. A Figura II.2 mostra o gráfico da seção de choque do isótopo  $^{10}\text{B}$  em função da energia dos nêutrons incidentes no intervalo de  $10^{-5}$  até  $10^7$  eV, plotado a partir da biblioteca de dados da ENDF/B-VII.0 (NNDC,2008).

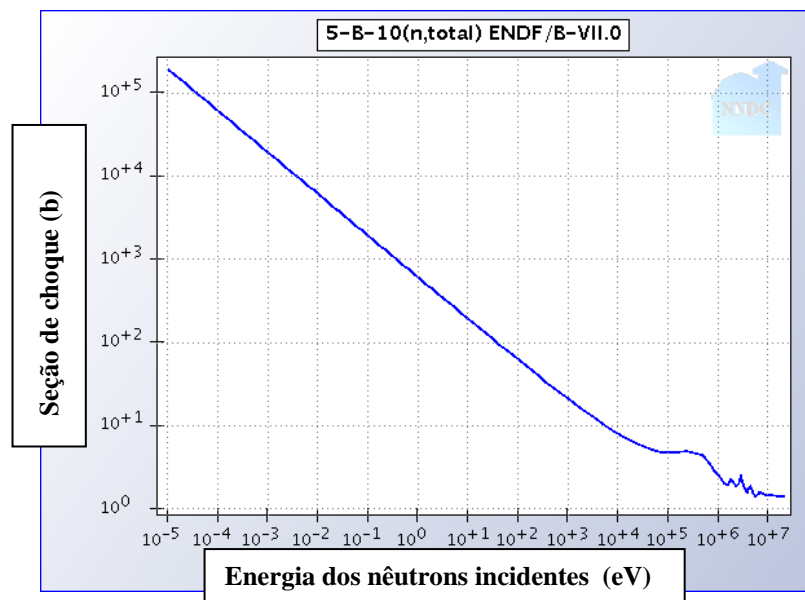


Figura II.2 – Gráfico da seção de choque (b) versus energia dos nêutrons (eV) para o isótopo  $^{10}\text{B}$ .

### II. 2. 3 – Técnicas de exposição neutrongráfica

As amostras podem ser expostas ao feixe de nêutrons por dois métodos distintos: Método direto e método indireto.

No método direto de exposição, a amostra e o registrador (conjunto filme-conversor) são irradiados simultaneamente, possibilitando que o filme registre imediatamente a radiação secundária resultante da interação do nêutron com o conversor, for-



mando uma imagem latente. No método indireto, primeiramente expõem-se a amostra e o conversor ao feixe neutrônico. Para um conjunto filme-conversor, após a irradiação, o conversor é posto em contato íntimo com o filme que sofre exposição devido à radiação proveniente do decaimento do conversor. Nesse método, a imagem produzida pela ativação neutrônica é formada na folha conversora e é transferida, logo em seguida, numa câmara escura, para um filme radiográfico, dentro de um chassi. O tempo necessário para o contato íntimo entre o conversor e o filme vai depender da meia vida do conversor, sendo suficiente três meias-vidas para a ativação e outras três meias-vidas para o decaimento radioativo.

### II.3 – Detectores em estado sólido de traços nucleares

Um tipo de detector muito utilizado para registrar a presença de partículas carregadas é o Detector em estado sólido de traços nucleares (SSNTD, sigla em inglês para *Solid State Nuclear Tracks Detector*). Esses detectores podem ser fabricados com materiais dielétricos, como, por exemplo, alguns minerais/cristais inorgânicos (zircônio, mica, quartz); certos tipos de vidro e, também, alguns tipos de plásticos, como o policarbonato, nitrato de celulose e o outros. Além de serem seletivos no registro da radiação, são, também, insensíveis aos fótons de luz, raios-X, elétrons e opacos à radiação UV (KALSI, 2008). A Figura II.3 mostra a fotografia de um SSNTD do tipo CR-39, sem a presença de traços, cortado em forma de lâmina.



Figura II.3 – Imagem de SSNTD, do tipo CR-39, sem registro de traços nucleares.

Da família dos SSNTD, o CR-39, nome comercial do polímero Polialil Diglicol Carbonato, PADC, de composição química  $C_{12}H_{18}O_7$  é um dos mais utilizados, pelo fato de possuir alto grau de transparência óptica, flexibilidade, somado a sua alta sensibilidade para registrar a presença de partículas alfa, prótons e íons pesados acima de certo

limite de energia e baixa sensibilidade para registrar fótons de luz, raios X, raios gama e ultravioleta e radiação beta.

Apesar do fenômeno da formação de traços latentes em sólidos serem conhecidos há cerca de 40 anos e a técnica para sua utilização ser relativamente simples e direta, não existe, até o momento, uma teoria única que explique o mecanismo de formação desses traços (NIKEZIC e YU, 2004).

### II.3.1 – Formação do traço latente

Quando uma partícula carregada atravessa um material sólido e dielétrico, orgânico ou inorgânico, ocorre, inicialmente, uma interação coulombiana entre a partícula e os elétrons orbitais dos átomos do material. Posteriormente, no final do seu alcance, a partícula interage com os átomos, através de colisões *knock-on* (tipo de colisão em que a distribuição de velocidades se desvia levemente da distribuição maxwelliana), tornando-os excitados ou ionizados. O número de eventos de ionização e excitação é extremamente alto e resulta num rastro rico em radicais livres estáveis e íons, chamados traços latentes, que deixam a matéria nessa região permanentemente em estado de alta desordem. Os elétrons secundários liberados durante o processo de ionização podem ser de alta ou de baixa energia. Os elétrons secundários de baixa energia, menor do que 100 eV, terão um curto alcance no material e as ionizações e excitações produzidas por eles ocorrerão muito próximos ao traço primário, acarretando a formação de pequenos traços espúrios; os elétrons secundários de alta energia, chamados raios delta, terão um maior alcance no material e produzirão ramificações de traços, a partir do traço primário (CHOPPIN *et al.*, 2002).

Os traços latentes apresentam diâmetros da ordem de angstrom, e para torná-los visíveis ao microscópio óptico, o detector é submetido a um processo químico de revelação, comumente chamado “ataque” que amplia os diâmetros dos traços para a ordem de micrometro ( $\mu\text{m}$ ), sendo, então, denominados traços revelados. O revelador (agente químico) usado para detectores fabricados a partir de materiais orgânicos ou inorgânicos, pode ser um ácido forte ou uma base forte, sendo as preferidas às soluções de hidróxido de sódio ou de potássio. Os materiais utilizados na detecção de partículas, segundo esse mecanismo, são chamados detectores em estado sólido de traços nucleares.

### II.3.2 – Processo de revelação dos traços nucleares

O processo de crescimento dos traços latentes se inicia, a partir do instante em que o detector é imerso no revelador, mantido a uma temperatura constante em um banho termostaticado durante um intervalo de tempo. Nessas condições, ocorre, simultaneamente corrosões na superfície do detector e na região do traço latente, que degradam e retiram porções do material. Como a região do traço latente é mais reativa, o agente químico age mais rapidamente sobre ela, dissolvendo-a a uma velocidade linear  $V_t$ , chamada velocidade de revelação dos traços, enquanto, na superfície e na região mais interna do detector, a degradação ocorre com velocidade  $V_g$ , denominada velocidade de revelação do volume. Com o tempo, forma-se um canal ao longo da trajetória da partícula e, conforme o revelador vai degradando a parede do canal, suas dimensões vão se ampliando, obtendo-se, então, o traço revelado. A condição necessária para haver formação do traço revelado é que diferença entre as velocidades  $V_t$  e  $V_g$  seja maior que zero,  $(V_t - V_g) > 0$ . A formação do cone em torno da trajetória da partícula, durante a revelação, pode ser entendida, quando se aplica o princípio de Huygens (ENGE, 1980). Pode-se imaginar que a velocidade de revelação na superfície do detector atua uniformemente em todas as direções, Figura II.4.

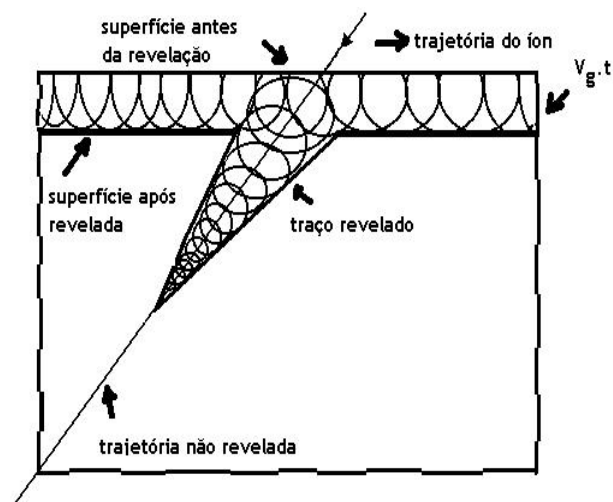


Figura II.4- Vista lateral de um traço revelado, onde o princípio de Huygens é aplicado para descrever a formação de cones.

A geometria do traço também depende da relação entre as velocidades  $V_t$  e  $V_g$ . Se  $V_t > V_g$  a forma geométrica dos traços será um cone de base circular ou elíptica, de-

pendendo do ângulo de incidência da partícula carregada, se normal ou oblíqua, respectivamente, em relação a superfície do detector. Se  $V_t \gg V_g$  o traço apresentará a forma cilíndrica, com a base circular ou elíptica. A Figura II.5 mostra em diagrama esquemático, a forma geométrica dos traços revelados nas condições citadas (ENGE, 1980, NIKEZIC e YU, 2004).

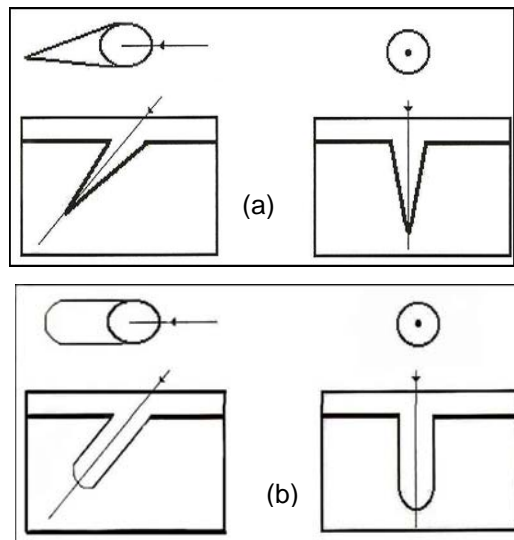


Figura II.5 – Visão lateral da geometria de um traço revelado: (a) forma cônica para  $V_t > V_g$  para partículas com incidência oblíqua e normal a superfície do detector; (b) forma cilíndrica para  $V_t \gg V_g$  para partículas com incidência oblíqua e normal a superfície do detector.

A Figura II.6 apresenta as imagens de traços produzidos por partículas alfa na superfície de um detector de traços, tipo CR-39 PM355, após o processo de revelação química.

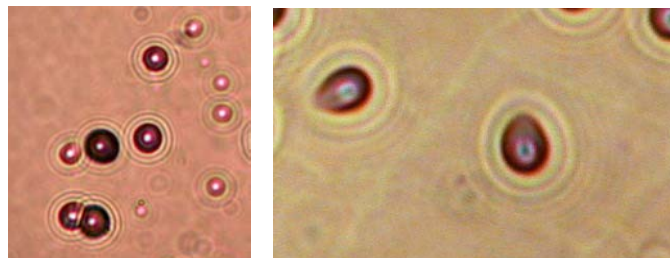


Figura II.6 – Imagens de traços de partículas alfa no detector CR-39 PM355, após o processo químico de revelação: a) traços isolados e traços sobrepostos com incidência normal a superfície; b) traço com incidência oblíqua em relação à superfície, nas condições de tempo de revelação de 60 minutos e temperatura de revelação 90°C.

### II.3.2 – O ângulo crítico de revelação do traço

A capacidade do reagente químico de revelar os traços nucleares latentes depende de um determinado ângulo característico do detector, chamado ângulo crítico de revelação,  $\phi_c$ . Como consequência, todos os traços latentes cujo ângulo de incidência,  $\phi$ , em relação à superfície do detector forem menores ou iguais ao ângulo crítico, não serão revelados. Isso acontece, porque a velocidade de remoção da superfície ( $V_g$ ) excede à da componente normal à superfície ( $V_t \text{ sen}\phi$ ) e o traço não será visualizado ao final da revelação, ou seja, o material é removido tão rapidamente que o ataque preferencial, ao longo da trajetória da partícula, é sobrepujado, e o traço eliminado. A Figura II.7, ilustra o perfil dos traços para vários ângulos de incidência, em relação ao ângulo crítico,  $\phi_c$  (WACHA, 1999).

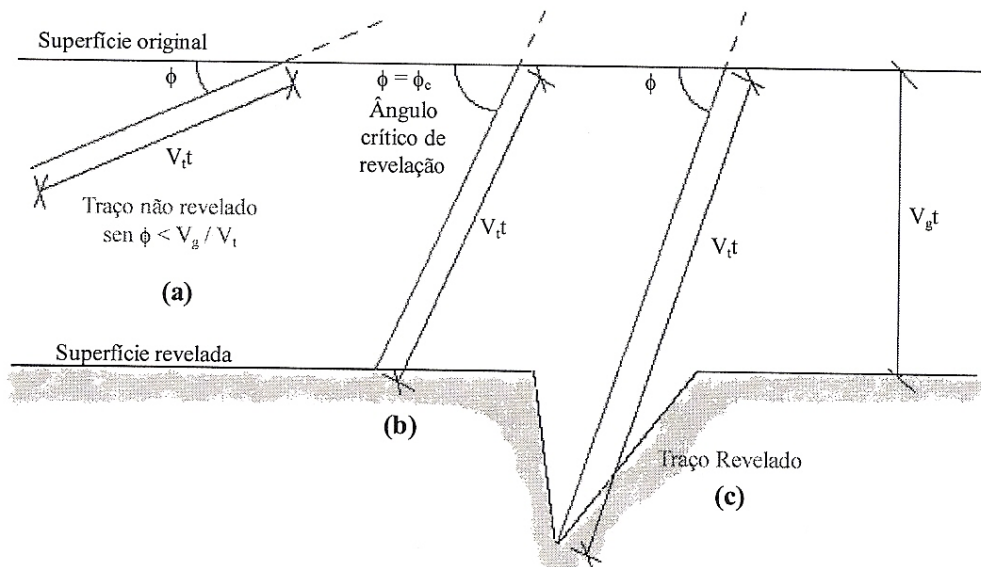


Figura II.7- Condições geométricas de revelação de um traço nuclear: a) se  $\phi < \phi_c : V_g > V_t \text{ sen}\phi$ , o traço não é revelado; b) se  $\phi = \phi_c : V_g = V_t \text{ sen}\phi$ , o traço não é revelado; c) se  $\phi > \phi_c : V_g < V_t \text{ sen}\phi$ ; o traço é revelado.

## II.4 – Micobactérias

### II.4.1 – Taxonomia e principais características das micobactérias

Em 1896, Lehmann e Neumann propuseram a criação do gênero *Mycobacterium*, para incluir o bacilo da tuberculose e o bacilo da lepra, até então, classificados como *Bacterium tuberculosis* e *Bacterium leprae* (GOODFELLOW, 1997). Segundo EUZÉBY (2009), até o momento, são conhecidas oficialmente 142 espécies e 11 subespécies de micobactérias. A maioria são saprófitas (decompositoras) que vivem e se replicam em ambientes naturais, enquanto uma pequena parcela delas se adaptaram ao ambiente intracelular, tornando-se patógenos preferencialmente de vertebrados superiores (BARRERA, 2007, EUZÉBY, 2009).

Em 1994, foi publicada nos Estados Unidos, a 9ª edição do *Manual Bergey's of Bacteriology Determinative* com o esquema de classificação para os procariotos baseado na composição da parede celular, morfologia, coloração diferencial, testes bioquímicos e outros, porém, não se atendo às relações evolutivas. Para o gênero *Mycobacterium*, o esquema taxonômico é o que se segue: (GARRITY *et al*, 2004):

Domínio → Bacteria

Filo → Actinobacteria

Classe → Actinobacteria

Ordem → Actinomycetales

subordem → Corynebacteriaceae

Família → Mycobacteriaceae

Gênero → *Mycobacterium*

Espécie → *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é composto por organismos unicelulares, procariontes (sem envoltório nuclear isolando os cromossomos), em forma de bastonetes delgados, retos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos, imóveis, não esporulados, não capsulados, sendo algumas espécies intracelulares facultativos, que se proliferam no interior de macrófagos. Apresentam dimensões que variam de 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 µm de largura. Quanto à velocidade de crescimento em meios de cultura, as espé-

cies são divididas em dois tipos: micobactérias de crescimento rápido, que evidenciam crescimento em menos de 7 dias, como por exemplo *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium abscessus*, e micobactérias de crescimento lento, como *M. tuberculosis* que requerem mais de 7 dias para crescerem. A temperatura ótima para o crescimento das espécies em meios de cultura é variável. As características mais marcantes desse gênero são: a sua grande resistência a descoloração com solução álcool-ácido, após serem tingidas com corantes fortes como a fucsina fenicada, sendo, por isso, conhecidos como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR); o alto conteúdo de guanina mais citosina (C+G) no DNA genômico, de 61% a 71 % e o alto teor de lipídios na parede celular, destacadamente os ácidos micólicos, que confere a essa família a resistência à descoloração com álcool-ácido. Resistem bem à ação do hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e alguns anti-sépticos (DAVIS, 1979, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998, BARRERA, 2007, TRABULSI *et al.*, 2008).

Algumas espécies, entre elas o Complexo *M. avium intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* e *M. scrofulaceum* são potencialmente patogênicas. As micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* são os agentes etiológicos da tuberculose, sendo que a *M. tuberculosis* e as suas variantes regionais ou subtipos, *M. africanum* e *M. canetti*, causam a tuberculose em humanos; a *M. bovis*, em gados; e a *M. microti*, principalmente, em pequenos roedores. Contudo, os dois maiores agentes patogênicos de grande impacto para a saúde pública são as espécies *M. tuberculosis* e *M. leprae* (Hanseníase).

