

## AÇÃO DOS SUCOS DIGESTIVOS SOBRE A ABSORÇÃO E DESTINO DO BCG ORAL

Rodnei C. Mortatti<sup>1</sup>, Luiz Carlos S. Maia<sup>2</sup> e Leila Fonseca<sup>1</sup>

*Estudou-se a ação do suco gástrico artificial e suco duodenal humano sobre a vacina BCG, bem como a absorção e destino desta após administração intragástrica em camundongos. O contato de 2 horas do bacilo com o suco gástrico provocou uma diminuição significativa do consumo de oxigênio e uma moderada perda da viabilidade. O suco duodenal induziu marcante decréscimo da respiração bacilar e grande redução da viabilidade. O BCG foi marcado com carbono-14 usando-se <sup>14</sup>C-glicerol como precursor dos lipídios micobacterianos. Níveis similares de radioatividade foram obtidos nos órgãos dos animais, 24 horas após administração intragástrica de <sup>14</sup>C-BCG, <sup>14</sup>C-BCG rompido por ultra-som e <sup>14</sup>C-glicerol. Os níveis de <sup>14</sup>C-BCG permaneceram estáveis do 6.º ao 24.º dia, enquanto o sonicado de <sup>14</sup>C-BCG e <sup>14</sup>C-glicerol definiram um processo de decaimento biológico. As curvas de biodecaimento no intestino delgado e no fígado indicaram que o processo de absorção foi desencadeado rapidamente e alcançou seu nível máximo às 24 horas, decaindo em seguida de acordo com a complexidade química do material dado aos camundongos. Não foram isolados bacilos viáveis dos órgãos dos animais que receberam BCG não marcado. Pode-se concluir, portanto, que a maioria dos bacilos foram absorvidos intactos mas não viáveis.*

Palavras-chaves: Micobactéria. BCG oral. Sucos digestivos. Carbono-14. Absorção. Biodisponibilidade.

De 1921 até poucos anos atrás, a vacina BCG foi administrada pela via oral a milhões de pessoas, na tentativa de induzir proteção contra a tuberculose. Devido a razões operacionais e econômicas, esta via foi abandonada sem uma conclusão final sobre sua absorção gastrointestinal. Todavia, resposta de hipersensibilidade retardada ao PPD após administração oral do BCG em humanos<sup>12 18 20 23</sup> e cobaios<sup>8 19</sup> tem sido aceita como evidência da relevância do BCG oral para o sistema imune. Recentemente, administração de BCG oral como um estimulante imunológico inespecífico, foi estendida à imunoterapia do câncer em modelos animais<sup>45 28</sup> e pacientes humanos<sup>16 25 29</sup>. Melhoria do estado imunológico de pacientes com câncer avançado pode ser alcançado sem reações adversas, mesmo após doses maciças de BCG oral<sup>30</sup>.

Após doses orais repetidas, poucas unidades viáveis de BCG foram recuperadas de órgãos de

cobaios, camundongos e humanos, e interpretados como uma evidência de sua absorção pelo trato gastrointestinal<sup>6 8 21 28</sup>. Contudo, a sensibilidade do BCG ao processo digestivo, a quantificação dos bacilos absorvidos e o seu destino no hospedeiro são questões que permanecem sem resposta. Na tentativa de examinar tais questões, nós tratamos BCG viável com os sucos digestivos *in vitro*, traçamos a biodistribuição de bacilos marcados com carbono-14 e enumeramos os bacilos viáveis nos órgãos dos camundongos.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Animais** – Foram usados camundongos SW55/Tor fêmeas, produzidas por acasalamento aleatório em colônias fechadas (Dr. S. T. Torres, Universidade Federal Fluminense, RJ). Os animais foram alimentados com ração granulada comercial e água acidificada *ad libitum*.

**Vacina BCG** – Foi usada a estirpe Moreau (Rio de Janeiro), produzida comercialmente pela Fundação Atauilho de Paiva. Esta estirpe vem sendo cultivada há vários anos na superfície de meio IVM que possui a seguinte composição por litro: citrato de sódio, 2g; sulfato de magnésio, 0,5 g; fosfato de potássio, 0,5 g; glutamato de sódio, 1g; pectona, 16,6 g; amido, 1 g; citrato férrico amoniacal a 15% (p/v), 0,4 ml e glicerol, 60 ml. Nos experimentos de marcação empregou-se também meio IVM sem adição de glicerol (IVM-GF).

1. Departamentos de Imunologia e Microbiologia Médica. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2. Fundação Atauilho de Paiva, Rio de Janeiro. Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Atauilho de Paiva.

Endereço para correspondência: Dr. Rodnei C. Mortatti, Deptº de Imunologia, Instituto de Microbiologia, UFRJ, CCS, Bloco I. 21941, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido para publicação em 10/3/86.

