

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO RECONHECER

BÁRBARA ANDRADE BARCELOS RANGEL

**ESTUDO SOBRE VIRULÊNCIA DE CEPAS CLÍNICAS DE BCG ISOLADAS DE
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE BCGite**

ORIENTADORA: ELENA LASSOUNSKAIA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO RECONHECER

BÁRBARA ANDRADE BARCELOS RANGEL

ORIENTADORA: ELENA LASSOUNSKAIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R196

Rangel, Bárbara Andrade Barcelos.

ESTUDO SOBRE VIRULÊNCIA DE CEPAS CLÍNICAS DE BCG ISOLADAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE BCGITE. / Bárbara Andrade Barcelos Rangel. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

50 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientadora: Elena Lassounskaia.

Coorientador: Fabrício Moreira Almeida.

1. BCG. 2. Isolados clínicos. 3. Virulência. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**ESTUDO SOBRE VIRULÊNCIA DE CEPAS CLÍNICAS DE BCG ISOLADAS DE
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE BCGite**

BÁRBARA ANDRADE BARCELOS RANGEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022.

Comissão examinadora:

Dr^a. Bianca Magnelli Mangiavacchi (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – FAMESC

Dr^a. Leide Laura Figueiredo Maciel (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Dr. Jorge Hudson Petretski (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Dr. Fabrício Moreira Almeida (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF –
Coorientador

Dr^a. Elena Lassounskaia (Doutora em Imunologia) – UENF – Orientadora

Dedico esta Dissertação a toda minha família e aos meus amigos por tamanho amor, incentivo, apoio e esforço para a realização desse meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa importante na minha vida sendo concluída e eu não poderia deixar de agradecer a todos que estiveram presentes comigo até o momento, pessoas que foram imprescindíveis para que eu pudesse continuar seguindo o meu caminho e que me ajudaram na realização de mais um sonho.

Primeiramente, eu gostaria de agradecer aquele que nunca me abandonou durante todo esse percurso e me deu o dom da vida. Agradeço a Deus por ser o motivo da minha maior força nessa caminhada e por me dar sabedoria para enfrentar todos os obstáculos.

Meus agradecimentos especiais vão aos meus pais, Adriana e Fábio, por me proporcionarem a melhor educação que eu poderia ter recebido, por todos os conselhos, por serem a minha base, a minha fonte inspiradora e por todo amor me dado ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos, Fabinho e Laura, que sempre estiveram junto comigo sendo os meus maiores parceiros. E à nossa fiel companheira, Atena, por toda lealdade, carinho e amor concedidos.

Às minhas avós, Teresinha e Vera, por serem as mulheres mais incríveis que já conheci, por iluminarem a minha vida e por serem os meus exemplos de força e amor. E aos meus avôs, Adelson (*in memoriam*) e Ramildo (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presentes, nunca serão esquecidos.

À minha madrinha, Ana Beatriz, por exercer um papel de mãe, sempre disposta a me apoiar, a se sacrificar, a acreditar em mim e por ter um dos corações mais belos que existe.

Aos meus padrinhos, Haroldo e Eliana, por nunca medirem esforços para me ajudar e contribuir com o meu crescimento, me oferecendo todo carinho e amor do mundo.

Aos meus tios, Vítor, Andrea, Quitéria e Ângelo, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo todo o apoio necessário e por toda a confiança. Aos meus primos, Cayo, Luiza e Arthur, por todos os momentos de felicidade e união compartilhados.

À minha orientadora Elena Lassounskaia, pela paciência, confiança no meu trabalho e potencial, pelo incentivo e pelo compartilhamento dos seus ensinamentos.

Ao meu coorientador, Fabrício Moreira, por toda sabedoria compartilhada, por me acompanhar durante horas nos meus experimentos, por me mostrar sempre uma solução, por não medir esforços para o sucesso do meu trabalho, mesmo com uma rotina extremamente cansativa e cheia de obstáculos.

À equipe do LBR, em especial a Dra. Giliane, Dr. Vinicius, Dr. Jorge, Dra. Alba, Ms. Luiza, Ms. Rebeqa, Ms. Yuri e Ms. Letícia, que se prontificaram a me dar todo ensinamento e apoio necessários, por deixarem os meus dias mais leves, pela atenção e carinho.

Aos técnicos Rita, Juliana, Núbia, Verônica e Fernando por colaborarem para a realização do meu trabalho, me oferecerem ajuda e disponibilidade para a execução do meu projeto. À Marilene e Marinete por tamanho cuidado, atenção e carinho.

Aos meus amigos, Thaís e Lucas, por nunca me abandonarem, por toda força concedida, por estarem sempre dispostos a me escutar e apoiar. Aos meus amigos Igor, Nina, Carlos, Nayara e Luciana por me oferecer tamanha atenção, ajuda e amor quando precisei.

Aos meus amigos da FMC, em especial a todos os integrantes da Turma 59, e as minhas maiores parceiras Karol, Bárbara, Paloma, Brenda, Lillian, Renata, Laura, Catalã e Lugon por todo carinho e apoio na minha cansativa rotina de estudo e trabalho. E aos meus amigos Frederico, Eduardo e Henrique por tantos conselhos e parceria.

Aos meus amigos Andrezza, Marcello, Murilo, Kamila, Tâmara, Gabriel e Maurício por sempre estarem comigo e por tantos momentos de alegria a mim concedidos nessa caminhada.

À UENF e seus funcionários por me acolherem nesses 7 anos e me proporcionarem tantos ensinamentos.

A todos que confiaram, torceram e contribuíram para essa conquista. Mais uma vitória que é nossa, AMO VOCÊS.

Muito obrigada!

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da via evolutiva proposta do bacilo da tuberculose ilustrando a perda sucessiva de DNA em certas linhagens	16
Figura 2: Genealogia refinada de vacinas BCG	24
Figura 3: A variedade de virulência das cepas de BCG está relacionada as alterações nos genes de virulência de micobactéria.....	26
Figura 4: Avaliação de virulência de cepas clínicas e vacinais de BCG pelo crescimento intracelular através do ensaio de CFU.....	32
Figura 5: Avaliação da viabilidade celular no modelo <i>in vitro</i> de macrófagos infectados com cepas clínicas e vacinais de BCG.	33
Figura 6: Avaliação de morte apoptótica e necrótica <i>in vitro</i> de macrófagos infectados com cepas clínicas e vacinais de BCG	35
Figura 7: Avaliação de quantificação das proporções de células apoptóticas e necróticas no dia 4	37
Figura 8: Produção de TNF- α por macrófagos murinos infectados pelas cepas clínicas e vacinais de BCG	40
Figura 9: Produção de NO por macrófagos murinos infectados pelas cepas clínicas e vacinais de BCG	41
Figura 10: Os dados genômicos e fenotípicos obtidos para cepas BCG isoladas na Argentina dos pacientes com a BCGite.....	44

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Índice de virulência relativa dos isolados clínicos de BCG em comparação a cepa vacinal BCG Pasteur avaliado no modelo de macrófagos infectados <i>in vitro</i>	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC – Suplemento de albumina, dextrose, catalase

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

BSA - Bovine Serum Albumin - Albumina Sérica Bovina

CFU – *colony-forming unit* - unidades formadoras de colônia

CTL – Controle

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO – Densidade ótica

HIV - Vírus da imunodeficiência adquirida

IL – Interleucina

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Salina Fosfatada Tamponada

pH – Potencial Hidrogeniônico

RPM – Rotação por Minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

TB – Tuberculose

TLR – Receptor Toll-similar

TNF- α – *Tumor necrosis factor alfa* - fator de necrose tumoral

RESUMO

A tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é uma das doenças mais antigas da humanidade e com uma das maiores taxas de mortalidade no mundo entre doenças infecciosas em adultos. Atualmente, a única vacina licenciada para a imunoprofilaxia de TB é Bacilo Calmette-Guérin (BCG). Com 100 anos de uso, a vacina está sendo aplicada nos recém-nascidos e protege crianças contra formas graves da TB. As complicações são raras, mas a BCGite é uma delas, sendo considerada uma doença local que consiste na ulceração persistente no local de injeção e linfonodos regionais e que pode evoluir para uma condição sistêmica. As complicações podem ser observadas nos indivíduos suscetíveis a micobactéria por causa de particularidades imunogenéticas, imunodeficiência ou por particularidades da cepa vacinal, que pode aumentar sua virulência. O objetivo desse trabalho foi avaliar as cepas BCG isoladas de pacientes argentinos com BCGite (doença localizada versus doença sistêmica) e as cepas BCG vacinais presentes no país (BCG Sofia e BCG Pauster) em respeito à sua virulência bacteriana e ao caráter da resposta imune induzida pela bactéria. A virulência foi avaliada no modelo de infecção *in vitro* dos macrófagos murinos RAW 264.7, analisando a capacidade de reprodução intracelular da micobactéria e na indução da morte apoptótica ou necrótica das mesmas. Todas as cepas apresentaram um perfil de virulência semelhante, porém a cepa Sofia estava induzindo a morte apoptótica preferencialmente, e a cepa Pasteur induziu quanto apoptose, tanto a necrose nas células infectadas. Além das cepas clínicas de infecção disseminada, principalmente ARG-22542 e ARG-09292, mostraram uma tendência a serem mais virulentas em comparação com as cepas vacinais e as cepas de doença localizada, demonstrando a maior capacidade de induzir morte necrótica dos macrófagos, produção de NO e TNF- α .

Palavras-chave: vacina BCG; BCGite, isolados clínicos, virulência

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is one of the oldest diseases of humanity and with one of the highest mortality rates in the world among infectious diseases in adults. Currently, the only licensed vaccine for TB immunoprophylaxis is Bacillus Calmette-Guérin (BCG). With 100 years of use, the vaccine is being applied to newborns and protects children against severe forms of TB. Complications are rare, but BCGitis is one of them, being considered a local disease consisting of persistent ulceration at the injection site and regional lymph nodes, which can progress to a systemic condition. Complications can be observed in individuals susceptible to mycobacteria because of immunogenetic particularities, immunodeficiency or particularities of the vaccine strain, which can increase its virulence. The objective of this work was to evaluate the BCG strains isolated from Argentine patients with BCGitis (localized disease versus systemic disease) and the vaccine BCG strains present in the country (BCG Sofia and BCG Pauster) with respect to their bacterial virulence and the character of the induced immune response. by the bacterium. Virulence was evaluated in the in vitro infection model of RAW 264.7 murine macrophages, analyzing the ability of the mycobacteria to reproduce intracellularly and to induce apoptotic or necrotic death. All strains showed a similar virulence profile, however the Sofia strain was inducing apoptotic death preferentially, and the Pasteur strain induced both apoptosis and necrosis in infected cells. In addition, to the clinical strains of disseminated infection, mainly ARG-22542 and ARG-09292, showed a tendency to be more virulent compared to vaccine strains and strains of localized disease, demonstrating the greater ability to induce necrotic death of macrophages, production of NO and TNF- α .

Keywords: BCG vaccine; BCGitis, Clinical Isolates, Virulence

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELA	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Tuberculose.....	15
1.2 Resposta Imune a micobactéria	18
1.3 Vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin).....	20
1.4 Virulência das sublinhagens BCG e da cepa <i>M. bovis</i> precursora.....	22
2 OBJETIVO GERAL	28
2.1 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 TESTES <i>IN VITRO</i>	28
3.1.1 Cultura Celular	28
3.1.2 Cultivo micobacteriano.....	29
3.1.3 Infecção das culturas dos macrófagos pelo BCG	29
3.1.4 Quantificação do crescimento intracelular de micobactérias em macrófagos.	30
3.1.5 Avaliação da morte celular em macrófagos infectados	30
3.1.6 Quantificação de citocinas.....	31
3.1.7 Análises estatísticas	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Avaliação de virulência pelo crescimento intracelular de cepas clínicas e vacinais de BCG através do ensaio de CFU	32

4.2	Avaliação da viabilidade celular no modelo de infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	33
4.3	Avaliação do padrão de morte celular pela quantificação de apoptose e necrose no modelo de infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	34
4.4	Quantificação da taxa de virulência relativa das cepas BCG	37
4.5	Avaliação da resposta dos macrófagos a infecção pelas cepas clínicas e vacinais através da quantificação dos mediadores inflamatórios	39
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÕES.....	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB), causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, doença infectocontagiosa que atinge os seres humanos, ainda continua sendo uma das doenças infecciosas com maior taxa de mortalidade no mundo. Estima-se que a TB já tenha causado a morte de mais de um bilhão de pessoas nos últimos 200 anos e cerca de 1,4 milhões mortes só em 2019. No Brasil, nesse mesmo ano, foram registrados 4.532 óbitos em decorrência da doença, o que equivale a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil hab. Desde 2010, o coeficiente de mortalidade varia entre 2,3 a 2,2 óbitos por 100 mil hab. (OMS, 2020; BRASIL, 2021).

A TB é uma das doenças mais antigas da humanidade. O gênero *Mycobacterium* possui origem estimada em 150 milhões de anos e já foram encontrados registros da doença em múmias egípcias e em trechos de livros hebraicos bíblicos, o que indica sua presença já nas principais civilizações (VERONESI & FOCACCIA, 2010).

