

Estudo exploratório da genotoxicidade de vacinas recombinantes para tuberculose bovina

Exploratory study of the genotoxicity from recombinant bovine tuberculosis vaccines

Ramos-Ibarra María*¹ , Villa-Castellanos José¹ , Barba-León Jeannette² , Flores-Valdez Mario³ , Zavala-Aguirre Luis⁴ , Torres Bugarín Olivia**⁵ 

¹Laboratorio de Toxicología Genética. Departamento, Salud pública, División Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. México. ²Laboratorio de Caracterización Molecular de Patógenos. Departamento de Salud Pública, División Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. México. ³Biología Médica y Farmacéutica Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. México. ⁴Laboratorio de Hidrobiología y Ecotoxicología Acuática, Dirección Departamental de Biología y Ambientales, Universidad Autónoma de Guadalajara. México. ⁵Laboratorio de Evaluación de Genotóxicos, Programa Internacional de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara. México. Autor Responsável Ramos-Ibarra María e para correspondência Torres-Bugarín Olivia. Laboratorio de Evaluación de Genotóxicos, Programa Internacional de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201. Lomas del Valle, CP 45129, Zapopan, Jalisco, México, Apartado Postal 1-440. Tel: (33) 36488824; Ext. 33152. maluisaramos@hotmail.com. chavavilla06@gmail.com, jeannbarba@gmail.com, floresv@ciatej.mx, jzavala@edu.uag.mx, oliviatorres@hotmail.com

RESUMO

A vacina BCG (Bacillus Calmette-Guérin) para o controle da tuberculose bovina tem eficácia variável e é necessária a geração e teste de novas vacinas. Por esse motivo, foi realizado um estudo exploratório para avaliar a genotoxicidade de duas vacinas em potencial, tuberculose bovina recombinante em bezerros da raça Holstein Freisan com idade média de 9 meses, utilizando eritrócitos micronucleados (EMN). Foram formados 5 grupos: 1) Solução salina, 2) O vetor pVAX1 (Vetor sem inserto), CV, 3) Vacina *Mycobacterium bovis* (M. bovis) tipo 1 (PE11 [VR1]), 4) Vacina M. bovis tipo 2 (PPE68 [VR2]), 5) Ambas as vacinas (VR1+VR2). Foram coletadas 5 amostras de sangue de cada organismo: a primeira antes do tratamento, a segunda para a quarta amostra a cada 24 horas e a quinta 90 dias após o tratamento. As amostras foram analisadas com microscopia e contados EMN/10.000 eritrócitos. As frequências das EMN diminuíram com a idade (Kruskall Wallis, 95%). Ao analisar os tratamentos com relação ao controle, identificou-se um menor valor de EMN nos grupos VR2 e VR1+VR2 (P=0,02). Esses resultados parecem ter um efeito citoprotetor, no entanto, pode ser um efeito mielossupressor mascarado (citotóxico), uma vez que a frequência de MND diminui devido à mielossupressão. Para confirmar a citotoxicidade, sugere-se continuar o estudo em organismos mais jovens.

Palavras-chave: vacina contra genotoxicidade, micronúcleos, bovinos e tuberculose recombinante.

ABSTRACT

BCG vaccine (Calmette-Guérin Bacillus) for bovine tuberculous control has a variable efficiency, been necessary to produce and evaluate new vaccines. Genotoxicity of two new recombinant antituberculous potential vaccines was evaluated in Holstein Freisan calves using micronucleated erythrocytes (MNE). Five treatments were analyzed: 1) Saline solution, 2) pVAX1 vector (CV), 3) *Mycobacterium bovis* (Mv) type 1

vaccine (PE11 [VR1]), 4) type 2 (Mv) vaccine (PPE68 [VR2]) and 5) both VR1 & VR2 vaccines. Five blood samples were taken to each organism. First sample was taken before any treatment. Samples 2 to 4 were taken every 24 hours; the fifth sample was taken at day 90 posttreatment. The samples were analyzed with microscope to obtain MNE/10,000 total erythrocytes. We observed a decrease at MNE, related to age increase of the organisms (Kruskal Wallis, 95%). A comparison with control group at the end of the treatments showed significant EMN reductions at VR2 and VR1&VR2 groups ($P=0.02$). It seems that the results show a cytoprotecting effect but also could be a masked myelosuppressive effect (cytotoxicity) because the EMN frequency decreases with myelosuppression. It is necessary to continue with studies with young organisms in order to confirm toxicity.

Keywords: Genotoxicity, micronuclei, cattle and recombinant antituberculous vaccine.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde indica que a tuberculose bovina é uma doença infecciosa bacteriana crônica zoonótica de alta morbimortalidade e é endêmica nos países em desenvolvimento; especificamente no México, prevalece em todo o país (OIE, 2020; PRONABIVE, 2015), onde é provável que a transmissão natural do gado seja favorecida (Van der Heijden *et al.*, 2017). A doença produz grandes perdas econômicas devido à diminuição da população de gado e leite; portanto, exige constante controle e prevenção (Flores, 2012; Gooding y Brook, 2014; Ortíz, 2015; OIE, 2020). *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e *M. tuberculosis* são a causa da tuberculose. Esta doença forma nódulos ou tubérculos nos gânglios linfáticos e em vários tecidos, de onde surge seu nome (Carriosa *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2019).