*Ação dos sucos digestivos sobre o BCG* – Suco gástrico artificial pH 1,92 foi preparado como descrito<sup>22</sup>. Suco duodenal pH 6,7 foi obtido por entubação gastroduodenal de doadores humanos. Diluiu-se 20 mg (1 ml) de vacina BCG líquida em 2 ml de suco gástrico (pH final 3,2) ou suco duodenal (pH final 7,2) ou ainda tampão de fosfatos-salina (PBS, pH 7,4) e inoculou-se em frascos de Warburg. O consumo de oxigênio foi medido ao cabo de 30, 60 e 120 minutos a 37°C em 3 a 8 réplicas, por técnica padrão de Warburg. Para estimar a viabilidade após 30 e 120 min., 0,1 ml da mistura de reação foi diluída em solução salina isotônica até 1:100.000, 1:200.000 e 1:400.000, inoculada em 5 a 10 réplicas em meio de Ogawa e incubadas a 37°C por 6 semanas. Quando se contou o número de partículas viáveis, os resultados foram computados para análise de variância e os valores de probabilidade calculados por teste-t entre as médias<sup>3</sup>.

*Marcação do BCG* – BCG marcado com carbono-14 foi preparado como descrito para *Mycobacterium phlei*<sup>27</sup>, mas com as seguintes modificações: inoculou-se 100 mg (peso seco) de vacina líquida em 10 ml de meios IVM ou IVM-GF, contendo 250  $\mu$ Ci de 1,3-<sup>14</sup>C glicerol (New England Nuclear, NEN, Mass., USA, atividade específica 40,8 mCi/mmol) e incubou-se a 37°C sob agitação leve e constante. Após 14 dias, os bacilos foram colhidos por centrifugação e lavados (10.000 xg, 15 min., 4°C) com água destilada, até que a contagem do líquido sobrenadante fosse reduzida ao nível daquela obtida com água destilada. O rendimento de marcação e a atividade específica do BCG marcado foram calculados em amostras solubilizadas com hidróxido de amônio quaternário 0,5 M (Protosol, NEN, USA) a 55°C por 18 horas de acordo com instrução do fabricante. As amostras digeridas foram diluídas em Econofluor (NEM, USA) e contadas (Beckman 3155P cintilador líquido).

*Experimentos de absorção* – Três grupos de 18 animais receberam os seguintes tratamentos intragástricos: 5 mg (0,45  $\mu$ Ci) de <sup>14</sup>C-BCG, 2,5 mg (0,23  $\mu$ Ci) de <sup>14</sup>C-BCG rompido pelo ultra-som por 15 min. em disruptor sônico (Heat System Ultrasonics, N.Y., USA) como descrito<sup>11</sup> e 0,25  $\mu$ Ci de <sup>14</sup>C-glicerol. Todas as soluções foram diluídas em salina isotônica e administradas através de sonda gástrica para alimentação de prematuros (Sherwood Inc. USA). Os animais sangrados pelo plexo axilar no 1º, 6º, 12º e 24º dias após o tratamento tiveram os intestinos, fígado, gânglios mesentéricos, baço e pulmões removidos. Os órgãos foram lavados com salina isotônica, cortados, fixados em formalina tamponada pH 7,2 e pesados após adsorção do líquido em excesso. Diversas amostras dos órgãos, incluindo duodeno, íleo (contendo placas de Peyer), ceco e região coloretal foram

removidas. As amostras de sangue foram preparadas por digestão com mistura 1:2 Protosol: etanol por 1 hora a 60°C, de acordo com as instruções dos fabricantes. As amostras de órgãos foram solubilizadas com Protosol por 48 horas a 55°C. As amostras foram, em seguida, diluídas em Biofluor (NEN) e contadas. A percentagem de recuperação foi calculada pela adição das leituras das amostras dos órgãos e projetadas para o peso total dos órgãos. Os resultados foram representados como percentagem da dose administrada. Para determinar a taxa de decaimento biológico, os dados sobre a recuperação total, do fígado e do intestino delgado foram tratados por análise de regressão curvilínea<sup>26</sup>.

*Contagem de unidades viáveis de BCG nos órgãos* – Um, 6, 12 e 24 dias após a instilação intragástrica de 5 ou 50 mg de vacina BCG líquida, grupos de 3 animais selecionados aleatoriamente foram sacrificados tendo os pulmões, fígado, baço e gânglios mesentéricos removidos assepticamente e homogenizados em gral de vidro com pistilo de teflon acoplado a motor de alta rotação, em 5 ml de salina estéril contendo 0,2% de soroalbumina bovina (nº a-4503, Sigma Chemical Co., MO., USA). Nos fragmentos de intestinos, as fezes foram expelidas com 30 ml de salina estéril antes da homogeneização. Diluições apropriadas do homogenado foram semeados em agar Middlebrook 7H10, contendo 20  $\mu$ g de ácido nalidixico, 10  $\mu$ g de anfotericina B e 50 U de penicilina por ml. As placas foram incubadas em embalagens seladas por 4 semanas a 37°C. Amostras de 0,1 ml de sangue foram também incubados em agar 7H10. Determinou-se a viabilidade dos inóculos orais pela contagem de unidades viáveis imediatamente após a administração intragástrica, semeando-se diluições adequadas do inóculo (fator de 10) em placas de agar 7H10 contendo antibióticos, como indicado acima.

