

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



***Mycobacterium bovis* BCG como imunobiológico: aplicações e interações
imunológicas bacilo-hospedeiro**

Tiffany Thurow Bunde

Pelotas, 2021

Tiffany Thurow Bunde

***Mycobacterium bovis* BCG como imunobiológico: aplicações e interações
imunológicas bacilo-hospedeiro**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Larré Oliveira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B942m Bunde, Tiffany Thurow

Mycobacterium bovis BCG como imunobiológico :
aplicações e interações imunológicas bacilo-hospedeiro /
Tiffany Thurow Bunde ; Thaís Larré Oliveira, orientadora.
— Pelotas, 2021.

70 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em
Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. BCG recombinante. 2. Imunidade treinada. 3.
Imunoterápico. 4. Tuberculose. I. Oliveira, Thaís Larré,
orient. II. Título.

CDD : 616.995

Tiffany Thurow Bunde

**“*Mycobacterium bovis* BCG como imunobiológico: aplicações e interações
imunológicas bacilo-hospedeiro”**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10/06/2021

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Thaís Larré Oliveira (Presidente da Banca)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Caroline Rizzi

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Karine Rech Begnini

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

A todos aqueles que contribuíram nesta caminhada,
Dedico.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Gisleia e Marcelo, por serem meus maiores exemplos de determinação e dedicação, por terem me mostrado que é possível realizar os nossos sonhos, pelo incentivo ao estudo desde pequena e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Essa conquista também é de vocês;

Ao meu primo Kerlon e minha vó Nilza, por estarem sempre ao meu lado e tornar a minha vida mais leve. Guardarei com muita gratidão todos os momentos vividos com vocês;

Aos demais familiares e amigos, principalmente a minha tia Ani, por sempre acompanhar cada etapa da minha vida, por comemorar cada conquista comigo, pelo apoio e amor incondicional;

Ao professor Odir Antônio Dellagostin, pela oportunidade de estágio, de fazer parte de um grupo de pesquisa, na qual aprendi muito, e pela iniciação da minha vida na ciência. Muito obrigada;

À minha orientadora, Thaís Larré Oliveira, por ser fundamental na realização deste trabalho. Por todo suporte prestado, por ser gentil e atenciosa a todo momento. És um exemplo de profissional;

Às minhas supervisoras de estágio, Natasha e Mara, por todos os ensinamentos transmitidos durante esses quatro anos. Pela cobrança, paciência e confiança em mim depositada para fazer parte dos projetos. Não tenho palavras suficientes para agradecer;

Aos demais amigos do Laboratório de Vacinologia, Michele, Amanda, Violetta, Sérgio, Tom, Amilton e, em especial, Carol. Pela convivência amigável, aprendizado e companheirismo ao longo destes anos;

Aos colegas e amigos da faculdade, por dividirem momentos que levarei para sempre comigo. Em especial, Carol, Luíza, Ana, Alice e Cristian, por serem grandes companheiros e incentivadores durante esta jornada;

As minhas amigas de longa data, Jéssica e Fernanda, por sempre se fazerem presentes em minha vida e por acreditarem em mim mais que tudo. Sou muito grata pela nossa amizade;

À Universidade Federal de Pelotas, ao curso de Graduação em Biotecnologia e aos professores pelo ensino público de qualidade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Muito obrigada!

*“Viver no mundo sem tomar consciência do seu significado é como vagar
por uma imensa biblioteca sem tocar os livros.”*

Dan Brown

Resumo

BUNDE, Tiffany Thurow. ***Mycobacterium bovis* BCG como imunobiológico: aplicações e interações imunológicas bacilo-hospedeiro**. 2021. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycobacterium bovis BCG foi derivada da cepa *Mycobacterium bovis* através de 231 passagens *in vitro* realizadas por Abert Calmette e Camille Guérin ao longo de 13 anos, dando origem ao nome BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Em 1921, o BCG foi administrado pela primeira vez em humanos como vacina contra tuberculose e demonstrou ser protetor contra a doença. Desde então, o bacilo continua sendo a única vacina licenciada contra tuberculose, protegendo contra formas extrapulmonares graves, mas com baixa eficácia contra a forma mais prevalente da doença, a tuberculose pulmonar. Ainda assim, mais de 90% de crianças em todo o mundo são vacinadas com BCG, tornando-a a vacina mais utilizada globalmente. O BCG demonstrou possuir efeitos imunoestimuladores não específicos, reduzindo a mortalidade infantil em geral e melhorando a resposta a outras doenças infecciosas. Em 1998, quando foi confirmado que a estimulação imunológica por doenças infecciosas reduz o risco de câncer, o uso de BCG ganhou uma atenção ainda maior nessa área. Atualmente, ele é indicado como imunoterápico contra o câncer de bexiga músculo não-invasivo e contra o câncer de pele tipo melanoma. No entanto, sua eficácia é variável e sua administração pode causar efeitos colaterais adversos. O desenvolvimento de cepas de BCG recombinante (rBCG) tem sido muito explorado com o objetivo de melhorar a sua eficácia contra a tuberculose e contra os cânceres de bexiga e melanoma, através de um maior estímulo imunológico. O uso de cepas de rBCG também é muito explorado como um vetor de expressão de antígenos heterólogos para desenvolver novas vacinas contra bactérias e vírus patogênicos. Os efeitos inespecíficos e protetores do BCG contra doenças infecciosas, neoplásicas, autoimunes, alérgicas e neurodegenerativas, são atribuídos à sua capacidade de indução de memória imunológica em células imunes inatas, um mecanismo também conhecido como *trained immunity*, o qual é fortemente dirigido pela reprogramação epigenética e metabólica das células. Considerando o potencial do uso de BCG e rBCG, esse trabalho teve por objetivo revisar a utilização de *M. bovis* BCG como imunobiológico bem como suas aplicações e propriedades imunológicas.

Palavras-chave: BCG recombinante; imunidade treinada; tuberculose; câncer de bexiga; melanoma; imunidade heteróloga; vetor vacinal; imunoterápico.

Abstract

BUNDE, Tiffany Thurow. ***Mycobacterium bovis* BCG as immunobiological: applications and immunological bacillus-host interactions**. 2021. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycobacterium bovis BCG was derived from the *Mycobacterium bovis* strain, through 231 in vitro passages made by Albert Calmette and Camille Guérin over 13 years, originating the name BCG (Bacillus Calmette-Guérin). In 1921, BCG was first administered to humans as a vaccine against tuberculosis and proved to be protective against the disease. Since then, it remains the only licensed vaccine against tuberculosis, protects against severe extrapulmonary forms, but it has low efficacy against the most prevalent form of the disease, pulmonary tuberculosis. Even so, over 90% of children worldwide are vaccinated with BCG, making it the most widely used vaccine globally. BCG has been shown to have non-specific immunostimulatory effects, reducing infant mortality in general and improving the response to other infectious diseases. In 1998, when it was confirmed the immune stimulation from infectious diseases reduces the risk of cancer, the use of BCG had even greater attention in this area. Currently, it is indicated as an immunotherapeutic against nonmuscle invasive bladder cancer and against melanoma skin cancer. However, its effectiveness is variable and its administration can cause side effects. The development of recombinant BCG strains (rBCG) has been extensively explored to improve their effectiveness against tuberculosis, against bladder and melanoma cancers, through improve immune stimulation. The use of rBCG strains is also widely used as an expression vector for heterologous antigens to develop novel vaccines for pathogenic bacteria and viruses. The non-specific and protective effects of BCG against infectious, neoplastic, autoimmune, allergic and neurodegenerative diseases, are attributed to its ability to induce immune memory in innate immune cells, a mechanism also known as trained immunity, which is strongly driven by epigenetic and metabolic reprogramming of cells. Considering the potential of using BCG and rBCG, this study aimed to review the use of *M. bovis* BCG as an immunobiological as well as its applications and immunological properties.

Keywords: recombinant BCG; trained immunity; tuberculosis; bladder cancer; melanoma; heterologous immunity; vaccine vector; immunotherapeutic.

Lista de Figuras

Figura 1	Histórico de desenvolvimento e uso de <i>M. bovis</i> BCG como vacina contra tuberculose.....	21
Figura 2	Diversificação genética de cepas de <i>M. bovis</i> BCG.....	24

Lista de abreviaturas e siglas

ADCC	Citotoxicidade celular mediada por anticorpos (<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CMM	Melanoma maligno cutâneo (<i>Cutaneous malignant melanoma</i>)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DCs	Células dendríticas (<i>Dendritic cells</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTH	Resposta de hipersensibilidade tardia (<i>Delayed-type hypersensitivity</i>)
DTIC	Dacarbazina
DU2	Unidade de duplicação 2 (<i>Duplication unit 2</i>)
EFD	Liofilização prolongada (<i>Extended Freeze-Drying</i>)
EM	Esclerose múltipla
FAP	Fundação Atauilpho de Paiva
FDA	Administração Federal de Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
H3K27Ac	Acetilação da histona 3 lisina 27
H3K4me1	Metilação da histona 3 lisina 4
H3K4me3	Tri-metilação da histona 3 lisina 4
hMPV	Metapneumovírus humano
hRSV	Vírus sincicial respiratório humano
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas (<i>Hematopoietic stem cells</i>)
HSV2	Herpes virus simples 2
IFN- α	Interferon-alfa
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
lncRNAs	RNAs longos não codificantes

INH	Isoniazida
IPLs	lncRNAs genes imunológicos proximais (<i>immune gene-priming</i> lncRNAs)
IV	Via intravenosa
LPS	Lipopolissacarídeo
LTBI	Infecção latente de tuberculose
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MIBC	Câncer de bexiga invasivo muscular (<i>Muscle invasive bladder cancer</i>)
MUC1	Mucina 1
NCCN	Rede Nacional Abrangente de Câncer (<i>National Comprehensive Cancer Network</i>)
NETs	Armadilhas extracelulares do neutrófilo (<i>Neutrophil extracellular traps</i>)
NK	Células exterminadoras naturais (<i>Natural Killers Cells</i>)
NMIBC	Câncer de bexiga não invasivo do músculo (<i>Nonmuscle invasive bladder cancer</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PDIMs	Dimicocerosatos de ftiocerol (<i>Phthiocerol dimycocerosate</i>)
PGLs	Glicolipídios fenólicos (<i>Phenolic glycolipids</i>)
PPD	Derivados de proteína purificada (<i>Purified Protein Derivative</i>)
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
PT	Toxina <i>pertussis</i>
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
rBCG	BCG recombinante
RD	Regiões descobertas de diferença
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SCID	Camundongo com imunodeficiência combinada grave (<i>Severe combined immunodeficiency</i>)
SNC	Sistema nervoso central

SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
TADs	Domínios de associação topológica (<i>Topologically associating domain</i>)
TB	Tuberculose
TD1	Diabetes tipo 1 (<i>Type 1 diabetes</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (<i>T helper</i>)
TLR4	Receptor do tipo Toll 4 (<i>Toll-like receptor 4</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
TT	Teste tuberculínico

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	19
4.1.1 Histórico.....	19
4.1.2 Propagação do BCG.....	21
4.1.3 Mutações das sub cepas de BCG.....	23
4.2 Mecanismos imunológicos de atuação do BCG.....	25
4.2.1. Resposta inata.....	25
4.2.2. Resposta humoral.....	29
4.2.3. Resposta celular.....	31
4.3 BCG como imunobiológico.....	33
4.3.1 BCG como vacina contra tuberculose.....	33
4.3.2 BCG como imunoterápico em câncer de bexiga.....	37
4.3.3 BCG como imunoterápico em melanoma.....	39
4.3.4 BCG como imunobiológico aplicado à outras doenças.....	41
4.4 BCG recombinante.....	44
4.4.1 BCG recombinante contra tuberculose.....	45
4.4.2 BCG recombinante contra câncer.....	48
4.4.3 BCG como vetor expressando antígenos heterólogos.....	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Bacille Calmette-Guérin (BCG) é uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, derivada de 231 passagens *in vitro* no Instituto Pasteur de Lille, desenvolvida para prevenir a tuberculose. A primeira vacinação com BCG ocorreu há 100 anos atrás, e até hoje continua sendo a única vacina licenciada contra tuberculose, com mais de 120 milhões de doses sendo administrada anualmente, tornando-se a vacina mais amplamente utilizada no mundo (ABDALLAH; BEHR, 2017). Entretanto, sua eficácia varia de zero a 80% de proteção contra tuberculose pulmonar em adultos (FINE, 1995). Da mesma forma, sua proteção varia de 70 a 80% contra formas disseminadas e meningíticas desta doença (TRUNZ; FINE; DYE, 2006). Apesar de ter sido desenvolvida unicamente para este fim, com o passar do tempo o BCG mostrou possuir efeitos em diversas outras aplicações.