A espécie *M. tuberculosis* é aeróbica obrigatória, um patógeno estrito da espécie humano, ou seja, não encontrado em outro hospedeiro natural (STAMM, 2004), com grande capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos. Possuem dimensões de 1 a 4 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro (RUNYON, 1974); sendo capazes de se desenvolverem sem se alongarem e sem formarem ramificações em cadeia. São encontradas isoladas ou agrupadas. É classificada como micobactéria de crescimento lento, levando cerca de 30 dias, para que o número de bacilos viáveis, num determinado meio de cultura seja alcançado, sendo, o seu tempo de geração, em condições favoráveis (temperatura de 37°C e pH neutro) de 16 a 24 horas (CHAUHAN, 2006). Dentro do gênero é a espécie que apresenta o maior conteúdo de guanina mais citosina (C+G) genômico, cerca de 65 mol% (BARRERA, 2007, ANDERSSON e SHARP, 1996). Os

ácidos micólicos específicos da parede celular possuem de 76 a 96 átomos de carbono e conferem a ela um aspecto bastante gorduroso, dificultando os mecanismos de absorção e desidratação.

#### II.4.2 – Estrutura celular das micobactérias

Estruturalmente, as micobactérias apresentam duas regiões distintas: a) o citoplasma e b) o envelope celular, composto pela membrana plasmática mais a parede celular. O citoplasma é constituído pelo citosol e algumas ultraestruturas, enquanto parede celular é constituída pelo periplasma mais a membrana externa (NIEDERWEIS, 2008). A Figura II.8 ilustra a disposição estrutural das micobactérias.

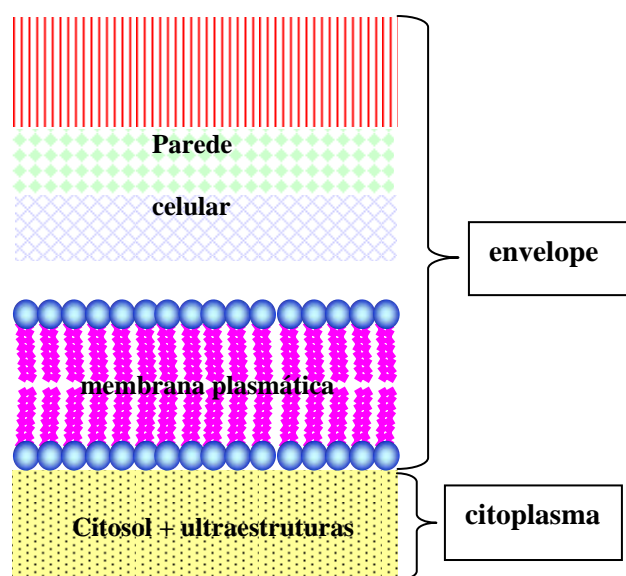


Figura II.8 – Esquema da estrutura celular de uma micobactéria.

##### a) Citoplasma

O citoplasma das micobactérias é semelhante ao de outras bactérias contendo, principalmente, proteínas, carboidratos, lipídios, íons orgânicos e compostos de baixo peso molecular. É um material espesso, semi-transparente, elástico e o sítio de muitas reações químicas. Contém estruturas como nucleóide, ribossomos e vacúolos lipídicos espalhadas em seu interior. O nucleóide é a região onde se concentra um cromossomo bacteriano não circundados por uma membrana nuclear. O cromossomo possui a forma circular e é constituído por molécula de DNA de dupla fita. Algumas espécies do



gênero como, por exemplo, *M. fortuitum* apresentam pequenos DNAs extracromossômico, de forma circular e de cadeia dupla, denominados plasmídeos; em relação à outras espécies ainda não existe confirmação da sua presença. Os ribossomos são estruturas muito pequenas responsáveis pela síntese proteica, que conferem aspecto granular ao citoplasma. É composto por proteínas e por um tipo de RNA, chamado RNA ribossômico (rRNA). Os vacúolos lipídicos armazenam os lipídios utilizados pelo microrganismos no metabolismo, quando necessário.

## b) Envelope celular

### Membrana Plasmática

É uma estrutura fina localizada na região mais interna do envelope que reveste o citoplasma micobacteriano. A membrana plasmática das micobactérias assemelha-se àquelas de outros organismos vivos, exceto pela presença de alguns lipopolissacarídeos que estão também presentes nos demais membros da ordem Actinomycetales (BARREIRA, 2007). Além dos lipopolissacarídeos (LPSs), a membrana é constituída, principalmente, de fosfolipídios e proteínas (DAFFÉ e ETIENNE, 1999, MAHAPATRA *et al.*, 2005, REZWAN *et al.*, 2007). Estruturalmente, parece apresentar uma dupla camada, já que, em micrografias eletrônicas, observa-se a existência de duas linhas escuras separadas por um espaço claro. As moléculas de fosfolipídios se organizam em duas linhas paralelas, chamadas camada dupla de fosfolipídios. Cada molécula de fosfolipídios pode ser dividida em duas partes: uma porção polar (hidrofílica), composta de grupos fosfatos e glicerol, e uma porção apolar, formada por ácidos graxos. Eles formam uma dupla camada na membrana plasmática, sendo arranjados de modo que suas regiões apolares se situem entre as polares. As proteínas se distribuem por toda a superfície da dupla camada, sendo que as proteínas, denominadas periféricas são encontradas na superfície interna ou externa da membrana, enquanto que, algumas proteínas, chamadas integrais, provavelmente, se estendem por toda a dupla camada da membrana citoplasmática e algumas delas possuem canais que permitem o transporte de moléculas específicas e de íons para o interior e exterior da célula. A principal função da membrana citoplasmática é atuar como uma barreira seletiva, permitindo ou não a entrada e saída de materiais. Segundo Daffé (1999), “apesar de vital para o microrganismo, ela, provavelmente, pouco participa dos processos patológicos”. A Figura II.9 mostra um esque-

ma do fosfolípido, da bicamada da membrana citoplasmática e o modelo de mosaico semi-fluído para a membrana citoplasmática.

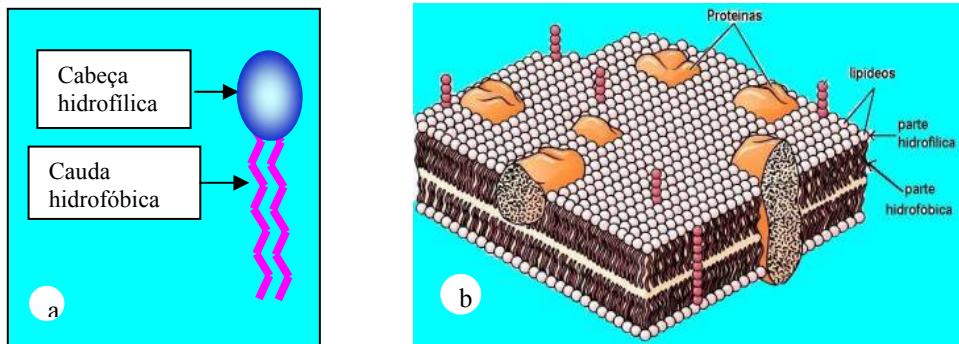


Figura II.9: a) símbolo do fosfolípido b) membrana citoplasmática conforme o modelo de mosaico semi-fluído. Fonte: <www.sbbq.org.br>.

## Parede celular

A parede celular das micobactérias é uma característica única dentre os procariontes, sendo, portanto, um traço bem marcante do gênero. Ela é responsável pela forma da célula, por várias características químicas e pela alta resistência das micobactérias aos ácidos, álcalis, detergentes e outras substâncias químicas, mesmo durante longa exposição. Sua espessura varia de 40 a 80 % do peso seco, de acordo a espécie, sendo constituída por ácidos micólicos, lipídios, polissacarídeos e proteínas. Apresenta um espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e a camada interna de arabinogalactana-peptídeoglicana, sendo a porção final externa dessa camada esterificada aos ácidos micólicos. Esses ácidos são ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 60 a 90 átomos de carbono, que conferem a esse gênero propriedades notáveis, como, por exemplo, resistência a desidratação e aos danos químicos, baixa permeabilidade a substâncias hidrofóbica e a moléculas hidrofílicas, incluindo moléculas de nutrientes como a glicose, o glicerol (HOFFMAN, 2008, NIEDERWEIS, 2008). As micobactérias apresentam três classes estruturais de ácidos micólicos: alfa-micólicos, que é o tipo mais abundante (acima de 70%), metóxi-micólicos e ceto-micólicos, menos abundantes (10 a 15%). A arquitetura desses ácidos é específico para cada espécie e essa propriedade é utilizada na identificação pela técnica cromatográfica (BARRY III, 1998, DUBNAU, 2000, TAKAYAMA *et al*, 2005). Modificações de ordem estruturais

e proporcionais nos ácidos micólicos parecem produzir alterações significativas na fluidez das camadas mais internas e, conseqüentemente, mudanças na permeabilidade da parede celular (DUBNAU, 2000). A camada mais externa da parede celular apresenta vários lipídios livres, como os sulfolípidios e o dimicolato de trealose (fator corda) um lipídio livre que confere um aspecto de corda aos bacilos em esfregaços realizados a partir de cultivos. Atravessando todo o envelope celular encontram-se alguns glicolípidios, que são ancorados à membrana citoplasmática e se estendem para o exterior da parede celular (BRENNAN, 2003).

O carácter ácido-resistente das micobactérias parece estar diretamente relacionado ao conteúdo de ácidos micólicos em sua parede celular. Apesar de sua importância prática como identificador do gênero, até hoje, não é bem compreendido, em termos moleculares, o porque da parede celular ser permeável às tinturas alcalinas e quais mecanismos que impedem sua remoção por ácidos. Experimentos pioneiros, realizados na primeira metade do século passado, conduziram à hipótese de que os corantes são retidos no citoplasma (YEGIAN e VANDERLINDE, 1947). Evidências posteriores sustentam o papel dos lipídios reterem o corante. A Figura II.10 apresenta um esquema da parede celular das micobactérias e seus principais constituintes, segundo o modelo proposto por Minnikim, em 1982.

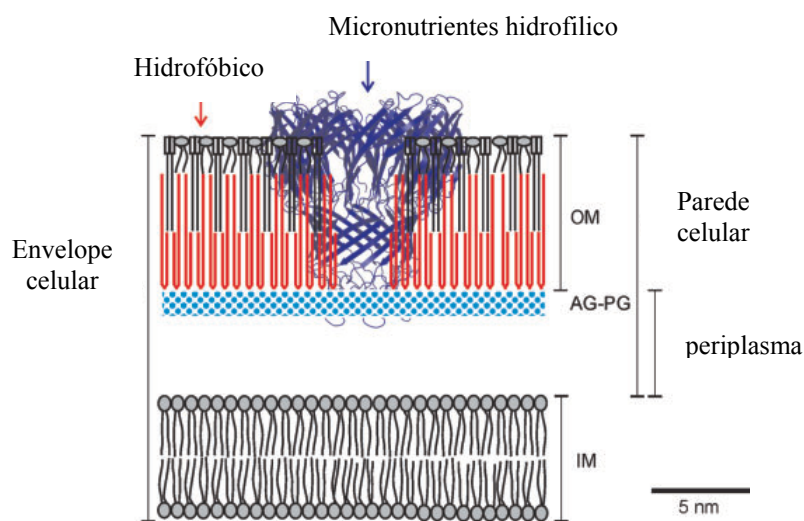


Figura II.10 – Parede celular de uma micobactéria com base no modelo proposto por Minnikim, em 1982 (NIEDERWEIS, 2008).

## Cápsula

É a região mais externa do envelope celular composta principalmente de polisacarídeos e proteínas (e em menor quantidade de lipídios). Esses constituintes não são covalentemente ligados à parede celular, não sendo, portanto considerados uma cápsula no sentido estrito da palavra, mas funcionalmente se comportam como se assim o fosse. Pesquisas recentes têm apontado para o fato de que, algumas substâncias presentes na cápsula estão potencialmente envolvidas em passos chaves da patogenicidade. A cápsula também impediria a difusão de macromoléculas para as regiões mais internas da célula, representando, portanto uma barreira seletiva (DAFFÉ e ETIENNE, 1999).

### II.4.3 – Característica tintorial das micobactérias

O método de coloração mais utilizado para corar as micobactérias e permitir a sua visualização por microscopia óptica é o método de Ziehl-Neelsen (ZN), descoberto pelos médicos Franz Ziehl e Friedrich Neelsen, em 1882. Nesse método, usa-se a fucsina fenicada (uma mistura dos corantes trifenilmetano, rasanilina e pararosalina em solução aquosa de fenol a 5% (DAVIS, 1979); uma solução álcool-ácido; e o corante azul de metileno, cujo procedimento será detalhado posteriormente. O resultado é positivo para bacilos álcool-ácido resistentes, se forem visualizados bacilos corados de rosa forte, já que outras bactérias ou células aparecem tingidas de azul. Será negativo se não forem observados bacilos tingidos de rosa forte, em 300 campos examinados. A Figura II.11 apresenta a imagem de microscopia óptica um esfregaço *Mycobacterium tuberculosis* corada pelo método de ZN.

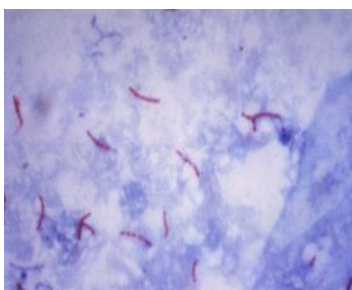


Figura II.11– Esfregaço de *Mycobacterium tuberculosis* submetida a Coloração de Ziehl-Neelsen. Fonte: <<http://www.biotopics.co.uk/newgcse/tbpreventioncontrol.html>>

## II.4.4 – Crescimento e curva de crescimento micobacteriano

### II.4.4.1 – Crescimento de culturas micobacterianas

Meios de cultura são meios sólidos, semi-sólidos ou líquidos, constituídos por nutrientes distintos e adequadamente balanceados para prover as necessidades básicas para o metabolismo dos microrganismos e seu crescimento populacional. Quanto à taxa de crescimento, as micobactérias são classificadas em dois grandes grupos: as de crescimento rápido e aquelas de crescimento lento. No primeiro grupo, o tempo de crescimento é menor do que sete dias e, no segundo, o tempo é maior (SHINNICK e GOOD, 1994). Na prática, a taxa de crescimento é expressa pelo número de gerações ocorridas por hora, sendo a geração definida como a duplicação do número de microrganismos. A população bacteriana em um meio de cultura dobra a cada geração. Se não houver morte celular, a população de células presente em cada geração pode ser calculada, através de uma progressão geométrica do tipo  $2^n$ , sendo  $n$  o número de gerações. O intervalo de tempo necessário para ocorrer à divisão celular é chamado de tempo de geração, que depende, principalmente, do tipo de nutrientes presentes no meio de cultura e das condições físicas de incubação.

### II.4.4.2 – Curva de crescimento

É uma curva que expressa o crescimento da população bacteriana em um meio nutriente líquido, durante um intervalo de tempo. Uma curva típica, conforme a mostrada na Figura II.12, apresenta as quatro fases desse crescimento, a saber:

- a) Fase de adaptação ou lag → é a fase que ocorre após a inoculação da cultura. É o período em que se dá a adaptação da célula ao meio, com crescimento lento.
- b) Fase logarítmica ou exponencial → é a fase em que a população bacteriana cresce exponencialmente, ou seja, o crescimento do número de células viáveis é maior do que o número de células que morrem. Ela ocorre em um intervalo de tempo curto, pois os microrganismos utilizam ativamente os nutrientes para a biossíntese de material celular e a produção de energia.

c) Fase estacionária → nessa fase o número de células que nascem é igual ao número de células que morrem, devido à redução de nutrientes no meio ou ao acúmulo de metabólitos tóxicos.

d) Fase de declínio → é a fase em que o número de bactérias que morrem é maior do que o número das que nasce. A taxa de mortalidade cresce até alcançar um máximo, em consequência da exaustão de nutrientes.

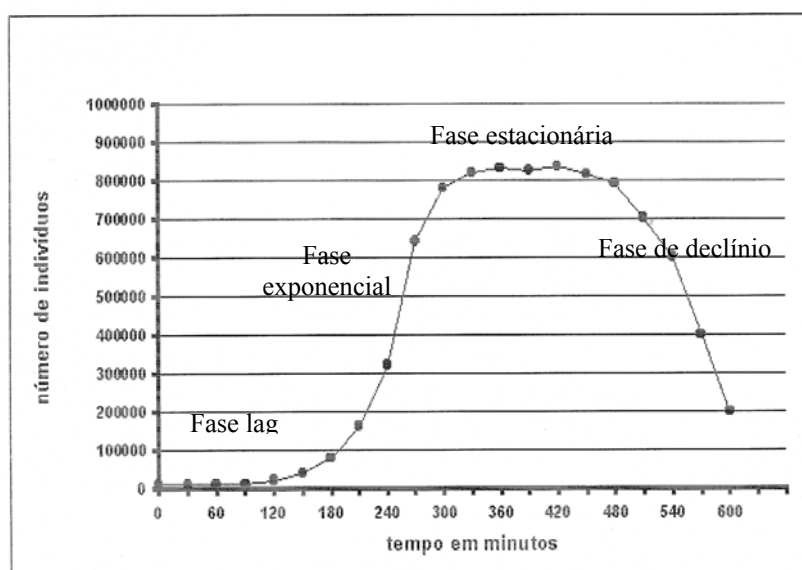


Figura II.12 – Curva de crescimento bacteriano típico (MORETTI, 2007)

## II.5 – Métodos Convencionais de Diagnóstico

### 1.a) Baciloscopia direta para bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR).

A baciloscopia do escarro é um método que permite o exame, com microscópio óptico, do escarro, após esfregaço em lâmina e tingimento pelo método de ZN. É o exame rotineiro para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, principalmente, a pulmonar. É um método de baixo custo e rápida execução, que permite a identificação de doentes bacilíferos, principal fonte de infecção. Através desse método, pode-se acompanhar a eficácia do tratamento, observando-se a redução bacilar e a negativação do escarro em exames mensais, enquanto o paciente tiver expectoração. Para que o resulta-

do baciloscópio seja considerado positivo é necessário detectar a presença de 5.000 a 10.000 bacilos por ml de escarro. A contagem dos bacilos deve ser feita em cem campos microscópicos, no mínimo, anotando-se o número de bacilos encontrados em cada campo e o resultado informado em número de cruces, conforme a escala semi-quantitativa abaixo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998):

Quadro 1 – Escala semi-quantitativa

(-)	Ausência de BAAR em 100 campos observados.
(+)	Presença de pelo menos 1 BAAR por campo em 100 campos observados.
(++)	Presença de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados.
(+++)	Presença de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados.