## RESULTADOS

*Ação dos sucos digestivos sobre o BCG* – Antes de embarcar no estudo da absorção gastrointestinal de *Mycobacterium bovis* BCG, pareceu interessante estudar o comportamento das células bacterianas quando tratadas pelo suco gástrico (SG) e suco duodenal (SD). A atividade inibitória do SG e SD sobre a vacina BCG é mostrada na Figura 1. Foi de 0,019  $\mu$ moles/mg a taxa de consumo de oxigênio pelos bacilos após contato de 30 min. com o SG enquanto o BCG incubado em PBS consumiu 0,027  $\mu$ moles/mg ( $p < 0,05$ ). Não se achou alteração da viabilidade dos bacilos ao fim desse tempo (Tabela 1). Os bacilos toleraram esse tratamento até 60 min., quando o consumo de oxigênio foi similar ao BCG em PBS (0,07  $\mu$ moles/mg). O sofrimento bacteriano se

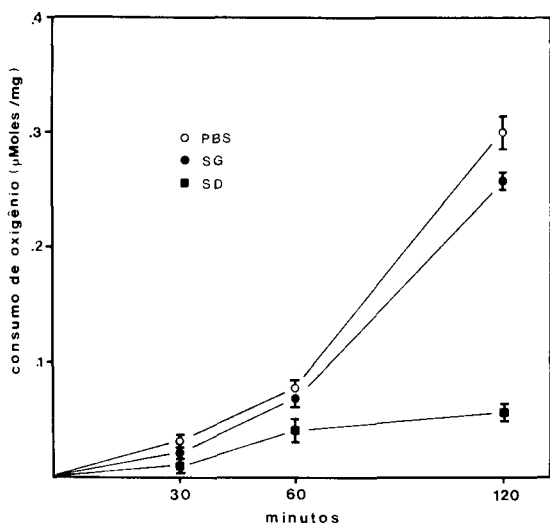


Fig. 1 – Consumo de oxigênio pelo BCG durante tratamento com suco gástrico (SG) e suco duodenal (SD).

tornou detectável aos 120 min., com consumo de oxigênio de 0,258  $\mu$ moles pelo SG-BCG comparado com 0,3  $\mu$ moles pelo PBS-BCG ( $p < 0,05$ ). A viabilidade nesse momento foi  $7,1 \times 10^5$  partículas viáveis por mg, o que significou uma redução de 40% na sobrevivência ( $p < 0,05$ , Tabela 1).

O suco duodenal foi mais danoso para célula de BCG que o suco gástrico. Após 30 min de contato, BCG consumiu 0,01  $\mu$ moles de  $O_2$  por mg, menos que a metade de PBS-BCG ( $p < 0,001$ ). Esta alteração não induziu perda da viabilidade como mostra a contagem de bacilos viáveis na Tabela 1. Até 60 min. de incubação com SD, houve suficiente aumento da respiração celular para manter a diferença dos controles em torno de 50% ( $p < 0,001$ ). Intenso sofrimento bacteriano foi evidenciado dos 60 aos 120 min. de contato com o SD, com decréscimo de 80% no consumo de  $O_2$  (0,058  $\mu$ moles/mg) quando comparado aos controles ( $p < 0,001$ ), resultando em drástica redução na contagem de partículas viáveis (65%,  $p < 0,005$ , Tabela 1).

Tabela 1 – Viabilidade de BCG após tratamento com PBS, suco gástrico (SG) e suco duodenal (SD)<sup>a</sup>

BCG em. <sup>b</sup>	Contagem de viáveis ( $\times 10^6$ ) após:		
	30 min.	120 min.	Mortalidade
PBS	1,9 $\pm$ 0,55 <sup>c</sup>	2,3 $\pm$ 0,50	0
Suco gástrico	1,21 $\pm$ 0,39	0,71 $\pm$ 0,18	40%
Suco duodenal	3,2 $\pm$ 0,55	1,2 $\pm$ 0,32	65%

<sup>a</sup> Contagem de viáveis realizada em meio de Ogawa 6 semanas após a inoculação. Os controles de tempo zero não foram diferentes das contagens de 30 min.

<sup>b</sup> 6mg de BCG por ml. O pH final da reação em PBS, SG e SD foi 7,4, 3,2 e 7,2 respectivamente.

<sup>c</sup> Média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças de sobrevivência foram significantes em cada grupo de tratamento ( $p < 0,05$ , análise de variância).