Os sinais clínicos podem ser subagudos ou crônicos; a taxa progressiva é variável; em alguns animais as bactérias permanecem dormentes ou levam anos para se-manifestar; enquanto em outros, eles podem ser seriamente afetados em pouco tempo, e é por isso que deve ser notificado de acordo com o Código de Saúde dos Animais Terrestres (OIE, 2020). É transmitida pelo contato com indivíduos ou tecidos infectados, pela ingestão de alimentos ou fluidos corporais contaminados (OIE, 2020; Herrera *et al.*, 2008; Higareda-de Sales *et al.*, 2015; Himsworth *et al.*, 2010; Grange, 2001).

Uma proposta para erradicar a doença é a vacinação, cujo objetivo é melhorar a resposta imune à tuberculose, reduzir a incidência de doença ativa; além de proteção mais durável, maior eficácia e segurança, aplicabilidade a qualquer população e compatibilidade com o restante do cronograma de vacinação; bem como baixo custo (Barba *et al.*, 2013).

Por sua vez, o teste de micronúcleo (MN) detecta a perda de fragmentos ou cromossomos completos durante a mitose e, no sangue periférico, é uma excelente ferramenta barata, altamente sensível e informativa que não requer amostras grandes para avaliar possíveis danos ao material DNA. Além disso, os modelos *in vivo* têm a característica de transformar substâncias, onde foi descrito que muitos de seus metabólitos podem se tornar mais tóxicos que o composto original; assim como a resposta imune pode ser avaliada através da ativação da medula óssea ou da

mielossupressão (Cristaldi, 2004; Cedano *et al.*, 2012; Torres-Bugarín *et al.*, 2015; Castañeda *et al.*, 2016).

Por mais de 100 anos, a vacina BCG (Calmette-Guérin bacillus), derivada de uma cepa atenuada de *M. bovis*, tem sido usada; chamado bacilo Calmette-Guérin, para a prevenção da tuberculose bovina. Esta vacina tem eficácia variável (Cordero *et al.*, 2013). Portanto, é prioritário trabalhar na geração de novas vacinas, com base em novos conhecimentos sobre o genoma de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, juntamente com sua resposta imune (Cordero *et al.*, 2013; Van der Heijden *et al.*, 2017).

Novas estratégias na geração de vacinas, como as do tipo DNA, são ferramentas que podem ser avaliadas e exploradas para a prevenção da tuberculose bovina. A esse respeito, foi relatado que bovinos vacinados com uma variante de DNA recombinante (rDNA), que codifica os antígenos 85B, MPT64 e MPT83, melhoram a resposta imune e diminuem a carga de antígeno. Portanto, Barba, *et al.*, (2013) avaliaram a eficácia de vacinas de rDNA usando outros tipos de antígenos de *M. bovis*; para isso, eles clonaram os genes que codificam as proteínas PE11 e PPE68, no vetor de expressão eucariótico pVAX1. Para fazer isso, eles construíram a vacina de DNA, com base num vetor de expressão eucariótica (pVAX1, Invitrogen, EUA), a partir do qual produziram proteínas PE11 e PPE68 codificadas num gene presente em RD1, uma região ausente do *M. bovis* BCG, uma cepa comumente usada como vacina em humanos e em modelos bovinos experimentais.

Essa cepa contribui para a reatividade cruzada e confusão entre animais vacinados e infectados, quando testados. Eles usaram pVAX1-PPE68 e PE11 para vacinar bovinos da raça Holstein e para determinar sua capacidade de induzir a produção de IFN- γ *in vitro*, além de gerar anticorpos em animais vacinados.

RD1 é uma seção de 9,5 kb de DNA chamada região de exclusão 1, está presente em cepas virulentas de *M. tuberculosis*, mas é removida em todas as cepas atenuadas da vacina *M. bovis* BCG. Essa região codifica pelo menos nove genes. Alguns ou todos os produtos do gene RD1 podem estar envolvidos na virulência e patogênese (Daugelat, *et al.*, 2003).

Embora a construção de novas vacinas seja necessária, também é essencial que esses novos tratamentos passem por um processo de avaliação, tanto de sua eficácia terapêutica quanto de possíveis efeitos tóxicos ou genotóxicos, a curto ou longo prazo. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a genotoxicidade de vacinas recombinantes contra tuberculose desenvolvidas por Barba, *et al.*, (2013) em bezerros da raça Holstein Friesian (*Bos taurus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo

Experimental, observacional, longitudinal, comparativo. Com o número de registro CINV.020/15, perante a Coordenação de Pesquisa do Centro Universitário de Ciências Biológicas e Agrícolas da Universidade de Guadalajara, Jalisco, México.

Organismos

Trabalhamos com 13 bezerros Holstein Friesian (*Bos taurus*) saudáveis, com idade média de 9 meses, da fazenda Production Cofradía, Universidade de Guadalajara, Jalisco, México.