Uma dessas aplicações, é a sua utilização como agente imunoterapêutico para carcinoma urotelial superficial e carcinoma de pele tipo melanoma, resultando em recorrência e progressão reduzidas destas doenças. Contudo, a sua administração está associada a taxas variadas de eficácia e pode causar efeitos colaterais adversos, podendo limitar a sua aplicação (BEGNINI et al., 2015). Além disso, mais recentemente o BCG demonstrou possuir um imenso potencial como imunoterápico para doenças autoimunes, alérgicas e neurodegenerativas, sendo relacionado com a hipótese da higiene (MOULSON; AV-GAY, 2021).

Outra aplicação do BCG que tem sido muito explorada, é a sua utilização como vetor vacinal para entrega de antígenos heterólogos. Isso se deve as suas fortes propriedades adjuvantes, além de ser estável, seguro e induzir uma proteção de longa duração com uma única dose (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005). Nenhum outro vetor vacinal foi testado com diferentes antígenos e demonstrou ser protetor contra tantos patógenos (BASTOS et al., 2009). Além disso, a construção de cepas recombinantes de BCG (rBCG) tem sido muito explorada como uma forma de aumentar os estímulos imunológicos para melhorar a sua eficácia contra a tuberculose e aumentar o seu efeito antitumoral contra os cânceres de bexiga e melanoma (BEGNINI et al., 2015; NIEUWENHUIZEN; KAUFMANN, 2018).

Estudos sugerem também que a vacinação com BCG possui efeitos inespecíficos e protetores contra infecções diferentes da doença-alvo (MOORLAG et al., 2019). Em um estudo realizado em crianças desnutridas com pneumonia e bacteremia confirmada, a mortalidade foi três vezes mais comum em crianças que não foram vacinadas com BCG (CHISTI et al., 2015). Recentemente, descobriu-se que esses efeitos do BCG ocorrem devido a mecanismos de indução de memória imunológica em células imunes inatas ou também conhecido por “*trained immunity*” (NETEA et al., 2020). Essas propriedades imunológicas do BCG são responsáveis pela sua extensa área de aplicação e pelos seus resultados promissores. Assim sendo, esse trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de literatura acerca das aplicações de BCG e rBCG como imunobiológico, bem como dos aspectos imunológicos envolvidos em seus mecanismos de ação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi elaborar uma revisão de literatura visando elucidar a utilização de *Mycobacterium bovis* BCG como imunobiológico, suas aplicações e propriedades imunológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Abordar o contexto histórico do BCG;
- Revisar o emprego do BCG como vacina contra tuberculose e como imunoterápico para câncer de bexiga e melanoma;
- Discutir a sua utilização como potencial vetor vacinal e o desenvolvimento de cepas de BCG recombinante;
- Investigar os mecanismos imunológicos envolvidos no mecanismo de ação do BCG;
- Verificar os mecanismos inespecíficos de imunidade induzidos por BCG aplicados à outras doenças;

3. METODOLOGIA

Para a elaboração do presente trabalho foi realizada uma pesquisa em forma de revisão de literatura para coletar dados e informações científicas de artigos originais e de revisão. Para isso, foram utilizados o banco de dados PubMed (NCBI), bem como sites de órgãos nacionais, como o Instituto Nacional do Câncer (INCA) e a Fundação Ataulpho de Paiva (FAP). A busca abrangeu 173 artigos. Os critérios de seleção dos artigos foram baseados na relevância para os tópicos apresentados no trabalho, bem como nas datas de publicação e contribuições para esta área de estudo. As palavras chaves utilizadas foram: BCG, BCG *historic*, *tuberculosis*, BCG *bladder cancer*, BCG *melanoma*, *recombinant BCG*, *rBCG cancer*, BCG *trained immunity*, BCG *humoral response*, *lymphocyte T BCG*, *autoimmune disease BCG* e COVID-19 BCG.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Mycobacterium bovis* BCG

4.1.1 Histórico

A nomenclatura BCG (*Bacillus de Calmette e Guérin*) surgiu devido aos pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin que derivaram a cepa original da vacina BCG de um isolado de *Mycobacterium bovis* no Instituto Pasteur de Lille, França no século XX (ABDALLAH; BEHR, 2017). Antes de 1900, Calmette havia feito tentativas de produzir uma vacina para tuberculose com diferentes cepas e diferentes formas de atenuação, mas nenhuma obteve sucesso (SAKULA, 1983).

Em 1908, Calmette e Guérin começaram o estudo de uma cepa bovina virulenta fornecida por Norcard, originalmente isolada em 1902 do leite de uma vaca que sofria de mastite tuberculosa. Inicialmente, o projeto consistia em estudar a patogênese da tuberculose bovina, portanto, para produzir inóculos para esses experimentos, os pesquisadores cultivaram esses bacilos tuberculosos em um meio com batata embebido em glicerol e adicionaram bile de boi para neutralizar a tendência de aglomeração das bactérias e tornar a suspensão mais homogênea dos bacilos. Com alguns meses de crescimento neste meio, eles puderam observar alterações morfológicas das colônias e quando inoculados em porquinhos-da-índia, os bacilos demonstraram ser menos virulentos que o *M. bovis* original de Nocard. Sendo assim, iniciou-se o projeto de produção de uma vacina a partir dessa cultura atenuada (ABDALLAH; BEHR, 2017; GRANGE; GIBSON; OSBORN, 1983).

O cultivo do *M. bovis* foi mantido em batatas embebidas em glicerol e bile de boi em aproximadamente três intervalos semanais. Em 1913 deveria ter ocorrido o primeiro ensaio de vacinação em bovinos, porém com a eclosão da primeira guerra mundial o experimento não foi realizado. Além disso, manter a cultura dos bacilos foi um grande desafio, devido a ocupação da Alemanha em Lille, que ocasionou em grande aumento no custo das batatas bem como, aumentou a dificuldade de obter bile de boi adequado no matadouro (SAKULA, 1983).

Em 1919, a cepa *M. bovis* isolada de Nocard foi administrada em diferentes modelos animais como, porcos, coelhos, gados e cavalos sob diferentes doses e

rotas. Demonstrou ser bem tolerada e falhou em produzir tuberculose progressiva. Esses resultados estabeleceram a segurança e eficácia da vacina BCG em animais experimentais. Então, por sugestão de Guérin, deram o nome de *Bacille Billie Calmette-Guerin*, mais tarde o “*Billie*” seria omitido, assim nascendo o BCG (ABDALLAH; BEHR, 2017).

Em 1921, depois do BCG ser cultivado durante 13 anos (1908-1921), totalizando 231 passagens, ela foi usada pela primeira vez como vacina humana. O destinatário foi uma criança saudável nascida de uma mãe que morreu de tuberculose pulmonar. Benjamin Weill-Halle, pediatra francês e bacteriologista, foi o responsável por dar uma dose de BCG por via oral no bebê. A criança sobreviveu e não desenvolveu tuberculose. A via oral foi escolhida por Calmette, que considerou o trato gastrointestinal como a via usual de infecção natural pelo bacilo da tuberculose (DANIEL, 2006; SAKULA, 1983). Essa rota de vacinação foi utilizada até o final dos anos 1940, desde então, a via de administração passou a ser percutânea ou intradérmica (SINGH; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2016).

Já em 1924, foi relatado uma série de 660 vacinações orais em crianças. Weill-Halle havia tentado outras vias, como subcutânea e cutânea mas devido as reações locais, foi preferível o método oral (SAKULA, 1983). Pela primeira vez, uma vacina segura e aparentemente eficaz estava disponível para a proteção contra a tuberculose humana. Sendo assim, O Instituto Pasteur de Lille começou a produção em massa da vacina BCG para uso médico (ABDALLAH; BEHR, 2017).

Entre 1924 e 1926, a cultura original da cepa BCG foi subcultivada e distribuída para 34 países. A propagação da cultura foi realizada em meio não sintético, portanto cada país havia sua forma de propagar o BCG, variando do uso de batata ao meio *Sauton* (GUALLAR-GARRIDO et al., 2020) e outros, que foram usados na produção local de vacinas. Em 1927, mais outros 26 países foram relatados por receberem a cultura BCG de Paris (OETTINGER et al., 1999).

Em 1928, a Liga das Nações anunciou a segurança de cepa BCG para uso em vacinação de animais e homens (LUGOSI, 1992). Desde 1924 até então, mais de 100.000 crianças haviam sido imunizadas, incluindo os filhos de Calmette (DANIEL, 2006). As estatísticas de Calmette e Guérin mostraram uma queda na mortalidade por tuberculose entre os bebês suscetíveis que haviam sido vacinados (SAKULA, 1983). Uma linha do tempo dos principais acontecimentos relacionados ao histórico de desenvolvimento do BCG como vacina contra tuberculose está presente na Figura 1.

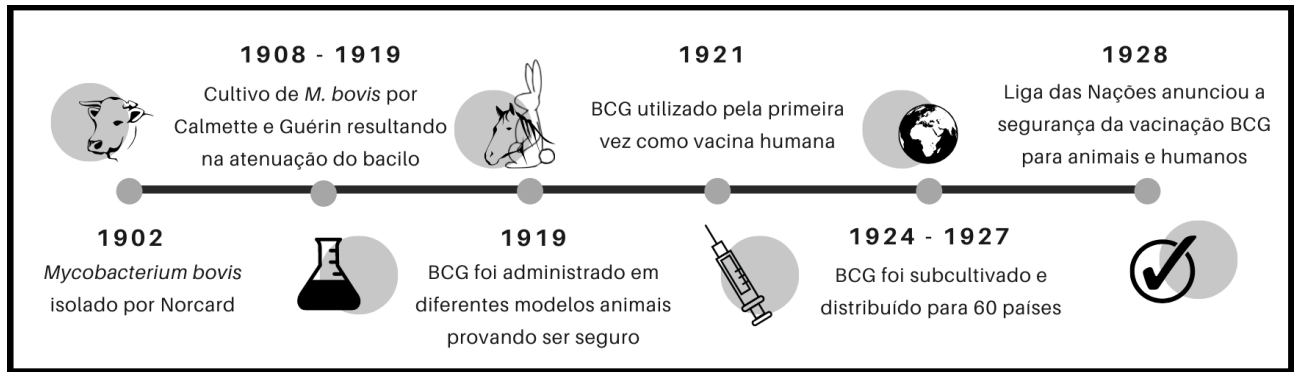


Figura 1. Histórico de desenvolvimento e uso de *M. bovis* BCG como vacina contra tuberculose.