**Marcação de BCG** – Como é mostrado na Tabela 2, bacilos crescendo em meio IVM completo (contendo 6% de glicerol não marcado) incorporaram 0,002  $\mu$ moles de  $^{14}C$ -glicerol (rendimento de marcação = 0,2%). Em meio IVM-GF a incorporação aumentou 18 vezes, alcançando 0,22  $\mu$ moles de  $^{14}C$ -glicerol por cada 100 mg de BCG (3,6% de rendimento). O destino dos carbonos assimilados foram discutidos alhures<sup>27</sup> mas a maioria das moléculas com carbono-14 está associada aos lipídios micobacterianos.

**Absorção e destino do  $^{14}C$ -BCG** – A absorção total e a biodistribuição de  $^{14}C$ -BCG em camundongos tratados pela via oral estão resumidas na Tabela 3. A absorção total foi considerada como a soma das leituras obtidas em todos os órgãos nas primeiras 24

horas. A Tabela 3 assinala a alta recuperação obtida no fígado e intestino delgado, em contraste com as recuperações nos demais órgãos. Observando estes dados, duas importantes questões devem ser formuladas. Primeiro, quais eram as condições de integridade celular do BCG após o evento absorptivo, tendo em mente a ação lesiva dos sucos digestivos. Segundo, se o patamar alcançado pelo  $^{14}C$ -BCG no fígado entre os dias 6 e 24 (diferenças mostradas não são significantes) estaria mantido pelo BCG inteiro ou por seus produtos de digestão. Com o fito de elucidar estas questões, dois controles foram introduzidos: o consumo de  $^{14}C$ -BCG para simular a digestão parcial e o  $^{14}C$ -glicerol para representar a solubilização total dos lipídios micobacterianos. A Figura 2 mostra que 5% da radioatividade administrada com  $^{14}C$ -BCG foi

Tabela 2 – Incorporação de  $1,3-^{14}C$  glicerol pelo BCG em meios IVM e IVM-GF<sup>a</sup>.

	IVM <sup>b</sup>	IVM-GF <sup>c</sup>
Contagem <sup>d</sup> (cpm/mg)	4.500	167.000
Atividade (dpm/mg)	4.600	200.000
Atividade específica. ( $\mu$ Ci/mg)	0,002	0,09
Rendimento (%)	0,2	3,6

<sup>a</sup> Culturas de 14 dias a 37°C sob permanente agitação.

<sup>b</sup> Contendo 6% de glicerol não marcado

<sup>c</sup> Meio sem glicerol

<sup>d</sup> Contagens radioativas realizadas em cintilador líquido Beckman 3155P a 25°C

Eficiência de contagem para  $^{14}C$  = 98%

Tabela 3 – Biodistribuição de  $^{14}C$ -BCG administrado intragastricamente em camundongos<sup>a</sup>

	Dias			
	1	6	12	24
Recuperação total	5,51 ± 0,40 <sup>b</sup>	1,65 ± 0,19	1,49 ± 0,05	1,43 ± 0,04
Fígado	1,98 ± 0,53	0,55 ± 0,11	0,50 ± 0,13	0,64 ± 0,01
Baço	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,15 ± 0,06
Gânglios mesentéricos	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Intestino delgado	2,12 ± 0,21	0,49 ± 0,06	0,33 ± 0,09	0,27 ± 0,06
Intestino grosso	0,077 ± 0,11	0,26 ± 0,09	0,23 ± 0,07	0,13 ± 0,02
Pulmões	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Sangue <sup>c</sup>	0,31 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,02

<sup>a</sup> Animais receberam 5mg (0,45 $\mu$ Ci) de  $^{14}C$ -BCG por via intragástrica.

<sup>b</sup> Percentagem da dose administrada. Média ± erro padrão da média.

<sup>c</sup> Corrigido para 1,5 ml (volume médio do sangue total de camundongos).

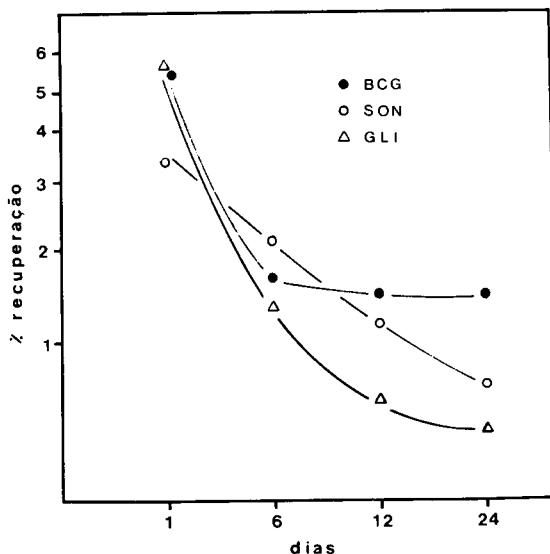


Fig. 2 – Recuperação total e decaimento biológico do  $^{14}C$ -BCG,  $^{14}C$ -BCG sonificado e  $^{14}C$ -glicerol após administração intragástrica em camundongos.

recuperada nos órgãos após 24 horas, caindo a 1,5% pelo dia 6 e permanecendo estável até o 24º dia. Se sonificado, o  $^{14}C$ -BCG teve um menor nível de absorção e mostrou um processo regular de biodecaimento (decaimento exponencial,  $r^2 = 0,998$ ) com 4% de radioatividade recuperada no 1º dia e 0,5% no 24º dia. O decaimento do  $^{14}C$ -glicerol foi rápido (função potência,  $r^2 = 0,990$ ) mostrando 6% no dia 1 e reduzindo-se 12 vezes e 20 vezes nos dias 12 e 24 respectivamente.