Na pesquisa biomédica, trabalhar com animais de uso raro representa dificuldades, tais como: tamanho e número ideais de animais, além de manutenção e cuidados. Como ressalta a OCDE, os bovinos são um tipo de uso raro em pesquisas biomédicas; devido à ética, metodologia e alto custo, o princípio do uso do número mínimo de animais deve ser respeitado. No caso particular em que o estudo foi realizado, não foi possível utilizar o número ideal de bezerros, devido à logística de cuidados, alojamento e alimentação (OCDE, 1999).

Grupos de estudo

Foram formados cinco grupos, nos quais uma dose de 1,0 mL foi administrada por via intramuscular, de um dos seguintes compostos:

- Grupo 1) [n=3] Controle Solução salina estéril a 0,9% (p/v) (CSS).
- Grupo 2) [n=2] Controle vetorial sem inserto pVAX1 (CV).
- Grupo 3) [n=3] Vacina recombinante codificada para PE11: plasmídeo 0,5 mg/mL *M. bovis* (VR1).
- Grupo 4) [n=3] Vacina recombinante codificada para PPE68: plasmídeo *M. bovis* 0,5 mg/mL (VR2).
- Grupo 5) (n=2) VR1+VR2 (PE11: 0,25 mg/mL+PPE68: 0,25 mg/mL).

Características das vacinas recombinantes

- Vetor pVAX1 (Invitrogen Thermo Fisher Scientific N° Cat. V26020)

Este vetor foi projetado de acordo com as diretrizes da FDA, as seqüências de DNA eucariótico são limitadas às necessárias para a expressão, a fim de minimizar a possibilidade de integração cromossômica (Barba et al., 2013).

- Preparação de vacinas PE11 e PPE68

Estes foram preparados no Centro Estadual de Pesquisa e Assistência em Tecnologia e Design de Jalisco (CIATEJ), onde as regiões codificadoras dos genes PE11 e PPE68 foram amplificadas a partir do DNA genômico de *M. bovis*; por reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos, específicos e expressamente projetados para este projeto. A identidade e a fidelidade da seqüência amplificada foram verificadas por restrição com endonucleases do tipo II (XbaI e HindIII) e sequenciamento. Estes foram então inseridos no vetor de expressão eucariótico pVAX1. O DNA do plasmídeo foi purificado usando um kit comercial Quiagen Plasmid Plus Midi (Barba et al., 2013).

- Proteínas proteínas PE11 e PPE68

Essas famílias de proteínas de estrutura globular são aquelas que conferem maior variabilidade ao *M. tuberculosis*. A proteína PE11 (motivos de ácido prolina-glutâmico no

nível do terminal N) é caracterizada por ser rica em prolina e ácido glutâmico, e a proteína PPE68 (prolina, prolina, ácido glutâmico) é definida por repetições em tandem (MPTRs) ([Fontalvo Rivera y Gómez Camargo, 2015](#)).

□ *Geração de vacinas recombinantes*

Os plasmídeos recombinantes transformados em *Escherichia coli* DH5α e contendo as proteínas PE11 ou PPE68 foram obtidos por meio do kit comercial Quiagen Plasmid Plus Maxi e misturados com solução salina isotônica (SSI); até ajustado para um volume de 0,5 mL, com uma concentração de 500 µg/mL (vacina administrada). Os genes PE11 e PPE68 foram amplificados por PCR, com a ajuda da enzima Phusion de alta fidelidade (Finnzymes, EUA) e o DNA genômico de *M. bovis* AN5 como modelo, e o par de MbPPE68-5FH3 (5´-GGAGAAGCTTGTCAACCATGCTGTGG-3) + MbPPE683RXb3RXb (5´-GATCCGCTCTAGATTACCTGCCTCCTG-3´).

Os produtos de PCR foram digeridos com HindIII e XbaI (New England Biolabs, EUA) e depois ligados ao vetor pVAX1, utilizando os mesmos locais de restrição. A clonagem foi confirmada por digestão com restrição e a razão entre identidade e fidelidade do gene inserido e, em seguida, verificada por sequenciamento realizado no Laboratório de Genômica para Biodiversidade (LANGEBIO, Cinvestav Irapuato, México). A expressão de genes clonados no pVAX1 depende do seu promotor do CMV, bem como das sequências Kozak e ATG que são incorporadas nos iniciadores, dada a sua ausência no pVAX1; como apontado por Barba e seus colaboradores ([Barba et al., 2013](#)).

Coleta e processamento de amostras

Amostras de sangue periférico foram coletadas de cada bezerro, a primeira antes do tratamento; do 2º ao 4º a cada 24 horas e o último após 90 dias. A amostra foi retirada da jugular, pela punção com agulha número 18 e foram realizados dois esfregaços por amostra, que foram deixados secar ao ar livre e fixados em etanol a 96% por 10 minutos. O segundo esfregaço foi para fins de backup. Posteriormente, foram corados com laranja de acridina, coloração específica para ácidos nucleicos ([Hayashi, 1990](#)) e mantidos até sua análise em caixas para mantê-los livres de poeira e exposição à luz ([Torres-Bugarín et al., 2015](#)).