Apesar da facilidade de execução, a baciloscopia apresenta algumas desvantagens, tais como, o elevado número de bacilos necessários para atestar a positividade; carência de sensibilidade, que varia entre 30% a 80% e incapacidade de discriminar a espécie de micobactéria (GEBRE, 1995, RIEDER, 1998)

#### 1.b) Cultivo de micobactéria

O cultivo é um procedimento que propicia a nutrição, o crescimento e a multiplicação dos microrganismos quando semeados em determinados meios líquido ou sólido, os meios de cultura. Para o isolamento e/ou crescimento das micobactérias, o meio mais utilizado é o Lowenstein-Jensen (LJ), um composto de ovos coagulados, verde malaquita, sais, farinha de batata, glicerol (fonte de carbono) e aspargina como fonte de nitrogênio. A Figura II.13 mostra a formação de colônias de MTB, no meio LJ. Outros meios também utilizados são os 7H10 e 7H11 de Middlebrook, solidificados à base de agar, e o meio líquido 7H9 de Middlebrook (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). A cultura é o método mais sensível que detecta de 70% a 89% dos casos, em média 80%, e permite a identificação posterior da espécie através de testes bioquímicos ou sondas genéticas (SCHIRM *et al.*, 1995). A limitação do método está no tempo necessário para o crescimento da cultura, que varia de 30 a 60 dias. Para pacientes com baciloscopia negativa de escarro, o diagnóstico micobacteriológico da TB é geralmente tardio.

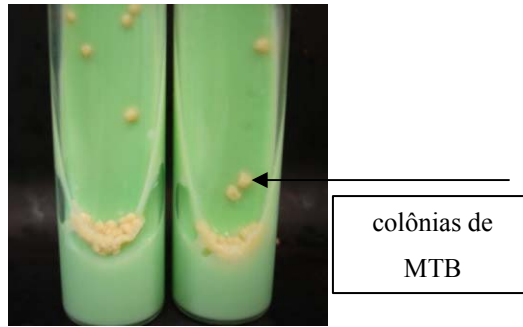


Figura II.13– Cultura bacteriana em meio de cultura LJ, mostrando colônias de *M. tuberculosis*. Fonte: <[www.ann.clinmicrob.com/content/4/1/18](http://www.ann.clinmicrob.com/content/4/1/18)>

## II.6 – Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença grave que afeta principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), porém, outras regiões e órgãos do corpo humano, como o sistema nervoso central, os olhos, a laringe, os gânglios linfáticos, ossos e articulações, os rins, os órgãos genitais, intestino e a pele, podem ser também acometidos (tuberculose extrapulmonar). Dentre os fatores responsáveis pela evolução da infecção tuberculosa, destacam-se: baixa resposta do sistema imunológico do indivíduo infectado; o número de bacilos infectantes e a sua virulência (habilidade do microrganismo em causar doença em um hospedeiro, superando a sua defesa). O seu tratamento é bastante prolongado, sendo necessário no mínimo seis meses.

### II.6.1 – Transmissão da doença

A infecção pelo bacilo de Koch é transmitida, através da inalação, por pessoas saudáveis, de gotículas de secreção respiratórias liberadas durante a fala, espirro, e principalmente, tosse de uma pessoa com tuberculose pulmonar bacilífera ou laríngea em atividade. Apesar da presença de gotículas de tamanhos variados, somente aquelas com diâmetros entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  e que permanecem em suspensão no ar (aerossóis) podendo alcançar os bronquíolos e os alvéolos causarão a infecção. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as médias, em geral, são retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios, sendo, em seguida, lançadas no trato digestivo.



rio, onde são deglutidas e inativadas (RIEDER, 1999). Quanto maior o tempo de contato entre indivíduos doentes e sadios, maior a probabilidade de transmissão, principalmente, em ambientes fechados e com pouca ventilação.

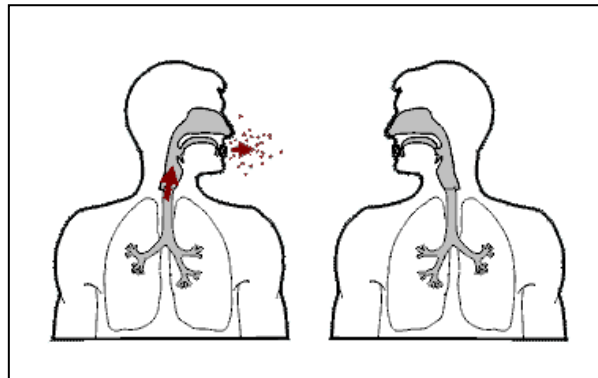


Figura II.14 - Esquema de transmissão da tuberculose.

Fonte: <[http://www.fw-ac-deptofhealth.com/tuberculosis\\_clinic.htm](http://www.fw-ac-deptofhealth.com/tuberculosis_clinic.htm)>

A tuberculose pulmonar apresenta duas formas distintas, denominadas: tuberculose primária (primoinfecção) e tuberculose secundária (também conhecida como tuberculose do adulto, pós-primária ou de reativação). A tuberculose primária ocorre em indivíduos que entram em contato com o bacilo pela primeira vez, enquanto que a forma secundária deve-se a uma nova infecção (reinfecção exógena) ou a reativação de bacilos latentes (reinfecção endógena) (BOMBARDA *et al.*, 2001).

Na primoinfecção, após a inalação, a maioria dos bacilos é apreendida na mucosa do trato respiratório, traquéia e nos brônquios superiores e são eliminados pelos mecanismos de defesa mucociliares. As gotículas contendo o bacilo e com dimensões inferiores a 5  $\mu\text{m}$ , que superam esta barreira, alcançam o trato respiratório inferior, especialmente os alvéolos, onde eles são fagocitados pelos macrófagos alveolares. A sobrevivência do bacilo no pulmão dependerá da relação patogenicidade/virulência e da eficácia dessas células de defesa (macrófagos) em eliminá-los pela ação fagocítica. Se os macrófagos alveolares não forem capazes de interromper o crescimento bacteriano, o sistema imunológico recruta os macrófagos ativados e modificados que voltam aos alvéolos, aglomeram-se ao redor dos bacilos, transformando-se em células epitelióides (células gigantes derivadas dos macrófagos). Terminada sua função fagocítica, as células epitelióides se agrupam dando origem às células gigantes multinucleadas. Todo esse conjunto de reação é finalizado com a formação do granuloma, Figura II.15. Assim,

estruturalmente, o granuloma é inicialmente formado por núcleo de macrófagos infectados, cercado por macrófagos ativados, com uma camada externa de linfócitos circundados pelo colágeno e por outros componentes da matriz extracelular (KRITSKI e MELO, 2007, BOMBARDA *et al* 2001). Segundo Bombarda *et al* (2001) “o conjunto de granulomas formados recebe o nome de nódulo de Ghon. Ao conjunto de nódulo de Ghon, linfangite e linfadenite dá-se o nome de complexo primário da tuberculose que, dependendo do número e da virulência dos bacilos e do grau de hipersensibilidade e resistência do hospedeiro, pode evoluir para a cura ou para doença”. Nessa fase do processo infeccioso, os indivíduos são assintomáticos.

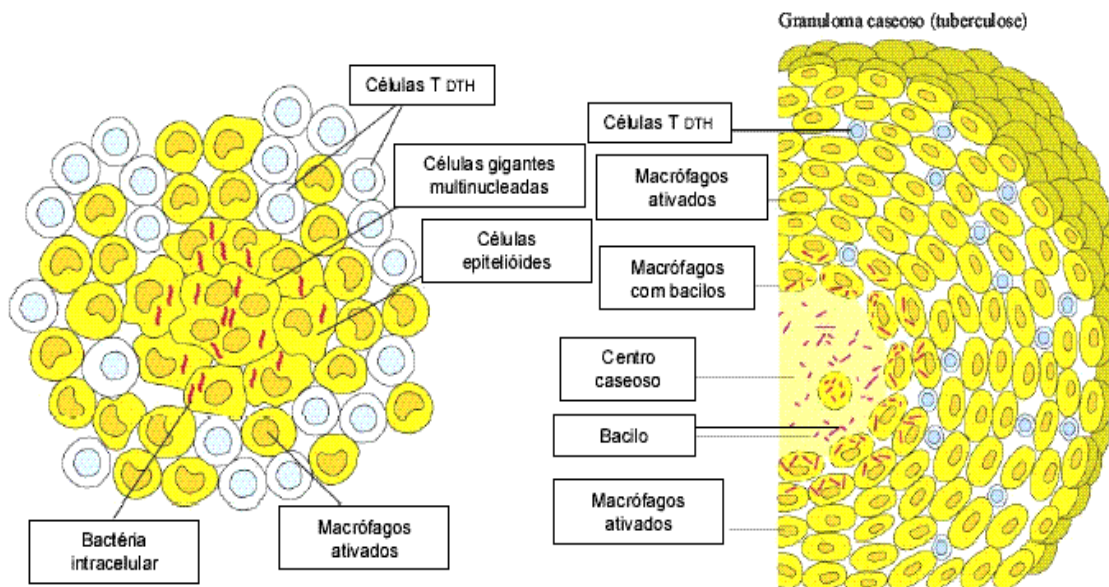


Figura II.15 – Morfologia de uma lesão granulomatosa (KUBY, 2001).

Na maioria das vezes, os indivíduos desenvolvem uma resposta imunológica específica bastante adequada e detêm a grande maioria dos invasores. Porém, alguns bacilos permanecem em estado de latência, podendo o infectado ficar assintomático por tempo indeterminado. Entretanto, em alguns indivíduos desse grupo, principalmente, os imunossuprimidos, após vários meses ou até anos, os bacilos latentes podem ser reativados, em fase da ruptura do balanço hospedeiro-parasita, possibilitando uma multiplicação rápida do agente etiológico, culminando em manifestações clínicas da doença (tuberculose secundária ou tuberculose pós-primária) (KRITSKI e MELO, 2007).

Se, na fase inicial do contágio, a resposta do sistema imunológico do indivíduo não for eficaz, o processo infeccioso avança rapidamente, permitindo o aumento progressivo do foco pulmonar primário, que sofre necrose central, podendo disseminar-se pelo restante dos pulmões e para a cavidade pleural que os envolve (tuberculose pulmonar primária progressiva). Esses indivíduos apresentam sintomas que incluem febre alta, prostração intensa, sudorese noturna e tosse produtiva.

A tuberculose extrapulmonar é o tipo que afeta outras partes do corpo e, em geral, origina-se durante a infecção primária e antes do desenvolvimento da resposta imune, caso o bacilo se fixe e se multiplique em algum órgão, após disseminação linfohematogênica. Nesse tipo de tuberculose, os órgãos mais afetados são aqueles que não oferecem condições ideais para o seu crescimento, razão pela qual, geralmente, sua evolução é lenta e as lesões e os fluidos corpóreos possuem pouca quantidade de bacilos presentes (paucibacilares). Como nem sempre o acesso a essas lesões, por secreções e fluidos corpóreos são possíveis, a obtenção de material para diagnóstico é feito, em muitos casos, por técnicas invasivas (KRITSKI e MELO, 2007).

## CAPÍTULO III

### METODOLOGIA

Iniciou-se a pesquisa de um protocolo específico para a caracterização da *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) presente em escarro de indivíduos infectados, a partir de imagens neutrográficas, utilizando protocolos semelhantes aos adotados para detecção de microrganismos em outras teses de doutorado (WACHA, 1999, LOPES, 2001): concentração da solução de  $^{10}\text{B}$  igual a 5 mg/mL; temperatura de incubação do bacilo com  $^{10}\text{B}$  de 37°C; tempo de exposição da amostra ao feixe de nêutrons térmicos de 30 minutos e tempo de revelação dos traços nucleares, em revelador NaOH 6,25 N, mantido a temperatura 90°C numa unidade de banho termoestatizado por 60 minutos. As espécies de micobactérias utilizadas na pesquisa foram a *M. avium* ATCC 19698, *M. smegmatis* ATCC 19420, *M. smegmatis* ATCC 14468, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. massiliense* (CRM0018), *M. fortuitum* ATCC 6841 e a *M. tuberculosis*, do Laboratório de Micobactérias/IMPPG/UFRJ; utilizou-se, também a bactéria *Escherichia coli*. Por questões de biossegurança, os ensaios foram realizados inicialmente com alguma das espécies acima citadas e, posteriormente, com a *M. tuberculosis*. O detector de traços usado em todo o trabalho foi o CR-39 PM355 fabricado pela empresa inglesa Page Moulding Ltda, com 625 µm de espessura.

#### III.1 – Cultura micobacteriana e armazenamento

As micobactérias foram cultivadas no meio sólido Lowenstein-Jensen (LJ) mantido numa estufa a uma temperatura ótima de crescimento, em torno de 37°C, por um período dependente da espécie cultivada. Decorrido esse tempo, uma massa da amostra foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 perolas de vidro e, em seguida, agitada no vortéx, com a finalidade de se obter uma maior quantidade de bacilos desgrumados. Depois, se adicionou 2,0 mL da solução de tampão sorensen + glicerol a 15% e agitou-se. Em seguida, deixou-se repousar por 10 minutos, para sedimentar os grumos. Transferiu-se 1,2 mL da suspensão para um criotubo, que foi armazenado num freezer e mantido à temperatura de -20°C, até as micobactérias serem utilizadas nos ensaios neu-

trongráficos. Em dois experimentos as micobactérias foram crescidas no meio líquido Middlebrook 7H9.

### III.2 – Quantificação do número de bacilos e diluições decimais

O método utilizado para se determinar o número de micobactérias presentes nas amostras foi o método de Turbidimetria e, como padrão de comparação, a escala de McFarland. A partir de um crescimento em LJ, transferiu-se uma massa da micobactéria escolhida para um tubo de ensaio com pérolas de vidro (5 pérolas/1mL de água destilada) e agitou-se no vórtex por 15 s. Adicionou-se 2 mL de água esterilizada e agitou-se-o novamente, para fazer uma suspensão e deixou-se repousar por 10 min. Transferiu-se um volume do sobrenadante para um tubo com 5 mL de água destilada para obter-se o padrão nº 1 da escala de McFarland, que indica um conteúdo de, aproximadamente, 300 milhões de micobactérias por mililitro. Para obter-se amostras menos concentradas utilizou-se o método das diluições decimais, conforme ilustra a Figura III.1.

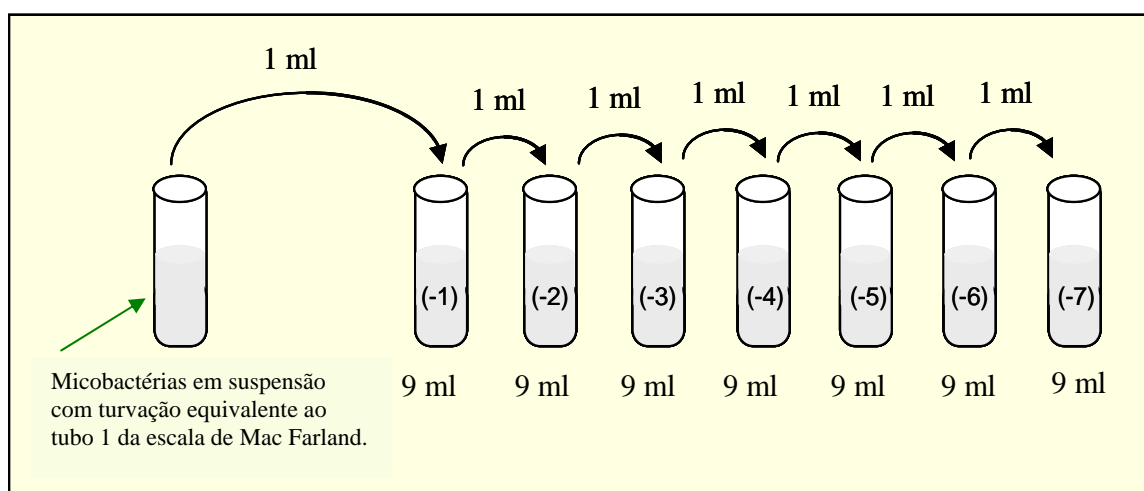


Figura III.1 – Diagrama representativo do método das diluições decimais.

### III.3 – Método de esterilização

Como já mencionado no capítulo II, a MTB é transmitida por inalação, e, portanto, ela só pode ser manipulada no interior de uma cabine biológica de segurança para micobactérias e com os equipamentos de proteção individual (EPI) ou, então, após ser

esterilizada. Dois métodos de esterilização foram usados: a) químico; b) por vapor úmido sob pressão usando autoclave. No primeiro método, usou-se como agente químico esterilizante o hipoclorito de sódio (NaClO) e o procedimento consistiu em, inicialmente, vortexar as amostras colocadas em tubos de ensaios com pérolas de vidros e, em seguida, adicionar certo volume de solução de hipoclorito de sódio (cloro livre com concentração de 1% a 2%) e deixá-la agir por, no mínimo, 30 minutos. No segundo método, as amostras foram agitadas, diluídas até a turvação correspondente a do tubo nº1 da escala de McFarland, e depois, por diluições decimais, até a concentração de 300 mil células/mL; por fim, foram colocadas no autoclave a uma temperatura de 121°C por 30 minutos.

#### III.4 – Conversor de nêutrons e dopagem com $^{10}\text{B}$

Nesse trabalho, escolheu-se como conversor de nêutrons o elemento químico boro, símbolo B, alocado no grupo 13 da tabela periódica. Ele é classificado como um semi-metal, possuindo número atômico 5, massa atômica de 10,811(7) u, valência  $+3$ , eletronegatividade de 2,04 (escala de Pauling), densidade igual a 2460 kg/m<sup>3</sup>. Os isótopos estáveis que ocorrem naturalmente na natureza são o  $^{10}\text{B}$ , que possui cinco nêutrons no núcleo e abundância natural de 19,9% e o  $^{11}\text{B}$ , que contém seis nêutrons e abundância natural de 80,1% (WEBELEMENTS, 2007).