Do intestino delgado foram recuperados no 1º dia cerca de 2% da radioatividade administrada com  $^{14}C$ -BCG (Fig. 3). A atividade decaiu em função potência ( $r^2 = 0,940$ ) até 0,25% no 24º dia. Observou-se um padrão similar de decaimento com o sonificado de  $^{14}C$ -BCG ( $r^2 = 0,990$ ) dando 1,3% no 1º dia e 0,2% no 24º dia. O biodecaimento do  $^{14}C$ -glicerol foi rápido (função potência,  $r^2 = 0,980$ ), dando leituras de 2% no dia 1 e caindo a níveis praticamente indetectáveis após o 12º dia. O padrão potência das curvas de biodecaimento mostra que o intestino delgado é um órgão de passagem, com pouca capacidade de retenção para as células BCG inteiras ou de seus produtos derivados.

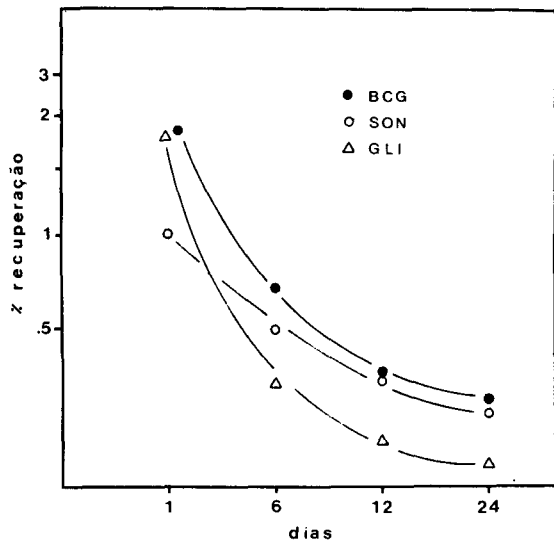


Fig. 3 - Recuperação e decaimento biológico do  $^{14}\text{C}$ -BCG,  $^{14}\text{C}$ -BCG sonicado e  $^{14}\text{C}$ -glicerol no intestino delgado de camundongos após administração intragástrica.

Fimdo o 1º dia, a radioatividade detectada no fígado dos animais tratados pelo  $^{14}\text{C}$ -glicerol compreenderam cerca de 2% da dose administrada (Fig. 4),

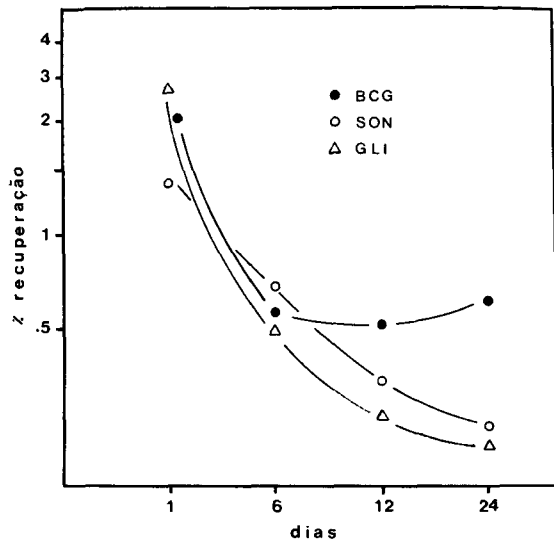


Fig. 4 - Recuperação e decaimento biológico do  $^{14}\text{C}$ -BCG,  $^{14}\text{C}$ -BCG sonicado e  $^{14}\text{C}$ -glicerol no fígado de camundongos após administração intragástrica.

enquanto  $^{14}\text{C}$ -BCG sonicado mostrou 1,4%. Nos dias subsequentes, o  $^{14}\text{C}$ -glicerol decaiu continuamente em função potência ( $r^2 = 0,990$ ). Já o  $^{14}\text{C}$ -BCG sonicado

decaiu exponencialmente ( $r^2 = 0,960$ ) porque, sendo uma mistura de diversos compostos e macroagregados está, provavelmente, sofrendo diferentes processos de eliminação. Foram consideradas desprezíveis a quantidade de radioatividade de ambos os produtos achados no 24º dia. Em contraste,  $^{14}\text{C}$ -BCG alcançou um patamar do 6º ao 24º dias, provendo leituras constantes em torno de 0,5%.