Na Alemanha, em Lubeck no ano de 1930, aconteceu um grave acidente que causou profundas mudanças na vacinação com BCG. Cerca de 250 crianças foram supostamente vacinadas com BCG e 73 morreram de tuberculose no primeiro ano, enquanto as outras 135 desenvolveram sinais e sintomas da doença. Investigações subsequentes revelaram que uma cultura de *M. tuberculosis*, isolada de uma criança doente, foi mantida na mesma incubadora com o BCG e acabou causando uma contaminação durante a preparação da vacina, a qual continha cerca de 1/3 do BCG e 2/3 do bacilo tuberculoso (BENÉVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005; SAKULA, 1983).

A vacinação com o BCG foi aceita em parte da Europa, porém ainda existiam países que resistiram, como a Grã-Bretanha que foi aderir a vacina apenas por volta de 1950 (BRYDER, 1999). Alguns pesquisadores também duvidaram do BCG e várias pesquisas foram feitas tentando reverter a sua virulência, mas nenhuma foi bem sucedida. Durante esse período muitas pesquisas foram realizadas, estima-se que em 1933 tenham sido publicados 1.600 livros, relatórios e artigos sobre esse assunto (GRANGE; GIBSON; OSBORN, 1983).

Atualmente, a demanda global anual de vacinas BCG é em média de 227 milhões de doses para 146 países. A capacidade global de produção de vacinas BCG está estimada em 500 milhões de doses com 22 fabricantes ao redor do mundo (CERNUSCHI et al., 2018).

4.1.2 Propagação do BCG

Em 1921, quando o BCG passou a ser administrado em pessoas para prevenir a tuberculose, ainda não era possível liofilizar a cepa ou guardar o estoque em um freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Portanto, o BCG continuou crescendo nas mesmas condições que resultaram em sua atenuação original até a liofilização de BCG-Pasteur após 1.173 passagens em 1961. Em 1924, lotes de BCG começaram a ser distribuídos para diversos países para a preparação local da vacina. Essas culturas de BCG foram propagadas em meios de cultura não sintéticos que variavam em torno do mundo e às vezes seguindo diferentes cronogramas de passagens, o que levou a diversificação em várias cepas geneticamente distintas de BCG. Com o passar das décadas, esses laboratórios desenvolveram sua própria linhagem de cepas filhas, normalmente nomeado de acordo com o diretor do laboratório, a cidade ou o país (ABDALLAH; BEHR, 2017; BEHR, 2002).

Mais de 14 subcepas de BCG evoluíram e foram usadas como vacina BCG em diferentes partes do mundo, mas muitas delas não estão mais em uso, sendo elas: Sweden, Birkhaug, Frappier, Mexico, China, Phipps, Prague. As subcepas de BCG produzidas atualmente e que ainda estão em uso são: Connaught, Danish, Glaxo (Merieux), Moreau, Pasteur, Russia, Tice e Tokyo (BCG World Atlas, 2020). A cepa Pasteur foi derivada em 1961 e é a cepa que mais se aproxima da descrição da cepa original derivada por Calmette (OETTINGER et al., 1999).

No Brasil, a cepa utilizada é a Moreau. Em 1925 o médico uruguaio Julio Elvio Moreau recebeu uma cepa BCG e passou para o pesquisador Arlindo de Assis, no Rio de Janeiro, que batizou a cepa de Moreau. Inicialmente, a vacina BCG foi produzida por Arlindo de Assis, posteriormente conhecido como o pai do BCG no Brasil, no Instituto Vital Brazil, até 1930, quando foi convidado pelo Ministro Ataulpho de Paiva, presidente da Liga Brasileira contra a Tuberculose, para continuar com a produção e experimentos com a vacina BCG na própria Liga. Em 1944 a imunização pelo BCG se desenvolveu muito mais que qualquer outro ano, cerca de 19.000 bebês foram vacinados com o BCG oral, o que indicou como a vacina foi bem aceita pela sociedade brasileira como um todo. Na década de 60 este lote foi nomeado como lote de semente principal pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BENÉVOLO-DE-ANDRADE et al., 2005; OETTINGER et al., 1999). A instituição responsável pela produção de vacinas BCG no Brasil é a Fundação Ataulpho de Paiva (FAP). Atualmente, a FAP fabrica anualmente cerca de 15 milhões de doses de BCG intradérmica, atendendo 100% da demanda nacional (FAP, 2021).

4.1.3 Mutações das sub cepas de BCG

As cepas atuais de BCG foram submetidas a duas fases de modificação genômica. A primeira fase (1908-1921) compreende as 231 passagens *in vitro* realizadas por Calmette e Guérin, na qual compartilham a modificação genômica particular adquirida entre o BCG e o *M. bovis* virulento. A segunda fase começa por volta de 1924, com o amplo uso e distribuição da cultura e termina várias décadas e centenas de passagens depois, com o estabelecimento de lotes de sementes congeladas, originando a modificação genômica específica das cepas filhas de BCG. Essas extensas diversidades genotípicas nas cepas filhas de BCG incluem regiões descobertas de diferença (RD), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), sequências de inserção, deleções e duplicações tandem (ABDALLAH; BEHR, 2017).

Por muito tempo se estudou quais seriam essas modificações genômicas, hoje já está bem definido quais são as características compartilhadas entre as cepas filhas de BCG que podem estar diretamente envolvidas na atuação do BCG e quais são as variações da proteção, eficácia e super atenuação de certas cepas (ABDALLAH; BEHR, 2017).

Durante a fase inicial da atenuação que compreende desde 1908 a 1921, genes da região RD1 do BCG foram deletados. O RD1 codifica para o sistema de secreção de proteínas ESX-1, que é um dos cinco sistemas de secreção tipo VII encontrados no genoma da *Mycobacterium tuberculosis* (ABDALLAH et al., 2007). O RD1 compreende nove genes, incluindo os genes que codificam as proteínas secretadas ESAT-6 e CFP-10, ambas são importantes alvos antigênicos de células T e são essenciais para a virulência de *M. tuberculosis*. Outra deleção que está presente em todas as cepas filhas de BCG é a eliminação da extremidade distal de *hspR*. Este gene está envolvido na regulação transcricional (repressão) de proteínas de choque térmico e é conhecido por afetar a virulência. O locus *hspR* ativa um conjunto de genes de choque térmico em resposta ao estresse geral na invasão de macrófagos (ABDALLAH; BEHR, 2017). Cepas com deleção de *hspR* exibem um crescimento atenuado em infecções crônicas (STEWART et al., 2001).

Embora o motivo mais atribuído para a atenuação primária seja a perda do locus RD1, a complementação do BCG com esta região não restaura totalmente a

virulência para níveis do tipo selvagem (PYM et al., 2003). Isso leva a especulação de que mutações genéticas adicionais que ocorreram no BCG também contribuíram à sua atenuação. Uma divergência crítica na evolução do BCG foi a perda da região de RD2 durante a propagação contínua do BCG entre 1927 e 1931, o que levou a duas estirpes de BCG denominadas de “cedo” (RD2 presente) e “tarde” (RD2 ausente). O RD2 contém o gene *mpb64* e codifica para a proteína MPB64, a função do RD2 associado a virulência foi confirmada. A complementação do gene *mpb64* na cepa filha de BCG Pasteur melhorou a imunogenicidade da vacina, mas não melhorou a proteção contra tuberculose pulmonar (ABDALLAH; BEHR, 2017; KOZAK; BEHR, 2011).

Com base nas deleções RD1 e RD2 entre as cepas filhas de BCG, foram sugeridos dois grupos principais. O primeiro grupo inclui o BCG Rússia, Moreau, Japan, Sweden e Birkhaug, que foram distribuídos no Instituto Pasteur entre 1921 e 1926, possuem apenas as exclusões RD1, RD3 e Del_Mb2377c. O segundo grupo, distribuído após 1927, inclui as cepas Prague, Glaxo, Merieux, Danish, Frappier, Connaught, Tice, Mexico, China, Phipps e Pasteur, as quais possuem as deleções do primeiro grupo bem como a exclusão RD2 (ABDALLAH; BEHR, 2017), conforme pode ser visualizado na Figura 2.

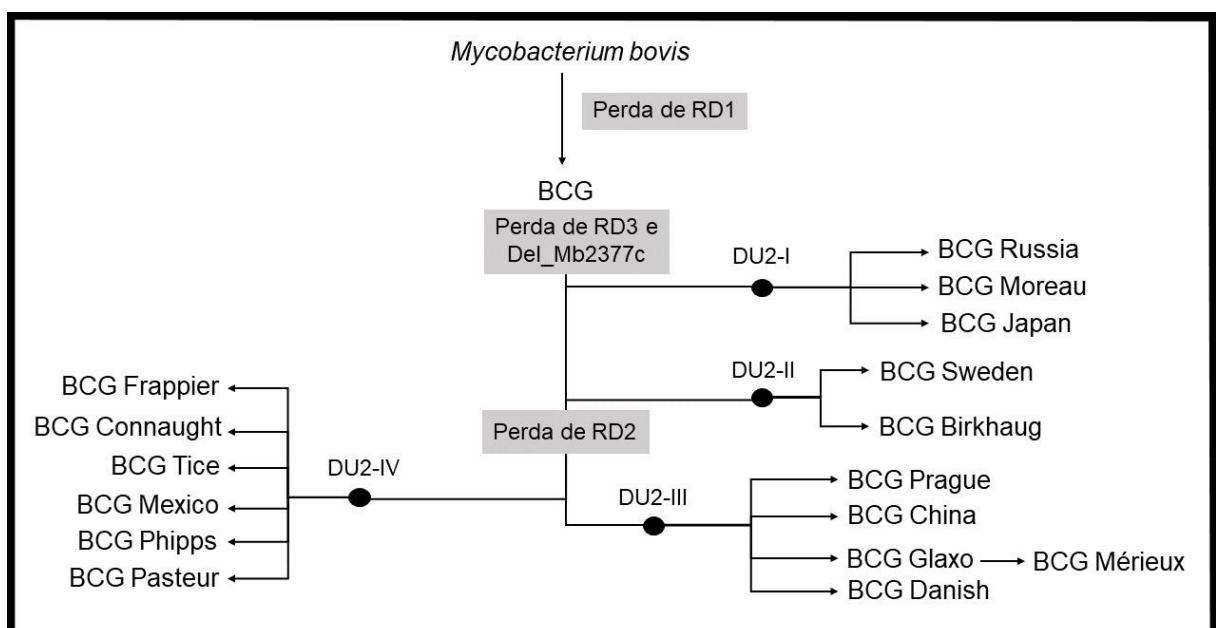


Figura 2. Diversificação genética de cepas de *M. bovis* BCG

Outra mutação que ocorreu nas cepas obtidas após 1927 foi a perda da produção de metoximicolatos, uma subclasse de ácidos micólicos da parede celular de *Mycobacterium*. Esse fenótipo foi atribuído a uma mutação pontual no gene *mmA3* que codifica os precursores que formam os ácidos metoximicólicos (BEHR et al., 2000). Além disso, tem sido postulado que este SNP leva a resistência de isoniazida de baixo nível (INH), visto que o INH é conhecido por inibir a síntese dos ácidos micólicos (ABDALLAH; BEHR, 2017; TAKAYAMA; WANG; DAVID, 1972). Curiosamente, a perda de metoximicolato parece não ter impacto sobre a virulência de cepas de BCG tardia (BELLEY et al., 2004).