Após os procedimentos de esterilização e diluição, prepararam-se vários tubos de ensaio contendo 50 µl de amostra em suspensão, com diferentes concentrações de bacilos, que foram dopados com 5 µl de solução de  $^{10}\text{B}$  (ácido bórico diluído em solução salina a 0,9%) na concentração de 5 mg/mL e colocados em uma estufa mantida na temperatura de 37°C por 30 minutos. Uma alíquota de 5 µl da amostra foi gotejada sobre as lâminas de CR-39 (detector) e secas à temperatura ambiente. Em seguida cada lâmina foi exposta ao feixe de nêutrons provindos do canal J-9 do reator Argonauta/IEN/CNEN. Numa fase mais avançada da pesquisa outras concentrações para a solução de boro foram utilizadas, como: 10 mg/mL, 15 mg/mL e 55 mg/mL.

### III.5 – Arranjos neutrongráficos e condições de irradiação

Montou-se dois tipos de arranjos para a realização dos ensaios neutrongráficos em função de se usar uma solução aquosa de boro-10 ou uma folha conversora de boro-10.

#### 1º) solução aquosa de boro-10

Nesse caso, a amostra contendo as micobactérias dopadas com a solução de boro-10 foi depositada sobre a lâmina de CR-39, e esta, fixado sob um suporte de alumínio. Posteriormente, o conjunto foi posicionado no canal de irradiação J-9 do Reator Argonauta, de forma que fluxo de nêutrons térmicos incidisse primeiro sobre a amostra, como ilustra a figura III.2.

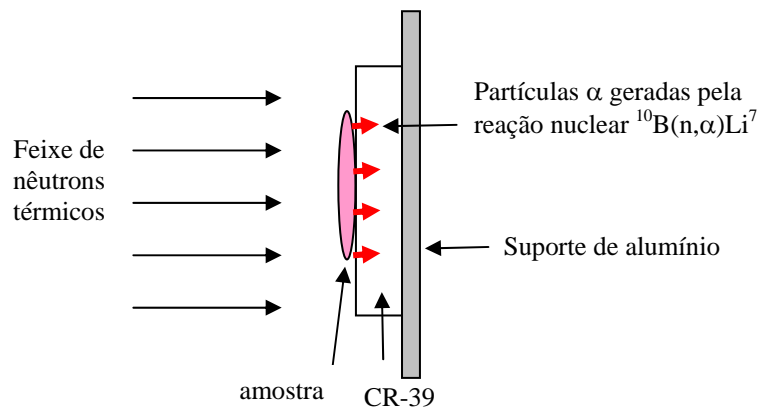


Figura III.2 – Esquema da montagem experimental do conjunto amostra-detector e da irradiação.

#### 2º) folha conversora

Nesse arranjo, a amostra foi depositada sobre a lâmina de CR-39 e sobre ela uma folha conversora de boro. Para garantir o contato íntimo entre o detector, a amostra e o conversor, colocou-se o conjunto no interior de um chassi radiográfico de alumínio Kodak, para posterior exposição ao feixe de nêutrons térmicos do reator Argonauta, por 2 horas. O chassi foi posicionado no canal de irradiação J-9, de forma que o feixe de nêutrons primeiro atravessasse o detector, depois a amostra e, por último, a folha converso-

ra. As partículas alfa produzidas durante a reação nuclear  $^{10}\text{B}(n,\alpha)\text{Li}^7$ , se direcionam para o CR-39 (PEREIRA, 2008). A Figura II.3 ilustra a montagem experimental.

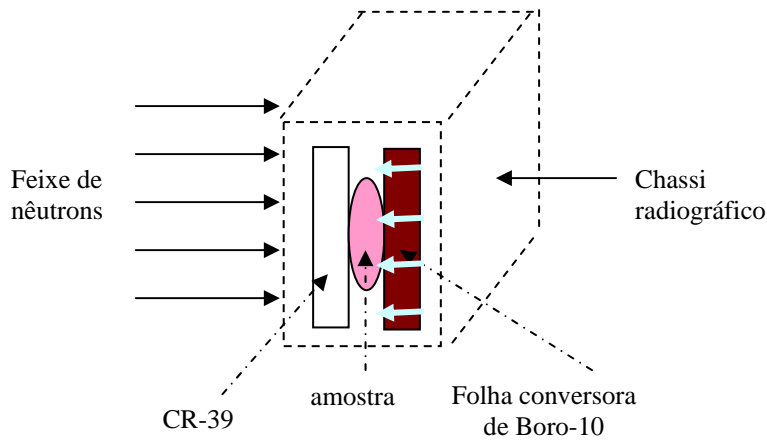


Figura III.3 – Desenho esquemático mostrando a montagem do chassi radiográfico e da irradiação.

Todos os ensaios neutrongráficos foram realizados no reator Argonauta IEN/CNEN, mantido no estado de criticalidade e operado a uma potência nominal de 340 watts. No canal de irradiação, J-9, está instalado um colimador divergente de grafita de onde se extrai o feixe de nêutrons térmicos com as seguintes características, no plano da imagem: fluxo de nêutrons térmicos de  $4,46 \times 10^5 \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; razão de colimação,  $L/D$ , igual a 70; razão  $n/\gamma$  de  $3 \times 10^6 \text{ n.cm}^{-2}.\text{mrem}^{-1}$ ; e energia média dos nêutrons térmicos de 30 meV. O arranjo instalado no canal de irradiação J-9 é mostrado na figura III.4.

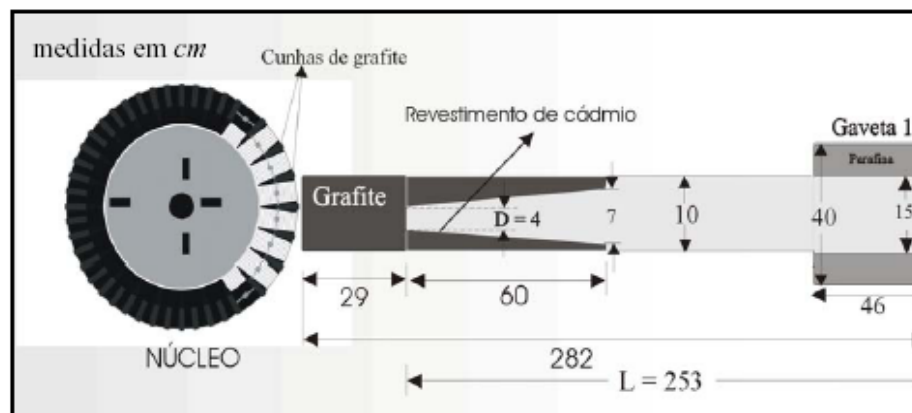


Figura III.4 – Esquema da coluna térmica externa situada na parte frontal do reator Argonauta (FERREIRA, 2003).



### III.6 – Revelação dos traços latentes

Para transformar os traços latentes produzidos pelas partículas alfa, provenientes da reação nuclear  $^{10}\text{B}(n,p)^7\text{Li}$ , em traços revelados, submeteu-se o detector a um ataque químico numa solução aquosa de NaOH a 6,25 N, mantido à temperatura de 90°C numa unidade de banho termostaticado, durante 60 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o revelador e cessar o processo de revelação; posteriormente, elas foram lavadas em água corrente destilada para a remoção de impurezas que pudessem interferir na análise das imagens gravadas no detector. Por último, fez-se a secagem das lâminas com ar morno, usando-se um secador de cabelos, ou deixou-se secar a temperatura ambiente.

### III.7 – Visualização das imagens no detector SSNTD

As imagens registradas nas lâminas de CR-39 foram visualizadas com o auxílio de um microscópio óptico de transmissão, Nikon E400, alinhado para a iluminação de Köhler, acoplado a uma ocular de 10x e objetivas de 10x, 40x e 100x, e digitalizadas com uma câmera digital Coolpix 995 da Nikon acoplada ao microscópio óptico. A câmera possui um zoom que permite ampliar em até 4x a imagem visualizada no campo óptico do microscópio, além daquelas fornecidas pelas lentes ocular e objetiva.

### III.8 – Procedimentos para coloração pelos métodos de Ziehl-Neelsen e Kinyoun

As lâminas de vidro e de CR-39 usadas como controle foram coradas pelos métodos de Ziehl-Neelsen (ZN) e Kinyoun, respectivamente. No método ZN, usa-se como corante a solução de fucsina fenicada a 0,3%, como reagente a solução álcool-ácido (970 mL de álcool a 95° e 30 mL ácido clorídrico PA) e como contraste o azul de metileno a 0,1%. No método Kinyoun a fucsina fenicada a 0,3% é substituída pela fucsina fenicada a 4% e a etapa de aquecimento do corante com calor da chama do bico de Bunsen não é realizada. Essa troca foi necessária porque o aquecimento com a chama provocou danos nas lâminas de CR-39.

#### Coloração de Ziehl-Neelsen:

- 1) preparou-se esfregaços homogêneos e delgados das amostras sobre lâminas de vidro e fixou-se por calor com um bico de Bunsen ou com uma mistura de glutaraldeído a 2% e formol a 37%;
- 2) colocou-se a lâmina no suporte, cobriu-se o esfregaço com fucsina fenicada a 0,3%, aqueceu-se à chama do bico de Bunsen até a emissão de vapores visíveis, sem deixar a fucsina fenicada ferver, por três vezes;
- 3) lavou-se a lâmina, cuidadosamente, com jatos de água de baixa pressão, para retirar a fucsina fenicada sem desprender a película corada;
- 4) descorou-se o esfregaço com o álcool-ácido por um minuto, executando-se movimentos suaves;
- 5) repetiu-se o procedimento de lavagem;
- 6) cobriu-se o esfregaço com o azul de metileno (corante de contraste) e deixou-se atuar de 30 a 60 segundos;
- 7) lavou-se com água corrente, mantendo-se a lâmina inclinada;
- 8) deixou-se a lâmina secar a temperatura ambiente;
- 9) observou-se as lâminas com microscópio óptico e objetiva de imersão de 100x.

#### Coloração de Kinyoun:

- 1) preparou-se esfregaços homogêneos e delgados com amostras dopadas com o boro-10 sobre lâminas de CR-39 e fixou-se com uma mistura de glutaraldeído a 2% e formol a 37%;
- 2) cobriu-se o esfregaço com a solução de fucsina fenicada de Kinyoun e deixou-se agir por 5 minutos, adicionando-se, sempre que necessário mais fucsina para evitar o ressecamento do corante;
- 3) lavou-se as lâminas cuidadosamente com jatos de água de baixa pressão;
- 4) descorou-se o esfregaço com a solução álcool-ácido por um minuto;
- 5) repetiu-se o procedimento de lavagem, mantendo as lâminas sempre inclinada;
- 6) cobriu-se o esfregaço com o azul de metileno e deixou-se atuar de 30 a 60 segundos;
- 7) lavou-se com água corrente, mantendo-se as lâminas inclinada;
- 8) deixou-se as lâminas secar em temperatura ambiente;

Observou-se algumas lâminas com microscópio óptico e objetiva de imersão de 100x, enquanto outras foram irradiadas com um feixe de nêutrons térmicos proveniente do canal de irradiação J-9, do reator Argonauta, por 30 minutos e reveladas, conforme descrito na seção III.6.

### III.9 – Procedimento para uso da fucsina fenicada e boro-10

Dois procedimentos foram realizados com uma suspensão de *M. fortuitum*, diluída até  $10^{-6}$  e esterilizada com hipoclorito de sódio: a) dopou-se com boro-10 e adicionou-se fucsina fenicada e b) adicionou-se a fucsina fenicada e dopou-se com boro-10. No primeiro, extraiu-se 50  $\mu\text{L}$  da suspensão e adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  da fucsina. Após 20 minutos, ela foi incubada com 5  $\mu\text{L}$  boro-10, por 30 minutos, e mantida numa estufa a 37°C. Posteriormente, um volume de 5  $\mu\text{L}$  dessa amostra foi depositado sobre o CR-39. No segundo, adicionou-se a 50  $\mu\text{L}$  da suspensão, 5  $\mu\text{L}$  boro-10 e deixou-se incubar por 30 minutos, em uma estufa mantida a 37°C. Depois, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  da fucsina e, após 20 minutos, depositou-se 5  $\mu\text{L}$  sobre o detector. Posteriormente, elas foram irradiadas com um feixe de nêutrons térmicos, proveniente do canal de irradiação, J-9. Em seguida, as lâminas foram reveladas com uma solução aquosa de NaOH a 6,25N, por 60 minutos, mantida a 90°C, numa unidade de banho termoestabilizado.

### III.10 – Preparação da suspensão de micobactérias com tween-80

Para o experimento com o tween-80 a espécie escolhida foi a *M. fortuitum* e manteve-se a adição da fucsina na suspensão. Os bacilos foram colocados em tubos de ensaio com pérolas de vidro e agitados no vórtex por 30 segundos. Adicionou-se o tween-80 a 0,05% e, em seguida, hipoclorito de sódio a 2%. Agitou-se bem os tubos e deixou-se repousar por 1 h. Depois, preparou-se duas amostras com 50  $\mu\text{L}$  de material diluído até  $10^{-6}$ , adicionou-se o volume de 5  $\mu\text{L}$  da fucsina fenicada na primeira amostra e 10  $\mu\text{L}$  na segunda e incubou-se-as por 20 minutos na temperatura 37°C. Dopou-se as amostras com o  $^{10}\text{B}$  e deixou-se-as na estufa, por 30 minutos, a 37°C. As amostras foram, então, irradiadas e, posteriormente, reveladas conforme descrito no item III.6.

### III.11 – Procedimento para o uso da D-cicloserina

O teste foi realizado com *M. fortuitum*, na diluição de  $10^{-5}$ , e procedeu-se da forma que se segue: deixou-se a amostra crescer no meio Middlebrook, 7H9, mais tween-80, por 7 dias, tempo necessário para a amostra atingir a fase exponencial de crescimento. Adicionou-se D-cicloserina na concentração de 30 mg/mL e incubou-se por 24 horas (período em que ocorre a formação de uma nova geração de micobactérias com as paredes celulares danificadas). Em seguida, pipetou-se uma alíquota desse material e diluiu-se-a em água destilada até obter uma turvação correspondente ao tubo nº1 da escala de McFarland, e efetuando-se as diluições seriadas. Na amostra diluída de  $10^{-5}$ , adicionou-se 5  $\mu$ L de  $^{10}\text{B}$  e deixou-se por 30 minutos a 37°C, numa estufa. Gotas de 5  $\mu$ L desse material foram depositadas numa lâmina de CR-39, deixando-se secar à temperatura ambiente.

### III.12 – Procedimento para o cultivo da *M. massiliense* sobre a lâmina de CR-39

A espécie *M. massiliense* (CRM0018) foi semeada sobre uma lâmina de CR-39 de 6 cm<sup>2</sup> de área, no meio de cultura Middlebrook 7H9 por 48 horas, e depois, esterilizada com formaldeído, por 15 minutos. Em seguida montou-se o arranjo neutrongráfico no interior do chassi radiográfico, conforme descrito na seção III.5, item 2. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, para retirada do material biológico, e submetidas ao ataque químico de rotina.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADO E DISCUSSÃO

É importante ressaltar que as imagens registradas no detector CR-39, visualizadas por microscopia óptica e capturadas pela câmera digital Coolpix 995, são projeções bidimensionais de agrupamentos de bacilos ou bacilos isolados, diferentemente daquelas fornecida por microscopia eletrônica de varredura, que são tridimensionais.

Para diferenciar as imagens decorrentes de artefatos ou defeitos das relacionadas às micobactérias, algumas lâminas de CR-39 foram irradiadas e submetidas ao processo de revelação, nas mesmas condições dos ensaios neutrongráficos realizados com as amostras micobacterianas. As amostras usadas foram: 1) lâminas de CR-39 virgem (não irradiado e sem solução de boro) submetido somente ao ataque químico; b) lâminas de CR-39 com gotas de solução de boro, irradiada e revelada. As imagens das lâminas correspondentes encontram-se ilustradas na figura IV.1.

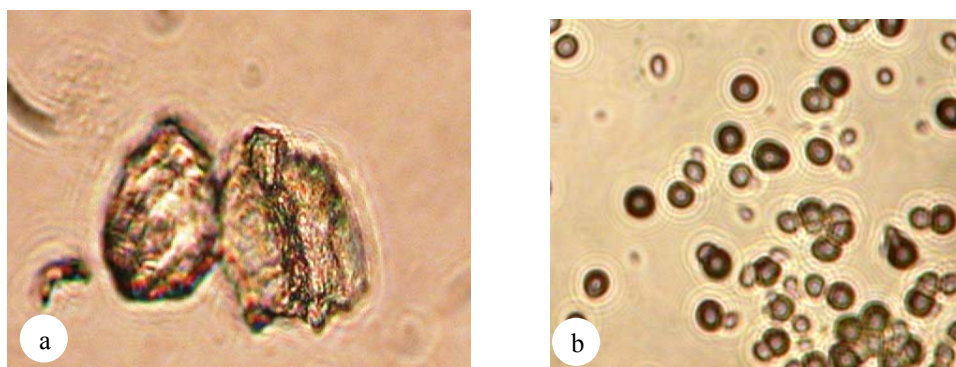


Figura IV.1 – Imagens da superfície das lâminas do detector CR-39: a) danos ou defeitos presentes na superfície de uma lâmina; b) traços de partículas alfa resultantes da reação  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$  registrados na lâmina de CR-39.

Para uma melhor visualização da geometria cônica dos traços revelados presentes no detector CR-39, gerados pela reação nuclear  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ , obteve-se algumas imagens por Microscopia de Força Atômica (MFA) utilizando o microscópio ASYLUM RESEARCH'S MFP-3D AFM, alocado no Laboratório de Física Biológica/

IBCCF/UFRJ. As imagens foram obtidas com o microscópio, operando no modo tip, com “scanner” de 50  $\mu\text{m}$  e equipado com um cantilever AC-2. Na figura IV.2 apresenta-se a imagem dos traços revelados obtidos com o MFA.