*Contagem de unidades viáveis de BCG nos órgãos* - A despeito da inclusão do sonicado de  $^{14}\text{C}$ -BCG e do  $^{14}\text{C}$ -glicerol como controles para o estudo da absorção de BCG, argumenta-se que a enumeração de bactérias usando recuperação de radioatividade em diferentes órgãos, não expressa o número real de bacilos BCG viáveis nos órgãos. Por conseguinte, foram contadas as partículas viáveis no fígado, pulmões, baço, intestinos, linfonodos mesentéricos e sangue. Realizaram-se esses experimentos por 3 vezes, dois dos quais com inóculo de 5 mg de BCG e um outro usando inóculo de 50 mg de BCG. Em nenhuma ocasião, partículas viáveis de BCG puderam ser recuperadas dos órgãos ou do sangue.

## DISCUSSÃO

Diversos relatos<sup>6 8 9 15 21 28</sup> têm mostrado que uma porção significativa de BCG viável administrado oralmente pode alcançar o intestino delgado, mas poucos bacilos passam pelas placas de Peyer e alcançam os demais órgãos. Todavia, a influência do processo digestivo na sobrevivência dos bacilos não fora ainda estudada.

Os resultados relatados aqui mostram um efeito nocivo, tempo-dependente, do suco gástrico sobre a vacina BCG. Experimentos de respiração bacilar mostraram que a ação lesiva do suco gástrico pode ser tolerada por, no máximo, 1 hora sem perda significativa da viabilidade. Contudo, o intenso dano induzido pelo suco duodenal sobre o BCG sugere que vários fatores, além do baixo pH, devem estar implicados na sobrevivência dos microorganismos dentro do trato digestivo. Ainda que o efeito nocivo do suco duodenal comece logo aos 30 min de contato provocando uma intensa depressão da respiração bacilar, o BCG pode sobreviver sem significativa redução da viabilidade se transferido para meio de cultura fresco. Entre 1 a 2 horas de contato com suco duodenal, as alterações metabólicas dos bacilos se tornam irreversíveis e a viabilidade cai fortemente.

Os estudos sobre a absorção de material marcado com carbono-14 indicam que  $^{14}\text{C}$ -BCG viável ou tratado pelo ultra-som e o  $^{14}\text{C}$ -glicerol são absorvidos em proporções similares e prontamente recuperados dos órgãos dos camundongos ao fim do 1º dia. As diferenças na persistência de cada produto dentro do organismo são percebidas comparando a inclinação

das curvas de biodecaimento. As diferenças dos padrões de decaimento podem ser correlacionadas à natureza ou complexidade química de cada material. O nível estável mantido do 6º ao 24º dia, correspondeu a terça parte da radioatividade total recuperada no 1º dia e sugere que, pelo menos, a integridade bacilar foi mantida após absorção. Esta proporção concorda com a proporção do BCG que sobreviveu ao tratamento com suco duodenal. Graus variáveis de persistência foram também vistos traçando o biodecaimento no intestino delgado. É importante enfatizar que o biodecaimento do intestino delgado pode ser interpretado como sendo o evento absorptivo das células de BCG viáveis ou de seus produtos.

Publicações prévias enfatizaram o importante papel do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) na absorção de material particulado<sup>13 14</sup>. A camada epitelial do GALT é penetrável por material particulado, que é subsequente fagocitado pelos macrófagos da zona subepitelial. É necessário longa exposição para se obter grande quantidade de partículas de carvão ou de látex em macrófagos subepiteliais<sup>12 13</sup>. A presença de partículas de látex de poliestireno em células epiteliais, lâmina própria e sinusóides hepáticos pode ser demonstrada poucas horas após instilação gástrica em ratos<sup>24</sup>. Entretanto, achou-se nos gânglios linfáticos mesentéricos e outros órgãos apenas uma pequena porção de tal material particulado. Células viáveis de *Salmonella enteritidis* foram detectadas na mucosa ileal, bem como em suas placas de Peyer 12 horas após administração oral em camundongos. Os gânglios de drenagem foram alcançados 48 horas mais tarde, mas não se achou salmonela no fígado e baço antes de 54 horas após a inoculação<sup>7</sup>. De outro modo, a invasão de tecido e a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* nos intestinos após inoculação oral, parece estar restrita a placas de Peyer, posto que nenhum organismo pode ser cultivado da mucosa intestinal livre das placas de Peyer<sup>17</sup>. Similarmente, somente 48 horas após administração oral foi possível o isolamento de *L. monocytogenes* do fígado e do baço. Nossos dados mostram que o processo absorptivo do <sup>14</sup>C-BCG e seus derivados no intestino delgado, é suficientemente vigoroso para induzir altas contagens no fígado 24 horas depois e parece ser independente da viabilidade bacilar. Como a passagem do BCG através do trato intestinal não se completou até 24 horas, parece que parte do BCG ou seus produtos podem ser retidos em macrófagos intestinais. É possível que a absorção do BCG ocorra através das células epiteliais. Sua fácil detecção no fígado 24 horas mais tarde, a níveis comparáveis ao <sup>14</sup>C-glicerol consubstancia esta afirmação. A quantidade desprezível de radioatividade achada nos gânglios mesentéricos durante os experimentos, indica que o BCG e seus produtos podem alcançar a corrente sanguínea por drenagem