A princípio, a tuberculose deve ter acometido animais por meio de uma variante ancestral de *M. tuberculosis*, que antecedeu o *M. bovis*, com provável disseminação causada pelo consumo humano de carne ou leite contaminados. Com o tempo, novas linhagens foram surgindo com formas adaptativas ao homem, dando origem a variante moderna de *M. tuberculosis*, passando a ter uma melhor transmissão aerógena, com localização pulmonar e menos virulência, como mostra a Figura 1. Com isso, transformaram-se em consideráveis e resistentes patógenos da espécie humana (DANIEL, 2006).

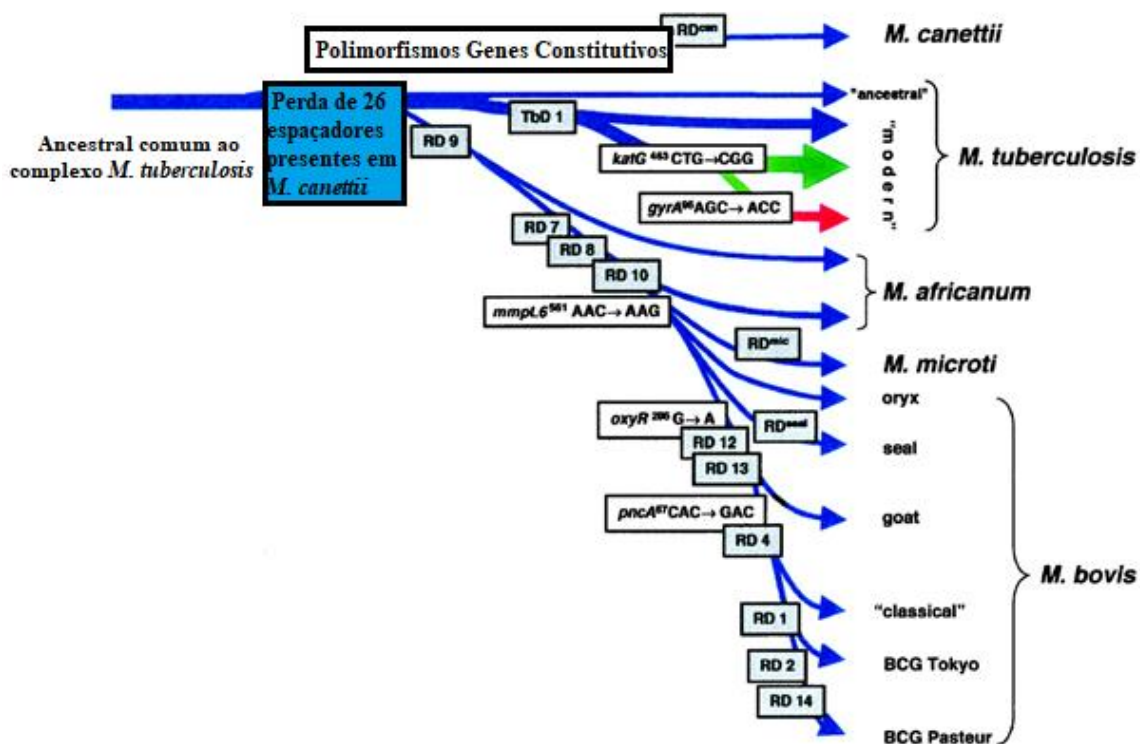


Figura 1: Esquema da via evolutiva proposta do bacilo da tuberculose ilustrando a perda sucessiva de DNA em certas linhagens (caixas cinza). Figura modificada de BROSCH, 2002. O esquema é baseado na presença ou ausência de regiões deletadas conservadas e em polimorfismos de sequência em cinco genes selecionados. Observe que as distâncias entre certos ramos podem não corresponder às diferenças filogenéticas reais calculadas por outros métodos. As setas azuis indicam que as cepas são caracterizadas por katG 463. CTG (Leu), gyrA 95 ACC (Thr), típico para organismos do grupo 1. As setas verdes indicam que as cepas pertencem ao grupo 2 caracterizado por katG 463 CCG (Arg), gyrA 95 ACC (Thr). A seta vermelha indica que as cepas pertencem ao grupo 3, caracterizado por katG 463 CCG (Arg), gyrA 95 AGC (Ser), conforme definido por SREEVATSAN et al, 1997.

No entanto, quando se trata de saúde pública, a espécie com mais relevância é a *M. tuberculosis*, que foi descrita por Robert Koch, bacteriologista alemão, em 1882, e também chamada de bacilo de Koch (BK), em sua homenagem. Porém, outras bactérias do complexo *M. tuberculosis*, como *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* e *M. microti* também podem causar TB em homem ou animais. O *M. tuberculosis* apresenta uma estrutura fina, levemente curva, com tamanho de 0,5 a 3 µm e é de crescimento lento. É também considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e com baixa permeabilidade, devido a sua parede celular rica em arabinogalactano e lipídios, como ácidos micólicos. Dessa forma, há redução na efetividade da maioria dos antibióticos e favorecimento na sua sobrevivência nos macrófagos (MEGID et al., 2016).

A transmissão da *M. tuberculosis* se dá por via aérea, com a eliminação de bacilos no ambiente por meio de aerossóis de uma pessoa infectada para outra pessoa, seja por tosse, fala ou espirro. Quando há a positividade da baciloscopia no escarro, as pessoas com

TB pulmonar ou laríngea são referidas com o termo “bacilífero”, indicando que elas possuem uma alta capacidade de transmissão. Porém, pessoas que positivaram em outros exames, como cultura e/ou Teste Rápido Molecular da Tuberculose (TRM-TB), também podem transmitir (BRASIL, 2011).

Quando se trata da descoberta de medicação efetiva no controle da doença ativa, ela foi iniciada pela utilização de bacteriostáticos, como o Ácido Paraminosalicílico (1943) e pelo Thiosemicarbazone (1945) para tratamento dos pacientes com TB. Tais medicamentos foram sucedidos pela descoberta do antibiótico Estreptomicina, que foi a primeira droga eficiente contra a micobactéria, e pela Isoniazida e Rifampicina, primeiras drogas orais para a administração da doença (DANIEL, 2006).

Desta maneira, o tratamento da TB consiste em uma associação de fármacos, Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol durante dois meses, seguida por mais quatro meses somente com Isoniazida e Rifampicina. Em casos de prescrição imprópria dessa associação ou falta de colaboração do paciente para o uso desse esquema terapêutico podem levar ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (multirresistência, MDR) (ROSSETTI et al., 2002)

Esse aumento na disseminação das cepas Mtb resistentes aos medicamentos anti-TB e a incidência crescente dos casos de coinfeção de HIV e *M. tuberculosis* acarretam na necessidade do desenvolvimento de novos fármacos e vacinas para tratamento e prevenção dessa doença (GANDHI et al., 2006).

O pulmão é o órgão que a TB acomete de forma prioritária. As gotículas de Pflüger expelidas, que são partículas líquidas quando uma pessoa fala, tosse ou espirra, transformam-se em partículas menores, chamadas de núcleos de Wells. Elas alcançam os alvéolos, local onde há a multiplicação e a primo-infecção. Quando há deposição de bacilos em roupas, utensílios, copos e etc., eles raramente se dispersam em aerossóis, portanto, não possuem papel na transmissão da doença (DUCATI et al., 2006).

A suscetibilidade de indivíduos expostos a TB, que apresentam um maior risco de desenvolvimento da doença, pode estar relacionada com alguns fatores como: aglomeração de pessoas, má nutrição, doenças autoimunes e fatores genéticos individuais (BARONNET et al., 2011). Além disso, o Mtb apresenta um conjunto de estratégias de evasão do sistema

imune que possibilita a sua resistência e escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro (OTTENHOFF, 2012).

A incidência de casos de TB sofre influência direta com número de casos de AIDS, já que as pessoas acometidas por essa doença apresentam uma condição de imunossupressão que favorece ao contágio e adoecimento, com cerca de 50% de óbitos em pacientes imunocomprometidos. Em 2020, as maiores proporções de coinfeção TB-HIV estiveram presentes no Distrito Federal, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. E, dentre as pessoas com coinfeção TB-HIV, apenas 45,1% realizaram terapia antirretroviral (TARV) durante o tratamento da TB (VALENTE, 2019; BRASIL, 2021).

1.2 Resposta Imune a micobactéria

O início da infecção se dá pela inalação de gotículas contendo os bacilos e a resposta imune inata é iniciada, quando esses patógenos atingem os alvéolos do indivíduo e são reconhecidos por receptores específicos, chamados de receptores Toll-like (TLRs). Esses receptores estão presentes em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e outras células do sistema imune inato (KORB et al., 2016).

Apesar da ativação inata dos macrófagos infectados, as micobactérias virulentas são capazes de sobreviver no interior da célula. Os principais mecanismos de escape do Mtb estão relacionados com a produção de moléculas como o ESAT-6, capaz de inibir a produção de IL-12 e IFN- γ . Assim como também, envolvem a inibição tanto da apoptose de macrófagos infectados, quando da fusão do fagócito ao lisossomo, gerando um favorecimento da sobrevivência e multiplicação dos bacilos no interior do fagócito (ALMEIDA et al., 2005).

As micobactérias acabaram desenvolvendo vários mecanismos de resistência relacionados aos componentes estruturais de sua parede, cuja membrana externa é constituída de cerca de 60% de ácidos micólicos e outros lipídeos. É expressa na parede celular a substância, ftiocerol dimicocerosato (PDIM), que mascara os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e evita o recrutamento de macrófagos microbicidas. Também estão presentes as moléculas de glicolípido fenólico (PGL) que induzem a expressão da quimiocina CCL2, responsável por recrutar os macrófagos e induzir o transporte do bacilo para outras regiões mais profundas do pulmão e iniciar a formação do granuloma (PAGÁN & RAMAKRISHNAN, 2014).

Após a fagocitose pelos macrófagos, os bacilos inalados ficam localizados em vacúolos citoplasmáticos e são apresentados aos linfócitos TCD4⁺ pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II, MHC-II, que estão presentes nos macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Essas células são denominadas de apresentadoras de antígenos (APCs) e produzem citocinas inflamatórias, capazes de recrutar outras células de defesa, como neutrófilos e monócitos (MOUTINHO et al, 2011).

Entre as citocinas liberadas, está o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsável por induzir a liberação do interferon gama (IFN- γ), uma das mais importantes interleucinas na resposta imune da TB e potente ativador de células Th1; a interleucina 2 (IL-2), que ativa macrófagos e age em comum com IFN- γ ; IL-4 e IL-5 que também ativam macrófagos; a IL-6 que participa na superação da fase aguda da infecção tuberculosa e a IL-12 responsável pela regulação do recrutamento de células T (ROSEMBERG, 2001; KORB et al., 2016).

O IFN- γ , junto com o TNF- α são capazes de estimular a produção de óxido nítrico sintetase (NOS-2), que é responsável por altos níveis de óxido nítrico e outros radicais intermediários do nitrogênio (RNI), com isso atuam como bactericidas e participam da resistência à infecção pelo Mtb. O TNF- α é fundamental no controle e manutenção do granuloma pela regulação da concentração de quimiocinas, prevenindo a reativação da TB. Sua neutralização pode resultar em reativação fatal da doença (MOUTINHO et al, 2011).

Após infectar macrófagos no pulmão, o Mtb se instala precocemente no fagossoma e escapa do sistema imune pela inibição da maturação do fagossoma e fusão com o lisossoma. O seu diâmetro aumenta junto com o número de vacúolos fundidos com os fagolisossomos, distribuídos no citoplasma. Os neutrófilos, linfócitos e outras células se concentram na região primária de infecção e ocorrerá a formação de um infiltrado celular que dará origem ao granuloma calcificado devido aos componentes fibróticos (OSÓRIO et al., 2014).

A composição do granuloma se dá por um núcleo de macrófagos infectados voltados de células de Langhans, células epitelióides e macrófagos com vacúolos lipídeos e granulócitos (KORB et al., 2016). Sua formação é fundamental para contenção física do bacilo, contudo, não há erradicação total do mesmo, pois pode ocorrer a formação de

necrose no interior do granuloma e com posterior cavitação, sendo um ambiente propício a permanência da micobactéria.

Dessa forma, o bacilo no interior do granuloma pode reduzir a sua atividade metabólica, ficando dormente e com alta sobrevivência no hospedeiro. Definida pela genética, infecções tuberculosas anteriores ou condições de imunossupressão, a resposta imunológica do indivíduo determinará se ocorrerá reativação da infecção (BARRIOS-PAYÁN et al., 2010).