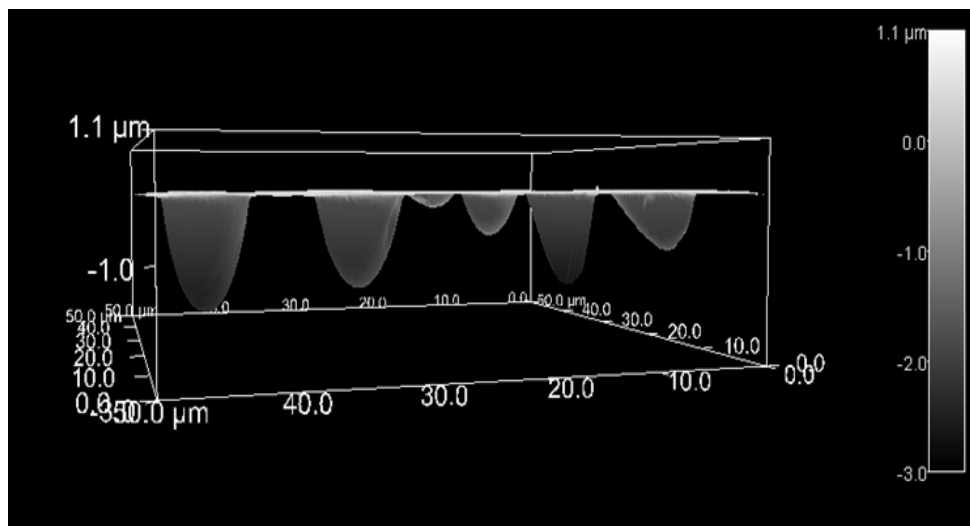


Figura IV.2 – Imagem dos traços revelados de partículas alfa sobre o CR-39 provenientes da reação nuclear  $^{10}\text{B}(n,\alpha)\text{L}^7$  obtida com um microscópio de força atômica (MFA).

Nos primeiros experimentos, trabalhou-se com amostras diluídas de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  a partir do tubo nº 1 da escala de McFarland, que corresponde às concentrações de 3.000, 300 e 30 micobactérias por mililitro, respectivamente. Portanto, em 5  $\mu\text{L}$  de suspensão da amostra, depositada sobre o detector, a expectativa era de se encontrar em média 3 ; 0,3 e 0,03 bacilos presentes, respectivamente, ou seja uma quantidade muito pequena. Por isso, e por razões que serão apresentadas mais adiante, passou-se a trabalhar com as amostras numa concentração de  $3 \times 10^8$  bacilos/mL no tubo nº 1 da escala de McFarland, ou seja, sem diluição.

#### IV.1 – Esterilização

O método de esterilização teve uma importância fundamental no protocolo, já que ele acarreta alterações significativas em alguma região da célula, levando-a a morte. Assim, para observar se o processo de esterilização interferiria na formação das imagens neutrongráficas das micobactérias, realizou-se dois experimentos utilizando, no primeiro, o hipoclorito de sódio e no segundo, a autoclavagem. A Figura IV.3, obtida com

auxílio de um microscópio óptico utilizando-se uma ocular de 10x e objetivas de 40x, Figura IV.3 (a) e 100x, Figura IV.3 (b), mostra duas estruturas presentes na superfície da lâmina de CR-39, que foi gotejada com uma suspensão de *M. avium* e *M. tuberculosis*, após esterilização com o hipoclorito de sódio e a autoclavagem, respectivamente. As imagens foram capturadas pela câmara digital Coolpix 995 com zoom óptico de 2x, na Figura IV.3(a).

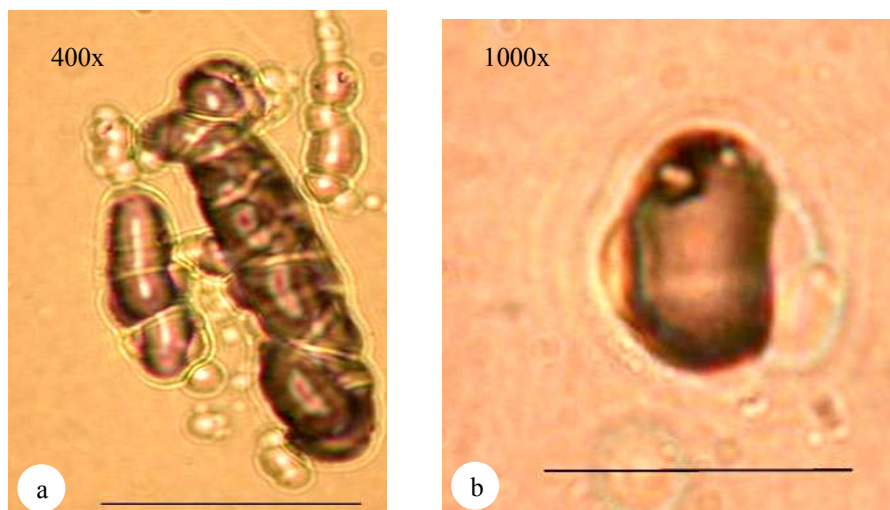


Figura IV.3 – a) Imagem neutrográfica obtida com a amostra contendo a *M. avium* esterilizada com hipoclorito de sódio b) Imagem neutrográfica obtida com a amostra contendo *M. tuberculosis* esterilizada por autoclavagem. (barra  $\equiv$  50  $\mu$ m)

Algumas estruturas observadas sobre a superfície do detector, após os ensaios neutrográficos realizados de acordo com os procedimentos descritos no capítulo III, não permitiram correlacioná-las, de forma conclusiva, a imagens de bacilos (vide figura IV.3). Para se obter imagens neutrográficas diferenciadas, que facultasse essa identificação, adicionaram-se substâncias às suspensões de micobactérias para que aumentasse o número de bacilos isolados ou se reduzisse a camada de lipídios presentes na parede celular, mantendo-se as condições de: a) dopagem com  $^{10}\text{B}$ ; b) irradiação; c) revelação dos traços latentes. Optou-se pelas seguintes substâncias: 1) a fucsina fenicada a 0,3 %, para tingir os traços revelados durante o procedimento de revelação; 2) o tween-80, um surfactante utilizado para desagregar os microrganismos e, assim, aumentar o número de micobactérias isoladas na amostra; 3) a D-cicloserina, um antibiótico que age inibindo a formação da parede celular da primeira geração descendente, sem provocar a sua

lise; e 4) o Xilol, que remove a camada de lipídios da parede celular de algumas micobactérias e tende a agrupá-las na superfície da suspensão, facilitando sua coleta.

#### IV.2 – Uso da fucsina fenicada e boro-10

Duas imagens obtidas com o procedimento descrito na seção III.9 são mostradas na Figura IV.4. A Figura 4.(a) foi obtida, ao se adicionar primeiro a fucsina e, depois o boro-10, observando-se uma estrutura interessante; na segunda, não se obteve imagens semelhantes à anterior, porém notou-se que os traços isolados ou sobrepostos de partículas  $\alpha$  no CR-39 apresentaram uma coloração ligeiramente lilás, no lugar da cor marrom mais comum de aparecer.

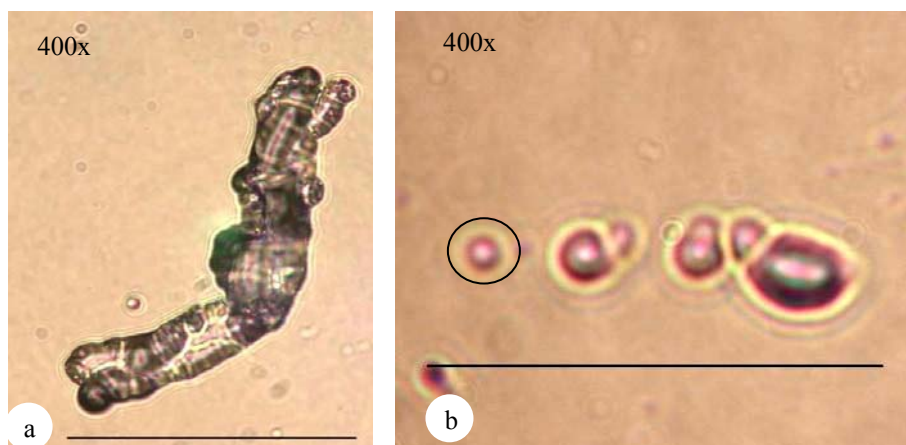


Figura IV.4 – a) Imagem neutrográfica obtida com amostras de *M. fortuitum* obtida adicionando-se primeiramente a fucsina e, depois o  $^{10}\text{B}$ ; b) imagem de um traço isolado (destacado pela circunferência) e traços sobrepostos de partículas alfa de cor lilás. (barra  $\equiv$  50  $\mu\text{m}$ )

#### IV.3 – Emprego do tween-80 na suspensão de micobactérias

A análise das imagens permitiu concluir que a adição de Tween-80 não interfere na obtenção e na qualidade da imagem, como mostra a figura IV.5.



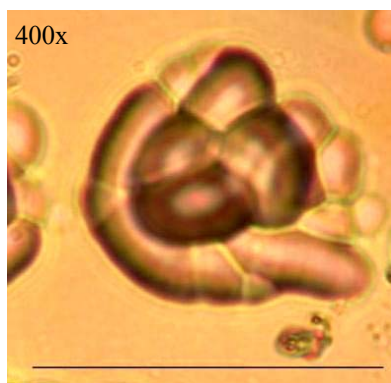


Figura IV.5 – Imagem neutrográfica obtida com amostra contendo *M. fortuitum*, com fucsina e tween-80 adicionadas à suspensão depositada sobre o detector CR-39. (barra  $\equiv$  50  $\mu$ m)

#### IV.4 – Emprego da D-cicloserina na suspensão de micobactérias

A D-cicloserina danifica a parede celular da micobactéria, criando orifícios de dimensões extremamente pequenas, da ordem de 1Å. Como a revelação dos traços nucleares por ataque químico produz uma ampliação da imagem registrada da ordem de 1000x, criou-se uma expectativa de se poder visualizar esses orifícios nas imagens observadas com o microscópio óptico. Apesar da visualização de alguns “nódulos” na imagem neutrográfica obtida, indicado pelas setas na Figura IV.6, o resultado não é conclusivo.

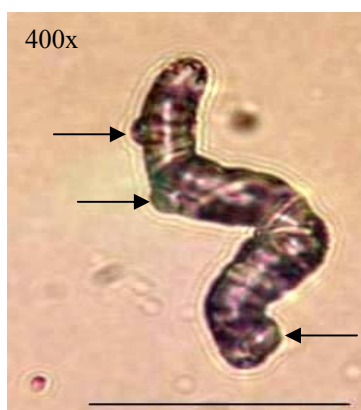


Figura IV.6 – Imagem neutrográfica de amostra preparada com a *M. fortuitum*, crescida no meio Middlebrook 7H9 com tween-80 durante 7 dias, sendo, posteriormente, adicionada D-cicloserina e deixado incubar por 24 horas. (barra  $\equiv$  50  $\mu$ m)

#### IV.5 – Uso do xilol na suspensão de micobactérias

O xilol é um líquido incolor pouco solúvel em água, que remove a camada de lipídios da parede celular de algumas micobactérias presentes numa suspensão, dividindo-a em duas fases, conforme mostra o desenho esquemático, na figura IV.7. A primeira fase contém os lipídios extraídos da parede celular e, na parte superior da segunda fase, uma grande quantidade de bacilos com e sem lipídios fica concentrada.

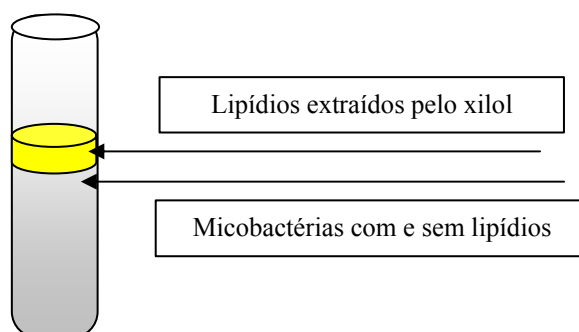


Figura IV.7– Esquema das fases presentes na suspensão, após a adição do xilol.

O teste foi realizado com a espécie *M. fortuitum*, diluída até  $10^{-5}$ . Usou-se um volume de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão com o microrganismo e 200  $\mu\text{L}$  de xilol. Após a formação das fases, dispensou-se a primeira, pipetou-se 50  $\mu\text{L}$  da parte superior da fase água e incubou-se-a com 5  $\mu\text{L}$  de  $^{10}\text{B}$ , por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , em estufa. Gotejou-se a amostra sobre as lâminas de CR-39 e irradiou-se-as com feixe de nêutrons térmicos do reator Argonauta. A figura IV.8 (a) e (b) mostram as imagens neutronográficas das estruturas com aspectos morfológicos irregulares e na figura IV.(c) uma estrutura que se assemelha a um grumo de bacilos.

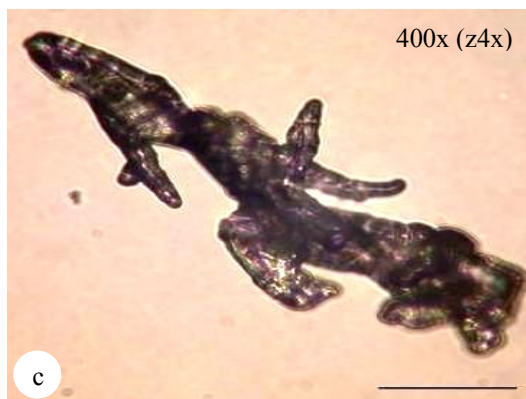
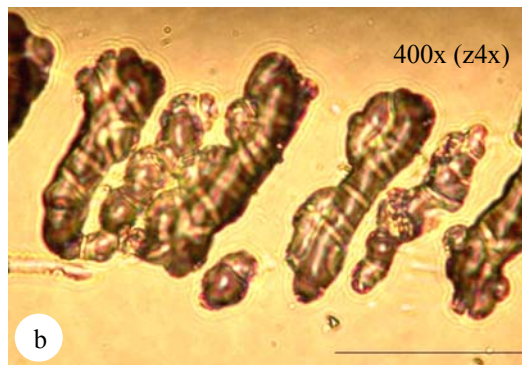
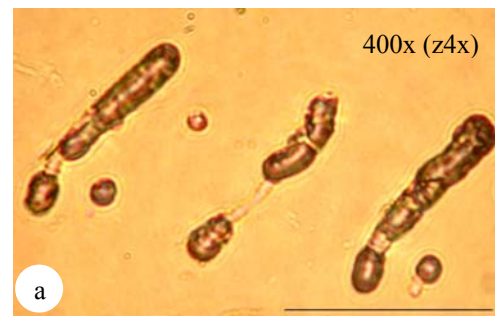


Figura IV.8 – Imagens neutrográficas observadas na amostra com a espécie *M. fortuitum*, depois de tratadas com xilol, dopadas com  $^{10}\text{B}$  e irradiadas com um feixe de nêutrons térmicos. (barra  $\equiv 50\ \mu\text{m}$ )

#### IV.6 – Traços versus tempo de revelação

Para se observar a ampliação da imagem registrada na lâmina de CR-39, em função do tempo de ataque químico, micobactérias da espécie *M. fortuitum* foram diluídas de  $10^{-5}$ , incubadas com  $^{10}\text{B}$ , por 30 minutos, numa estufa à  $37^\circ\text{C}$  e expostas ao feixe neutrônico. As lâminas de CR-39 foram submetidas ao processo de revelação por 10,

20, 30, 40, 50 e 60 minutos, respectivamente, da seguinte maneira: a cada intervalo de 10 minutos, interrompia-se o ataque químico, lavava-se, secava-se, observava-se a imagem gravada no CR-39 num microscópio óptico e se capturava a imagem com a câmera digital Coolpix 995 da Nikon com lentes ocular de 10x e objetiva de 40x e com um zoom óptico da câmara de 1x. A evolução da ampliação da imagem é apresentada na Figura IV.9. Uma vez que as características da imagem se mantiveram visíveis e idênticas ao longo do processo, continuou-se usando o tempo de revelação de 60 minutos. A imagem relativa ao tempo de revelação de 10 minutos não foi apresentada, porque os detalhes aparecem muito pequenos.

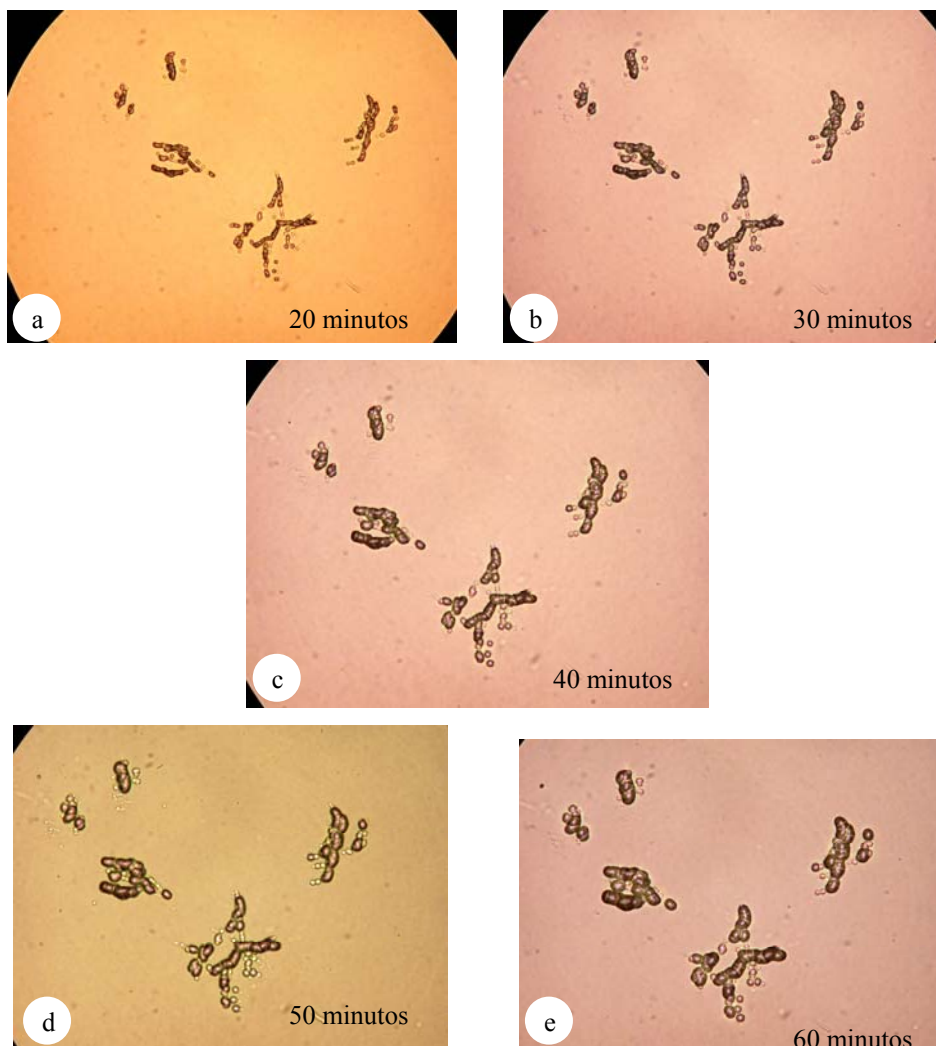


Figura IV.9 – Imagens neutrongráficas mostrando a evolução das dimensões dos traços de partículas  $\alpha$ , em função do tempo de revelação do CR-39.