linfática do sítio absorptivo em direção ao canal torácico, por alguma derivação que exclua os gânglios mesentéricos ou por via desconhecida. É de esperar-se que, se o BCG penetrasse nos linfonodos, seriam certamente seqüestrados e fagocitados pelos macrófagos ganglionares. Não pode ser excluída a possibilidade da absorção do BCG pela migração de macrófagos contendo bacilos da lâmina própria ou zona subepitelial para a circulação sistêmica. Isto seria, contudo, um fenômeno retardado que poderia ocorrer após o pico absorptivo do 1º dia.

O nível patamar mantido por 18 dias poderia ser explicado pela presença de BCG intacto no fígado, mas não significa necessariamente que os bacilos estariam vivos. Na verdade, nós achamos que bacilos viáveis estavam ausentes dos órgãos dos animais tratados. Ainda que alguns relatos tenham mostrado que BCG administrado por via oral possa ser recuperado de diferentes órgãos, o assunto é ainda controverso. Nossos dados concordam com recente publicação mostrando recuperação de pouquíssimas partículas viáveis de BCG no fígado de camundongos, submetidos semanalmente a doses maciças de BCG<sup>28</sup>. Em adição, Gernez-Rieux e cols<sup>10</sup> não foram capazes de recuperar BCG viável de linfonodos mesentéricos, de pacientes neoplásicos submetidos a doses altas de BCG oral, a despeito do número significativo de bacilos viáveis no suco intestinal.

Tokunaga e cols<sup>28</sup> mostraram que os macrófagos infiltram as placas de Peyer após administração de BCG oral. Os eventos imunológicos que seguem a infiltração de macrófagos nas placas de Peyer não estão bem estabelecidas, mas nossos resultados sugerem que as células fagocíticas poderiam ter restringido a infecção pelo BCG, quando estes estavam danificados pela ação dos sucos digestivos. Apesar de ser bem conhecida a propriedade do BCG oral de induzir reação positiva ao PPD em humanos e animais<sup>2 18 19 23</sup>, ainda não foi comprovado se esta resposta é equivalente ao nível de imunidade celular induzida pelo BCG vivo administrado por via intradérmica.

## SUMMARY

*The absorption and the biological routing of Mycobacterium bovis BCG vaccine following intragastric administration to mice was studied. A harmful action of gastric (GJ) and duodenal juices (DJ) on BCG cells in vitro was found. Treatment with GJ induced a significant decrease of the oxygen uptake and a moderate loss of viability, as expressed by the number of colony-forming units (CFU) of BCG. Severe decreases of bacilli respiration and a notable fall of CFU counts were detected during DJ treatment. The biorouting of BCG cells was determi-*

*ned using carbon-14 labelled bacilli. The labelling was accomplished through a metabolic precursor of mycobacterial lipids, <sup>14</sup>C -glycerol. The levels of radioactivity recovered at the first day in the organs of mice receiving either gastric instillation of <sup>14</sup>C-BCG, sonically disrupted <sup>14</sup>C-BCG or <sup>14</sup>C glycerol were very similar. Subsequently, sonicated <sup>14</sup>C-BCG and <sup>14</sup>C -glycerol were involved in a biological decay process, while the level of <sup>14</sup>C-BCG associated radioactivity remained stable in the organs from 6 to 24 days. Data on the biodecay from the small intestine and liver showed that absorptive events were fast enough to reach the highest level at 24 hours, dropping thereafter according to the complexity of the material given to the mice. In all instances, however, living BCG was not cultured from organs of mice given unlabelled BCG. The preceding data suggest that the great majority of BCG cells that passed the gut barriers were absorbed intact but not alive.*