Análise da amostra

O técnico responsável pela análise das amostras desconhecia as informações a elas relacionadas, que por amostra continham 10.000 eritrócitos totais (ET), para identificar os valores dos eritrócitos micronucleados (EMN), através de um microscópio equipado com fluorescência (marca Zeiss®) sob objetivo 100X. Foi considerado EMN quando apresentava em seu citoplasma uma estrutura pequena, redonda ou oval, bem definida com uma cor amarela brilhante (tom característico do DNA devido à coloração com acridina laranja, específica para ácidos nucleicos), e que ao focalizar e desfocar o

objetivo, ele está no mesmo plano da célula; como visto na figura 1 ([Torres-Bugarín et al., 2015](#)).

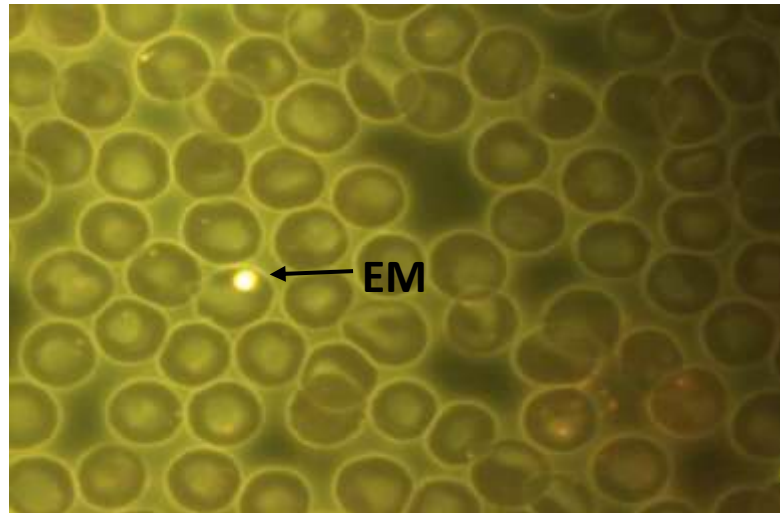


Figura 1. Esfregaço de sangue periférico. Eritrócito normocromático micronucleado (EMN). Mancha de acridina laranja. Microscópio Binocular Carl Zeiss Mod. Axioscope A1® IVFL Filtro de Fluorescência de 450 a 490 nanômetros, Câmera AxioCam MRc3 Rev1, Objetivo Planocromático 100x/1,25. Imagem capturada com 1.000 ampliações reais.

Análise estatística

Para a comparação dos valores de EMN, foram realizadas avaliações prévias dos índices de viés, curtose e homoscedasticidade, para discriminar entre o uso de ANOVA ou Kruskal Wallis e prosseguir com a análise. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo e, se apropriado, foram realizados testes de LSD para localizar grupos homogêneos. O programa STATGRAPHICS™ Centurion, ver. 15 (StatPoint, EUA).

Considerações éticas

Todos os animais foram tratados de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo PADRÃO Oficial Mexicano NOM-062-ZOO-1999, especificações técnicas para a produção, cuidados e uso de animais de laboratório ([NOM-062-ZOO-1999](#); [OCDE, 1999](#)).

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o tamanho da amostra, os valores individuais e médios e os erros padrão dos valores da linha de base do EMN, Cabe ressaltar que VR2 e VR1+VR2 apresentaram frequência de EMNs com efeito dose-resposta ($P=0,02$, Kruskal Wallis).

Tabela 1. Valores de eritrócitos micronucleados de sangue periférico (EMNs) em bezerros da raça Holstein expostos a vacinas de teste recombinantes ao longo do tempo

Amostragem	EMN/10.000 valores de eritrocitos totais				
	CSS, (n=3)	CV, (n=2)	VR1,(n=3)	VR2, (n=3)	VR1+VR2, (n=2)
Dia 1	2.6 ± 1.98 [n=13]				
Valores Basais					
Dia 2	2, 2, 5	1, 2	1, 3, 4	1, 1, 3	1, 2
Dia 3	1,1,3	1, 1	2, 2, 2	1, 1, 2	2, 2
Dia 4	1, 3, 4	1, 2	0, 2, 3	1, 1, 2	2, 1
Dia 90	1, 2, 3	1, 2	0, 2, 3	0, 1, 2	2, 2
Promédio geral	2.4 ± 0.3	1.4 ± 0.2	2.5 ± 0.5	1.3 ± 0.2	2.0 ± 0.3

Valores individuais e média ± erro padrão são mostrados. EMN: eritrócitos micronucleados; CSS: solução salina de controle; CV: controle de veículo; VR1: vacina recombinante (PE-11); VR2: vacina recombinante (PPE-68); VR1+VR2: vacina recombinante (PE-11+PPE-68); n: tamanho da amostra.