#### IV.7 – Aderência dos bacilos nas lâminas e a interferência do hipoclorito de sódio

Em todos os experimentos realizados a quantidade de estruturas presentes na superfície do detector, que pudessem estar relacionadas aos bacilos, manteve-se muito aquém do esperado, mesmo ao se lidar com amostras no padrão de turbidez idêntico ao dos tubos nº1 e nº2 da escala de McFarland, que correspondem às concentrações de 300 milhões de bactérias/mL e 600 milhões de bactérias/mL, respectivamente. Suspeitou-se de que elas escorregavam na superfície lisa do CR-39. Investigou-se, então, que fatores, durante o procedimento, poderiam estar afetando a aderência das micobactérias nessa superfície. As hipóteses levantadas foram: 1) características de hidrofobicidade e superfície bastante lisa do CR-39; 2) uso do hipoclorito de sódio no processo de esterilização. Para investigar as hipóteses citadas, preparou-se uma amostra com a espécie *M. fortuitum* com turbidez igual ao tubo nº 2 da escala de McFarland, esterilizou-se com hipoclorito de sódio a 1% e dopou-se com boro-10. Realizou-se dois experimentos: no 1º, tentou-se fazer um esfregão da suspensão sobre a lâmina de CR-39, porém, não se conseguiu espalhar e manter o material aderido à lâmina; no 2º, fez-se um esfregão sobre a lâmina de vidro e procedeu-se ao tingimento pelo método ZN. Usou-se como controle uma amostra não esterilizada com hipoclorito de sódio. Observou-se experimentalmente que, durante a etapa de lavagem das lâminas em água corrente, no procedimento de coloração, a amostra esterilizada com a hipoclorito de sódio foi perdida, enquanto que a não esterilizada foi fixada. Concluiu-se, então, que o hipoclorito de sódio dificulta a fixação dos microrganismos nas lâminas.

Buscando-se solucionar o problema, testou-se o uso do soro fetal bovino (SFB) e do formol como fixadores. Gotejou-se, então, a mesma amostra do experimento anterior sobre as lâminas de vidro e de CR-39, cobrindo-se ambas com soro fetal bovino ou com formol; realizou-se o esfregão de forma suave, deixando-as secar, para se proceder a coloração de Kynioun, conforme descrito na seção III.8 e visualização por microscopia óptica. Algumas lâminas de CR-39 foram irradiadas e, posteriormente, reveladas com o NaOH a 6,25 N.

Os conjuntos amostras-fixadores, depositados sobre lâminas de vidro e de CR-39 para esfregão e coloração, foram os seguintes:

- 1º) formol + micobactéria incubada com boro;
- 2º) SFB + micobactéria incubada com boro;
- 3º) SFB + micobactéria incubada com boro + hipoclorito de sódio a 1%;
- 4º) formol + micobactéria incubada com boro + hipoclorito de sódio a 1%;

O soro fetal bovino fixou melhor os bacilos presentes nas lâminas de vidro e de CR-39 do que o formol. Nas lâminas de CR-39, que foram irradiadas e reveladas, não se observou imagens neutrongráficas de bacilos.

#### IV.8 – Procedimentos alternativos para a adesão do bacilo ao CR-39

Em face dos resultados anteriores, buscou-se na literatura um procedimento alternativo que pudesse minimizar o problema da adesão do bacilo na superfície das lâminas de CR-39. Artigos específicos sobre o tema, não foram encontrados mas, sim, alguns relacionados às pesquisas sobre a topografia dos detectores de traços nucleares, biocompatibilidade entre o material do detector e a cultura de células e experimentos radiobiológicos. A idéia que se adotou foi a do aumento da rugosidade da superfície do CR-39, através de um ataque químico com o agente revelador antes de se depositar a amostra (HO *et al*, 2003, GAILLARD *et al*, 2005, LI *et al.*, 2006, NG *et al*, 2008). Optou-se, então, por realizar um pré-ataque químico com a solução de NaOH, em condições semelhantes àquelas usadas para a revelação das amostras, porém, com o tempo de revelação igual a 10 minutos, antes da deposição das amostras sobre o detector. Para testar a eficiência do pré-ataque, realizou-se baciloscopias de escarro *in natura* de um paciente com diagnóstico de tuberculose pulmonar 3+, usando-se lâminas de CR-39 pré-tratadas, não tratadas e lâminas de vidro. As amostras foram fixadas e esterilizadas, por aquecimento com um bico de Bunsen, e depois submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Em seguida, as lâminas foram observadas no microscópio óptico, com lentes ocular de 10x e objetiva de 100x imersa em óleo. Observou-se um aumento na quantidade de bacilos presentes nas lâminas de CR-39 pré-tratadas quimicamente, em relação àquelas que não foram, porém, inferior ao número de bacilos presentes nas lâminas de vidro. A Figura IV.10.(a) mostra um campo da lâmina de CR-39 e a Figura IV.10.(b) um campo da lâmina de vidro. Esse pré-ataque passou a ser utilizado em todos os experimentos posteriores.

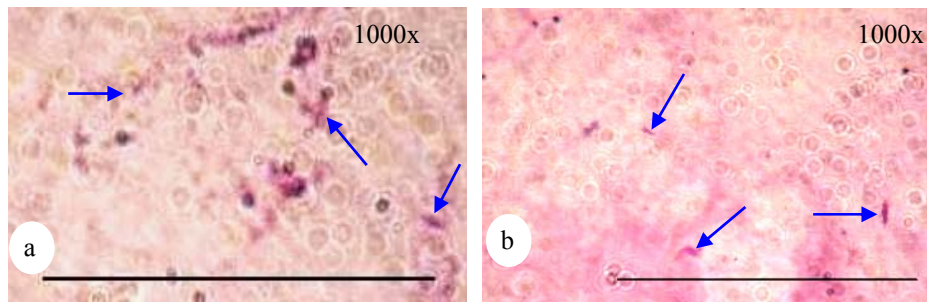


Figura IV.10 – Baciloscopia de escarro *in natura*, com coloração ZN: a) esfregaço sobre lâminas de CR-39 pré-tratada com hidróxido de sódio e b) esfregaço sobre lâminas de vidro. As setas azuis indicam a posição de alguns bacilos. (barra  $\equiv$  50  $\mu$ m)

Após confirmação de uma melhor adesão da *M. tuberculosis* nas lâminas pré-tratadas, conforme descrito no parágrafo anterior, deu-se prosseguimento aos experimentos com a Neutronografia, utilizando-se como amostra biológica, o escarro *in natura* de pacientes com diagnóstico 3+, para TB. As condições para a irradiação e revelação do detector foram semelhantes aquelas utilizadas para as amostras cultivadas, ou seja, irradiação com fluxo de nêutrons, por 30 minutos, e revelação com NaOH 6,25N, a 90°C, por 60 minutos. A manipulação desse material ainda não estéril seguiu todas as normas de segurança recomendado pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária). As amostras foram preparadas da maneira que se segue: dopou-se a amostra com  $^{10}\text{B}$  por 30 minutos, a 37°C e, em seguida, fez-se esfregaços sobre algumas lâminas de vidro e de CR-39 pré-atacado quimicamente. Depois, procedeu-se a esterilização e a fixação por aquecimento com um bico de Bunsen, aproximando-se a lâmina de CR-39 da chama o suficiente para esquentá-la, mas, sem produzir-lhe danos. Para uma análise comparativa do número de bacilos presentes em cada lâmina, submeteu-se os esfregaços sobre as lâminas de vidro à coloração ZN e aqueles sobre as lâminas de CR-39, a irradiação e revelação. Posteriormente, todas as lâminas foram observadas com microscópio óptico. A baciloscopia realizada com as lâminas de vidro confirmou o resultado esperado para um escarro 3+, ou seja, 20 ou mais bacilos em cada campo óptico, o mesmo não ocorrendo com a baciloscopia efetuada com o CR-39.

Decidiu-se, então, adicionar ao escarro dopado com  $^{10}\text{B}$ , separadamente, a fucsina fenicada a 0,3%, o tween-80 e o xilol, substâncias já utilizadas nas amostras laboratoriais, devido suas características específicas, porém, os resultados foram idênticos

àqueles obtidos com as amostras cultivadas, conforme descrito capítulo III. Testou-se, também, a adição de outros compostos, como o fenol a 10%, o TBE10X (uma solução tampão que contém uma mistura de base T (Tris), ácido Bórico e EDTA), o triton-X100 (octilfenol etoxilado), o SDS a 0,1% (dodecilsulfato de sódio, um surfactante aniônico), para desgrumar as bactérias. Esses experimentos foram realizados com as espécies de *M. smegmatis* ATCC 14468, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. chelonae* ATCC 35752, esterilizadas por autoclave, dopadas com  $^{10}\text{B}$  na concentração de 5mg/mL, sendo irradiadas e reveladas nas condições descritas nas seções III.5 e III.6.

Como a quantidade de estruturas que pudessem ser associado ao mapeamento dos bacilos, pelas partículas alfa resultante da reação  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ , manteve-se inferior ao esperado, decidiu-se continuar a pesquisa usando as amostras clínica e laboratorial turvação do tubo nº1 da escala de McFarland e alterando-se outros parâmetros. Avaliou-se novas concentrações para a solução de  $^{10}\text{B}$ , como por exemplo, 10mg/mL e 15 ml/mL; outros períodos de incubação da micobactéria com o boro-10, como por exemplo, 60 e 90 minutos, assim como, testar a solução PEW<sub>65</sub> (15% KOH + 65% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH + 20% H<sub>2</sub>O), como agente revelador dos traços latentes, pois segundo a literatura (YANAGIE *et al*, 1999, OGURA *et al*, 2001) em imagens de experimentos radiobiológicos de seções finas de cortes histológicos de corpo inteiro de camundongos a revelação com essa solução melhora a qualidade da imagem.

#### IV.9 – Aderência e transporte do boro-10 no bacilo

Diante da persistência de estruturas não conclusivas e do baixo número das mesmas nas lâminas de CR-39 contendo amostras marcadas com  $^{10}\text{B}$ , resolveu-se investigar se o problema não estaria associado à adesão do marcador à superfície do bacilo ou do seu transporte até o interior dos bacilos, em função da espessura e do alto teor de lipídios, características da parede celular desse gênero, aliado ao fato do elemento boro não estar inserido na sua lista de micro e macro nutrientes.

Iniciou-se essa investigação com uma massa *M. smegmatis* ATCC 14468, não diluída em líquidos e não dopada com  $^{10}\text{B}$ , colhida diretamente da cultura, esterilizada em autoclave à 121°C, por 30 minutos, usando-se o arranjo descrito na seção III.5, ítem 2. Em seguida, o CR-39 foi revelado em solução de NaOH a 6,25N, por 60 minutos, a



70°C. A imagem formada sobre a superfície do detector tem uma área de 0,24 cm<sup>2</sup> e foi capturada com uma câmera digital Coolpix 995, ajustada com foco macro e zoom óptico de 3,5x. A Figura IV.11 mostra a imagem obtida.



Figura IV.11 – Imagem de uma massa de *M. smegmatis* obtida com um detector de traços nucleares e uma folha conversora de boro.

Repetiu-se o experimento acima com escarro e obteve-se as imagens ilustradas na figura IV.12.

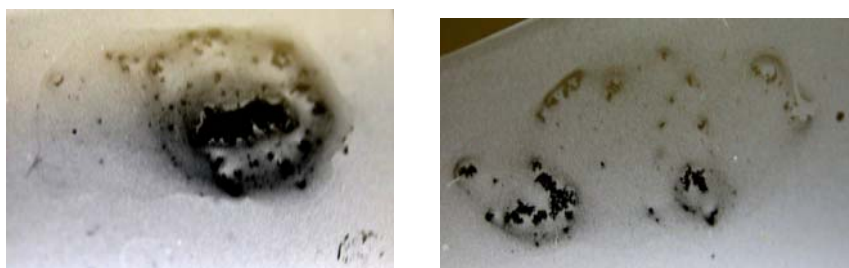


Figura IV.12– Imagens de um esfregaço sobre lâmina de CR-39, utilizando como conversor uma folha de boro.

Com base no resultado da Figura IV.11, onde é possível se observar nitidamente a região em que a massa de *M. smegmatis* foi depositada, duas análises podem ser feitas: 1) os nêutrons ou foram espalhados e/ou absorvidos pelo material, e portanto, não alcançaram a folha conversora de <sup>10</sup>B e, conseqüentemente, a reação nuclear <sup>10</sup>B(n,α)<sup>7</sup>Li não ocorreu; 2) os nêutrons alcançaram a folha conversora após atravessar a amostra, a reação nuclear ocorreu, porém as partículas alfa geradas não chegaram ao detector, pelo

fato da espessura da amostra ser maior que o seu alcance. Entendeu-se que esse resultado é um indício de que ocorre uma interação entre os nêutrons, o material e a folha conversora e que a deposição de uma finíssima camada de material (filme fino) aumente a probabilidade.

Fez-se outro ensaio neutrongráfico com a espécie *M. massiliense* (CRM0018) seguindo os procedimentos descrito nas seções III.5 e III.12. Capturou-se dois tipos de imagens do cultivo de *M. massiliense* sobre a lâmina de CR-39: a) antes da irradiação e do ataque químico e, b) depois da irradiação e da revelação. A região do cultivo impressa na superfície do detector tem 1,0 cm de altura e 0,8 cm de largura. A câmera digital coolpix Nikon 995 foi ajustada para o foco macro e zoom de 3,5x. A Figura IV.13 (a) e (b) ilustra as imagens obtidas no experimento.

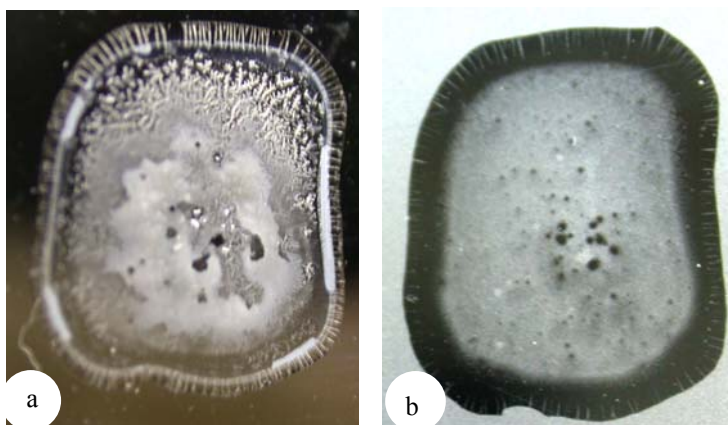


Figura IV.13 – Imagem obtidas com a espécie *M. massiliense* sobre o detector, a) antes da irradiação e da revelação e b) depois da irradiação e da revelação.

Observa-se que as imagens da região onde ocorreu o crescimento do bacilo sobre a lâmina de CR-39, antes e depois da irradiação e da revelação, mantiveram-se idênticos, porém a região onde observava-se estruturas ramificadas na figura 13 (a) foram perdidas na figura 13 (b). Acredita-se que, nesse caso, tempo de ataque químico de 60 minutos, foi prolongado, resultando na perda dessa informação. Na figura 14.(b) o contorno mais externo e os círculos (ambos preto) é a região onde se visualiza com um microscópio óptico, ausência de traços revelados e a região em tom acinzentado, ao contrário, é muita densa em traços revelados.

#### IV.10 – Dopagem do bacilo com borofenilalanina (BPA)

Como o principal objetivo é obter-se imagens, por microscopia óptica, de micobactérias dopadas com  $^{10}\text{B}$  em solução, a adesão ou incorporação desse isótopo é fundamental. Decidiu-se, então, fazer uma pesquisa bibliográfica para se identificar compostos borados que poderiam atuar como carreador de  $^{10}\text{B}$  para essas amostras. Não se encontrou nenhuma publicação cujo tema estivesse relacionado diretamente ao transporte do boro para o interior de microrganismos, mas, várias publicações relacionadas à pesquisa do transporte de  $^{10}\text{B}$  para o interior de células cancerígenas cerebrais e de outros órgãos, usando a técnica de Terapia de Captura Neutrônica por Boro, BNCT (SKVARC *et al.*, 1999, WITTIG *et al.*, 2000, OGURA *et al.*, 2001, DRAGOSA *et al.* 2002, CODERRE *et al.*, 2003, YOKOYAMA *et al.*, 2006). Essas publicações apontam que os dois agentes distribuidores de  $^{10}\text{B}$  usados mais rotineiramente em experiências clínicas, são: a sulfidril borada  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  (BSH), usada há cerca de 30 anos em pesquisa de tumores cerebrais (glioblastomas), e o p-borofenilalanina (BPA) utilizado em pesquisas de melanoma, em virtude de sua semelhança estrutural com os precursores da melanina. Outros compostos aprovados para o estudo da biodistribuição de boro no organismo humano são a porfirina borada (BOPP) e o borado poliedral estável  $\text{Na}_2[\textit{closo}\text{-B}_{10}\text{H}_{10}]$  proposto para a terapia com nêutrons rápidos (CODERRE *et al.* 2003).