Key words: Mycobacteria. Oral BCG. Digestive juices. <sup>14</sup>C-labelling. Absorption. Bioavailability.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Milton Fontes Magarão pelo seu esforço na provisão de financiamentos. Somos gratos também ao Dr. Hugo David por seus comentários e proveitosas críticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Assis A. Concurrent BCG vaccination. *Diseases of the Chest* 16:266-269, 1949.
2. Assis A. The oral application of BCG. *Advances in Tuberculosis Research* 8:105-122, 1957.
3. Bailey NTJ. *Statistical methods in biology*. John Wiley & Sons Inc. 5<sup>th</sup> edition, New York, 1959.
4. Baldwin RW, Hopper DG, Pimm MV. Influence of orally administered BCG on growth of transplantable rat tumors. *British Journal of Cancer* 31:124-128, 1975.
5. Bast RC, Bast BS. Critical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with nonspecific immunostimulants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 277:60-92, 1976.
6. Calmette A, Well-Halle B, Saenz A, Costil R. Demonstration expérimentale du passage de bacilles-vaccins BCG a travers la muqueuse de l'intestin chez l'enfant et chez le sing. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine* 110:203-206, 1933.
7. Carter PB, Collins FM. The route of enteric infection in normal mice. *Journal of Experimental Medicine* 139:1189-1203, 1974.
8. Gernez-Rieux C, Tacquet A, Fabre M, Gerard A, Voisin C. Absorption digestive du BCG chez les cobayes et les souris avant et après la vaccination. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille* 6:94-115, 1953-1954.
9. Gernez-Rieux C, Breton A, Tacquet A. Premiers essais d'absorption de BCG à dose massive et répétés chez les enfants allergiques. *Archives Françaises de Pédiatrie* 11:291-295, 1954.
10. Gernez-Rieux C, Breton A, Tacquet A, Gerard A, Fabre M, Piat M. Vaccination antituberculeuse par voie digestive chez les sujets allergiques. I. Étude expérimentale. II. Étude clinique. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie* 18:677-700, 1954.
11. Janicki BW, Wright Jr. GL, Good RC, Chaparas SD. Comparison of antigens in sonic and pressure cell extracts of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 13:425-437, 1976.
12. Joel DD, Laissue JA, LeFreve ME. Distribution and fate of ingested carbon particles in mice. *Journal of Reticuloendothelial Society* 24:477-487, 1978.
13. LeFreve ME, Olivo R, Joel DD. Accumulation of latex particles in Peyer's patches and their subsequent appearance in villi and mesenteric lymph nodes. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 159:298-302, 1978.
14. LeFreve ME, Hammer R, Joel DD. Macrophages of the mammalian small intestine: a review. *Journal of Reticuloendothelial Society* 26:553-573, 1979.
15. Lewis MG, Jerry LM, Rodwen TM, Phillips TM, Shibata H, Capek A. Some effects of oral administration of BCG on immune response in cancer patients. In: Lamoureaux G, Turcotte R, Portelance V (eds). *BCG in cancer immunotherapy*. Grune & Stratton, New York, p. 339-358, 1976.
16. MacDonald AS, Norvell ST, Bordutha IA. Effects of oral BCG in solid tumors. In: Lamoureaux G, Turcotte R, Portelance V (eds). *BCG in cancer immunotherapy*. Grune & Stratton, New York, p. 133-138, 1976.
17. MacDonald TT, Carter PB. Cell-mediated immunity of intestinal infection. *Infection and Immunity* 28:516-523, 1980.
18. Magarão MF, Brascher HM, Vargens JR, Mortatti RC, Lima AO. Imunidade humoral e celular em crianças vacinadas com BCG pela via oral. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 10:175-180, 1977.
19. Negre L, Bretey J, Roy D. Etude de l'allergie à la tuberculine chez le cobayes par ingestion de grosses doses de BCG. *Annales de L'Institut Pasteur* 98:1-6, 1960.
20. Olinto M. The Brazilian experience in prevention of tuberculosis with a concurrent method of BCG vaccination. *Pediatrics* 19:833-844, 1957.
21. Pasquier JF, Lucel Y. Preuve autoradiographique du passage intestinal chez la souris de bacilles BCG vivants et de bacilles tuberculeux bovins marques au <sup>14</sup>C administrés par voie digestive. *Comptes Rendus de Séances de la Société de Biologie* 155:1930-1940, 1961.
22. Remington JS, Melton ML, Jacobs L. Chronic toxoplasma infection in the uterus. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 58:879-883, 1960.
23. Rosemberg J. Present status of the oral BCG vaccination. *O Hospital* 42:15-20, 1952.
24. Sanders E, Ashworth CTA. A study of particulate intestinal absorption and hepatocellular uptake. *Experimental Cell Research* 22:137-145, 1961.
25. Shibata HR, Jerry LM, Lewis MG, Mansel PWA, Capek A, Marquis G. Immunotherapy of human ma-

- lignant melanoma with irradiated tumor cells, oral BCG and levamisole. *Annals of the New York Academy of Sciences* 277:355-366, 1976.
26. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*, 6<sup>th</sup> edition. The Iowa State University Press, Iowa, p. 447-471, 1976.
27. Tepper BS. Differences in the utilization of glycerol and glucose by *Mycobacterium phlei*. *Journal of Bacteriology* 95: 1713-1717, 1968.
28. Tokunaga T, Taguchi S, Chino F, Murohashi T. Immunotherapeutic trials of murine and guinea-pig solid tumors by oral administration of BCG. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 32:1-18, 1979.
29. Toma JM, Penderleith IH, Clements DV, Landi S. Observations in immunotherapy of lymphoma and melanoma patients. *Clinical and Experimental Immunology* 21:82-96, 1975.
30. Varella AD, Bandeira DC, Amorim AR, Calvis LA, Santos IO, Escalera N, Gentil F. Treatment of disseminated malignant melanoma with high-dose oral BCG. *Cancer* 48:1353-1362, 1981.