As cepas BCG Japan, Moreau e Glaxo não produzem os fatores de virulência lipídica dimicocerosatos de ftiocerol (PDIMs) e glicolipídios fenólicos (PGLs), enquanto as outras cepas de BCG produzem esses lipídeos. Isso sugere que essas três cepas são possivelmente mais atenuadas e seguras, já que os PDIMs e PGLs são fatores de virulência de *M. bovis* e *M. tuberculosis* e ambas moléculas desempenham um papel na modulação da resposta imune do hospedeiro (CHEN et al., 2007). Além disso, a exclusão de PDIMs e PGLs do BCG Pasteur reduziu a sua virulência, bem como a eficácia da proteção (TRAN et al., 2016).

4.2 Mecanismos imunológicos de atuação do BCG

4.2.1. Resposta inata

Numerosos estudos epidemiológicos, clínicos e imunológicos demonstram que a vacinação com BCG impacta na resposta imunológica a infecções subsequentes, resultando em redução da morbidade e mortalidade. Ou seja, a vacina BCG tem efeitos protetores benéficos e não específicos contra infecções diferentes das doenças-alvo (MOORLAG et al., 2019; NETEA et al., 2020). A primeira evidência para esse fenômeno foi descrita em 1927 na Suécia pelo médico Carl Näslund, que descobriu que recém-nascidos vacinados com BCG tinham uma taxa de mortalidade três vezes menor do que bebês não vacinados durante o primeiro ano de vida. Essa observação também foi realizada por Albert Calmette em 1931. Posteriormente, essa redução na mortalidade infantil foi observada em vários lugares do mundo, incluindo Reino Unido, Sul e Sudeste Asiático, Índia e Haiti. Além disso, vários estudos realizados na África Ocidental demonstraram uma redução de mais de 40% na

mortalidade após a vacinação com BCG, prevenção contra malária, sepse, infecções respiratórias e lepra (AABY; BENN, 2012; COVIÁN et al., 2019). Esses efeitos protetores que foram observados em estudos de vacinação com BCG foram denominados de imunidade heteróloga ou imunidade não específica provavelmente ocorrem via indução de memória imunológica em células imunes inatas, um mecanismo também denominado como imunidade treinada (*trained immunity*) (MOORLAG et al., 2019).

Dado o sucesso evolutivo de organismos sem respostas imunes adaptativas, que representam até 97% da biodiversidade da terra (PURVIS; HECTOR, 2000), é improvável que a memória imunológica tenha evoluído apenas em vertebrados. Nas últimas décadas, um número crescente de estudos forneceu evidências de que o sistema imunológico de plantas e invertebrados exibem características adaptativas, podendo ser “preparado” por uma infecção inicial, levando à proteção contra infecções subsequentes (MILUTINOVIĆ; KURTZ, 2016; REIMER-MICHALSKI; CONRATH, 2016). Esse processo, denominado imunidade treinada, lembra as características da memória imunológica, porém em células imunes inatas, promovendo um aumento da resposta inata a uma infecção secundária, seja com o mesmo ou com um microrganismo diferente. A imunidade treinada é controlada por diferentes mecanismos, é menos específica e de menor duração do que a memória imune adaptativa, embora ambas cumpram uma mesma função principal, uma resposta mais rápida e forte contra patógenos, melhorando a sobrevivência do hospedeiro (COVIÁN et al., 2019; NETEA et al., 2020).

A imunidade treinada é caracterizada como sendo independente das respostas de células T e B e é mediada por monócitos, macrófagos, células *natural killers* (NK) e células dendríticas (COVIÁN et al., 2019). Em camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID), que carecem de células T e B funcionais, a vacinação com BCG forneceu proteção contra um desafio não micobacteriano secundário, demonstrando a importância das células imunes inatas na mediação deste efeito (KLEINNIJENHUIS et al., 2012). A base celular da proteção induzida pela imunidade treinada durante as infecções reside na reprogramação epigenética. Até recentemente era um enigma como essas respostas da imunidade treinada poderiam durar de três meses até um ano, sendo comprovado que a proteção heteróloga induzida por vacinas vivas contra infecções poderia durar até cinco anos (NANKABIRWA et al., 2015), ainda que monócitos e células dendríticas possuem curta duração, tanto em

camundongos como humanos, com meia-vida média de cinco a sete dias (NETEA et al., 2020; PATEL et al., 2017). Trabalhos recentes mostraram que a imunidade treinada pode ocorrer em células progenitoras da medula óssea (imunidade treinada central), bem como em monócitos sanguíneos e macrófagos de tecidos (imunidade treinada periférica) (NETEA et al., 2020). KAUFMANN et. al. demonstraram que a vacinação com BCG em modelo de rato para tuberculose, reprograma células-tronco hematopoiéticas (HSCs) na medula óssea em direção à mielopoiese de uma forma dependente de interferon-gama (IFN- γ), que leva a proteção através da imunidade treinada (KAUFMANN et al., 2018). Sendo assim, a descoberta de que HSCs exibem uma função de memória poderia explicar o antigo mistério de porque as células imunes de curta duração podem adquirir memória.

No sistema imunológico, modificações epigenéticas estão envolvidas na diferenciação celular, inflamação e doenças autoimunes (COVIÁN et al., 2019). Existem diferentes tipos de modificações epigenéticas, incluindo modificações de DNA, RNAs não codificantes, modificações de histonas e remodelação da cromatina. Modificações de histonas são altamente dinâmicas e podem mudar em minutos, também possuindo diversas classes de modificações. Acetilação e metilação de histonas desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica e na remodelação do epigenoma, sendo mecanismos moleculares importantes implicados na modulação da sinalização de células imunes inatas. Histonas podem ser metiladas em resíduos de arginina ou lisina. A lisina pode aceitar até três grupos metila, sendo mono, di ou trimetilados (COVIÁN et al., 2019; KHADER et al., 2019; KOUZARIDES, 2007). Após a vacinação com BCG, foi demonstrado que monócitos do sangue periférico obtiveram um aumento na modificação da histona H3 com tri-metilação no quarto resíduo de lisina (H3K4me3) associada com os promotores dos genes que codificam fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e receptor do tipo Toll 4 (TLR4), o que leva à ativação transcricional destas sequências para produção de citocinas pró-inflamatórias (COVIÁN et al., 2019; KLEINNIJENHUIS et al., 2012). Antes dessa reprogramação, a maioria dos genes pró-inflamatórios estão em uma configuração reprimida, dificultando o acesso da maquinaria de transcrição. Essa forma não é a ideal para classes de genes que precisam responder imediatamente e uniformemente a estímulos externos através das células imunes. Portanto, para reduzir a estocasticidade na expressão, o contato cromossômico entre os genes precisa estar em um estado mais estável ou pré-formado, que é obtido através dessa

reprogramação epigenética (NETEA et al., 2020; SMALE; TARAKHOVSKY; NATOLI, 2014). A cicatriz epigenética H3K4me3 é uma marca registrada da imunidade treinada, bem como metilação da histona 3 lisina 4 (H3K4me1) e acetilação de histona 3 lisina 27 (H3K27Ac) (SAEED et al., 2014).

O metabolismo celular é um mediador crítico da reprogramação epigenética. Os metabólitos podem modular a atividade das enzimas modificadoras da cromatina, portanto, a religação metabólica de células imunes inatas ou seus progenitores irão regular a plasticidade e a reprogramação epigenômica no contexto da imunidade treinada (NETEA et al., 2020; PENKOV et al., 2019). Os processos metabólicos das células do sistema imunológico são precisamente regulados, para fornecer a energia necessária para funcionar corretamente. Monócitos e macrófagos em estado de repouso recuperam sua energia através da fosforilação oxidativa, no entanto quando expostos a estímulos inflamatórios, eles são capazes de converter glicose à lactato mesmo na presença de oxigênio, em um mecanismo também denominado de efeito Warburg (VAN DER MEER et al., 2015). Foi demonstrado que a vacinação com BCG leva a essa mudança na reprogramação metabólica da célula, passando da fosforilação oxidativa à glicólise aeróbica. Além disso, a inibição da via glicolítica prejudica o desenvolvimento de um fenótipo de imunidade treinada, evitando rearranjos epigenéticos (CHENG et al., 2014; COVIÁN et al., 2019). Uma das marcas principais da imunidade treinada é a glicólise com aumento da produção de lactato. Além disso, o fumarato é um metabólito chave que induz rearranjos na cromatina, sendo capaz de induzir um aumento de H3K4me3 nos promotores de TNF- α e IL-6, levando ao aumento da secreção dessas citocinas após a restimulação com lipopolissacarídeo (LPS). Sendo assim, fica claro que a reprogramação metabólica e epigenética medeiam em conjunto a imunidade treinada, sendo mutuamente dependentes e indispensáveis (CHENG et al., 2014; LIU et al., 2020).

A primeira etapa para a imunidade treinada é o reconhecimento dos patógenos e danos aos tecidos através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), mais especificamente pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os processos ativados através de PRRs incluem respostas como fagocitose, locomoção celular, destruição de patógenos ou células e produção de citocinas (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; NETEA et al., 2020). Conseqüentemente, o aumento de citocinas pró-inflamatórias levam a uma mudança no estado metabólico da célula que, como dito anteriormente,

induz a reprogramação epigenética (VAN DER MEER et al., 2015). Essa reprogramação ocorre através do acúmulo de H3K4me3 em localizações específicas no genoma. H3K4me3 é direcionado aos promotores pela presença de uma classe de RNAs longos não codificantes (lncRNAs) chamado de lncRNAs genes imunológicos proximais (IPLs). IPLs são posicionados dentro de domínios de associação topológica (TADs), que são regiões enriquecidas com interações de *looping* de longo alcance da cromatina reunindo complexos multigênicos. Dentro das TADs, os IPLs recrutam um complexo de modificação de histonas, denominado complexo COMPASS, que por sua vez direciona a trimetilação de H3K4me3. O silenciamento de IPLs ou a interrupção do complexo COMPASS resulta na perda de acúmulo de H3K4me3 em genes imunes treinados (FANUCCHI et al., 2019; KHADER et al., 2019; WANG et al., 2011). Essas modificações epigenéticas regulam positivamente a expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), aumento na produção de citocinas e a ativação celular (VAN DER MEER et al., 2015).

A imunidade treinada representa uma grande vantagem quando usada em recém-nascidos, porque eles ainda não têm um desenvolvimento completo do sistema imunológico adaptativo e não foram expostos a uma ampla gama de patógenos, devido a isso, a vacinação com BCG desempenha papéis fundamentais ajudando os indivíduos vacinados a responder a uma ampla variedade de patógenos através da memória imunológica em células imunes inatas. Bem como, essa estratégia também pode ser aplicada em idosos e indivíduos imunocomprometidos que são incapazes de desenvolver respostas imunes específicas baseadas em células T ou B. Além disso, a imunidade treinada pode contribuir para a proteção contra diferentes patógenos para os quais ainda não existe vacina específica, como é o caso do vírus da influenza A, que possui uma alta taxa de mutação que pode prejudicar a eficácia de vacinas altamente específicas (ABZUG, 2014; COVIÁN et al., 2019; WITT; CRAVEN; MCCABE, 1987; XUE et al., 2018).

4.2.2. Resposta humoral

A resposta humoral, pertencente ao sistema imunológico adaptativo, é mediada pelos linfócitos B através da geração de anticorpos específicos. Os anticorpos podem mediar o efeito antimicrobiano por meio de diversos mecanismos, como a inibição da

replicação do patógeno, citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC), indução de uma reação em cascata do sistema complemento e opsonização. A opsonização através de anticorpos específicos ajuda a melhorar a fagocitose e eliminar patógenos (KROCOVA et al., 2020). Além disso, os anticorpos também podem interagir com as células T para promover a imunidade, através da formação de complexos anticorpo-bactéria que resultam em um aumento do processamento e apresentação de antígenos para células T CD4+ por fagócitos, assim aumentando a ativação de células T e intensificando as respostas citotóxicas (LI; JAVID, 2018).