Resolveu-se, então, testar o uso de um desses compostos como carreador de boro em nossas pesquisas. Iniciou-se com o BPA (4-boro-DL-fenilalanina) fornecido pela Sigma-Aldrich, apenas pela facilidade de aquisição no mercado, já que o tempo necessário para a importação do BSH e do BOPP não permitiria a sua chegada em tempo hábil.

Fez-se o primeiro experimento utilizando o BPA com tecido da pata de um camundongo Balb/c, sacrificado de acordo com as normas vigentes. Injetou-se 0,1 mL de solução de BPA na concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , deixou secar em temperatura ambiente. Em seguida, seccionou-se a amostra em camadas finas que foram fixadas sobre a lâmina de CR-39 com uma fita adesiva. A amostra foi irradiada com feixe nêutrons térmicos proveniente do canal de irradiação J-9 do reator Argonauta, durante 120 minutos, e posteriormente, revelada em solução de NaOH a 6,25N e temperatura de  $70^\circ\text{C}$ , por 60 minutos.

A Figura IV.14 (a) e (b) mostra as imagens obtidas antes e depois da irradiação e da revelação, respectivamente com uma câmera Coolpix 955 ajustada para o foco macro. Pode-se observar na Figura IV.14 (b) a imagem da amostra formada na superfície do detector, como resultado dos traços nucleares produzidos pelas das partículas alfas provenientes da reação  $^{10}\text{B}(n,\alpha)\text{Li}^7$  e pelos prótons gerados pelas reações  $^1\text{H}(n,n')^1\text{H}$  e  $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ . As regiões do tecido impressa no detector, mostrada na segunda imagem possuem áreas de aproximadamente  $0,8\text{cm}^2$  e  $0,7\text{cm}^2$ .

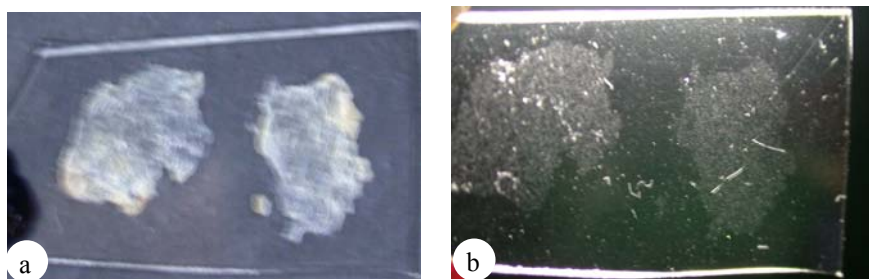


Figura IV.14 - (a) imagem do corte de tecido da pata de um camundongo Balb/C dopado com BPA antes da irradiação e da revelação e (b) mesma amostra com imagem obtida depois da irradiação e revelação.

Realizou-se, então, o segundo experimento com escarro e *M. bovis* (BCG) na turvação do tubo nº1 da escala de McFarland, ambos esterilizados por autoclave e a solução de BPA na concentração de  $100\ \mu\text{g}/50\ \text{mL}$ . A amostra foi preparada da maneira que se segue: Centrifugou-se  $100\ \mu\text{l}$  da espécie, a  $14\ 000\ \text{rpm}$ , durante 2 minutos. Depois lavou-se uma vez com Triton X-100 (10%). Em seguida ressuspendeu-se em  $1\ \text{mL}$  de Triton e centrifugou-se novamente na mesma condição anterior. Descartou-se o líquido e adicionou-se  $50\ \mu\text{l}$  da solução de BPA na concentração de  $100\ \mu\text{g}/50\ \text{ml}$  ao sedimento. Colocou-se a amostra em uma estufa, por 30 minutos, na temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Gotejou-se  $10\ \mu\text{L}$  de cada amostra no CR-39, seguindo-se depois os procedimentos de irradiação e revelação de rotina. A Figura IV.15 (a) é a imagem por microscopia óptica de uma região do esfregaço e a Figura IV.15 (b) a da borda da gota contendo *M. bovis*. Em ambas vê-se uma boa densidade de traços de partículas alfa, principalmente na amostra gotejada, porém, não se identificou na superfície do CR-39, nenhuma estrutura que pudesse caracterizar bacilos isolados ou agrupados. Possivelmente, o BPA não cumpriu a função de carreador de  $^{10}\text{B}$ , para essas amostras diluídas.

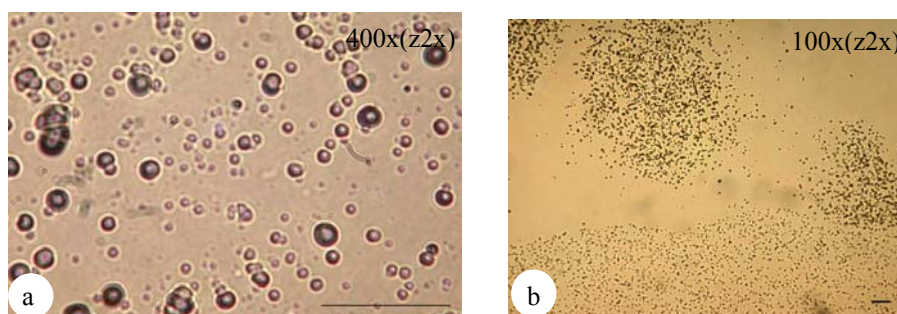


Figura IV.15 - (a) a imagem de microscopia óptica de uma região do esfregaço de escarro positivo para tuberculose e (b) imagem da borda de uma gota contendo *M. bovis* (BCG), ambas dopadas com BPA, irradiadas com nêutrons térmicos e reveladas em solução de NaOH a 6,25N. (barra  $\equiv$  50  $\mu$ m)

#### IV.11 – Eletroporação de *M. fortuitum* para inserção do boro-10

Resolveu-se utilizar a técnica de Eletroporabilidade ou Eletroporação para o transporte do boro-10 através do bacilo. Durante a eletroporação, ocorrem vários fenômenos na membrana das células em suspensão, conforme descrito na seção I.4.4. A câmara de eletroporação utilizada foi a Cell-Porator System Electroporation Pulse Control & Power Supply, fabricada pela Life Technologies, e disponibilizada pelo Laboratório de Instrumentação Biomédica/COPPE/UFRJ e as cubetas com eletrodos de alumínio da eppendorf. Nesse modelo de câmara de eletroporação, o estímulo elétrico é gerado por descarga no capacitor.

Submeteu-se as bactérias *E. coli* e *M. fortuitum* ATCC6841, suspensas em uma solução enriquecida com  $^{10}\text{B}$ , à técnica da eletroporação, para incorporar o boro-10 e, posteriormente, irradiou-se-as com feixe de nêutrons térmicos, para obtenção da imagem neutrongráfica. A espécie *Mycobacterium fortuitum* foi crescida no meio LJ; uma massa da cultura foi coletada e triturada com pérolas de vidro. Adicionou-se água destilada até obter-se a concentração do tubo nº1 de McFarland. A espécie *Escherichia coli* foi crescida no meio Luria-Bertani (LB), contendo 10g de triptona (bacto-tryptone), 5 g de extrato de levedura (bacto-yeast extract) e 5g de NaCl por litro, com agitação vigorosa a uma temperatura de 37°C, por 24 horas. Depois, a cultura foi colhida e centrifugada a 400 g por 10 minutos a 4°C. Um volume de 0,35 mL do tampão HEPES manitol a

10% com mais 0,10 mL da suspensão, contendo uma das amostras e 0,05 mL de solução de  $^{10}\text{B}$  na concentração de 0,055 g/mL, foram colocados em duas cubetas estéreis. Usou-se tampão HEPES manitol a 10% como meio eletroporador, conforme recomendação do manual de instrução do aparelho. A tabela IV.1 mostra os valores ajustados para o experimento.

Tabela IV.1 – Calibração do eletroporador para a eletroporação das amostras.

<b>Grandezas</b>	<b>Amostra 1: <i>M. fortuitum</i></b>	<b>Amostra 2: <i>E. coli</i></b>
Volume da amostra	0,5 mL	0,5 mL
Capacitância	1980 $\mu\text{F}$	1980 $\mu\text{F}$
Tensão (max)	500 V	250 V
Largura do pulso (tempo)	40 ms	40 ms
Nº de pulsos	5	5
Intervalo entre dois pulsos	1 minuto	1 minuto

Um volume de 0,5 mL de cada espécie foi pipetado na cubeta, que foi posicionada na câmara de eletroporação. Após a calibração do equipamento, a cada intervalo de 1 minuto, o capacitor, localizado no interior da cubeta, era carregado e, em seguida, ocorria uma descarga elétrica. Repetiu-se esse procedimento por 5 vezes. Para se verificar se ocorreu a lise das bactérias, em decorrência da calibração ajustada, fez-se uma coloração ZN com amostras de *Mycobacterium fortuitum* eletroporada. Não foi visualizada nenhuma bactéria nessa lâmina, enquanto que, na lâmina controle com amostras não eletroporadas, a visualização dos bacilos após a coloração, foi satisfatória, significando que, no primeiro caso ocorreu a lise das bactérias.

Repetiu-se o experimento anterior com a espécie *M. fortuitum*, porém ajustando o eletroporador, com outros valores, uma vez que os utilizados anteriormente provocaram a lise dos bacilos. As amostras foram preparadas da seguinte forma: a amostra I continha 0,25 mL tampão + 0,25 mL de bactéria + 0,025 mL de  $^{10}\text{B}$  (55mg/mL) e a amostra II, 0,25 mL tampão + 0,25 mL de bactéria + 0,050 mL de  $^{10}\text{B}$  (55mg/ml).

Optou-se por alterar valor da largura de pulso de 40ms para 1,0 ms. Assim, de acordo com a tabela do manual de instrução, a capacitância deveria ser ajustada para 50  $\mu\text{F}$ . Os demais valores foram mantidos iguais, conforme mostra a tabela IV.2. Em seguida 0,5 mL da amostra I foi colocado na cubeta 1 e 0,5 mL da amostra II na cubeta 2.

Tabela IV. 2: Valores calibrados para a eletroporação da *M. fortuitum*

Grandezas	Amostra 1: (25 µl B)	Amostra 2: (50 µl B)
Volume da amostra	0,5 mL	0,5 mL
Capacitância	50 µF	50 µF
Tensão (max)	500 V	500 V
Largura do pulso (tempo)	1 ms	1 ms
Nº de pulsos	5	5
Intervalo entre dois pulsos	1 minuto	1 minuto

Com essa nova calibração visualizou-se com o auxílio do microscópio óptico da E 400 da Nikon, as micobactérias *M. fortuitum*, que foram submetidas ao processo de eletroporação, e depois, coradas com ZN, conforme se observa na Figura IV.16. Este resultado indicou que os ajustes estão próximos aos níveis adequados para a espécie, pois a quantidade de bacilos sobre a lâmina de controle com as amostras não eletroporadas foi muito maior, o que significa que um percentual de bacilos eletroporados tiveram suas paredes celulares lisadas.

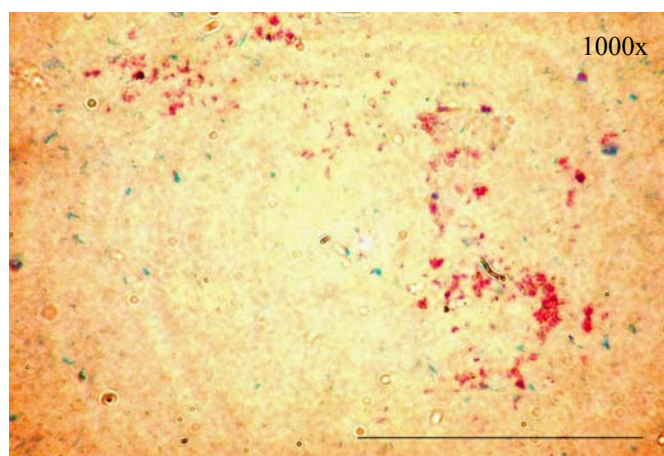


Figura IV.16 - Imagem de microscopia óptica de uma região do esfregaço *M. fortuitum* ATCC 6841 depois da eletroporação e da coloração ZN. (barra ≡ 50 µm)

Um resultado inesperado que pode ser notado na figura IV.16 é que algumas micobactérias eletroporadas ficaram tingidas de azul, preferencialmente, as que aparecem isoladas, enquanto que as grumadas foram tingidas de vermelho. Uma hipótese para esse resultado é que os bacilos grumados foram menos estimulados pelo campo elétrico pulsado, preservaram a identidade da parede celular e reteram a coloração com a fucsina fenicada. As isoladas, ao contrário, sofreram maior dano na estrutura celular, perderam

a coloração devido a fucsina fenicada, após a lavagem com o reagente álcool-ácido, e retiveram a coloração do azul do metileno.

Quando se realizou os ensaios neutrongráficos com as amostras eletroporadas, não se observou a presença de estruturas que evidenciassem o mapeamento dos bacilos pelos traços de partículas alfa, mas somente de traços. Esse resultado conduz as seguintes hipóteses: 1) a ausência de estruturas nas neutrongrafias poderiam estar associadas à não adesão ou inserção do boro-10 pelos bacilos; 2) a dificuldade da formação das imagens neutrongráficas poderia também estar relacionada ao pequeno alcance das partículas alfa no meio (bacilo), de tal forma que elas não consigam atingir superfície do detector; 3) os nêutrons térmicos poderiam estar sendo espalhados pela camada mais externa do bacilo, rica em lipídios e outras moléculas orgânicas, que contém hidrogênio, oxigênio e carbono, conforme ilustra a Figura II.10; e 4) as partículas alfa provenientes das regiões mais internas do bacilo perdem suas identidades, ao atravessar as zonas de alta densidade de elétrons, transformando-se, em átomos de hélio.



## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES

Essa pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia que propiciasse a obtenção de imagens neutronográficas de bactérias do gênero *Mycobacterium*, em especial da espécie *M. tuberculosis*, mais ampliadas do que aquelas obtidas pela baciloscopia convencional e que contribuísse para otimizar o diagnóstico da tuberculose. Para tal, as micobactérias foram diluídas, dopadas com boro-10, gotejadas ou estendidas sobre as lâminas de CR-39 e expostas ao feixe de nêutrons térmicos do canal de irradiação J-9 do reator Argonauta/IEN/CNEN. A interação dos nêutrons térmicos com o boro-10 produz uma reação nuclear, da qual resulta a emissão de partículas alfas de 1,48 MeV. A expectativa era de que as partículas alfa provenientes do boro-10 aderido a superfície do bacilo criassem traços latentes sobre a superfície do detector, reproduzindo a morfologia dele ampliada, devido ao processo de revelação com o NaOH. Os resultados obtidos permitem concluir:

- 1) As estruturas observadas sobre a superfície do detector, após os ensaios neutronográficos não permitiram correlacioná-las, de forma conclusiva, as imagens de bacilos desse gênero;
- 2) Não é recomendado esterilizar com NaClO, amostras que serão submetidas a coloração, pois a substância dificulta aderência do bacilo tanto em lâminas de vidro, quanto em lâminas de CR-39;
- 3) Deve-se efetuar um pré-ataque químico nas lâminas de CR-39 antes do depósito ou esfregação da amostra;
- 4) Obtem-se imagens das áreas do depósito da amostra quando se substitui a solução de boro-10 pela folha conversora de boro-10;
- 5) O p-borofenilalanina (BPA) não foi eficaz como carreador de boro-10 para as bactérias analisadas;
- 6) O uso da técnica da Eletroporação não resultou em imagens neutronográficas das espécies estudadas, porém o resultado pode ser uma vantagem para a análise tintorial;

O item 6 nos conduz as seguintes hipóteses:

- I. a ausência de imagens nas Neutronografias poderiam estar associadas à não adesão ou incorporação do boro-10 pelos bacilos;
- II. a dificuldade de se obter as imagens neutronográficas poderia também estar relacionada ao pequeno alcance das partículas alfa no meio (bacilo), de tal forma que elas não chegassem a atingir a superfície do detector;
- III. os nêutrons térmicos são espalhados pelo material agregado à camada mais externa do bacilo, rico em lipídios e outras moléculas orgânicas, que contém hidrogênio, oxigênio e carbono;
- IV. as partículas alfa provenientes das regiões mais internas do bacilo perdem suas identidades, ao atravessar as zonas de alta densidade de elétrons e, se transformam em átomos de hélio.

#### Propostas Futuras

- a) ajustar as condições operacionais para o emprego da técnica de Eletroporação, para outros carreadores à base de boro-10;
- b) Realizar modelagens computacionais que simulem a morfologia e a estrutura celular de uma micobactéria para determinar o alcance das partículas alfa nesse meio;
- c) investigar a utilização de outras metodologias que permitam detectar a emissão de linhas espectrais do átomo de hélio

A ratificação ou não das hipóteses apresentadas acima direciona a pesquisa para outras linhas de investigação, no sentido de se continuar a busca pelo ajuste das condições operacionais para o emprego da técnica de Eletroporação, para um carreador à base de boro. Para as 2ª e da 3ª hipóteses, sugere-se a realização de modelagens computacionais que simulem a morfologia e a estrutura celular de uma micobactéria. Em relação à 4ª hipótese, sugere-se investigar a utilização de outras metodologias que permitam detectar a emissão de linhas espectrais do hélio.

A pesquisa para obtenção de imagens neutronográficas de micobactérias em suspensões contendo compostos borados mostrou-se desafiadora, mas acredita-se que vale

a pena insistir. E, por que vale a pena insistir? Essa motivação se prende aos dados alarmantes sobre a disseminação da doença e o alto índice internacional de óbitos por tuberculose e por outras doenças micobacterianas, publicados em relatórios oficiais, como os Report da WHO. Assim sendo, toda pesquisa que venha colaborar com a identificação desses bacilos, em menor tempo, ou que melhore sua visualização por microscopia ótica, com certeza, será importante.

## Referências Bibliográficas

ANDERSSON, G. E., SHARP, P. M., “Codon usage in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex”. **Microbiology**, v. 142, pp. 915-925, 1996.

ANDRADE, M. L. G., **Caracterização de Sistemas Filme-Convertor para Radiografia com Nêutrons**, Dissertação de MSc, IPEN/CNEN/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2002.