1.3 Vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin)

A vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) foi produzida a partir do bacilo da *Mycobacterium bovis* por meio de atenuação por sucessivas replicações de uma cepa isolada por Nocard em 1908, responsável por causar mastite tuberculosa bovina: a "Lait Nocard". Nos anos seguintes, Albert León Charles Calmette e Camille Guérin, pesquisadores do Instituto Pasteur em Lille, foram realizando diversas passagens com a cepa enviada por Nocard. E após cerca de 230 passagens do *M. bovis*, em 1921, obtiveram uma cepa atenuada e não virulenta que seria incapaz de progredir à doença, sendo nomeada como BCG em homenagem aos seus criadores (LUCA & MIHAESCU, 2013).

No mesmo ano, ela foi utilizada pela primeira vez em humanos, a aplicação foi realizada em um recém-nascido que a mãe apresentava TB. Essa criança acabou não desenvolvendo a doença e nenhum efeito adverso. A utilização da vacina BCG foi adotada em grande escala a partir de então e com incentivo da Organização Mundial da Saúde (OMS) e United Nations Children's Fund (Unicef) a partir de 1948. Em 1962, já havia 400.000 crianças vacinadas contra TB em 46 países. Posteriormente, a vacina se tornou obrigatória em diversos países (COLLINS, 2006).

A vacina BCG é indicada para a prevenção das formas graves de TB, que são a TB miliar e meningite tuberculosa nas crianças. Ela é aplicada por via injeção intradérmica na região de inserção inferior do músculo deltoide direito, em uma dose única e de forma mais precoce possível, preferencialmente, 12 horas após o nascimento. Na prática, o imunizante tem destino para crianças na faixa etária de 0 meses a 5 anos. A vacina é apresentada na forma liofilizada em ampola multidose junto com a ampola do diluente específico e a meta de cobertura vacinal do Programa Nacional de Imunizações (PNI) para BCG é de 90% das crianças menores de um ano de idade (BRASIL, 2021).

Em relação a vacinação, o novo desafio presente e preocupante é a queda nas coberturas vacinais. Em 2020, o índice de 73,51% se apresentou bem inferior aos anos anteriores, que foi próximo a 95% do público-alvo. Atualmente, o número de vacinados é de cerca de 2,8 milhões de recém-nascidos (BRASIL, 2021).

Como reações normais após vacinação, podem-se incluir: induração eritematosa ≤ 5 mm no local da inoculação, progressão para pústula após 2-3 semanas, ulceração subsequente e formação de crosta exsudativa após 10-12 semanas, que proporciona uma cicatriz residual superficial. É também considerado normal o envolvimento não-supurativo dos gânglios regionais ou locais, mas que geralmente passa despercebido. As complicações são raras $< 1:1000$ vacinados (BOLGER et al., 2006).

E em relação a cicatriz típica decorrente dessa vacinação, estudos revelaram alta sensibilidade e especificidade da cicatriz como indicador da vacinação BCG. Contudo, outros estudos mostraram a não apresentação dessa cicatriz em 17 a 25% das crianças previamente vacinadas. A presença da mesma indica vacinação prévia com BCG, mas não há evidências na literatura que associe a cicatriz vacinal com uma possível proteção ou imunidade contra TB. Apesar disso, o Ministério da Saúde recomenda que crianças que não apresentem a cicatriz vacinal sejam vacinadas, devido à possibilidade de uso de unidades inviáveis da vacina (PEREIRA et al., 2003).

A eficácia protetora da vacina BCG apresenta uma heterogeneidade, principalmente quando se trata da TB pulmonar, que pode estar relacionada a diversos fatores como: a variabilidade biológica da vacina BCG devido a diferentes cepas, exposição prévia a micobactérias ambientais e outros fatores (BARRETO et al., 2006). A variabilidade biológica da vacina BCG devido a diferentes cepas ocorre graças a prováveis mutações e diferenças imunogênicas entre as cepas cultivadas nos demais laboratórios e em culturas sucessivas durante anos. Tal fator pode interferir na eficácia da vacina, mas ainda não há total consenso sobre isso. Estudos avaliando a mesma cepa de BCG em diferentes países relatam níveis discrepantes de proteção (STARKE & CONNELLY, 2004).

A exposição de populações a outras micobactérias ambientais pode modificar também a resposta imune do receptor, influenciando na eficácia da vacina BCG. Estudos realizados com populações de diversas regiões do Equador, com baixa ou nenhuma prevalência de exposição ambiental às micobactérias, mostraram taxas mais altas de

eficácia, cerca de 70%. Já os ensaios clínicos realizados no sul da Índia indicam uma baixa taxa de eficácia da vacinação por conta da grande exposição ambiental às micobactérias da região, gerando uma imunidade heteróloga (BOM, 2000).

Os demais fatores relacionados ao uso da vacina, como viabilidade, dose utilizada, via de administração da vacina; fatores relacionados ao hospedeiro, como estado nutricional, outras infecções e aspectos genéticos, também podem ter um importante papel nas diferentes estimativas da eficácia da vacina (BARRETO et al., 2006). Diante do exposto, embora existam algumas evidências de que a ocorrência da exposição a outras micobactérias ambientais seja um fator mais forte para explicar a heterogeneidade das taxas de eficácia protetora, trata-se apenas de uma hipótese, sem uma prova conclusiva e que são necessários mais estudos para tal avaliação (BOM, 2000).

A BCGite, a doença induzida pela BCG, vem a ser uma das complicações e é uma doença local ou loco-regional que consiste na ulceração persistente no local de injeção (abcesso cutâneo), fistulização e/ou linfadenite regional com ou sem supuração e que possui uma evolução com tendência a cura. A BCGite deve ser diagnosticada quando a adenopatia se torna palpável e/ou quando há um agravamento e se torna uma preocupação (CONSTANT et al., 2011).

A BCGite extrarregional tem ocorrência à distância do local de inoculação, que envolve um único local mais afastado e os sintomas apresentados são: febre, perda ponderal ou má progressão estaturoponderal e morte. Já a BCGite disseminada é ocasionada pela infecção em 2 ou mais áreas do local de inóculo, como gânglios, pele, ossos etc., e identificação ocorre por cultura ou PCR (polymerase chain reaction) (CONSTANT et al., 2011).

Outras síndromes relacionadas com BCG, onde acaba não existindo uma identificação do agente, como por exemplo, a formação de queloides, uveíte e líquen escrofuloso, provável reação imunológica, também são complicações mais raras (CONSTANT et al., 2011).

1.4 Virulência das sublinhagens BCG e da cepa *M. bovis* precursora

A vacina BCG é produzida em diversos laboratórios no mundo, no entanto, elas podem não ser bacteriologicamente idênticas, por causa da variabilidade biológica das cepas, que são genotipicamente e fenotipicamente distintas. Dessa forma, suas

características são diferentes, podendo variar em vários fatores como: viabilidade, imunogenicidade, reatogenicidade e virulência residual (ZHANG et al., 2013; STARKE & CONNELLY, 2004).

Assim, a subclassificação das cepas de BCG em relação ao tempo pode ser dividida em: cepas antigas, as que possuem maior proximidade da BCG original obtido por Calmette e Guérin, como a BCG Rússia, Tokyo, Moreau, Birkhaug e Suécia, que apresentam menores deleções cromossômicas comparadas com as cepas recentes, que são as: BCG Prague, Glaxo, Danish, Tice, Frappier, Connaught, Phipps, Pasteur e Korea (ABDALLAH et al., 2015). De acordo com a OMS, atualmente, as vacinas com mais uso no mundo são a: BCG Rússia, BCG Sofia (descendente da cepa BCG-1 Rússia) e a cepa BCG Japão. Com isso, para diminuir essas divergências, houve a padronização do processo de produção e o estabelecimento do estoque dos lotes-sementes (OMS, 2018).

A ausência dos processos de liofilização, congelamento ou lotes-sementes até 1960 permitiu que as recorrentes passagens de BCG ocorressem em diversas condições laboratoriais, resultando também em cepas filhas com diferentes morfologias e características bioquímicas e imunológicas (COPIN et al., 2014).

Hoje em dia, testes são realizados em cada um dos lotes criados para verificar a qualidade da vacina, entre eles estão os de susceptibilidade antimicrobiana, identificação por métodos microbiológicos e moleculares, testes para descartar contaminação fúngica e bacteriana, testes de hipersensibilidade retardada e virulência em cobaias. Assim como, testes de viabilidade para determinar a quantidade de partículas viáveis presentes na vacina. A relação entre o número de bacilos viáveis por dose pode variar até dez vezes entre cepas BCG (AREND E VAN SOOLINGEN, 2011).

A Figura 2 demonstra que o maior evento que determinou atenuação de uma cepa de *M. bovis* durante seu cultivo entre 1906 e 1921 foi a deleção de um segmento de DNA de 9,5 kb, da região de diferença denominada RD1, e todas as sublinhagens posteriores da bactéria estão carregando esta mutação. Levando em consideração ao aparecimento de diferentes variantes após o ano de 1924, as vacinas BCG se subdividem em dois grupos principais de cepas mais antigas: 1) BCG Tóquio, Moreau, Rússia e 2) Suécia e Birkhaug. O primeiro é caracterizado por secretar grande quantidade da proteína MPB70, possuir duas cópias de inserção da sequência IS6110 na região promotora do gene *phoP* e conter

os genes que codificam MPB64 e metoximicolato, que foram deletados nas cepas do segundo grupo (PALOMINO et al., 2007).

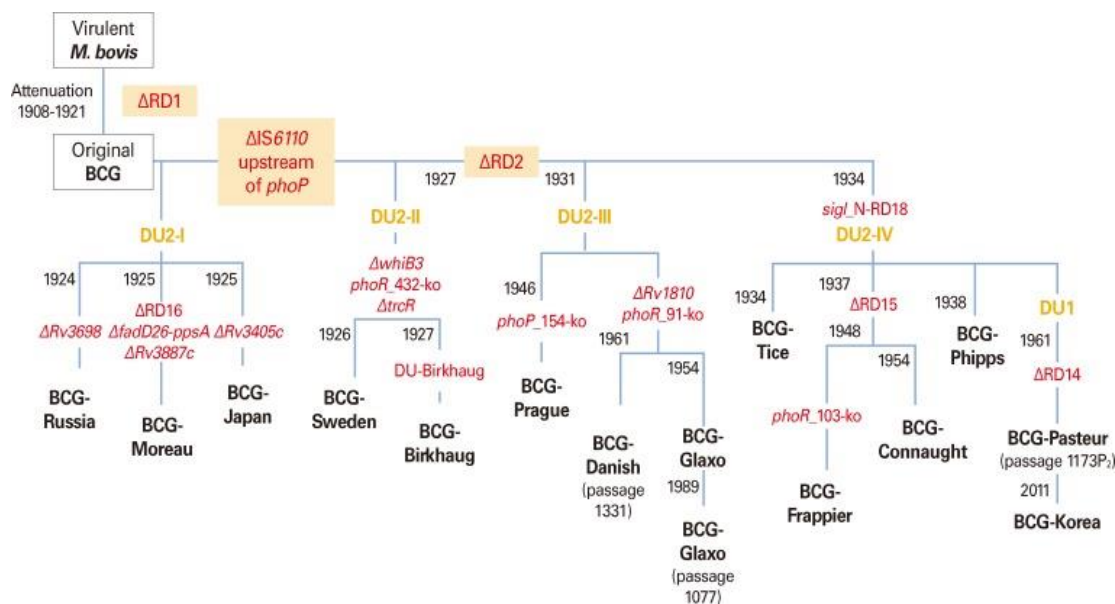


Figura 2: Genealogia refinada de vacinas BCG. Cepa original BCG dando origem a cepas descendentes, com seus respectivos anos e regiões de diferença. Grandes deleções e inserções no genoma estão marcadas em vermelho (Joung & Ryoo, 2013).

Uma nova deleção do loci denominado RD2 (entre 1927 e 1931) deu origem as sublinhagens modernas de BCG (figura 1). O grupo de BCG Pasteur, Copenhagen/Danish, Glaxo, Tice e outros apresentam pouca secreção de MPB70, contém uma cópia única de inserção IS6110 e não possuem os genes de MPB64 e metoximicolato. Através de análises genômicas comparando a BCG, *M. bovis* e outras cepas, foi revelada a perda de mais de 100 genes da BCG em relação a *M. bovis*, que pode ser uma das explicações para as variações na eficácia dos BCG. Entre estas, a deleção de RD16, foi encontrada apenas na cepa BCG Moreau quando comparada com o genoma de *M. tuberculosis* e a outras cepas BCG, o que resulta numa perda do controle transcricional do gene *rv3406*, codificante para uma putativa enzima responsável pelo catabolismo de taurina (HONDA et al., 2006).

A ausência de reversão à virulência das sublinhagens de BCG sugere que ela tenha sofrido um processo irreversível de RD1, que afeta o sistema de secreção de proteínas ESX-1, incluindo importantes fatores de virulência de *M. tuberculosis*, como a proteína ESAT-6. A proteína ESAT-6, codificada pelo gene de RD1 (*Rv3875*), está secretada junto com a proteína CFP-10, codificada pelo gene vizinho (*Rv3874*), e são componentes abundantes do filtrado de cultura de *M. tuberculosis* e antígenos imunodominantes para

células T que induz potente resposta Th1 (MAHAIRAS et al., 1996; SIMEONE et al., 2009). Além disso, ESAT-6 é um fator de virulência, que está envolvida na promoção dos mecanismos de escape do fagossomo, morte celular de macrófagos, disseminação célula-célula de cepas patogênicas e, conseqüentemente, na propagação do *M. tuberculosis* (BROSET et al., 2015).