Há uma escassez na literatura sobre a produção de anticorpos induzida pela vacinação com BCG, devido a essa via ser considerada de pouca relevância para a proteção contra tuberculose. Mesmo não sendo uma via predominante, a imunidade humoral pode ser necessária, mas não suficiente para a proteção, bem como pode ser relevante para alguns hospedeiros, mas para outros não (TANNER et al., 2019). No entanto, em um estudo realizado em bebês sul-africanos vacinados com BCG, os níveis de IgG específico contra o antígeno Ag85A foram associados à redução do risco de tuberculose, sugerindo que os anticorpos protetores podem ter sido induzidos pela vacinação com BCG (FLETCHER et al., 2016).

Existem evidências de que a vacinação com BCG pode aumentar a resposta imune humoral de vacinações não relacionadas na infância, atuando como um adjuvante. OTA et. al. (2002) relataram que bebês vacinados com BCG ao nascer tiveram, no momento da vacinação contra hepatite, níveis significativamente mais elevados de IgG contra antígenos da vacina da hepatite B, quando comparado a bebês que foram vacinados com BCG aos quatro meses e meio (OTA et al., 2002). Ademais, a vacinação anterior ou concomitante de BCG também foi associada a níveis significativamente mais elevados de anticorpos contra poliomielite tipo 1, pneumococo e influenza (ZIMMERMANN; CURTIS, 2018). GOULART et. al. (2020) testaram rBCG PspAPdT / rPspA-PdT contra pneumococo, e a imunização com essa cepa de rBCG demonstrou induzir uma resposta humoral nos pulmões, o que promoveu a eliminação precoce da bactéria (GOULART et al., 2020).

Os resultados relatados até o momento são inconsistentes, as evidências da indução de anticorpos por BCG são variáveis e a relevância da proteção ainda não está clara. Os motivos podem ser: estudos com uma população amostral pequena e/ou amostragem não especificada, diferentes pontos temporais ou duração do acompanhamento. Além disso, os resultados também podem ser influenciados por

métodos de ensaio, dose e cepa da vacina BCG, bem como a espécie animal ou populações humanas (TANNER et al., 2019).

4.2.3. Resposta celular

As principais células envolvidas na resposta celular após a vacinação com BCG são os linfócitos T, células dendríticas e neutrófilos. Quando agentes infecciosos entram no corpo pela via da mucosa ou pela pele, os fagócitos mononucleares residentes são as primeiras células imunes a serem expostos (MOREL et al., 2008). No entanto, quando há um desafio microbiano, os neutrófilos, que circulam no sangue, são recrutados em grande número para o tecido em questão, no qual desempenham funções como a ingestão de micróbios (SERHAN; SAVILL, 2005). Os neutrófilos são descritos como células que respondem rapidamente a invasão e, em seguida, morrem rapidamente por apoptose. Contudo, sabe-se que os neutrófilos possuem um papel maior que ajuda nas respostas imunes efetoras. Eles secretam uma grande variedade de citocinas e quimiocinas, instruindo outras células. Podem ajudar macrófagos a eliminar patógenos intracelulares altamente adaptados, como *Mycobacterium tuberculosis*. Assim como, foi demonstrado recentemente que podem ser parceiros fundamentais das células dendríticas (MARTINEAU et al., 2007; MOREL et al., 2008).

As células dendríticas (DCs) são capazes de sair dos tecidos através dos vasos linfáticos em direção à drenagem de órgãos linfáticos. Durante esse processo, elas perdem sua propriedade de captação de antígenos e adquirem a capacidade de apresentação de antígenos para células T (SCHUSTER; HURRELL; TACCHINI-COTTIER, 2013), sendo este um papel também realizado pelos macrófagos. Quando os neutrófilos migram para os vasos linfáticos aferentes para drenar os nódulos linfáticos, eles transportam o BCG e ficam na vizinhança das células dendríticas e células T residentes (ABADIE et al., 2005). Um estudo demonstrou que a transferência do BCG e seus antígenos dos neutrófilos para as DCs, ocorre através de um contato íntimo, porém os mecanismos subjacentes desta transferência permanecem desconhecidos. Assim, os neutrófilos infectados com BCG instruem as DCs, garantindo a apresentação eficiente dos antígenos às células T, sugerindo ser uma via importante na resposta imune ao BCG (MOREL et al., 2008). Além desse mecanismo, também foi observado que BCG é capaz de estimular neutrófilos a

formarem NETs, também denominadas de armadilhas extracelulares, tanto *in vitro* quanto em modelo de camundongo. Esse processo demonstrou estar envolvido na supressão do desenvolvimento de tumores de bexiga em camundongos que receberam instilação intravesical de BCG (SUN et al., 2020).

As células T são pertencentes ao sistema imunológico adaptativo e são principalmente divididas entre células T CD4+ e células T CD8+. A vacinação com BCG induz uma resposta envolvendo ambos T CD4+ e T CD8+, mediando uma atividade citotóxica. Um estudo demonstrou que indivíduos denominados respondedores de alta inflamação, apresentaram resposta à vacinação com BCG caracterizada por células T CD4+ polifuncionais que expressam IL-2, TNF- α e IFN- γ e células T CD8+ expressando IFN- γ , enquanto aqueles indivíduos denominados respondedores de baixa inflamação tiveram uma resposta de citocina quase ausente, acompanhada pela indução de células T reguladoras CD8+ (CD8+ Tregs) (BOER et al., 2015). A atividade das células T reguladoras pode não só diminuir a imunogenicidade e a eficácia protetora das vacinas contra tuberculose, mas também dificultar o diagnóstico da infecção por tuberculose. Além disso, BOER et. al. compararam a vacinação com BCG vivo com o BCG inativado pelo calor, na qual o BCG inativado demonstrou ser o principal estímulo para células T CD4+, por meio da via de apresentação de antígeno MHC II. Já o BCG vivo induziu as células CD8+ Tregs através da apresentação de antígenos pela via MHC I, sugerindo que essa via está envolvida na ativação dessas células. O que também pode estar envolvido na indução dessas células T CD8+ regulatórias ao longo do tempo, é a persistência longa do BCG como uma bactéria intracelular viva após a vacinação (BOER et al., 2014).

As células T CD4+ são divididas nas respostas Th1 e Th2. A ativação das células Th1 e Th2 é regulada pela interleucina IL-10, induzida no início da infecção por BCG. Contudo, sabe-se que a indução de IFN- γ derivado de células T helper 1 (Th1) é fundamental para a proteção (KAUFMANN; LADEL; FLESCHE, 1995). IFN- γ parece ser uma citocina com resposta tardia à estimulação com BCG, uma vez que a sua indução requer o envolvimento de várias citocinas Th1 e Th2 produzidas endogenamente. Foi demonstrado que a supressão funcional de qualquer uma das citocinas IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α ou IFN- α por anticorpos neutralizantes leva a redução da produção de IFN- γ . Além disso, as citocinas humanas IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- α são observadas em sinergia com BCG para a produção de IFN- γ (LUO; CHEN; O'DONNELL, 2003).

A IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas, monócitos e células T. Essa citocina induz as células T reguladoras CD4+ e CD8+. Ademais, foi demonstrado que a IL-10 ajuda na persistência da tuberculose em humanos, bloqueando a maturação do fagossoma em macrófagos (O'LEARY; O'SULLIVAN; KEANE, 2011). Além disso, a IL-10 impede a ativação das DCs, o que retarda a ativação completa das respostas de células T, bem como impede a respostas Th1. Um estudo demonstrou que a deficiência de sinalização de IL-10 durante a vacinação com BCG aumentou as respostas Th1 e Th17, melhorando a proteção contra a infecção por tuberculose (PITT et al., 2012). A resposta Th1 é fundamental para a capacidade do hospedeiro de conseguir responder a infecção por tuberculose, porque as células Th1 liberam e ativam mecanismos de morte em células infectadas. XU et. al. descobriram que camundongos deficientes em IL-10 produziram mais IFN- γ e TNF- α (XU et al., 2019).

A citocina IFN- γ produzida pelas células T CD4+ após a ativação com antígenos micobacterianos é um elemento essencial da reação positiva ao derivado proteico purificado (PPD), sendo um elemento chave da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) utilizada no teste tuberculínico (TT) (KOWALEWICZ-KULBAT et al., 2018). Quando uma pessoa é infectada com micobactérias, os linfócitos T proliferam e ficam sensibilizados e, dentro de duas semanas, essas células T sensibilizadas ficam circulando na corrente sanguínea. Quando é feito o teste tuberculínico na pele, o PPD estimula os linfócitos e ativa uma série de eventos que levam a DTH, que é chamada de “tardia” porque a reação só se torna evidente depois de 24-48 horas. A reatividade dérmica envolve vasodilatação, edema e infiltração de linfócitos, basófilos, monócitos e neutrófilos no local da injeção. Os linfócitos T específicos do antígeno proliferam e liberam linfocinas, mediando o acúmulo de outras células no local. Essa área de infiltração celular reflete a atividade de hipersensibilidade tardia (HUEBNER; SCHEIN; BASS, 1993).

4.3 BCG como imunobiológico

4.3.1 BCG como vacina contra tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno principalmente pulmonar. Embora possa se desenvolver

em qualquer parte do corpo, a doença envolvendo os pulmões é necessária para a sua transmissão. Do ponto de vista clínico e de saúde pública, os pacientes com tuberculose (TB) são classificados como tendo infecção latente de TB (LTBI), sendo este um estado assintomático e não transmissível, ou como tendo a TB ativa, sendo este, um estado transmissível. Além destes, existe ainda a TB subclínica, que consiste nos pacientes apresentarem TB ativa com cultura positiva mas são assintomáticos. Os indivíduos podem avançar ou reverter posições, dependendo das alterações do hospedeiro e das comorbidades. Estima-se que 1,3 milhões de pessoas morrem de tuberculose a cada ano (ESMAIL et al., 2014; FURIN; COX; PAI, 2019; PAI et al., 2016).

Ademais, a tuberculose resistente a medicamentos, como ao antibiótico rifampicina, tem se tornado uma grande ameaça aos esforços de controle da doença. Cada ano, mais de meio milhão de pessoas adoecem com formas de tuberculose resistentes à rifampicina (FURIN; COX; PAI, 2019).

A única vacina atualmente licenciada para prevenir o desenvolvimento da tuberculose ativa é o BCG. Sendo intitulada como a vacina mais usada no mundo, foi administrada para mais de 3 bilhões de pessoas. Globalmente, mais de 90% dos recém-nascidos são vacinados e mais de 120 milhões de doses de BCG são administradas anualmente (PAI et al., 2016; ZWERLING et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde recomenda dose única de BCG para bebês recém-nascidos onde a TB é altamente endêmica ou onde há risco de exposição ao patógeno, porém cada país possui sua própria política de vacinação. Nove países (Andorra, Áustria, Alemanha, Luxemburgo, Bélgica, Dinamarca, Irlanda, Eslováquia e Síria) não recomendam a vacinação com BCG. Cinco países (Bulgária, Cazaquistão, Rússia, Tajiquistão e Turcomenistão) possuem uma política de revacinação em crianças com idade escolar ou com teste tuberculínico negativo. Países com baixa incidência de TB vacinam apenas grupos de risco (BCG World Atlas, 2020).