Ao analisar os valores de MND de todos os organismos nos diferentes grupos e dias de amostragem, identificou-se que os dados não atendem ao princípio de variâncias e normalidade homogêneas; portanto, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis, com o qual se constatou que os valores de EMN mostram aparente diminuição ao longo do tempo, mas sem significância estatística ($P = 0,70$), (Figura 2).

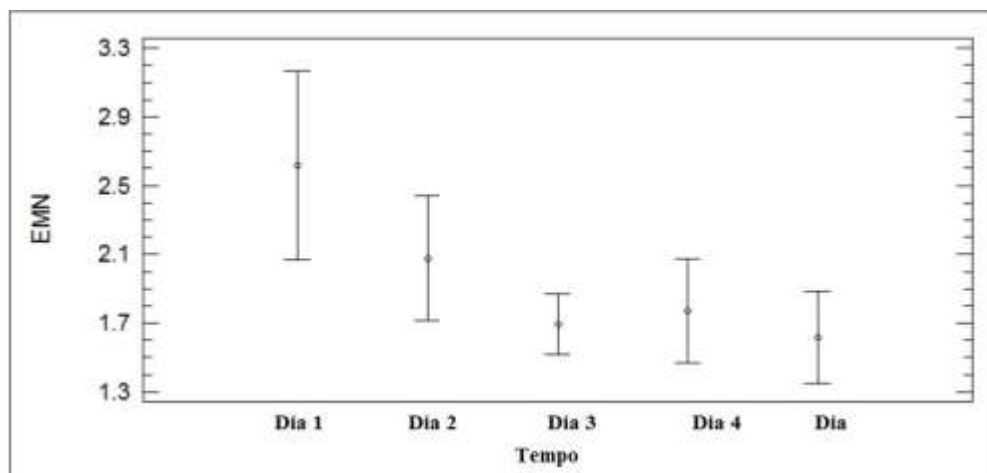


Figura 2. Valores de eritrócitos micronucleados (EMN/10.000 eritrócitos) no sangue periférico de bezerros Holstein Freisan nos diferentes grupos de estudo e amostrados em dias diferentes. Os gráficos mostram erro médio e padrão.

Na tabela 1 e figura 3, pode ser observado o efeito da resposta à dose ($P=0,02$, Kruskal Wallis) nas frequências de EMN da aplicação VR2. Além disso, deve-se notar que os grupos CSS e VR1, bem como os grupos CV e VR2, se comportam de maneira muito semelhante ($P > 0,05$); enquanto o grupo VR1+VR2 apresenta valores intermediários de EMN entre VR1 e VR2 ($P > 0,05$), veja a figura 3.

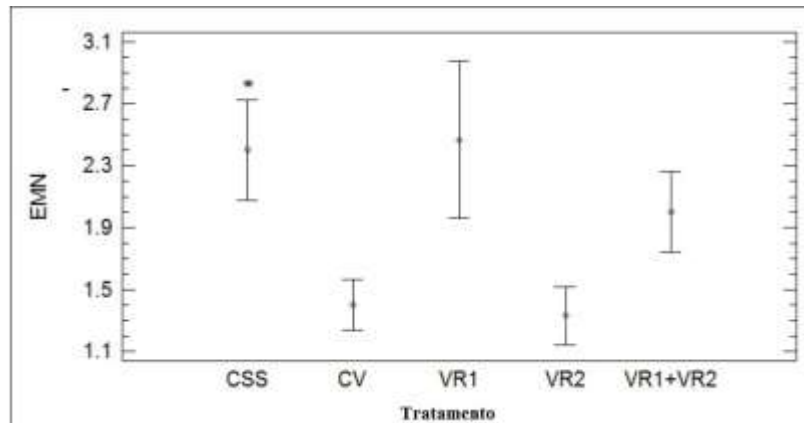


Figura 3. Valores dos eritrócitos micronucleados no sangue periférico (EMN/10.000 ET) de bezerros Holstein Freisan tratados. CSS: Salina, CV: Vetor sem inserto (pVAX1), VR1: Vacina recombinante codificada para PE11 (PE11/0,5 mg/mL plasmídeo *Micobacterium bovis* (*M. bovis*), VR2: Vacina recombinante codificada para PPE68 (PPE68/0,5 mg/mL de plasmídeo *M. bovis*, VR1+VR2 (PE11/0,25 mg/mL+PPE68/0,25 mg/mL) Os dados mostram erros médios e padrão CV, VR2 e VR1+VR2 vs CSS (P=0.02, Kruskal Wallis)*.