Em relação a discrepância do efeito protetor da vacina BCG, ela pode estar relacionada com diversos fatores, como: diferenças genéticas entre as populações, níveis diversos de desnutrição entre os indivíduos vacinados, variações na virulência das diferentes cepas do *M. tuberculosis*, diferenças quanto a resposta imune do paciente ao BCG e aos níveis de proteção contra as diferentes formas clínicas de TB (BARRETO et al., 2006).

ZHANG et al. investigaram a virulência e o efeito protetor anti-TB de cepas vacinais de todos 4 grupos principais de BCG, através de infecção dos camundongos imunodeficientes SCID ou camundongos da linhagem *wild-type* BALB/c, respectivamente (ZHANG et al., 2016). Uma maior virulência foi observada no grupo DU2-IV. Cepas BCG deste grupo, seguidas pelas cepas do grupo DU2-I, foram capazes de crescer nos pulmões dos camundongos SCID mais rápido do que demais cepas. Foi demonstrado também maior eficácia das cepas mais virulentas na proteção dos camundongos BALB/c contra infecção pelo *M. tuberculosis*. As alterações genéticas que contribuem a virulência das cepas de BCG de diferentes grupos estão apresentadas na Figura 2.

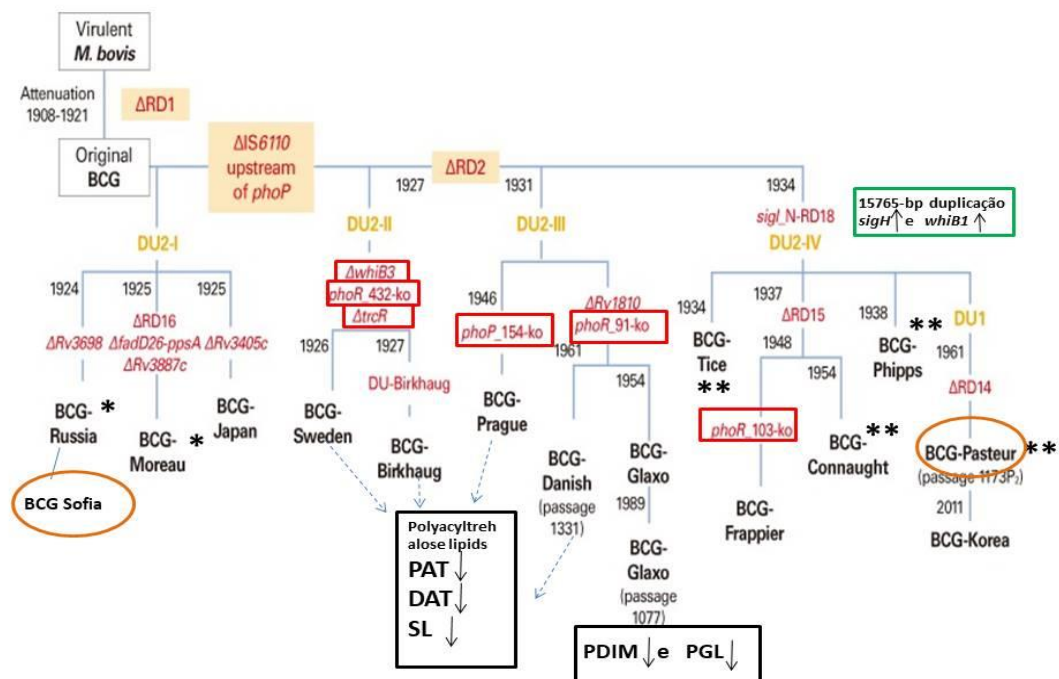


Figura 3: A variedade de virulência das cepas de BCG está relacionada as alterações nos genes de virulência de micobactéria. Figura 1 (Joung & Ryoo, 2013) foi adaptada de acordo com resultados de quantificação de virulência pelo Zhang et al., 2016. As cepas mais virulentas estão marcadas com símbolos ** ou *, de acordo com o grau de virulência. Os genes de virulência que foram deletados ou amplificados estão marcados pelos retângulos vermelhos ou verdes, respectivamente. Os fatores de virulência que sofreram redução na expressão estão marcados pelos retângulos pretos.

A virulência de BCG foi drasticamente reduzida pela deleção de região RD1. Entretanto, posteriormente as micobactérias BCG, intensivamente cultivadas nos vários países do mundo, sofreram alterações adicionais nos seus genomas. Os grupos DU2-II e DI2-III estão caracterizados por várias alterações (SNPs, deleções) no locus PhoP-PhoR. PhoP é um importante regulador do sistema de dois *PhoP-PhoR*, que controla a síntese e exportação de vários fatores de virulência em *M. tuberculosis*, incluindo a proteína EsxA e lipídios de poliactilglicose e de sulfolipídios da membrana externa na parede celular de micobactéria e, portanto, é fundamental para a virulência (PEREZ et al., 2022).

No grupo II, a deleção de *whiB3*, um regulador redutor de estresse, e *trcR*, um regulador do sistema de dois componentes *trcR-trcS*, também pode contribuir a sua baixa virulência (LEUNG et al., 2008). Além disso, alterações em cluster de genes de virulência envolvidos na biossíntese de PDIM e PGLs (por ex. enzima FadD26), que levam a redução de expressão desses lipídios na parede celular, podem levar a redução de virulência. Ao contrário, a duplicação de 15765-bp observada nas cepas do grupo IV, que inclui genes de

dois fatores de virulência *sigH* e *whiB1*, pode levar ao aumento da replicação de micobactérias em camundongos, sendo que o fator sigma SigH desempenha um papel crítico na resposta a estresse oxidativo em *M. tuberculosis*, e o WhiB1 é fator de transcrição regulado pelo óxido nítrico (PEREZ et al., 2022).

As vacinas compostas de micro-organismos vivos possuem grande potencial protetor, porém oferecem alguns riscos também, como reversão de virulência ou possível indução de doença mediante situações de imunossupressão. Estudos apontam que a maioria dos pacientes com doença disseminada de BCG possuem algum tipo de imunodeficiência. E os distúrbios de imunidade mediada por IL-12 e IFN- γ imunodeficiência combinada grave, defeito imunológico celular ou doença granulomatosa crônica podem levar ao desenvolvimento de doença disseminada (AZZOPARDI et al., 2009). Além de que, pode causar doença menos grave (linfadenite osteíte) em crianças saudáveis sem uma imunodeficiência evidente. Em bebês imunocomprometidos, há contraindicação da vacinação BCG, mas como geralmente são vacinados antes do diagnóstico, a imunodeficiência só é descoberta após o desenvolvimento de complicações de BCG (PAIMAN et al., 2006).

No caso de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), após a vacinação da BCG, o risco supera o benefício de prevenção gerado pela vacina. Em 2007, segundo recomendação da OMS, foi declarada que a infecção pelo HIV é uma contraindicação para o uso do BCG (TRAN et al., 2016). Portanto, a política atualmente indicada pela OMS é que crianças sabidamente infectadas pelo HIV, mesmo sem apresentar sintomas, não devem ser imunizadas com BCG (ZHANG et al., 2016).

Acredita-se que essas reações adversas induzidas por BCG sejam devidas ao uso de cepas vacinais com virulência residual variável, a técnica de cultura, a via de administração e a dose de bacilos viáveis na vacina BCG entregue. Juntamente com a idade, imunidade, estado nutricional e genética dos hospedeiros vacinados (BROSCH et al., 2007).

Portanto, um dos fatores que podem contribuir fortemente para complicações da vacinação das crianças suscetíveis é a virulência da cepa de BCG, que pode ter sofrido alterações responsáveis pela conversão ao estado patogênico em indivíduos imunossuprimidos e até naqueles imunologicamente competentes. Logo, o presente

trabalho teve como objetivo verificar e comparar a virulência dos isolados clínicos e das cepas vacinais.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a virulência das cepas de *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guérin (BCG) provenientes de isolados clínicos de pacientes com BCGite em comparação com as cepas vacinais.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de crescimento das cepas de BCG de diferentes isolados clínicos em meio líquido.
- Comparar as principais características das cepas de isolados clínicos de pacientes com BCGite com as cepas vacinais nacionais na infecção *in vitro* de macrófagos murinos.
- Avaliar as principais características associadas a virulência (crescimento intracelular, indução de produção de citocinas e NO, indução de morte celular) das cepas BCG isoladas de pacientes com BCGite e das cepas BCG vacinais, utilizando modelo de infecção *in vitro* de macrófagos murinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TESTES *IN VITRO*

3.1.1 Cultura Celular

Células murinas da linhagem RAW 264.7, obtidas da ATCC – American Culture Collection (VA, USA), foram cultivadas em garrafas de plástico utilizando meio de cultura DMEM-F12 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sendo incubadas em estufa com 37°C e 5% de CO₂. Para a realização do experimento, 24h antes da infecção com as cepas de BCG, as células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de 5x10⁴ células/poço em placa de 96 poços com volume de 100 µL de meio de cultura e mantidos em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

3.1.2 Cultivo micobacteriano

Neste estudo foram utilizados os isolados clínicos de BCG obtidos de crianças com BCGite da severidade variada e as cepas vacinais BCG. Todas as cepas foram anteriormente submetidas ao sequenciamento genômico completo, utilizando a tecnologia Illumina, e avaliadas para a susceptibilidade a drogas anti-TB (Zerpa, 2020). Uma coleção dos isolados clínicos de BCG obtidos na Argentina (24 cepas) foram disponibilizados para estudo pelo Dr. Philip Suffys do Instituto Oswaldo Cruz-RJ.

Para a experimentação, foram aleatoriamente selecionadas as cepas que causaram a doença de diferente nível de severidade: Grupo 1 - provenientes de infecção disseminada, incluindo as cepas ARG-13854 (isolada de material de biopsia de osso), ARG- 22542 (material de biopsia de osso), ARG- 09292 (sangue); Grupo 2 - provenientes de infecção localizada, incluindo as cepas ARG-14663 (isolada do gânglio axilar) e ARG-24160 (abscesso do braço); Grupo 3 -as cepas vacinais BCG Sofia SL222 e BCG Pasteur 1173P2, utilizadas na Argentina para vacinação de crianças.

As cepas de isolados clínicos e vacinais de BCG selecionadas para o estudo foram cultivadas em tubos plásticos de 50 mL contendo 10 mL de meio 7H9 suplementado com 0,2 mL de glicerol, 0,2 mL de Tween 80 e 10% de ADC, até a cultura atingir a densidade ótica de no mínimo 0,6 nm, quantificação da densidade ótica (DO) da cultura por espectrofotometria a 600 nm, que corresponde a fase de crescimento exponencial da cultura.

A concentração de bactérias na cultura foi avaliada através de ensaio de contagem de células em meio sólido, com a DO da cultura ajustada para 0,200. No ensaio de contagem de células em meio sólido, as micobactérias foram cultivadas, em meio Ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com 10% de meio de enriquecimento OADC (DIFCO), por 21 dias em estufa úmida à 37° C com 5% de CO₂. Antes do uso, as culturas foram sonicadas em banho ultrassom por 1 minuto e a solução foi agitada em vórtex para dispersão dos grumos. Este passo foi repetido por 3 vezes.

3.1.3 Infecção das culturas dos macrófagos pelo BCG

Macrófagos murinos RAW 264.7 (5×10^4 células/poço) foram plaqueados 24 horas antes da infecção micobacteriana, em placas de 96 poços com meio DMEM-F12 suplementado com 10% SFB e na ausência de antibióticos. Após esse período, a suspensão

de cada cepa foi homogeneizada e com um ajuste da densidade óptica para 0,200. A cultura de macrófagos foi infectada com cada cepa, de forma separada, e em diferentes proporções de multiplicidade da infecção (MOI): 1:1 (bactéria/macrófago) para a verificação do crescimento micobacteriano; 10:1 para avaliação do perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias secretadas pelos macrófagos infectados e para análise da indução de morte celular provocada pela micobactéria. Após a infecção as culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 3 horas para a fagocitose dos bacilos pelos macrófagos. Após 3 horas, os poços contendo os macrófagos foram lavados 3X com PBS 1x estéril, para remoção das micobactérias não fagocitadas. Após as lavagens foi adicionado 100µL do meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB em cada um dos poços da placa contendo os macrófagos. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 4 dias.