Essas diferenças na política de vacinação ocorrem, em parte, devido a eficácia variável da vacina BCG. Estudos clínicos e de caso-controle realizados em diferentes países para medir o efeito protetor da primeira dose da vacina BCG contra formas clínicas de tuberculose meníngea e miliar indicaram níveis de proteção acima de 80% para as cepas Copenhagen, Moreau e Glaxo. Metanálises também apontaram um efeito protetor médio entre 73% e 86%. O efeito protetor da vacina BCG para tuberculose pulmonar foi entre zero e 80%, em estudos clínicos e caso-controle

realizado em vários países desde 1940 (PAI et al., 2016; PEREIRA et al., 2007). Além do mais, uma meta-análise de eficácia da vacina BCG pediátrica indicou que a duração da proteção é geralmente até 10 anos, com a eficácia diminuindo com o tempo (ABUBAKAR et al., 2013). Estudos clínicos e de caso-controle demonstraram que a revacinação com BCG não oferece proteção (RODRIGUES et al., 2005; SEPULVEDA; PARCHA; SORENSEN, 1992). Isso se torna problemático uma vez que a maioria dos casos de TB pulmonar ativa transmissível ocorre em adolescentes e adultos (PAI et al., 2016).

Várias hipóteses surgiram para explicar a eficácia variável da vacina BCG. A hipótese de mascaramento propõe que a exposição do hospedeiro a micobactérias ambientais fornece algum nível de imunidade protetora contra a tuberculose e subsequente imunização com BCG não melhora mais o nível de proteção. Já a hipótese do bloqueio sugere que a replicação do BCG é inibida devido a sensibilização prévia com micobactérias ambientais, devido à presença de uma resposta imune pré-existente (FATIMA et al., 2020; FINE, 1995). Entretanto, sabe-se que um fator chave entre os cenários possíveis atribuíveis à diferença da proteção conferida pela vacina é a variabilidade genética entre as cepas de BCG (ZHANG et al., 2013).

Dentre essas diferenças no genoma, foram descobertas mutações nos epítomos de antígenos celulares da vacina BCG. O sistema imunológico representado pelas células T do hospedeiro é essencial para o reconhecimento e controle de *M. tuberculosis*; tais células dependem da ligação de epítomos de antígenos específicos para estímulo da resposta imune, portanto essas mutações afetam o grau de proteção da vacina (ZHANG et al., 2013). De 483 epítomos de células T experimentalmente verificados presentes em *M. bovis* e *M. tuberculosis*, apenas 295 epítomos são apresentados em todas as treze cepas de BCG (Frappier, Glaxo, Moreau, Phipps, Prague, Sweden, China, Tice, Russia, Danish, Mexico, Tokyo e Pasteur), os 188 epítomos de células T perdidos estão localizados em RD1, que codifica vários antígenos essenciais. Outros 28 epítomos de células T, localizados em RD2, foram perdidos durante a propagação de oito cepas de BCG, enquanto as cepas Moreau, Russia, Tokyo e Sweden retiveram esses epítomos. Portanto, quando comparadas com outras cepas, essas quatro contêm mais antígenos. Cada cepa BCG possui epítomos exclusivos que foram perdidos. Das treze cepas analisadas, a cepa Tokyo conteve o maior número de epítomos de células T (ZHANG et al., 2013).

A variação na virulência das cepas BCG também está relacionada com as diferenças genéticas entre elas. ZHANG et al. compararam a virulência de treze cepas de BCG, representando todas as linhagens, em camundongos SCID que não possuem linfócitos T e B e são altamente imunocomprometidos. As cepas foram agrupadas com base nas duplicações em tandem no genoma nos grupos: I (Russia, Japan e Moreau), II (Sweden e Birkhaug), III (Danish, Prague, Glaxo e China) e IV (Phipps, Tice, Frappier e Pasteur). As cepas mais virulentas (Phipps, Pasteur, Frappier e Tice) pertencem todas ao DU2 (*duplication unit 2*) grupo IV, já as cepas menos virulentas (Sweden e Birkhaug) fazem parte do DU2 grupo II (ZHANG et al., 2016). Quando comparados os grupos III e IV de DU2 foi descoberta uma duplicação que inclui dois genes reguladores *sigH* e *whiB1*, que em expressão elevada podem melhorar a replicação do BCG e assim, exibir uma maior virulência (BROSCH et al., 2007). Essa mutação não ocorre nos grupos I e II. Quando analisado o grupo III, a cepa Glaxo demonstrou ser menos virulenta que as cepas China e Danish pertencentes ao mesmo grupo, provavelmente devido ao BCG Glaxo ser naturalmente deficiente na produção de dimicocerosatos de ftiocerol (PDIMs) e glicolipídios fenólicos (PGLs). No entanto, parece haver uma tendência geral de que cepas de BCG virulentas também sejam mais protetoras. As cepas do grupo mais virulento demonstraram melhor proteção do que as cepas Suécia e Birkhaug do grupo II. Entre as cepas pertencentes ao grupo I, a BCG Japão é menos virulenta e também menos protetora do que BCG Russia e Moreau (ZHANG et al., 2016).

Além disso, a via de administração da vacina também parece possuir influência quando se trata da eficácia do BCG. Sabe-se que o BCG possui uma eficácia variável contra TB pulmonar quando administrado por via intradérmica. Em um estudo recente na qual macacos-rhesus foram vacinados com BCG por via intravenosa (IV), a vacina demonstrou um alto potencial contra a tuberculose (DARRAH et al., 2020). A rota intravenosa levou a uma grande infiltração de células T nos pulmões em comparação com as rotas intradérmica e aerossol. Seis meses após a vacinação, os animais foram expostos a *M. tuberculosis* e ainda pôde ser observado a presença de células T de longa sobrevivência, que poderiam ser rapidamente ativadas após a infecção. A explicação para este rápido influxo e expansão de células T pode ser que a vacinação IV leve à entrega de uma alta dose de BCG para o pulmão (DIJKMAN et al., 2019; FATIMA et al., 2020).

Portanto, os fatos citados anteriormente podem ser úteis para o desenvolvimento de novas vacinas recombinantes, de epítomos ou DNA. Já existem várias pesquisas com bons resultados quando se trata de uma nova vacina utilizando o BCG recombinante, essas pesquisas serão mencionadas posteriormente.

4.3.2 BCG como imunoterápico em câncer de bexiga

O câncer de bexiga é o nono câncer mais comum no mundo, e é quatro vezes mais comum em homens do que em mulheres (ANTONI et al., 2017), sendo responsável por cerca de 500.000 novos casos e 200.000 mortes em todo o mundo. A prevalência é alta, com mais de 1,6 milhão vivendo com a doença mundialmente (RICHTERS; ABEN; KIEMENEY, 2020). No Brasil, a estimativa de novos casos foi de 10.640 em 2020 e 4.517 mortes em 2019 (INCA, 2020).

O câncer de bexiga é categorizado como câncer de bexiga músculo não-invasivo (NMIBC), o qual representa a forma não agressiva e não invasiva da doença, e câncer de bexiga músculo-invasivo (MIBC), que inclui estágios patológicos T2-T4, sendo T2 invasão do tumor no músculo, T3 invasão do tumor na gordura perivesical e T4 invasão do tumor nos órgãos adjacentes. A maioria dos pacientes recém-diagnosticados possuem NMIBC (70% a 80%), o que permite aos pacientes opções de preservação da bexiga para o tratamento do câncer. Porém, esta é uma doença frequentemente multifocal e metacrônica, os tumores comumente recorrem e podem progredir para MIBC (FARLING, 2017; LARSEN et al., 2020). A terapia mais eficaz para pacientes com risco intermediário e alto de NMIBC é a instilação intravesical de BCG, recomendada tanto pela associação europeia de urologia quanto pela associação americana de urologia, representando o único agente conhecido por reduzir a recorrência e a progressão para câncer de bexiga músculo-invasivo (BEGNINI et al., 2015; LARSEN et al., 2020).

A primeira ligação entre a tuberculose e o câncer ocorreu em 1929, em que foi observado uma incidência menor de câncer em pacientes com TB e foi concluído que existia algum antagonismo mútuo entre as doenças. Em 1950, alguns estudos foram capazes de mostrar que neonatos imunizados com BCG tinham uma incidência significativamente menor de leucemia. Mas foi apenas em 1998 que o conceito de que a estimulação imunológica de doenças infecciosas reduz o risco de câncer foi

confirmado. Depois desses estudos, o uso de BCG em oncologia foi proposto de forma mais concreta e em 1990, a Administração Federal de Medicamentos (FDA) aprovou o uso clínico de BCG no tratamento de câncer de bexiga músculo não-invasivo. Atualmente, a terapia com BCG é a de maior sucesso contra NMIBC (BEGNINI et al., 2015; MASTRANGELO; FADDA; MILAN, 1998; ROSENTHAL, 1948).

Os mecanismos precisos pelos quais o BCG exerce seus efeitos são complexos, entretanto sabe-se que a fixação e internalização do BCG por meio de macropinocitose nas células cancerígenas da bexiga são um fator importante na seletividade e eficácia da terapia (REDELMAN-SIDI et al., 2013). Além disso, a internalização de BCG pelas células cancerígenas pode levar a eventos que resultam na morte das células da bexiga através de efetores do sistema imunológico ou por meio da citotoxicidade direta do BCG contra as células cancerígenas da bexiga (BEGNINI et al., 2015; LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

Existem várias diretrizes em relação ao tratamento com BCG, porém recomenda-se que para tumores multifocais ou de baixo grau Ta deve ser feita a instilação uma vez por semana durante seis semanas, seguida de manutenção. Já para tumores Ta e T1 de alto grau deve ser feita a indução de BCG seguido de manutenção por 36 semanas (FARLING, 2017). Ademais, é consenso que pelo menos doze doses de BCG sejam necessárias para mostrar superioridade sobre a terapia com quimioterapia na prevenção da recorrência (BÖHLE; BRANDAU, 2003).

As taxas de resposta positiva de BCG são de 55-65% para tumores Ta e T1 e 70-75% para Tis, o que indica que 30-45% dos pacientes terão falhas na resposta induzida por BCG. Já a taxa de resposta completa em pacientes com alto risco NMIBC pode ser tão alto quanto 80%. No entanto, estima-se que 50-90% dos pacientes com doença de alto risco sofrerá recorrência dentro de 5 anos e até 20% irão progredir para músculo-invasivo (BEGNINI et al., 2015; HALL et al., 2007; HUSSAIN et al., 2009). Dentre as razões que explicam a falha do BCG dentro do tratamento, as mais comuns são as instilações insuficientes ou excessivas de BCG, geração de resposta imunológica inadequada e doença invasiva ou metastática oculta (BEGNINI et al., 2015).

As repetidas instilações requerem doses e volumes muito maiores de BCG do que a vacinação contra a tuberculose, conseqüentemente os pacientes possuem efeitos adversos que podem levar à descontinuação da terapia, embora a maioria dos pacientes tolere a terapia com BCG intravesical. Os efeitos colaterais incluem febre,

irritação da bexiga, diminuição da capacidade da bexiga, incontinência e hematúria. Esses sintomas locais leves ocorrem em aproximadamente 85% dos pacientes. Já efeitos colaterais mais graves como cistite, sintomas de micção irritativos e sepse por BCG são observados em até 20% dos pacientes, o que os torna intolerantes ao tratamento com BCG (BEGNINI et al., 2015; LARSEN et al., 2020; NIEUWENHUIZEN et al., 2017). Devido a esses efeitos colaterais e aos 30-40% dos pacientes que não respondem a terapia BCG, a tecnologia do BCG recombinante (rBCG) vem sendo uma alternativa para melhorar a eficácia e a tolerabilidade do BCG na terapia do câncer de bexiga. Vários estudos têm sido realizados com essa tecnologia, modificando os rBCGs para expressarem moléculas imunoestimuladoras, citocinas, como granulocitomacróforo (GM-CSF), IL-4, IL-6 e IFN- γ (MURRAY; ALDOVINI; YOUNG, 1996), e antígenos, sendo o mais comum a proteína Ag85 (BEGNINI et al., 2013; JAGANNATH et al., 2009), para testar a sua capacidade de induzir respostas imunológicas mais fortes e específicas (LARSEN et al., 2020).