BARRERA, LUCÍA. “The Basics of Clinical Bacteriology”, In: **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3, Leão, Palomino, Leão, Ritacco editores, pp. 95-112. Disponível em: <<http://www.tuberculosistextbook.com>>. Acesso em: 24/08/2007.

BARRY III, C. E., LEE, R. E., MDLULI, K., “Mycolic Acids: Structure, Biosynthesis and Physiological Functions”, **Prog. Lipid. Res.**, v. 37, n°2/3, pp.143 -179, 1998.

BECKER, K., “Neutron Personnel Dosimetry by Non-Photographic Nuclear Tracks Registration”. In: ENEA Symposium on Radiation Dose Measurement at Stockholm, 317-338, 1967.

BECKURTS, K.H., WIRTZ, K., **Neutron Physics**, Springer-Verlag, 1964.

BOMBARDA, S., FIGUEIREDO, C. M., FUNARI, M. B. G. *et al.*, “Imagem em Tuberculose Pulmonar” **J. Pneumologia** v.27(6), São Paulo, Nov./Dec. 2001

BRENNAN, P. J., “Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*”, **Tuberculosis**, v. 83, pp. 91–97, 2003.

CARTWRIGHT, B. G., SHIRK, E. K., PRICE, P. B., “A Nuclear Tracks Recording Polymer of Unique Sensitivity and Resolution”. **Nuclear Instruments and Methods**, v.153, pp. 457-460, 1978.

CAVE, A. J. E., “The Evidence for the Incidence of Tuberculosis in Ancient Egypt”, **Br J. Tuberc**, v. 33, pp. 142-152, 1939.

CHAUHAN, A., MADIRAJU, M. V., FOL, M., *et al.* “*Mycobacterium Tuberculosis* Cells Growing in Macrophages Are Filamentous and Deficient in Ftsz Rings”. **J Bacteriol**, v. 188, pp. 1856-1865, 2006.

CHOPPIN, G., LILJENZIN, J-O., RYDBERG, J., **Radiochemistry And Nuclear Chemistry**, 3ª edição, 2002. Disponível em: <<http://book.nc.chalmers.se/>>. Acesso em: 22/08/2006.

CODERRE, J. A., TURCOTTE, J. C., RILEY, K. J., *et al.*, “Boron Neutron Capture Therapy: Cellular Targetting of High Linear Energy Transfer Radiation”. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 2 (5), pp. 355-375, 2003.

CRISPIM, V.R., **Desenvolvimento de Ensaios Não-Destrutivos com Neutronografias**, Tese de DSc, PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1993.

DAFFÉ, M., ETIENNE, G., “The Capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its Implications for Pathogenicity”, **Tubercle and Lung Disease**, v. 79(3), pp. 153-169, 1999.

DANIEL, T. M., “The Origins and Precolonial Epidemiology of Tuberculosis in the Americas: Can We Figure Them Out?” **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 4, pp.395-400 , 2000.

DANIEL, T. M., “The History of Tuberculosis”, **Respiratory Medicine**, v. 100, pp. 1862-1870, 2006.

DAVIS, B.D., DULBECCO, R., **Microbiologia**. Harper & Row do Brasil, São Paulo, Brasil, 1979.

DOMANUS, J. C., **Practical Neutron Radiography**, Commission of the European Communities, 1ª edição, Kluwer Academic Publishers, 1992.

DONOGHUE, H. D., MARCSIK, A., MATHESON, C. *et al.*, “Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in Human Archaeological Samples: A Possible Explanation for the Historical Decline of Leprosy”. **Proc. R. Soc. B**, v. 272, pp.389-394, 2005.

DRAGOSA, M. A., VIAGGI, M., KREIMANN, E., *et al.* “Selective Uptake of p-Borophenylalanine by Undifferentiated Thyroid Carcinoma for Boron Neutron Capture Therapy”. **Thyroid**, v.12 (1), pp. 7-12, 2002.

DUBNAU, E., CHAN, J., RAYNAUD, C., *et al.*, “Oxygenated Mycolic Acids Are Necessary for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in Mice”, **Molecular Microbiology**, v. 36 (3), pp. 630-637, 2000.

ENGE, W., “Introduction to Plastic Track Detectors”. **Nuclear Tracks**, v. 4, n° 4, pp.283-308, 1980.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>>. Acesso em 15/07/ 2009.

FERREIRA, F. J. O., **Estudo para Implantação de um Sistema Eletrônico para Aquisição de Imagens Neutronográficas no Reator Argonauta do IEN/CNEN**, Tese de Mestrado, PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

FISCHER, C. O., “The History of the First Neutron Radiographs in Berlin 1935-1944”, **Proceeding of Fourth World Conference**, San Francisco, California, USA, May, 1992.

FLEISCHER, R. L., **Tracks to Innovation: Nuclear Tracks in Science & Technology**, 1ª edição, Springer-Verlag, New York, USA, 1998.

GAILLARD, S., ARMBRUSTER, V. HILOL, M. A., *et al.*, “Production and Validation of CR-39-based Dishes for Alpha-particle Radiobiological Experiments”. **Radiation Research**, v.163 (3), pp. 343-350, 2005.

GASPAR, P. F., **Considerações Sobre o Estudo da BNCT (Terapia de Captura Neutrônica por Boro)**, Dissertação de Mestrado, IPEN/CNEN, São Paulo, SP, 1994.

GAMOW, G., **Biografia da Física**, Zahar Editores, 1963.

GARRITY, G. M., BELL, J., LILBURN, T. G. **Taxonomic Outlines of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2ª edição, maio, 2004.

Disponível em: < <http://www.bergeys.org/outlines.html>> acesso em: 16/07/2009.

GEBRE, N., KARLSSON, U., JÖNSSON, G., *et al.*, “Improved Microscopical Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis”. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 89, pp. 191-193, 1995.

GOMES, M. J. P., DRIEMEIER, D., RIBEIRO, V. R. *et al.*, “Doença de Johne: Isolamento do *Mycobacterium avium*, subesp. paratuberculosis (Map) em rebanho leiteiro infectado na região sul do Brasil”, **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30(2), pp. 113-118, 2002.

GOODFELLOW, M., MAGEE, J.G., “Taxonomy of Mycobacterium”. In: **Mycobacteria I Basic Aspects**, v. I, **Chapman and Hall Medical Microbiology Series**, Gangadharam e Jenkins, pp. 1-71, 1997.

GUTIERREZ, M. C., BRISSE, S., FABRE, M., *et al.*, “Ancient Origin and Gene Mosaicism of Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*”. **PloS Pathog.** v.1e 5, 2005.

HENSHAW, D. L., “Applications of CR-39 Nuclear Track Detector in Medicine and Technology”. **Physics in Technology** v.13, p. 266-272, 1982.

HERZOG, B., “History of Tuberculosis”. **Respiration**, v.65, pp.5-15, 1998.

HO, J. P.Y., YIP, C.W.Y., NIKEZIC, D., “Differentiation Between Tracks and Damages in SSNTD Under the Atomic Force Microscope”, **Radiation Measurements**, v. 36, pp.155 – 159, 2003.

HOFFMANN, C., LEIS, A., NIEDERWEIS, M., *et al.*, “Disclosure of the Mycobacterial Outer Membrane: Cryo-electron Tomography and Vitreous Sections Reveal the Lipid Bilayer Structure”, **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 105(10), p. 3963-3967, 2008.

KALSI, P.C., RAMASWAMI, A. and MANCHANDA, V. K., “Solid State Nuclear track Detectors and their Applications.” Disponível em:  
<<http://www.barc.ernet.in/webpages/letter/2005/200506-2.pdf>>. Acesso em: 12/02/2008

KAPLAN, I., **Física Nuclear**, 2ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1978.

KAUFMANN S.H, SCHAIBLE, U.E., “100th Anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the Discovery of the Tubercle Bacillus”. **Trends Microbiol.** v. 13, pp. 469-475, 2005.

KNOLL, G. F., **Radiation Detection and Measurement**, John Wiley & Sons, Inc., 3ª edição, 1999.

KOTNIK, G., PUCIHAR, M., REBERSEK, D., “Role of Pulse Shape in Cell Membrane Electroporation”, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1614, pp. 193-200, 2003.

KRITSKI, A., MELO, F. A. F., “Tuberculosis in Adults”, , In: **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**, Cap. 15, Palomino, Leão, Ritacco edits. pp. 487-524. Disponível em: <<http://www.tuberculosis-textbook.com>>. Acesso em: 24/08/2007

KUBY, “Immunology”, 2001. Disponível em: <<http://www.whfreeman.com/kuby/>>. Acesso em: 05/2007.

LEÃO, S.C., PORTAELS, F., “History”. In: **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**, Cap.1. Palomino, Leão, Ritacco editores. Disponível em: <<http://www.tuberculosis-textbook.com>> Acesso: 24/08/2007.



LI, W.Y., CHAN, K.F., TSE, A.K.W., et al., “Studies of biocompatibility of chemically etched CR-39 SSNTDs in view of their applications in alpha-particle radiobiological experiments” **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** v.248, pp. 319-323, 2006.

LOPES, J. D. R., **Caracterização Morfológica e Análise Quantitativa de Bactérias *in vitro* por Técnicas Nucleares de Medidas**, Tese de DSc, PEN/COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

MAGYAR, L. A., “The History of the Term Tuberculosis”. In: **Tuberculosis Past and Present**, Gyorgy Pálfi et al. eds., pp. 25-27. 1999.

MAHAPATRA, S., BASU, J., BRENNAN, P., *et al.*, “Structure, Biosynthesis, and Genetics of the Mycolic Acid-Arabinogalactan-Peptidoglycan Complex”. In: **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus**, Cap. 18, ASM Press, Washington DC, 2005.

MARASHI, M. K., “Analysis of Absorbed Dose Distribution in Head Phantom in Boron neutron Capture Therapy”, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 440, pp. 446-452, 2000.

MARTIN, A., PORTAELS, F., “Drug Resistance and Drug Resistance Detection”. In: **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**, Cap.19. Palomino, Leão, Ritacco editores. Disponível em: <<http://www.tuberculosistextbook.com>> Acesso: 24/08/07.

MATSUMI, C. T., RUSCZAK, J. R., RAMOS, A., *et al.*, “Desenvolvimento de um Eletroporador de Células Biológicas”. In: **21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, pp. 649-652, Salvador, Bahia, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referencia Professor Hélio Fraga, **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2ª edição, RJ, Brasil, 1998.

MIR, L. M., “Therapeutic Perspectives of *in vivo* Cell Electroporation”, **Bioelectrochemistry**, v. 53, pp. 1-140, 2000.

MORETTI, P. E., **Microbiologia, Saúde & Ambiente**, Seção 1, Bacteriologia, Parte 4 Fisiologia. Disponível em: <[www.fam.br/microrganismos/index\\_0.htm](http://www.fam.br/microrganismos/index_0.htm)>. Acesso em: 15/11/ 2007.

NATIONAL NUCLEAR DATA CENTER, Disponível em : <<http://www.nndc.bnl.gov/sigma/>>. Acesso em: 14/01/ 2009.

NG, C.K.M., CHAN, K.F., LI, W.Y., TSE, A.K.W., et al. “Biocompatibility Enhancement of Chemically Etched CR-39 SSNTDS through Superficial Pore Formation by Alpha-Particle Irradiation.” **Radiation Measurements**, v. 43 (1), pp. 537-540, 2008.

NIEDERWEIS, M., “Nutrient Acquisition by Mycobacteria”, **Microbiology** , v. 154, pp. 679–692, 2008.

NIKEZIC, D., YU, K. N., “Formation and Growth of the Tracks in Nuclear Tracks Materials”. In: **Mat. Sci. and Eng.** . R 26, pp. 51-123, 2004.

OGURA, K., YAMAZAKI, A., YANAGIE, H., et al., “Neutron Capture Autoradiography for a Study on Boron Neutron Capture Therapy”. **Radiation Measurements**, v. 34, pp. 555–558, 2001.

PALMERO, D., “Tuberculosis and HIV/AIDS”. Cap.17, In: **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. Palomino, Leão, Ritacco editores. Disponível em: <<http://www.tuberculosisistextbook.com>>. Acesso: 24/08/07.

PEASE A. S., “Some Remarks on the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis in Antiquity”. **Isis**, v. 31, pp. 380-393, 1940.

PELCZAR Jr., M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R., **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, v. 2, 2ª edição, São Paulo, Brasil, MAKRON Books, 2008.

PEREIRA, M. A. S., PUGLIESE, R., PUGLIESI, F., “Neutron Induced Alpha Radiography”, **Radiation Measurements**, v. 43, pp. 1226-1230, 2008.

PRAT, J. G., SOUZA, S. M., “Prehistoric Tuberculosis in America: Adding Comments to a Literature Review”, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98 (I), pp. 151-159, 2003.

REZWAN, M., LANEELLE, M.A., SANDER, P., *et al.*, “Breaking Down the Wall: Fractionation of Mycobacteria”, **Journal of Microbiological Methods**, v. 68(1), pp. 32-39, 2007.

RIEDER H.L., CHONDE T. M, MYKING H, *et al.* “The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network: Minimum Requirements, Role and Operation in a Low-income Country”. In: **International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, France, 1998.

RIEDER H. L., **Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control**, 1ª edição, Cap.2 International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999.

ROLS, M. P., TEISSIÉ, J., “Electropermeabilization of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration”, **Biophysical Journal**, v.75, pp.1415-1423, 1998.

ROTHSCHILD, B.M, MARTIN, L. D., LEV, G. *et al.*, “*Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present”. **Clinical Infection Disease**, v. 33, pp.305-11, 2001.

RUNYON, E.H., WAYNE, LG., KUBICA, G.P. “Family II Mycobacteriaceae”. In: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (Editors), **Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology**, 8ª ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.

SCHIRM, J., OOSTENDORP, L. A., e MULDER, J. G., “Comparison of Amplicor, in-house PCR, and Conventional Culture for Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples”. **J. Clin. Microbiol.** v.33, pp.3221-3224, 1995.

SHINNICK, T. M., GOOD R. C., “Mycobacterial taxonomy”. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.13, pp. 884-901, 1994.

SILK, E.C.H., BARNES, R.S., “Examination of fission fragment tracks with an electron microscope”. **Philos. Mag.** V.4, p.970–971, 1959.

SILVA, J. R. L., BOÈCHAT, N., “O Ressurgimento da Tuberculose e o Impacto do Estudo da Imunopatogenia Pulmonar”. **J. Bras. Pneumol.** v. 30(4), pp. 478-84, 2004.

SKVARC, J., *et al.* “Selective Radiography with Etched Track Detectors”. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 152, pp. 115-121, 1999.

SOLOWAY, A. H., TJARKS, W., BARNUM, B. A *et al.*, “The Chemistry of Neutron Capture Therapy”, *Chemical Review*, v. 98, pp. 1515-1562, 1998.

STAMM, L. M., BROWN, E. J., “*Mycobacterium marinum*: The Generalization and Specialization of a Pathogenic Mycobacterium”, **Microbes and Infection**, v.6, pp. 1418–1428, 2004.

SZYDLOWSKI, A., SARTOWSKA, B., BANASZAK, A., *et al.*, “Calibration of PM-355 Nuclear Track Detectors; Comparison of Track Diameter Diagrams with Track Depth Characteristics”, **Radiation Measurements**, v.40, pp. 401-403, 2005.

TAKAYAMA, K., WANG, C., BESRA, G. S., “Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*”, **Clinical Microbiology Reviews**, v.18 (1) pp. 81–101, 2005.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L., **Microbiologia**, Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2005.

TOUNGOUSSOVA, O. S., BJUNE, G., CAUGANT, D. A., “Epidemic of Tuberculosis in the Former Soviet Union: Social and Biological Reasons”, **Tuberculosis** v.86, pp. 1–10, 2006.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., **Microbiologia**, 5ª edição, Editora Atheneu, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

WACHA, R., **Detecção de Microorganismos em Meios de Cultura pela Técnica Neutronográfica**, Dissertação de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1999.

WALKER, R.M., PRICE, P.B., FLEISCHER, R.L. “A versatile disposable dosimeter for slow and fast neutrons”. **Appl. Phys. Lett.**, v.3, p.28–29, 1963.

WEBELEMENTS. Disponível em: <<http://www.webelements.com>>. Acesso em: 12/10/2007

WHO, “10 Facts About Tuberculosis”.

Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/index.html>>.

Acesso em: 12/07/2009

WHO, “Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing, Report 2008”.

Disponível em: <<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>>. Acesso em: 30/03/2008

WITTIG, A., SAUERWEIN, W. A., CODERRE, J. A. “Mechanisms of Transport of p-Borono-Phenylalanine Through the Cell Membrane In Vitro. **Radiation Research**, v.153, p.173–180, 2000.

XIE, T. D., TSONG, T. Y., “Study of Mechanims of Electric Field-Induced DNA Transfection III”, **Biophysical Journal**, v.63, pp.28-34, 1992.

YANAGIE, H., OGURA, K., MATSUMOTO, T., *et al.*, “Neutron Capture Autoradiographic Determination of  $^{10}\text{B}$  Distributions and Concentrations in Biological Samples for Boron Neutron Capture Therapy.” **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 424, pp. 122-128, 1999.

YEGIAN, D., VANDERLINDE, R.J., “The Nature of Acid-fastness”, **J. Bacteriol**, v. 54, pp. 777-783, 1947.

YOKOYAMA, K., MIYATAKE, S., KAJIMOTO, Y., *et al.*, “Pharmacokinetic study of BSH and BPA in Simultaneous Use for BNCT”. **Journal of Neuro-Oncology**, v.78, pp. 227–232, 2006.

Disponível em: <[http://www.fw-ac-deptoofhealth.com/tuberculosis\\_clinic.htm](http://www.fw-ac-deptoofhealth.com/tuberculosis_clinic.htm)>.

Acesso em: 30/03/2007

Disponível em: <<http://www.biotopics.co.uk/newgcse/tbpreventioncontrol.html>>.

Acesso em: 25/07/2007

Disponível em: <[www.sbbq.org.br](http://www.sbbq.org.br)>. Acesso em: 09/08/2007

Disponível em: <[www.ann.clinmicrob.com/content/4/1/18](http://www.ann.clinmicrob.com/content/4/1/18)>. Acesso em: 30/03/2007