3.1.4 Quantificação do crescimento intracelular de micobactérias em macrófagos.

Para a quantificação do crescimento intracelular das micobactérias em macrófagos infectados (MOI = 1:1), 3h após da infecção (no dia 0) e após 4 dias (no dia 4 de infecção) foi realizada através do plaqueamento do lisado celular em meio sólido (método bacteriológico - ensaio contagem de células em meio sólido). Os macrófagos sofreram lise pelo uso da solução de saponina a 0,1% por 20 minutos. O lisado foi fortemente agitado, sonificado em ultrassom de banho e diluído em PBS 1x (Tampão Fosfato Salino) estéril na diluição de 1:10 e 1:100 (dia 0) e 1:100 e 1:1000(dia 4). Uma alíquota de 40µL de cada diluição foi semeada em duplicata em meio de cultivo ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com 10% de ADC (BD BBL). As placas ficaram incubadas por 21 dias em estufa à 37°C, o número de colônias quantificadas foi ajustado para CFU/mL e os valores expressos em Log₁₀. A capacidade de crescimento intracelular de cada cepa foi expressa através da subtração das médias do CFU dia 4 e dia 0 (CFU_{dia4} - CFU_{dia0}).

3.1.5 Avaliação da morte celular em macrófagos infectados

Os macrófagos foram infectados como descrito no item 3.1.3 com MOI = 10:1 e permaneceram em cultura num período de 4 dias. Para avaliar o tipo da morte celular induzida pela infecção, os macrófagos foram corados com os corantes de DNA laranja de acridina (5µg/ml) (Sigma) e brometo de etídio (5µg/ml) (Sigma) e analisados com o uso do Microscópio de Fluorescência (microscópio invertido Nikon) com aumento de 400x e filtro verde [Currents Protocols of Immunology, 1998].

Para avaliação do tipo da morte celular, foram adotados os padrões convencionais com relação à morfologia das células, observadas por microscopia de fluorescência: 1) células vivas – morfologia do núcleo intacto, DNA corado por laranja de acridina (cor verde); 2) células apoptóticas: a) apoptose primária – células com condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (cor verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não-permeável ao brometo de etídio; b) apoptose secundária – células com condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (cor vermelha), que demonstra a permeabilização necrótica da membrana plasmática que permite a entrada do brometo de etídio; 3) células necróticas – morfologia do núcleo necrótico, corado por brometo de etídio. A porcentagem de cada subpopulação celular (células vivas, apoptóticas e necróticas) em relação ao total foi calculada.

3.1.6 Quantificação de citocinas

Nos dias 1 e 3 de infecção, 24h e 72h respectivamente, os sobrenadantes dos macrófagos infectados com MOI = 10:1 foram coletados, filtrados com filtro poro de 0,2 μm e congelados a uma temperatura de -70°C até o momento da quantificação das citocinas. A citocina pro-inflamatória TNF- α foi quantificada por meio do ensaio de ELISA, utilizando kits correspondentes (R&D Systemas) de acordo com o protocolo do fabricante.

A produção do óxido nítrico (NO) foi avaliada através da quantificação do nitrito nos sobrenadantes pela reação de Griess. O volume de 50 μL de sobrenadante da amostra foi acrescentado a 50 μL de uma mistura da solução A (2,5 ml de ácido fosfórico, 0,5g de sulfanilamida, 47,5 ml de H₂O de milliQ) de Griess (vol/vol) numa placa de 96 poços e incubado por 10 minutos na estufa a 37°C . A leitura foi realizada no leitor de microplacas - leitor de ELISA (Dynatech MR5000) com o comprimento de onda 540nm. A curva padrão foi realizada utilizando diluições de NaNO₃ de 200 μM a 1.56 μM .

3.1.7 Análises estatísticas

Para a realização da análise estatística, houve a descrição dos dados como média \pm desvio padrão e a avaliação foi feita por meio do teste T, quando comparados 2 grupos, e da análise de variância One-Way ANOVA e por Teste de Turkey, quando comparados 3 grupos ou mais, sendo considerado significativo $p < 0,05$. Os softwares utilizados foram: Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação de virulência pelo crescimento intracelular de cepas clínicas e vacinais de BCG através do ensaio de CFU

O crescimento intracelular das cepas clínicas disseminadas ARG-13854, ARG-22542 e ARG-09292, das cepas clínicas localizadas ARG-14663 e ARG-24160 e das cepas vacinais BCG Sofia e BCG Pasteur foi verificado através do ensaio de CFU nos dias 0 e 4 de infecção e sua taxa foi determinada através da diferença das médias dos Log10 de CFU obtidos no dia 4 e dia 0 ($\log_{10} \text{CFU}_{\text{dia 4}} - \log_{10} \text{CFU}_{\text{dia 0}}$) para cada cepa como é mostrado na Figura 4.

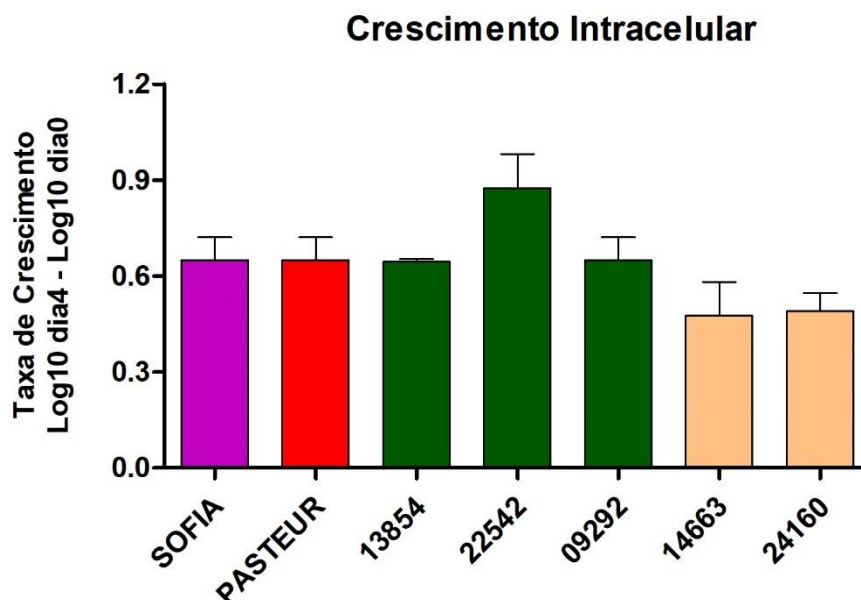


Figura 4. Avaliação de virulência de cepas clínicas e vacinais de BCG pelo crescimento intracelular através do ensaio de CFU. Células Raw 264.7 foram infectadas com MOI= 1:1 e o crescimento intracelular das cepas clínicas e vacinais de BCG foi avaliado através do ensaio de CFU nos dias 0 e 4 de infecção. A taxa de crescimento intracelular foi determinada através da diferença das médias dos Log10 de CFU obtidos no dia 4 e dia 0 ($\log_{10} \text{CFU}_{\text{dia 4}} - \log_{10} \text{CFU}_{\text{dia 0}}$) para cada cepa. Isolados clínicos obtidos de pacientes com doença disseminada (colunas verdes), isolados de pacientes com doença localizada (colunas amarelas), cepas vacinais (colunas em cor vermelho e roxo).

Os resultados demonstraram que a taxa de crescimento se assemelha em relação às cepas vacinais e aos isolados clínicos, com uma certa tendência de aumento na taxa entre as cepas de infecção disseminada (em verde), em especial a cepa ARG-22542, quando comparada as de infecção localizada (em laranja). Porém, essa diferença não é tão significativa quando comparadas as cepas vacinais, o que indica uma semelhança entre elas.

4.2 Avaliação da viabilidade celular no modelo de infecção de macrófagos *in vitro*

Para o estudo das propriedades que podem determinar a virulência das cepas clínicas e vacinais, houve uma comparação na capacidade de sobrevivência dos macrófagos infectados. Propriedades como a rápida reprodução em macrófagos e indução de morte necrótica destas células pode ocasionar uma liberação do bacilo e a novos ciclos de infecção, sendo uma característica importante para causar patologias e apresentar um potencial nível de virulência (SOHN et al., 2009; LASSOUNSKAIA et al., 2010). Diferentemente da morte necrótica, a morte pela apoptose, que leva a formação dos corpos apoptóticos, promove a eliminação de microbactéria após a fagocitose pelos macrófagos ativados.

A viabilidade celular nestes macrófagos infectados está mostrada na Figura 5. Os resultados demonstram que os macrófagos de diferentes grupos de infecção apresentam uma queda na viabilidade durante 4 dias de observação. Não foi observada uma diferença significativa entre grupos. Porém, no dia 4 da infecção, as cepas clínicas do grupo disseminado (em verde) apresentam uma tendência a maior queda da viabilidade em comparação com o grupo de doença localizada (em laranja), demonstrando uma média de viabilidade de 45% e de 52%, respectivamente.

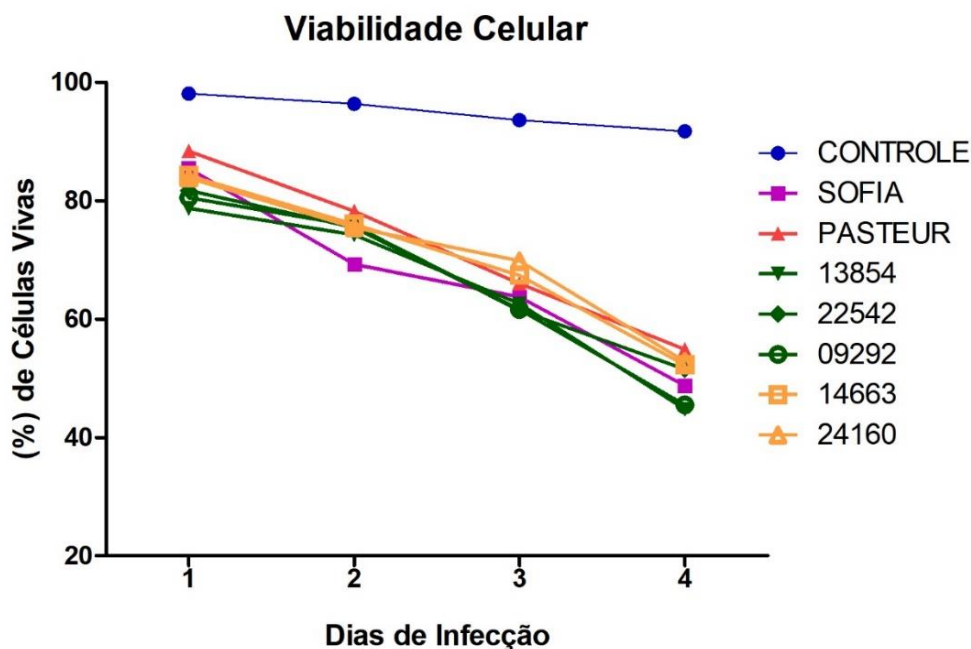
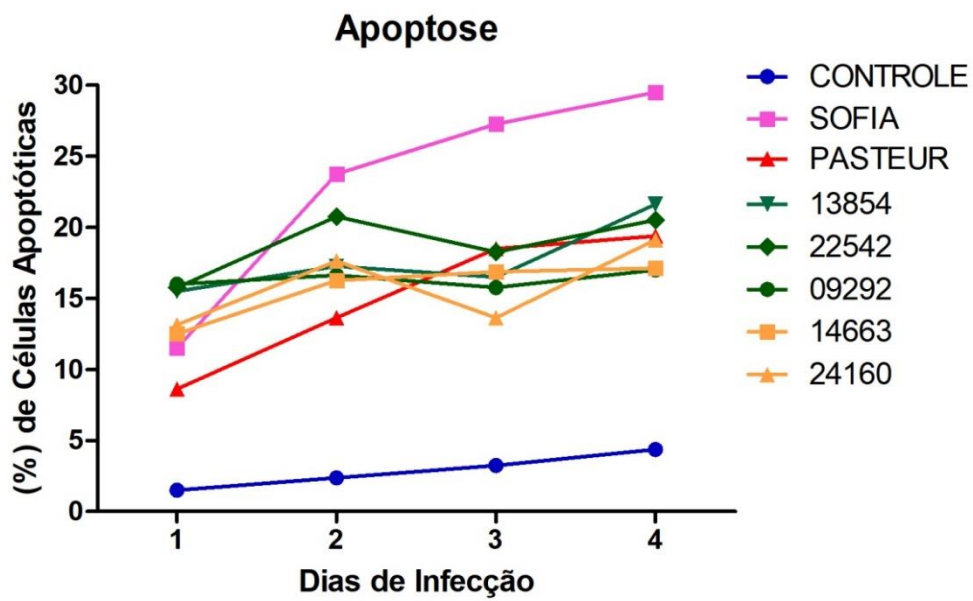


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular no modelo *in vitro* de macrófagos infectados com cepas clínicas e vacinais de BCG. Células Raw 264.7 foram infectadas com MOI= 10:1 e a viabilidade celular foi avaliada através da contagem das células viáveis com brometo de etídio e laranja de acridina nos 4 dias de infecção.