4.3.3 BCG como imunoterápico em melanoma

O melanoma é uma doença neoplásica causada pela transformação maligna de melanócitos normais e pode ocorrer em qualquer tecido que contenha estas células, incluindo locais não cutâneos. O melanoma maligno cutâneo (CMM) representa a forma mais agressiva desse tipo de câncer, possui uma taxa significativamente maior em relação a morbidade e mortalidade. Embora seja o terceiro câncer de pele mais comum, responsável por apenas 3% de todos cânceres de pele, também é responsável por 65% de todas as mortes. Essa doença está associada a fatores ambientais e dados demográficos do paciente, como tom de pele mais claro, sensibilidade ao sol, múltiplas sardas, pessoas com sistema imunológico enfraquecido e histórico familiar de melanoma (BENITEZ et al., 2019; CUMMINS et al., 2006; KREMENOVIC; SCHENK; LEE, 2020). Um total de 106.110 novos casos de melanoma serão diagnosticados e 7.180 mortes são esperadas em 2021 apenas nos Estados Unidos (SIEGEL et al., 2021). No Brasil, a estimativa de novos casos foi de 8.450 em 2020 e 1.978 mortes em 2019 (INCA, 2020).

A detecção precoce do melanoma é crucial para a sobrevivência a longo prazo, porque existe uma correlação acentuada entre a espessura do tumor e a mortalidade.

A taxa de sobrevivência a longo prazo dos pacientes com melanoma maligno metastático é de apenas 5%. Entretanto, para casos de melanoma em trânsito em estágio III inoperável, o BCG tem sido o agente mais conhecido para terapia intralesional de CMM, sendo uma opção terapêutica recomendada pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). Ademais, a terapia com BCG tem sido uma terapia relativamente barata para CMM inoperável (BALCH et al., 2004; CUMMINS et al., 2006; LARDONE et al., 2017).

BCG é usado como um agente imunoterapêutico, podendo ser administrado sozinho ou em combinação com uma vacina de células tumorais autólogas ou droga por injeção intralesional (SLOOT et al., 2016), resultando em regressões de tumores locais e regionais e melhorando a sobrevida do paciente. Não há consenso sobre a melhor cepa, dose ou calendário para a terapia com BCG. O volume de microrganismos BCG injetados em cada lesão irá variar dependendo do tamanho da lesão. Sendo geralmente aplicado semanalmente, frequentemente em doses crescentes até que a inflamação seja atingida. O teste cutâneo derivado de proteína purificada (PPD) pode ser usado como um marcador de atividade (BENITEZ et al., 2019; TRIOZZI; TUTHILL; BORDEN, 2011).

As taxas de respostas em relação a terapia com BCG são altas em metástases cutâneas, atingindo mais 80% em vários relatórios. Já metástases subcutâneas são mais resistentes, menos de 20% responderá ao tratamento. A regressão induzida por BCG intralesional de lesões em trânsito é de 91%. Além disso, sabe-se que a taxa de resposta para metástase cutânea é menor em pacientes que possuem doença visceral e grande carga de tumor do que em aqueles com apenas metástase cutânea (MORTON et al., 1974; TAN; HO, 1993; TRIOZZI; TUTHILL; BORDEN, 2011). Quando combinado o BCG com dacarbazina (DTIC), uma das combinações mais comuns, resulta em um aumento de 36,5% na taxa de sobrevivência de 10 anos para pacientes com melanoma no estágio II (CASCINELLI et al., 1989). Ademais, a combinação de BCG com a vacina alogênica canvaxin™ em pacientes com melanoma em estágio IV após a ressecção, resultou em uma taxa de sobrevida global de 5 anos em 39% em comparação com 20% para pacientes não vacinados (HSUEH et al., 2002).

Se presume que o BCG utilize dos mesmos mecanismos imunes que na terapia em células de bexiga. Além do mais, também foi sugerido que há um compartilhamento de antígenos entre o BCG e as células do melanoma que contribuem para o efeito do sistema imunoterapêutico (TRIOZZI; TUTHILL; BORDEN,

2011). Assim como no câncer de bexiga, a administração de BCG também pode causar efeitos colaterais no melanoma, como por exemplo, febre, hematúria, irritação e inflamação local. Sendo assim, uma alternativa para diminuir os efeitos colaterais e aumentar ainda mais a resposta imune e a sobrevivência do paciente, é produzir cepas de BCG geneticamente modificadas (rBCG), podendo ou não, ser administradas com agentes quimioterápicos ou imunoterapêuticos (BENITEZ et al., 2019).

4.3.4 BCG como imunobiológico aplicado à outras doenças

O bacilo Calmette-Guérin possui um imenso potencial imunoterapêutico não apenas em doenças neoplásicas, mas também para doenças autoimunes, alérgicas, neurodegenerativas, além de servir como uma medida preventiva contra alguns agentes infecciosos. Muitos desses efeitos protetores de amplo espectro, como comentado anteriormente, são atribuídos à imunidade treinada, à reprogramação epigenética e metabólica das células imunes inatas (MOULSON; AV-GAY, 2021).

Nas últimas quatro décadas, as taxas de doenças autoimunes e alérgicas aumentaram significativamente nos países industrializados (KOTZ; SIMPSON; SHEIKH, 2011), assim como, pacientes em idade mais jovem começaram a ser afetados (KARVONEN; PITKÄNIEMI; TUOMILEHTO, 1999), indicando um aumento na prevalência dessas doenças. Essas doenças ocorrem devido a fatores genéticos e ambientais. No entanto, de acordo com a hipótese da higiene, o aumento das condições autoimunes e alérgicas está associado a falta de interação entre microrganismos e o sistema imunológico. Com o aumento das populações industrializadas, a melhoria da higiene e os cuidados médicos, o sistema imunológico humano perdeu o contato com vários micróbios não patogênicos presentes em diversos ambientes, como fazendas, animais, fontes de água não tratadas, entre outros (BACH, 2018). Esse contato é muito importante, porque os microrganismos possuem capacidade de manipular as respostas imunológicas humanas, sendo fundamentais para o seu desenvolvimento e sua funcionalidade adequada. Para compreender essa relação, o modelo de equilíbrio da função imunológica precisa ser levado em consideração, na qual conceitua o sistema imunológico como uma entidade dinamicamente regulada que mantém o equilíbrio entre as respostas antagônicas por meio de mecanismos repressivos cruzados. Como exemplo, as respostas TH1 podem proteger contra infecções virais ou reduzir o crescimento de tumores, sendo induzidas

de forma direta ou indireta por meio da supressão de respostas TH2 (EBERL, 2016). Nesse sentido, a utilização do BCG seria adequada para a modulação do sistema imunológico e conseqüentemente a repressão de respostas pró-alérgicas e/ou autoimunes (MOULSON; AV-GAY, 2021).

O BCG tem se mostrado um promissor terapêutico para diabetes tipo 1 (TD1). TD1 é uma doença autoimune caracterizada pela destruição de células beta pancreáticas, que leva a falta de produção de insulina e conseqüentemente, a um quadro de hiperglicemia, poliúria e hipoinsulinemia (COVIÁN et al., 2019). Em um ensaio clínico randomizado de Fase I observou-se que em TD1 de longa data, a vacinação com duas doses de BCG intradérmico alcançou valores de HbA1c (um indicador dos níveis de glicose no sangue) reduzidos para uma faixa quase normal. Esse efeito persistiu por até oito anos após a vacinação, sem necessitar de outra dose de BCG (KÜHTREIBER et al., 2018). A redução de HbA1c está relacionada com a redefinição do sistema imunológico em um nível celular de duas maneiras: através da indução de células T reguladoras supressoras (Treg) e através de morte de linfócitos T citotóxicos que atacam as células das ilhotas pancreáticas. Ambos os mecanismos dependem da indução da citocina TNF pelo BCG (BAN et al., 2008; KÜHTREIBER; FAUSTMAN, 2019). Ademais, também foi identificado um novo mecanismo de redução do açúcar no sangue que baseia-se no imunometabolismo. Pacientes com TD1 apresentam fosforilação oxidativa excessiva em suas células, sendo este um mecanismo que transporta quantidades relativamente pequenas de açúcar para energia. O BCG modula o imunometabolismo de alta dependência de fosforilação oxidativa para uma alta dependência de conversão de glicose à lactato mesmo na presença de oxigênio, assim diminuindo os níveis de glicose e restaurando o metabolismo imunológico (KÜHTREIBER et al., 2018; KÜHTREIBER; FAUSTMAN, 2019).

Outra doença autoimune para a qual o BCG tem se mostrado ser benéfico, é a esclerose múltipla (EM). Essa doença é caracterizada pela disfunção neurológica devido à desmielinização gradual do sistema nervoso central (SNC), como conseqüência de uma resposta inflamatória autoimune (VAUGHN et al., 2019). Em ensaios clínicos, a vacinação com BCG demonstrou reduzir a frequência de lesões ativas no SNC de 12 pacientes com EM (RISTORI et al., 1999). Além disso, em um ensaio clínico de fase II a vacinação com BCG, após o primeiro episódio de desmielinização, reduziu o risco de desenvolver EM clinicamente definitiva por cinco

anos (RISTORI et al., 2014). Ademais, na década de 1990, estudos epidemiológicos começaram a relatar uma diminuição da prevalência de asma alérgica em crianças imunizadas com a vacina BCG (EL-ZEIN et al., 2010). Um estudo prospectivo de coorte demonstrou que a vacinação com BCG melhorou a função pulmonar e reduziu o uso de medicação em adultos com asma moderada a grave em comparação com o placebo (CHOI; KOH, 2002).

Uma nova preparação do BCG denominada *Extended Freeze-Drying* (EFD), demonstrou ser eficiente em modelos animais para esclerose múltipla e asma. EFD é uma preparação de células inteiras de BCG inativada por um processo que evita a desnaturação dos componentes biológicos presentes nas micobactérias (LAGRANDERIE; GUYONVARCH, 2014). Em modelo de camundongo de encefalite autoimune experimental (EAE), a injeção de EFD BCG atenuou a gravidade da doença, reduzindo a infiltração de células CD45+ da medula espinhal e reduzindo as células Tregs em órgãos linfoides secundários (LIPPENS et al., 2018). Já em modelos de porquinhos-da-índia e camundongos de asma alérgica, o EFD BCG reduziu a hiper-responsividade nas vias aéreas. Esse efeito protetor durou de 10-12 semanas após a injeção subcutânea. Observações clínicas nos animais tratados com EFD BCG demonstraram uma diminuição do recrutamento de células inflamatórias para os pulmões, assim como, houve uma produção positivamente regulada de IL-10 (LAGRANDERIE et al., 2008, 2013).