DISCUSSÃO

A raça vacinal Holstein Freisan como bioindicadora de genotoxicidade

Antes de avaliar a genotoxicidade de um agente por meio do teste de MN no sangue periférico num organismo que não foi testado como bioindicador de agentes genotóxicos, os valores espontâneos da referida espécie devem estar disponíveis (Zúñiga-González *et al.*, 2001). Na situação específica do gado, o valor espontâneo de EMN/10.000 eritrócitos descrito é de $2,4 \pm 1,7$ (erro médio e padrão) (Zúñiga *et al.*, 1996); e estudos experimentais de agentes genotóxicos são escassos. Foi encontrada apenas uma investigação que descreve o comportamento da raça Latvian Brown adulta, exposta a radiação eletromagnética, e observa-se que os valores de EMN foram $0,6/1.000$ vs. $0,1/1.000$ eritrócitos, nos animais não expostos (Balode, 1996). Para o caso específico da raça Holstein Friesian, não havia histórico, mas este grupo de trabalho encontrou valores EMN espontâneos de $2,6 \pm 1,98/10.000$ eritrócitos (erro médio e padrão) em animais friesianos de 9 meses de idade; valor muito semelhante ao descrito anteriormente por Zúñiga *et al.*, (1996); no entanto, neste último estudo, o sexo, raça ou idade do gado estudado não foi especificado. Os valores de EMN encontrados nesses animais supunham baixa eficiência, como bioindicadora de agentes genotóxicos, o que pode melhorar se trabalhar com bezerros mais jovens (Zúñiga *et al.*, 2001). Esses resultados motivaram a avaliação dos valores espontâneos das EMN e dos eritrócitos policromáticos (EPC) em bezerros da raça Holstein Freisan com idade entre 24 e 48 horas; de tal maneira que as amostras de sangue periférico foram coletadas de organismos recém-nascidos de diferentes raças, conforme observado na Tabela 2. De fato, foi confirmado que a idade dos animais determina os valores de EMN e EPC, e foi possível determinar que os animais mais jovens apresentam os valores mais altos e,

como observado na Tabela 2, esse padrão é repetido em bezerros das raças Simmental e Brown Suíço ([villa, et al., 2015](#)).

Esse fenômeno foi observado em outras espécies, uma vez que os valores espontâneos de EMN no sangue periférico de muitas espécies, como rato, esquilo e humano, dependem da maturação do baço, e o baço amadurece com a idade ([Zúñiga-González et al., 2001](#); [Batista-González et al., 2006](#)).

No presente estudo, pode-se observar que a frequência de EMN tende a diminuir com a idade (Tabela 2), o que concorda com o que já foi descrito ([Zúñiga-González et al.; 2001](#)). Por esse motivo, recomenda-se o uso de animais jovens, e este trabalho é um antecedente em pesquisas com bovinos; onde se pode ver claramente que a idade dos bovinos é um fator a considerar nos valores de EMN e EPC.

Tabela 2. Eritrócitos policromáticos e micronucleados espontâneos em diferentes raças de bezerros

Raças	n	Edade	EMN/10,000 ET	EPC/1000 ET	Referência
Holstein Friesian	13	9 m	1.6 ± 0.3	0	Este trabalho
	13	6 m	2.6 ± 0.5	0	Este trabalho
	5	24-48 h	7.4 ± 1.0	7.4 ± 2.3	Villa, et al., 2015
Brown Suíço	5	24-48 h	7.8 ± 0.7	9.0 ± 3.9	Villa, et al., 2015
Simmental	5	24-48 h	6.4 ± 0.7	11.8 ± 4.3	Villa, et al., 2015

n: tamanho amostra; h: horas; m: meses; EPC: Eritrócitos policromáticos; EMN: micronucleados; médias e erro padrão.

Efeito genotóxico na resposta imune de vacinas recombinantes em teste

O objetivo do projeto de [Barba et al., \(2013\)](#) foi propor novas vacinas recombinantes para o controle da tuberculose bovina. Após o desenho das vacinas em teste, elas foram limitadas pela disponibilidade de animais, pelo que foram decididos tamanhos reduzidos da amostra, a fim de avaliar o controle necessário e os grupos experimentais. Portanto, no presente estudo exploratório que descreve o efeito genotóxico, não foi possível ajustar o tamanho ideal da amostra.

Ao analisar o efeito genotóxico das vacinas recombinantes contra tuberculose, identificou-se que os valores de EMN eram menores com efeito dose-resposta nos grupos tratados com VR2; isso pode ser interpretado como um efeito citoprotetor ou antigenotóxico; no entanto, esses resultados devem ser tomados com cautela, pois há dois pontos a serem considerados:

- Primeiro deles foi o tamanho da amostra, que, embora o teste MN seja altamente sensível e não exija grandes tamanhos de amostra; o ideal seria trabalhar com mais de cinco animais por grupo, mas devido ao custo, tamanho e idade desses animais, apenas dois ou três bezerros por grupo estavam disponíveis; e isso pode ter distorcido os resultados.

-Segundo ponto é que, para determinar a genotoxicidade por meio do teste de micronúcleos nos eritrócitos do sangue periférico, deve-se considerar a atividade mitótica da medula óssea, avaliada pela presença ou ausência de EPC no sangue periférico. As EPC são glóbulos vermelhos jovens que têm no máximo 24 horas após serem liberados; isto porque a formação de MN é realizada durante o estágio anáfase-telófase da divisão celular; e se isso não ocorrer, os MNs não poderão se formar. No entanto, se houver divisão celular na medula óssea (mieloproliferação), o efeito micronucleogênico ou genotóxico das substâncias testadas pode ser facilmente observado; em oposição; se o último inibe a divisão celular (mielossupressão); isto é, se houver citotoxicidade, não será possível observar o aumento de EMN no sangue periférico (efeito genotóxico).