4.3 Avaliação do padrão de morte celular pela quantificação de apoptose e necrose no modelo de infecção de macrófagos *in vitro*

Para a avaliação do padrão de morte celular (apoptótica ou necrótica), foi utilizada como referência a morfologia dos núcleos celulares corados pelos fluorocromos de DNA (laranja de acridina e brometo de etídio), que foi avaliada por microscopia de fluorescência. As células vivas apresentavam um núcleo intacto, DNA corado com um corante vital (laranja de acridina) e possuindo a coloração esverdeada. As células apoptóticas já demonstraram uma morfologia diferente, a apoptose primária apresentava uma condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, sem perda de integridade da membrana celular. O seu DNA era corado por laranja de acridina, ficando na cor verde, pela membrana celular intacta não estar permeável ao brometo de etídio, que dá a coloração vermelha quando intercala entre as bases de DNA e fluoresce sendo exposto à luz UV. Após um tempo, as células apoptóticas sofrem a necrose secundária, como resultado de permeabilização de membrana. As células com necrose secundária apresentavam a condensação da cromatina e fragmentação do núcleo (marcas apoptóticas), entretanto o DNA foi corado por brometo de etídio na cor vermelha, demonstrando a permeabilização da membrana plasmática. Já nas células necróticas a cromatina aparenta uma massa difusa vermelha, sendo corada por brometo de etídio. Dessa forma, a porcentagem de cada subpopulação celular, apoptóticas (incluindo apoptose primária e necrose secundária) e necróticas, em relação ao número total de células foi calculada, conforme observada na Figura 6.

A



B

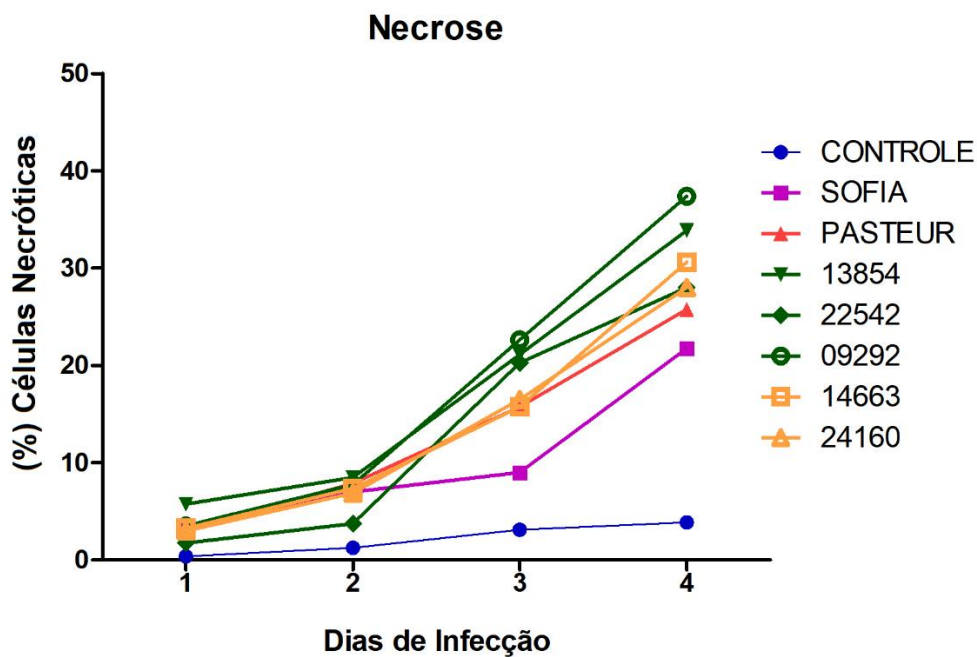


Figura 6. Avaliação de morte apoptótica e necrótica no modelo *in vitro* de macrófagos infectados com cepas clínicas e vacinais de BCG. Células Raw 264.7 foram infectadas com MOI= 10:1 e as células apoptóticas (A) e necróticas (B) foram avaliadas através da contagem com brometo de etídio e laranja de acridina nos 4 dias de infecção.

Os resultados demonstram que todas as cepas foram capazes de induzir morte em cerca de 10-15% dos macrófagos já 24 h após infecção, e o principal tipo da morte foi a apoptose (Figura 6A). Em culturas infectadas pelas cepas vacinais, o número das células apoptóticas estava crescendo até dia 4. Em culturas infectadas com isolados clínicos, a proporção das células apoptóticas estava permanecendo no mesmo nível, com pequenas variações. O número das células necróticas em culturas começou a aumentar após dia 2, e cresceu até dia 4. O aumento das células necróticas foi maior em culturas infectadas pelos isolados clínicos que pelas cepas vacinais (Figura 6B). O maior número de células necróticas no dia 4 foi induzido pelas cepas 09292 e 13854, que causaram doença disseminada em pacientes.

Os resultados de quantificação das proporções de células apoptóticas e necróticas no dia 4 estão apresentados na Figura 7. A figura demonstra que a cepa vacinal Sofia foi a única cepa que induziu mais apoptose que necrose. Em todas as outras culturas a proporção das células necróticas foi maior que as apoptóticas. A relação das células necróticas e apoptóticas foi maior no grupo das cepas de infecção disseminada (média D) em comparação com o grupo das cepas de infecção localizada (média L). Entretanto, a diferença significativa no número das células necróticas entre a cepa vacinal Sofia e os demais grupos foi observada nas culturas infectadas pelas cepas ARG-13854, ARG-09292 e média D e, no número das células apoptóticas, essa diferença foi vista nas cepas ARG-09292, ARG-14663, ARG-24160, média D e média L. Já em relação à cepa vacinal Pasteur, só houve diferença significativa no número de células necróticas em relação à cepa ARG-09292.

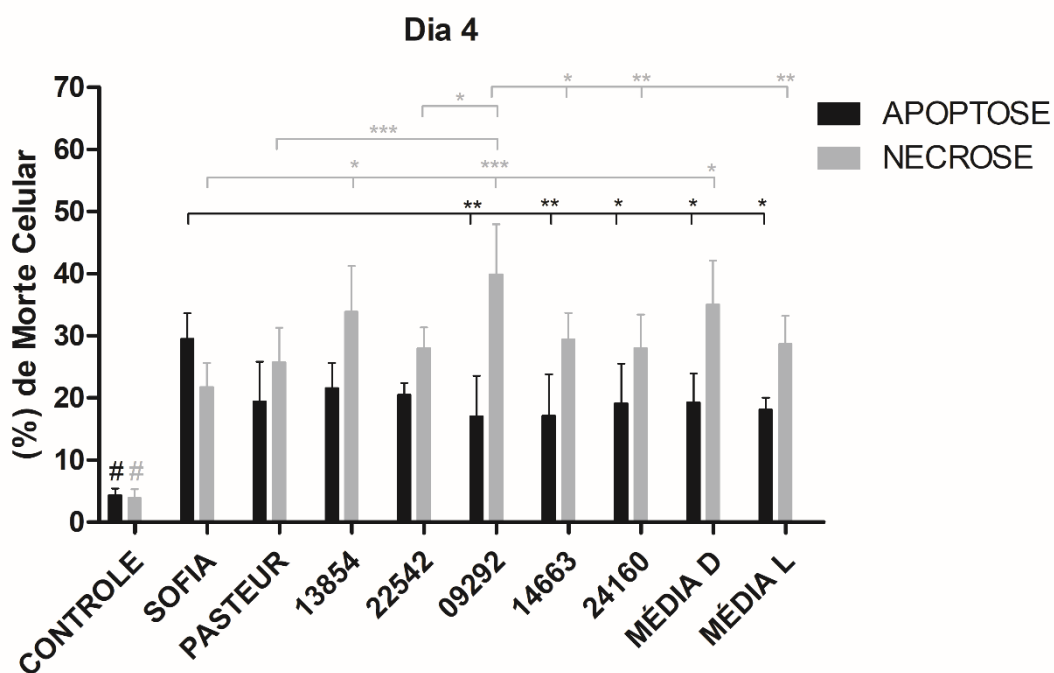


Figura 7. Avaliação de quantificação das proporções de células apoptóticas e necróticas no dia 4. Células Raw 264.7 foram infectadas com MOI= 10:1 e as células apoptóticas e necróticas foram avaliadas através da contagem com brometo de etídio e laranja de acridina no 4º dia de infecção.

4.4 Quantificação da taxa de virulência relativa das cepas BCG

A capacidade de crescimento intracelular acelerado assim como a capacidade de induzir a morte necrótica dos macrófagos infectados foram previamente associados à virulência em micobactérias patogênicas, quanto *M. tuberculosis* (LASSOUNSKAIA et al., 2010), tanto *M. kansasii* (SOHN et al., 2010). Apesar de as micobactérias BCG são atenuadas, entretanto, nossos resultados (Figura 7) demonstram que a cepa vacinal Pasteur e os isolados clínicos provenientes dessa cepa vacinal foram capazes de induzir maior número das células necróticas que as apoptóticas. Foram observadas também algumas pequenas diferenças na capacidade das cepas estudadas de crescer intracelularmente, apesar de não significativas (Figura 4).

Com base nestes resultados foi avaliado o nível de virulência relativa dos isolados clínicos de BCG em relação da cepa vacinal BCG Pasteur, aplicando os critérios estabelecidos no nosso laboratório para as micobactérias patogênicas (LASSOUNSKAIA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016, MUSSI et al., 2021). Essa classificação foi realizada quanto à capacidade de crescimento intracelular (Index A) e capacidade de indução de morte celular necrótica nos macrófagos (Index B) comparado à cepa Pasteur (taxa 1,0) e a

média destes dois index foi calculada para cada isolado clínico de BCG [(index A + index B) /2] e utilizada como índice de virulência relativa (Tabela 1).

Tabela 1: Índice de virulência relativa dos isolados clínicos de BCG em comparação a cepa vacinal BCG Pasteur avaliado no modelo de macrófagos infectados *in vitro*. As cepas BCG obtidas dos pacientes com a doença disseminada estão marcadas na cor verde, e as obtidas dos pacientes com a doença localizada – na cor laranja.

Cepa	Capacidade relativa de crescimento intracelular em macrófagos (Index A)	Capacidade relativa para induzir morte necrótica (Index B)	Índice de virulência relativa* (Index A + Index B / 2)
Cepa de referência Pasteur	1,0	1,0	1,0
09292	1,03	1,6	1,31
13854	0,99	1,4	1,19
22542	1,33	1,16	1,25
14663	0,66	1,12	0,89
24160	0,83	1,04	0,93

* virulência preditiva

Os resultados demonstram que apesar da diferença pequena entre as taxas de virulência das cepas BCG utilizadas para este estudo, foi observado que as cepas BCG obtidas dos pacientes com a doença disseminada apresentaram a virulência maior que a cepa vacinal, dessa forma, a virulência das cepas obtidas dos pacientes com a doença localizada foi menor.

4.5 Avaliação da resposta dos macrófagos a infecção pelas cepas clínicas e vacinais através da quantificação dos mediadores inflamatórios

Para avaliar a resposta imune inata induzida pelas cepas em estudo, o perfil de citocinas produzidas *in vitro* foi caracterizado pela infecção de macrófagos murinos. Células da linhagem RAW 264.7 foram infectadas e o sobrenadante da cultura foi coletado após 24h e 72h de incubação para medir os mediadores inflamatórios.

A citocina TNF- α , que tem a sua produção principalmente em macrófagos e monócitos ativados por infecções e na condição de inflamação (GUICCIARDI & GORES, 2009), é fundamental na resposta imunológica durante uma infecção por Mtb e está presente em todas as fases da resposta inflamatória; sua superprodução pode resultar imunopatologias e sua deficiência em descontrola na infecção (QUESNIAUX et al., 2010). Além de promover o recrutamento de células imunes para o local de infecção, ativação dos macrófagos e regulação da atividade de outras citocinas pro-inflamatórias (RAY et al., 2009; ALGOOD et al., 2004). O TNF- α também pode participar do aumento da produção de óxido nítrico (NO) em diferentes células, influenciando na susceptibilidade do hospedeiro à infecção (CHAN et al, 2001). Ambos os mediadores pro-inflamatórios, TNF- α e NO, foram quantificados e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Os resultados demonstram que no período de 24 horas da infecção, todas as cepas foram capazes de induzir forte produção do TNF- α pelos macrófagos, que foi um pouco maior nas culturas infectadas pelas cepas ARG-22542 e ARG-24160. Porém, no período de 72 horas, foi observado aumento da produção em todas as culturas infectadas, principalmente, nas cepas disseminadas ARG-13854 e ARG-09292 e na cepa localizada ARG-14663, com a exceção da cultura infectada pela cepa ARG-24160, que reduziu a produção dessa citocina (Figura 8).