-Portanto, voltando à figura 3, onde se observa que os valores de EMN nos grupos VR2 e VR1+VR2 são inferiores aos do grupo CSS ($P=0,02$). O que pode realmente ter acontecido é que o uso de VR2 está afetando significativamente a medula óssea do bezerro, a ponto de ter induzido mielossupressão devido à atividade imune gerada. Entretanto, neste estudo não há como corroborar esse efeito pela técnica clássica, quantificando os glóbulos vermelhos policromáticos no sangue periférico, uma vez que bezerros com idade média de 6 a 9 meses não apresentam esse tipo de células (Tabela 2).

[Barba et al., \(2013\)](#), em paralelo demonstraram que a vacina de DNA pVAX1-PPE68 (VR2) construída e avaliada em bovinos da raça Holstein Freisan, induziu a produção de citocinas IFN- γ (proteínas produzidas por imunócitos; em resposta a um antígeno) , geralmente viral) em animais vacinados acima dos níveis de referência, mas foi capaz de induzir a produção de anticorpos direcionados contra proteínas que reagem cruzadamente em extratos celulares completos de *M. bovis* BCG; ao contrário da vacina recombinante pVAX1-PE11 (VR1), que não induziu uma resposta imune mediada por IFN- γ , pelo menos em níveis detectáveis pelo kit comercial usado [Barba et al., \(2013\)](#). Em outras palavras, somente a vacina VR2 produziu uma resposta imune e também uma alteração na frequência das células micronucleadas (somente a vacina VR2 teve efeito sobre esse biomarcador); mesmo quando a dose administrada era metade, a resposta era de 50%, menor em relação ao grupo tratado com solução salina (CSS), conforme observado na figura 3. Isso indica que o VR2 produz um efeito na medula óssea, de tal forma que afete a formação de EMNs. Daí resulta que a atividade imunológica mais provável induzida pela vacina VR2 também causa mielossupressão.

Este estudo, embora preliminar; além de ter demonstrado um efeito dose-resposta das vacinas recombinantes contra tuberculose, também levanta uma grande questão: as vacinas recombinantes contra tuberculose podem ter a mielossupressão como efeito colateral? Vale ressaltar que a versatilidade do teste de micronúcleos nos eritrócitos do sangue periférico também permite avaliar o efeito mielossupressor das vacinas recombinantes.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, embora preliminar, tenha produzido resultados muito valiosos, um efeito de resposta à dose de VR2 foi detectado na formação de EMN; no entanto, os resultados podem ser mascarados por uma possível mielossupressão (citotoxicidade), efeito que não foi corroborado, uma vez que os bovinos nessa idade média de 9 meses não apresentam eritrócitos policromáticos no sangue periférico; sugere-se trabalhar com bovinos com menos de um mês e um número maior de animais. Esses achados nos motivam a continuar investigando a indução da instabilidade genômica e citotoxicidade das vacinas em geral e, em particular, contra a tuberculose, uma vez que seu papel na medula óssea e na integridade do material genético é desconhecido, tanto em organismos experimentais quanto em fazenda.

LITERATURA CITADA

BALODE Z. 1996. Assessment of radio-frequency electromagnetic radiation by the micronucleus test in Bovine peripheral erythrocytes. *Science of the Total Environment*. 180(1): 81-85. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04923-1](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04923-1)

BARBA J, Flores-Valdez MA, Aceves-Sánchez MJ, Pacheco-Gallardo C, Álvarez AH, González-Aguilar D. 2013. A DNA Vaccine Containing PPE68 Induces Humoral Response in Cattle. *Intern J Appl Res Vet Med*. 11 (2):96-99. https://www.researchgate.net/publication/251231209_A_DNA_vaccine_containing_PPE68_induces_humoral_response_in_cattle

BATISTA GC, Corona RR, Gómez MBC, Zamora PAL, Ramos IML, Zuñiga G. 2006. Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. *Rev Biomed*. 17: 11-16. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio061c.pdf>

CARRIOSA UJ, Flores VE, Gutiérrez RJA, Juárez LNO. 2015. Evaluación del grado de concordancia entre los resultados del examen histopatológico y del cultivo bacteriológico en el diagnóstico de tuberculosis bovina en México. *Veterinaria México OA*. 2(3): 1-12. ISSN: 2448-6760. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-67602015000300002

CASTAÑEDA-Yslas JI, Arellano-García ME, García-Zarate MA, Balam Ruíz-Ruiz B, Zavala-Cerna MG, Torres-Bugarín O. 2016. Biomonitoring with micronuclei test in buccal cells of female farmers and children exposed to pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, México. *Journal of Toxicology*. 2016:1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/7934257>

CEDANO DA, Martínez GS, Escalera VF, Salgado MS, Carrillo DF, Macías CH, Peña PB. 2012. La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. *Abanico Veterinario*. 2(2):43-52. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44884>

CORDERO CAM, Gil PR, Gil de MA. 2013. Actualización de las nuevas vacunas frente a la tuberculosis. *Medicina respiratoria*. 6(1):45-52. <http://www.neumologiaysalud.es/descargas/R6/R6-6.pdf>

CRISTALDI M, Leardi LA, Udroui I, Zilli R. 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutat Res*. 559:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.10.021>

DAUGELAT S, Kowall J, Mattow J, Bumann D, Winter R, Hurwitz R, Kaufmann SH. 2003. The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization. *Microbes Infect*. 5(12):1082-95. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00205-3)

FLORES SHO. 2012. Prevalencia y pérdidas económicas provocadas por tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en una planta faenadora de la Región de Los Lagos, 2006 – 2010. *Boletín Veterinario Oficial*. 14: 1-16. https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_15_I_semestre_2012/articulos_PDF/regiones/prevalencia_TB_tesis_HFlores.pdf

FONTALVO RIVERA D, Gómez Camargo D. 2015. Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *MÉD.UIS*. 28(1):39-51. <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a04.pdf>

GOODING MR, Brook RK. 2014. Modeling and mitigating winter hay bale damage by elk in a low prevalence bovine tuberculosis endemic zone. *Preventive Veterinary Medicine*. 114(2):123-131. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.005>

GRANGE JM. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*. 81(1-2): 71-77. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0263>

HAYASHI M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate Jr M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research Letters*. 245(4):245-249. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B)

HERRERA LE, Estrada CC, Díaz MDM, Huitron NG. Femat FAR. 2008. Oportunidades para modelar y controlar enfermedades que afecta al ganado bovino en México. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/3417>

HIGAREDA-de Sales LG, Ramírez CFJ, Razo IF, Milián SF, Aguilar TG, Herrera-RSE. 2015. Potencial presencia de tuberculosis zoonótica en la región Altos Sur de Jalisco, México. *Rev Sal Jal.* 2(1):25-29. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=77291>

HIMSWORTH CG, Elkin BT, Nishi JS, Tasha Epp T, Lyashchenko KP, Om Surujballi O, Turcotte C, Esfandiari J, Greenwald R, Leighton FA. 2010. Comparison of test performance and evaluation of novel immunoassays for tuberculosis in a captive herd of Wood bison naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Wildlife Diseases.* 46(1): 78-86. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.78>

MARTÍNEZ JC, Llerena C, Valbuena YA. Importancia de Investigar *Mycobacterium bovis* en muestras clínicas de procedencia humana. 2019. *Biomédica, Revista del Instituto Nacional de Salud.* 39 (Sp 1). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4358>

NOM-062-ZOO-1999, NORMA Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>

OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina.1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 19962019. <https://www.uss.cl/wp-content/uploads/2014/12/Gui%CC%81a-para-el-Cuidado-y-Uso-de-los-Animales-de-Laboratorio.pdf>

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, proteger a los animales, preservar nuestro futuro) 2020. Tuberculosis bovina. <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina>.

ORTIZ MEP. 2015. Tuberculosis bovina: un problema aún sin resolver. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias.* 4(8):162-169. <https://doi.org/10.23913/ciba.v4i8.32>. <http://ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/32>

PRONABIVE (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, Gobierno de México). 2018. Tuberculosis bovina en México. <https://www.gob.mx/pronabive/articulos/tuberculosis-bovina-en-mexico>

TORRES-Bugarin O, Ramos IML, Ruíz BS, Flores GA, Zavala MG. 2015. La Prueba de micronúcleos: Biomarcador de contaminación genotóxica, mutagénica y/o teratogénica. En: Botello AV, Páez-Osuna F, Mendez-Rodriguez L, Betancourt-Lozano, M, Álvarez-Borrego S, Lara-Lara R. Ed. Pacífico Mexicano. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. UAC, UNAM-ICMYL, CIAD-Mazatlán, CIBNOR, CICESE, México. Pp. 819-848. ISBN: 978-607-7887-94-2

VAN DER HEIJDEN EMDL, Chileshe, Vernooij JJCM, Gortazar C, Juste RA, Sevilla I, Crafford JE, Rutten VPMG, Miche AL. 2017. Immune response profiles of calves following vaccination with live BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccine candidates. *PLoS ONE*. 12(11):1-20. e0188448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188448>

VILLA CASTELLANOS JS, Ramos-Ibarra ML, Barba León J, Mario Flores Valdez M, Torres-Bugarín O. 2015. Frecuencia de eritrocitos micronucleados en becerras expuestas a vacunas recombinantes y en terneros no expuestos al biológico. En Carvajal S, García Sahagún ML. *Progreso en las Ciencias Biológico - Agropecuarias 2014*. Editorial Universidad de Guadalajara. Pp. 129.
http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files//adjuntos/xxv_snicyt_20150503_1113.pdf

ZÚÑIGA G, Torres-Bugarin O, Ramírez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. 1996. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 369:123-127. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90056-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90056-7)

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ G, Torres-Bugarín O, Zamora-Peréz A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D, Gallegos-Arreola MP. 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. 494:161-67. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00180-2)