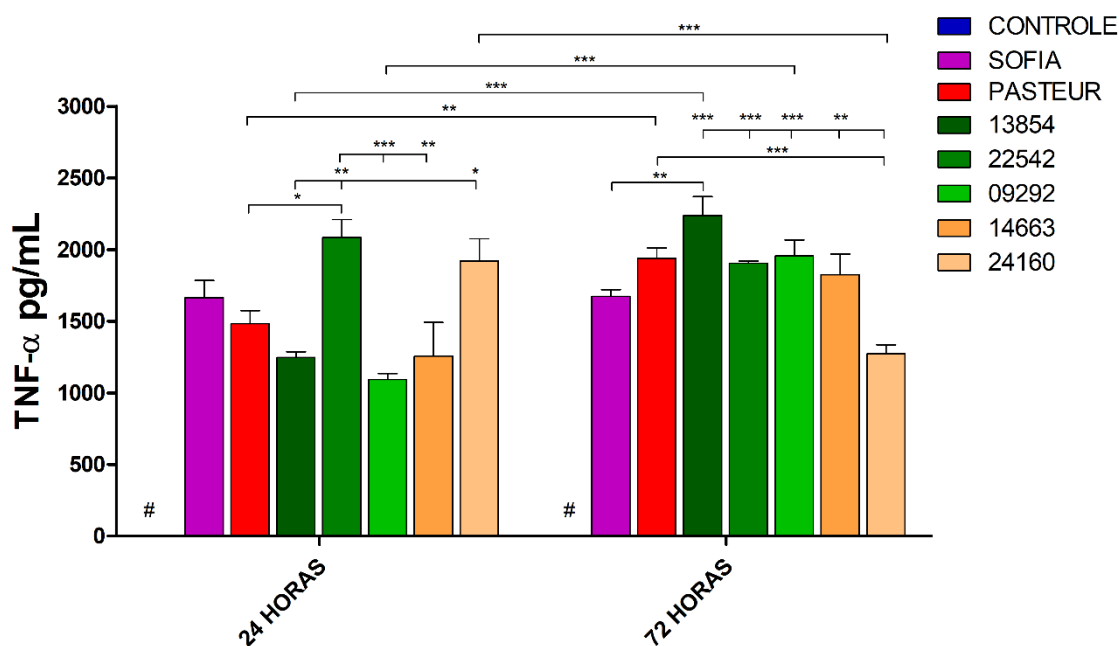


Figura 8: Produção de TNF- α por macrófagos murinos infectados pelas cepas clínicas e vacinais de BCG. Células Raw 264.7 foram infectadas com MOI 10:1 e, após o tempo de 24h e 72h de incubação, a citocina pro-inflamatória TNF- α foi quantificada no sobrenadante por ELISA. Foi utilizado o teste estatístico teste T na comparação entre o evento tempo de 24h e 72h para cada grupo de infecção, assim como o controle. No evento tempo 72h, foi utilizado o teste estatístico One way ANOVA, seguido de teste de Tukey, para a comparação da produção de TNF- α entre os grupos de infecção e controle.

A quantificação de NO demonstrou que a produção deste mediador inflamatório foi induzida somente após 72 h de infecção (Figura 9). A produção de NO pelos macrófagos infectados pelas cepas obtidas da doença disseminada, ARG-13854, ARG-09292 e ARG-22542, foi significativamente maior que nas culturas infectadas pelas cepas da infecção localizada, ARG-14663 e ARG-24160 e que nas culturas infectadas pelas cepas vacinais.

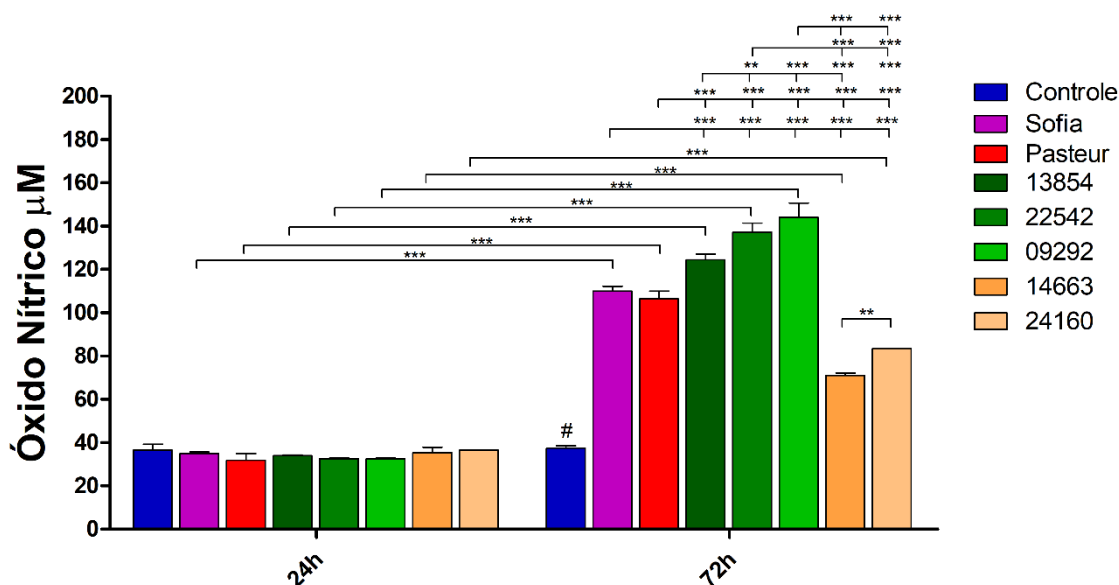


Figura 9: Produção de NO por macrófagos murinos infectados pelas cepas clínicas e vacinais de BCG. Células Raw 264.7 foram infectadas com MOI 10:1 e, após o tempo de 24h e 72h de incubação, os sobrenadantes foram coletados e houve a quantificação de oxido nítrico (NO) pela Reação de Griess. Foi utilizado o teste estatístico teste T na comparação entre o evento tempo de 24h e 72h para cada grupo de infecção, assim como o controle. No evento tempo 72h, foi utilizado o teste estatístico One way ANOVA, seguido de teste de Tukey, para a comparação da produção de NO entre os grupos de infecção e controle.

5 DISCUSSÃO

Bacille Calmette-Guérin (BCG) é uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis* e é utilizada como a única vacina disponível contra a tuberculose, podendo proteger as crianças contra as formas disseminadas da TB, incluindo a meningite tuberculosa. A vacina é produzida em vários países do mundo e já está em uso para a vacinação das crianças contra de TB por mais de 100 anos (TRUNZ et al., 2006).

Estudos subsequentes das múltiplas cepas vacinais, utilizadas nos vários países, mostraram a diversidade do genoma, indicando vários rearranjos cromossômicos, incluindo as deleções e duplicações, em sublinhagens de BCG (NARVSKAYA et al., 2020). Foi demonstrado que as diferentes cepas de BCG apresentam diferenças na sua virulência e no efeito protetor contra tuberculose, o que pode ser associado as alterações genéticas adquiridas (ZHANG et al., 2016). Supõe-se que as cepas BCG que sobrevivem no organismo do indivíduo vacinado maior tempo que esperado, provocando reações patológicas adversas (locais ou sistêmicas) podem sofrer alterações genéticas e fenotípicas

ainda mais expressivas, que podem aumentar o grau de virulência de cepa utilizada para a vacinação, contribuindo a patogenia da doença.

Para verificar esta hipótese, foram avaliados os isolados clínicos dos pacientes argentinos com a doença disseminada (ARG-13854, AGR-22542 e ARG-09292); as cepas clínicas de doença localizada (ARG-14663 e ARG-24160) e as cepas vacinais BCG Sofia e BCG Pasteur, utilizadas na Argentina, quanto as suas características associadas à virulência.

No modelo de infecção *in vitro* de macrófagos, foram avaliadas as taxas de crescimento intracelular de micobactéria, viabilidade celular dos macrófagos, padrão de morte celular (apoptose e necrose) e produção de mediadores pro-inflamatórios NO e TNF- α . Apesar de apresentar um padrão de crescimento similar em macrófagos, os isolados clínicos de doença disseminada apresentaram uma certa tendência de aumento na taxa de crescimento, sendo comparadas com as cepas de infecção localizada.

Da mesma forma, foi observada uma similaridade na cinética de perda da viabilidade dos macrófagos infectados pelas diferentes cepas de BCG. Porém, o principal tipo da morte induzida em macrófagos pela cepa vacinal BCG Sofia foi a apoptose, enquanto outras cepas, incluindo todos os isolados clínicos e a cepa vacinal Pasteur, induziram preferencialmente a morte necrótica. A relação das células necróticas e apoptóticas foi maior no grupo das cepas de infecção disseminada em comparação com o grupo das cepas de infecção localizada, e foi particularmente alta para a cepa ARG-09292 isolada do sangue de um paciente com forma disseminada da doença.

A maior capacidade de micobactéria de induzir a morte necrótica dos macrófagos pode contribuir com a patogenia de doença. Quando há uma replicação intracelular acelerada de micobactérias e ocorre uma indução de morte necrótica, isso promove então a liberação do bacilo. Dessa forma, há a disseminação da bactéria, a infecção de novas células permissíveis, e se iniciam novos ciclos de replicação, características que estão envolvidas a progressão de doença (LERNER et al., 2015).

A quantificação da taxa de virulência relativa dos isolados clínicos estudados em comparação com a cepa BCG Pasteur, utilizando a mesma abordagem que foi utilizada para avaliação de virulência *in vitro* dos isolados clínicos de micobactérias patogênicas (LASSOUNSKAIA et al., 2010, MUSSI et al., 2021), demonstrou que a virulência das

cepas BCG obtidas dos pacientes com a doença disseminada foi maior que da cepa vacinal, enquanto, a virulência das cepas obtidas dos pacientes com a doença localizada foi menor.

A avaliação da capacidade das cepas BCG de induzir a ativação pro-inflamatória dos macrófagos demonstrou que as cepas obtidas da doença disseminada induziram maior produção de NO pelos macrófagos infectados que as cepas de infecção localizada ou cepas vacinais. Todas as cepas induziram também as altas concentrações do TNF- α nos macrófagos em resposta a infecção, e a produção tinha tendência de aumentar com tempo, entretanto, em cultura infectada com uma cepa de doença localizada a produção de TNF- α diminuiu. O óxido nítrico e o TNF- α são mediadores inflamatórios muito importantes na defesa contra a micobactéria. Foi demonstrado que na população de pacientes com tuberculose existe um aumento da expressão de NO pelas células mononucleares do hospedeiro, que contribui a eliminação de micobactéria e na regulação de inflamação pulmonar (LAPA e SILVA, 2004).


































A produção da TNF- α é importante para a organização continuada das lesões granulomatosas e tem propriedades imunorreguladoras (MOOTOO et al., 2009). Essa citocina também tem participação na ativação de macrófagos adjacentes, que sintetizam moléculas bactericidas e mediadores inflamatórios (FLYNN et al., 2011). Entretanto, a produção exacerbada e prolongada destes mediadores contribui para a imunopatologia. Por isso, um maior nível de produção dessas moléculas pelos macrófagos, em casos de doença disseminada, pode prejudicar o organismo.

No entanto, experimentos *in vivo* no modelo de infecção animal podem servir como uma melhor alternativa para a avaliação do papel de produção dos produtos pro-inflamatórias e de virulência de micobactéria, por apresentarem resultados mais próximos a infecção humana.




Para entender melhor por que alguns isolados de BCG podem exibir maior virulência que outros, nós realizamos uma análise dos dados genômicos disponíveis para as cepas estudadas (ZERPA, 2020) e associamos estes dados com o fenótipo de virulência dessas cepas determinado neste estudo.

Em vários isolados clínicos de BCG incluídos neste estudo, foram observadas alterações genômicas comuns, que não foram detectadas na cepa BCG vacinal proveniente (cepa Pasteur). As cepas apresentaram inversão ou deleção de algum dos componentes do

sistema ESX-5, sistema de dois componentes VapC/VapB ou no sistema ESX-3 (Figura 10).

Cepa	Ab	Gen	Material	Índice de virulência
BCG Pasteur	 * 	  		1,0
13854	  	  	Biópsia de osso	1,19
22542	  	  	Biópsia de osso	1,25
09292	 * 	  	Sangue	1,30
14663	 * 	  	Gânglio axilar	0,89
24160	  	  	Abscesso de braço	0,93

Antibióticos

-  Isoniazida
-  Etambutol
-  Rifampicina

Gen-rearranjos cromossômicos




-  ESX-5
-  VapC/VapB
-  ESX-3

Figura 10. Os dados genômicos e fenotípicos obtidos para cepas BCG isoladas na Argentina dos pacientes com a BCGite. Os dados de virulência foram obtidos neste estudo. Os dados de rearranjos cromossômicos, de susceptibilidade a drogas anti-TB e dados dos pacientes foram disponibilizados pela Dra. Maria Zerpa. Quadrados preenchidos significam resistência a droga (CIM), quadrados vazios significam que a cepa é sensível. Asterisco significa que a CIM obtida está no intervalo de susceptibilidade intermediária ou inconclusiva. Círculos preenchidos significam alteração nos genes do sistema especificado (Inversão, deleção ou translocação), círculos vazios significam ausência de alteração (Zerpa, 2020).

Os dados apresentados na Figura 10 demonstram, que as cepas mais virulentas, que foram obtidas do material de biópsia óssea dos dois diferentes pacientes (forma disseminada de doença) apresentaram rearranjos genômicos similares, sugerindo uma possibilidade de relação de causa e consequência, que ainda deve ser estudada melhor. Entretanto, a cepa ARG-09292 isolada de sangue, outra forma disseminada de doença, não apresentou nenhuma alteração em comparação com a cepa vacinal proveniente. A disseminação sistêmica com a presença de bactérias no sangue do paciente (septicemia) sugere um alto nível de imunodeficiência deste paciente, o que pode determinar sua alta susceptibilidade a cepas bem atenuadas de micobactérias. As cepas de infecção localizada apresentaram alterações somente no sistema de ESX 5.

Entre as alterações cromossômicas detectadas, as que estão presentes no sistema ESX-5 são observadas em várias cepas. O sistema ESX-5 está envolvido na secreção de proteínas PE/PPE, que regulam a permeabilidade da parede celular e ajudam na internalização de fontes de carbono (ATES et al., 2015; ABDALLAH et al., 2011).

Embora a deleção dos genes do sistema ESX-5 causa atenuação de *M. tuberculosis*, com redução da capacidade de multiplicação em macrófagos e da virulência em camundongos SCID, em outras espécies, como *M. marinum*, foi detectado um fenótipo hipervirulento em cepas ESX-5 deficientes. Nesse estudo, mesmo a cepa mutante apresentando um poder de replicação igual ao da cepa controle, foi observada uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12p40 e IL-6, o que favorece a invasão da micobactéria em outras células (WEERDENBURG et al., 2012).

Alguns estudos têm sugerido o envolvimento das PPEs em diversos aspectos da patogênese, virulência e evasão do bacilo durante a infecção, incluindo fixação bacteriana às células do hospedeiro, imunomodulação e capacidade de persistir no granuloma (VELAYUDHAN & PORCELLI, 2013).

As cepas vacinas BCG Sofia e Pasteur utilizadas neste estudo também apresentam diferenças quanto aos genes de fatores de virulência. Na vacina BCG Sofia, os fatores de virulência codificados pelos genes *pks*, *fadD26*, *ppsA*, *ppsC*, *mce1A*, *pe-pgrs30*, *espB*, *espE*, *pe36*, *mycP2* e *ppe25* não foram encontrados. No entanto, os genes *chp1*, *mce2D*, *espA*, *eccC2*, *esxC* e um fator com gene não determinado do sistema ESX-2 eram exclusivos dessa vacina e não foram encontrados na vacina Pasteur (ZERPA, 2020). Estes dados confirmam os dados anteriores que demonstram certas diferenças genômicas entre cepas vacinais de grupos diferentes, apresentados na Figura 2, e explicam as diferenças nas propriedades associadas a virulência dessas cepas, que foram observadas neste estudo.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos no presente trabalho:

- Os isolados clínicos BCG obtidos de pacientes com a doença disseminada apresentaram uma taxa de virulência maior em comparação com as cepas de doença localizada, quando avaliada no modelo de infecção *in vitro*;

- As cepas disseminadas, principalmente as cepas ARG-09292 e ARG-22542, foram capazes de induzir a produção dos mediadores pro-inflamatórios, NO e TNF- α , um pouco maior ou mais prolongado, que as cepas obtidas dos casos de doença localizada;

- As cepas vacinais BCG Pasteur e BCG Sofia apresentaram uma diferença na sua capacidade de induzir morte nos macrófagos infectados em cultura celular, sendo que a

cepa Sofia estava induzindo a morte apoptótica preferencialmente, e a cepa Pasteur induziu tanto apoptose, quanto a necrose nas células infectadas;

- As diferenças fenotípicas na virulência e alterações cromossômicas que foram detectadas nas cepas BCG estudadas podem contribuir para a gravidade de doença observada nos hospedeiros;

- Os dados sugerem que no modelo de infecção animal, principalmente nos animais com imunodeficiência, essas cepas podem apresentar diferenças na sua patogenia ainda mais expressivas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah AM, Gey Van Pittius NC, Champion PA, COX J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk BJ, Bitter W. Type VII secretion - mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.*, 5(11) : 883-91, 2007.

Abdallah AM, Hill-Cawthorne Ga, Otto TD, Coll F, Guerraassunção JA, Gao G, NAEEM R, Ansari H, Malas TB, Adroub SA, Verboom T, Ummels R, Zhang H, Panigrahi Ak, Mcnerney R, Brosch R, Clark Tg, Behr Ma, Bitter W & Pain A. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep.* 5 : 15443, 2015.

Almeida CS, Abramo C, Ferreira AP, L'Hotellier M, Kolk A; Ottenhof THM, Teixeira HC. Avaliação de novos antígenos de Mtb para vacinação e imunodiagnóstico precoce da TB. *Principia: Camin Inic Cient.* 10:97-106, 2005.

Ates, L. S., R. Ummels, S. Commandeur, R., van de Weerd, R., van der Weerd, M., Sparrius, E., Weerdenburg, M., Alber, R., Kalscheuer, S. R., Piersma, A., Abdallah, M., Abd El, Ghany, M., Abdel-Haleem, A., M., Pain, A., Jiménez, C. R., Bitter, W., e Houben, E. N. Essential Role of the ESX-5 Secretion System in Outer Membrane Permeability of Pathogenic Mycobacteria. *PLoS Genet* 11: 1005190, 2015

Azzopardi, P., Bennett, C.M., Graham, S.M. and Duke, T., Bacille CalmetteGuérin vaccine-related disease in HIV-infected children: a systematic review, *International journal of tuberculosis and lung disease*, 13:1331- 1344, 2009.

Barreto, M L.; Pereira, SM; Ferreira, AA .. Vacina BCG: eficácia e indicações para vacinação e revacinação. *J. Pediatr. (Rio J.)* 82: 3, 45-s54, 2006.

- Barrios-Payán, J. A., Castañón-Arreola, M., Flores-Valdez, M.A., e Hernández-Pando, R. Biological, clinical and epidemiological aspects of latent tuberculosis. *Salud Publica Mex* 52,70-78, 2010.
- Behr MA. BCG - diferentes cepas, diferentes vacinas?. *Lancet Infect Dis.* 2:86-92, 2002.
- Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect;* 33:249-52, 2001.
- Bolger T, O’Connell M, Menon A, Butler K: Complications associated with the bacille Calmette-Guérin vaccination in Ireland. *Arch Dis Child.* 91:594–7, 2006.
- Bom PE. Vacinas e vacinação. In: Reichman LB e Hershfield ES, editor. *Tuberculose. Uma abordagem abrangente e internacional.* Nova York: Marcel Dekker; 503-22, 2000.
- Brasil, Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico de Tuberculose da Secretaria de Vigilância em Saúde.* 1ª edição, 2021.
- Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 2436, de 21 de setembro de 2017, que aprova a política nacional de atenção básica, 2017.
- Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.* Ministério da Saúde; 2011.
- Brasil, Ministério da Saúde. *Vacina BCG completa 44 anos de imunização da população brasileira contra a tuberculose,* 2021.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci;* 104(13):5596–601, 2007
- Broset E, Martín C, Gonzalo-Asensio J. Evolutionary landscape of the Mycobacterium tuberculosis complex from the viewpoint of PhoPR: Implications for virulence regulation and application to vaccine development. *MBio,* 6:1-15, 2015.
- Brosch R, Behr MA. In: *Tuberculose and the Tubercle Bacillus.* Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr, editores. Washington, DC: Am Soc Microbiol; 155–164, 2005.
- Collins HS. Tuberculosis. In: *Encyclopedia Americana.* Vol. 27. Danbury, Connecticut, USA: Scholastic Library Publishing, Inc.; 193 – 194, 2006.

Constant F., Figueredo A., Brito MJ. Adenite do bacilo Calmette-Guérin: protocolo diagnóstico e terapêutico. *Acta Med Port.* 2:263-8, 2011.

Copin R, Coscollá M, Efstathiadis E, Gagneux S, Ernst Jd. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Vaccine.* 32 (45) : 5998-6004, 2014.

Daniel TM. *Captain of Death: the story of tuberculosis.* NY: University of Rochester Press; 2006.

Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, et al. Extensively drugresistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet;* 368:1575-80, 2006.

Honda I, SM, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, Toida I. Identification of two subpopulations of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine.* 24(23):4969-74, 2006.

Korb Vc, Chuturgoon Aa & Moodley D. *Mycobacterium tuberculosis*: manipulator of protective immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (131), 2016.

Kunnath-Velayudhan S, Porcelli SA. Recent Advances in Defining the Immunoproteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol.* 11;4:335, 2013.

Lapa e Silva, JR; Boéchat, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia [online].*, 30(4):388-394, 2004.

Lassounskaia E., Ribeiro S.C.M., Manicheva O., Gomes L.L., Suffys P.N., Mokrousov I., Ferrazoli L., Andrade M.R.M., Kritski A., Otten T., Kipnis T.L., Da Silva W.D., Vishnevsky B., Oliveira M.M., Gomes H.M., Baptista I.F., Narvskaya O. Emerging multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia Express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 467-475, 2010.

Leung AS, Tran V, Wu Z, Yu X, Alexander DC, Gao GF, et al. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics.*;9:413, 2008.

Megid, Jane; Ribeiro, Márcio Garcia; Paes, Antônio Carlos. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.* 1ª edição - Rio de Janeiro, Roca,. 754, 2016.

Moutinho, Ivana Lúcia Damásio. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev Med Minas Gerais*, 42-48, 2011.

Mussi VO, Simão TLBV, Almeida FM, Machado E, de Carvalho LD, Calixto SD, Sales GAM, Carvalho ECQ, Vasconcellos SEG, Catanho M, Suffys PN e Lasunskaja EB Um modelo murino de infecção por *Mycobacterium kansasii* reproduzindo patologia pulmonar necrótica revela considerável heterogeneidade na virulência de isolados clínicos. *Front. Microbiol.* 12:718477, 2021.

Narvskaya, Olga & Starkova, Daria & Levi, Diana & Alexandrova, Natalia & Molchanov, Vladimir & Chernyaeva, Ekaterina & Vyazovaya, Anna & Mushkin, Alexander & Zhuravlev, Viacheslav & Solovieva, Natalia & Vishnevskiy, B. & Mokrousov, Igor. First insight into the whole-genome sequence variations in *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) vaccine seed lots and their progeny clinical isolates from children with BCG-induced adverse events. *BMC Genomics.* 21. 10.1186, 2020.

Organização Mundial da Saúde. Global tuberculosis report, 2020.

Pagán, A. J. e L. Ramakrishnan Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5, 1-19, 2014.

Paiman, SA, Siadati, A., Mamishi, S., Tabatabaie, P., & Khotae, G. Infecção disseminada por *Mycobacterium bovis* após vacinação com BCG. *Jornal iraniano de alergia, asma e imunologia,* 133-7, 2006.

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. [place unknown]: BourcillierKamps, New vaccines against tuberculosis; 341-59, 2007.

Pereira SM, Bierrenbach AL, Dourado I, Barreto ML, Ichihara MY, Hijjar MA, et al. Sensibilidade e especificidade da leitura da cicatriz BCG. *Rev Saude Publica.* 37: 254-9, 2003.

Rosemberg, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. *Boletim de Pneumologia Sanitária* 9(1), 2001

Rossetti, Maria Lúcia Rosa et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública* [online]. 36:4, 525-532, 2002

Sohn H., Lee K. S., Kim S. Y., Shin D. M., Shin S. J., Jo E. K., Park J. K., Kim H. J.. Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv. *Scand J Immunol.*, v.69(1), p.43-50, 2009.

Starke JR, Connelly KK. Bacille Calmette-Guerin vaccine. In: Plotkin MEA, editor. *Vaccines.* Philadelphia: WB Saunders;. 456-89, 2004.

Tran V, Ahn Sk, Ng M, Li M & Liu J. Loss of Lipid Virulence Factors Reduces the Efficacy of the BCG Vaccine. *Sci Rep.* 6 : 29076, 2016.

Trunz BB, Fine P, Dye C: Efeito da vacinação BCG na meningite tuberculosa infantil e tuberculose miliar em todo o mundo: uma meta-análise e avaliação de custo-eficácia *Lanceta.* 367: 1173-1180, 2006.

Valente BC, Angelo JR, Kawa H, Baltar VT. A tuberculose e seus fatores associados em um município da região metropolitana do Rio de Janeiro. *Rev. Bras Epidemiol.* [internet], 22:E190027: 1-12, 2019.

Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia. Quarta Edição.* Rio de Janeiro: Atheneu; 2010.

Weerdenburg, E. M., Abdallah, A. M., Mitra, S., de Punder, K., van der Wel, N. N., Bird, S., Appelmelk, B. J., Bitter, Wandersar, A. M. ESX-5-deficient *Mycobacterium marinum* is hypervirulent in adult zebrafish. *Cell Microbiol* 14, 728-739, 2012.

Zerpa MCS. Comparação genômica e susceptibilidade a drogas de cepas patogênicas e vacinais de *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette – Guerin. UFRJ. Rio de Janeiro, 2020.

Zhang W, Zhang Y, Zheng H, Pan Y, Liu H, Du P, Wan L, Liu J, Zhu B, Zhao G, Chen C & Wan K. Genome sequencing and analysis of bcg vaccine strains. *Plos One*, 8:E71243. 2013.