Além de um papel em condições autoimunes e alérgicas, o BCG também demonstrou proteger contra vírus respiratórios, como o vírus sincicial respiratório (RSV), influenza A e herpes vírus simples 2 (HSV2), devido, pelo menos parcialmente, a imunidade treinada (DATAU et al., 2010; OHRUI et al., 2005; STENSALLE et al., 2005). Em vista disso, a vacina BCG ganhou atenção significativa como um potencial agente na luta global contra a doença do coronavírus (COVID-19). Essa doença recente é uma nova forma de infecção do trato respiratório que pode ser complicada por pneumonia grave e síndrome do desconforto respiratório agudo, sendo causada pelo patógeno viral nomeado como coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (O'NEILL; NETEA, 2020). Estudos epidemiológicos preliminares sobre a pandemia relataram taxas de infecção e mortalidade mais baixas em populações vacinadas com BCG (GURSEL; GURSEL, 2020; HEGARTY et al., 2020). Entretanto, é importante ressaltar que esses estudos sofrem de vários vieses

inerentes relacionados a diferenças na notificação de casos, medidas de saúde pública e critérios de diagnóstico (MOULSON; AV-GAY, 2021).

Existem atualmente vários ensaios clínicos randomizados em andamento em todo o mundo para avaliar a vacinação com BCG como uma terapia potencial para COVID-19. Os ensaios clínicos da Austrália, Holanda e Estados Unidos estão testando se a vacinação com BCG consegue proteger os profissionais de saúde contra COVID-19. Outros estudos estão testando o efeito da vacinação com BCG sobre a prevenção da infecção grave por SARS-CoV-2 em pessoas mais velhas. E por fim, um estudo na Alemanha está testando se VPM1002, uma vacina de BCG recombinante mencionada anteriormente, consegue proteger tanto trabalhadores da saúde quanto pessoas mais velhas contra COVID-19 (REDELMAN-SIDI, 2020). Em teoria, a indução da imunidade treinada por BCG em indivíduos saudáveis deve aumentar a defesa antimicrobiana, inibir a replicação viral, reduzir a carga viral, diminuir a inflamação sistêmica e, assim, reduzir a gravidade, duração, morbidade e mortalidade associadas à infecção por SARS-CoV-2 (MOULSON; AV-GAY, 2021; O'NEILL; NETEA, 2020).

4.4 BCG recombinante

O interesse pelo BCG aumentou nos anos noventa com o resultado do desenvolvimento de diferentes sistemas genéticos para expressão de antígenos heterólogos em micobactérias. Esses sistemas incluem o desenvolvimento de diferentes vetores e sistemas de expressão e de secreção desses antígenos (OLIVEIRA; RIZZI; DELLAGOSTIN, 2017). Isso se deve às vantagens únicas que o BCG oferece como vacina. Sendo elas, a estabilidade e segurança do BCG, administração em qualquer momento após o nascimento e por fim, geralmente é administrado em dose única, provocando uma imunidade de longa duração. Além disso, possui propriedades adjuvantes extraordinárias tornando-se um vetor atraente para o desenvolvimento de vacinas recombinantes, principalmente após ser demonstrado que rBCG promove respostas imunes celulares e humorais contra antígenos heterólogos (DENNEHY; WILLIAMSON, 2005). Ademais, nenhum outro vetor de vacina viva foi avaliado com tantos antígenos e obteve proteção demonstrada

contra tantos patógenos. O potencial do rBCG é evidente e deve ser ainda mais explorado (BASTOS et al., 2009; STOVER et al., 1991).

4.4.1 BCG recombinante contra tuberculose

A estratégia baseada em BCG recombinante contra tuberculose visa melhorar a eficácia da vacina, gerando cepas de rBCG que expressam, em sua maioria, antígenos específicos para *Mycobacterium tuberculosis*. A abordagem que tem sido mais estudada por diferentes grupos de pesquisa, é a super expressão de antígenos que são encontrados tanto em BCG quanto em *M. tuberculosis*, sendo o principal antígeno o complexo Ag85, em uma tentativa de aumentar as respostas imunológicas (NIEUWENHUIZEN; KAUFMANN, 2018).

O complexo Ag85 é uma família composta por três proteínas Ag85A, Ag85B e Ag85C, em que todas as três possuem atividade enzimática de micolil-transferase e estão envolvidas na síntese da parede bacteriana. Possuem um forte potencial para induzir respostas imunes do tipo Th1, sendo importantes para o controle de infecções intracelulares, portanto estão entre os antígenos mais promissores como candidatos à vacina contra tuberculose (HUYGEN, 2014). A maioria das pesquisas que obtiveram bons resultados, utilizaram alguma proteína do complexo Ag85.

Em 2000 Horwitz e Harth desenvolveram a primeira vacina que demonstrou ser mais potente que o BCG contra tuberculose. O rBCG foi construído utilizando a cepa BCG Tice super expressando o antígeno Ag85B, sendo denominado como rBCG30. O plasmídeo utilizado foi o pMTB30 que pode ser mantido de forma estável em *Escherichia coli*, mas é utilizado para expressão apenas em micobactérias. Porquinhos-da-índia que foram imunizados com rBCG30 e posteriormente desafiados por aerossol com uma cepa altamente virulenta de *M. tuberculosis* sobreviveram significativamente mais do que os animais imunizados com BCG convencional, bem como, tiveram significativamente menos patologia pulmonar e menos tubérculos nos pulmões, fígados e baços do que os animais imunizados com a vacina BCG parental (HORWITZ; HARTH, 2003). Com base nesses resultados promissores, foi realizado um ensaio clínico de Fase I duplo-cego, no qual 35 adultos foram randomizados para receber rBCG30 ou BCG parental via intradérmico. O resultado da primeira demonstração em humanos foi uma vacina bem tolerada, capaz de induzir um

aumento significativo na imunidade específica de Ag85B quando comparada com o BCG parental, sendo capaz de inibir micobactérias intracelulares. Assim como, a vacinação intradérmica com rBCG30 foi tão bem tolerada quanto o BCG não recombinante (HOFT et al., 2008).

Ainda utilizando o mesmo antígeno Ag85B, porém pensando em uma estratégia de estender a capacidade de proteção durável da vacina, YUAN et al. (2015) desenvolveram o rBCG::XB, o qual super expressa antígenos imunodominantes de múltiplos estágios, Ag85B que é expressa durante a infecção primária e HspX que é expressa durante a fase de latência. Os resultados demonstraram que rBCG::XB pode induzir proteção contra o desafio com *M. tuberculosis* em camundongos do que a BCG parental, devido a cargas bacterianas mais baixas no pulmão e baço e menos alterações patológicas pulmonares ao longo do tempo. Portanto, a rBCG::XB poderia não apenas preservar a vantagem do BCG em proteger contra a infecção primária de TB, mas também estender e ampliar a proteção da vacina BCG para melhor controlar a tuberculose em adultos (YUAN et al., 2015).

Buscando uma estratégia totalmente diferente, NASCIMENTO et al. (2017) desenvolveram rBCG LTAK63 que expressa LTAK63, uma toxina mutante não tóxica de *E. coli* que apresenta propriedades adjuvantes. Foram utilizados dois promotores diferentes, um fraco e outro forte para obter diferentes níveis de expressão. Os resultados demonstraram que os camundongos imunizados com o rBCG LTAK63 de promotor mais fraco, mostrou um nível de proteção consideravelmente mais alto, assim como, as análises histopatológicas indicaram redução considerável na lesão pulmonar quando comparado com o BCG parental. A imunogenicidade e proteção superiores induzidas por esta cepa de BCG recombinante contra o desafio de *M. tuberculosis* revelou um novo mecanismo de proteção contra a patologia após a infecção e pode ser a base para a expressão de outros antígenos imunogênicos da TB, na tentativa de aumentar ainda mais suas propriedades protetoras (NASCIMENTO et al., 2017).

Uma das vacinas mais avançadas baseadas em rBCG contra tuberculose é a VPM1002. O seu desenvolvimento começou na década de 1990 com o objetivo de melhorar o BCG estimulando respostas mais robustas e eficazes de células T. A VPM1002 foi modificada pela inserção do gene da listeriolisina de *Listeria monocytogenes* e pela deleção do gene da urease. Acredita-se que a listeriolisina perfure o fagossomo, permitindo o vazamento do antígeno micobacteriano de

VPM1002 para o citosol e, assim, facilitando a apresentação cruzada e o aumento da resposta das células T CD8. Os resultados demonstraram eficácia e segurança superior sobre BCG em vários modelos animais, incluindo camundongos imunodeficientes, coelhos e animais primatas não humanos. A vacina passou em dois ensaios clínicos de fase I realizados na Alemanha e na África do Sul, demonstrando sua segurança e imunogenicidade em jovens adultos. Também foi testado com sucesso em um ensaio clínico randomizado de fase II em indivíduos saudáveis recém-nascidos na África do Sul. Além do seu desenvolvimento como vacina para recém-nascidos, VPM1002 também está sendo avaliada como uma vacina pós-exposição para adultos, uma vez que estudos pré-clínicos em camundongos pós-exposição demonstraram cargas bacterianas reduzidas. Para isso, atualmente VPM1002 está em avaliação em um ensaio clínico de Fase III (KAUFMANN, 2020; NIEUWENHUIZEN et al., 2017).

Além disso, o potencial zoonótico da TB bovina, causada por *Mycobacterium bovis*, também representa um risco para a saúde pública, além de resultar em perdas financeiras significativas para os produtores. Embora o principal hospedeiro do *M. bovis* seja o gado, outros animais, incluindo humanos, podem ser afetados. Dessa forma, o comércio internacional e o desenvolvimento da indústria de laticínios e carnes podem ser prejudicados. Uma alternativa econômica para controlar a doença é através da vacinação em rebanho. No entanto, a vacina BCG apresenta uma eficácia limitada contra a tuberculose bovina. Uma estratégia para melhorar essa eficácia, é o desenvolvimento de cepas recombinantes de BCG (WATERS et al., 2012).

RIZZI et al. (2012) construíram uma cepa de rBCG super expressando o antígeno Ag85B, através de um sistema de expressão baseado no uso de uma cepa auxotrófica para o aminoácido leucina, denominada Δ leuD BCG Pasteur. A imunização de bovinos com essa vacina reduziu significativamente os danos histológicos dos pulmões dos animais em comparação com o BCG Pasteur do tipo selvagem. Além disso, o rBCG também induziu maiores níveis de expressão de IL-17 e IL-4 após estimulação com derivado de proteína purificada (PPD) de células mononucleares de sangue periférico. A expressão de IL-17 apresentou ter uma correlação inversa com a gravidade da doença, sugerindo ser uma citocina potencial a ser empregada como biomarcador de proteção do gado contra a tuberculose bovina. Sendo assim, é importante ressaltar que a vacinação com o rBCG conferiu taxas de

proteção significativamente maiores do que o BCG Pasteur do tipo selvagem (RIZZI et al., 2012).

4.4.2 BCG recombinante contra câncer

A alta variabilidade nas taxas de eficácia e as possíveis complicações com as terapias utilizando BCG para o tratamento dos cânceres de bexiga e melanoma, levaram esforços para desenvolver modelos mais ativos e menos tóxicos de imunoterapia. Uma estratégia promissora é a modificação genética do BCG para criar uma resposta imune mais específica com a super expressão de moléculas imunogênicas ou com a inclusão de antígenos estranhos (BEGNINI et al., 2015).

Uma das abordagens mais populares é a geração de diferentes cepas de rBCG que expressam citocinas de camundongos e humanos, principalmente citocinas Th1, devido a evidências que sugerem que a resposta imune Th1 é essencial para o sucesso da imunoterapia com BCG, principalmente para câncer de bexiga não invasivo do músculo. Estratégias de rBCG baseadas em citocinas Th1 incluem a expressão das interleucinas (IL) IL-2, IL-12, IL-18, IFN- α e IFN- γ (LUO; HENNING; O'DONNELL, 2011; WANG et al., 2014).

O'DONNELL et. al. (2004) desenvolveram um rBCG expressando IL-12, em razão de evidências que sugerem que IL-12 pode ter um papel na imunovigilância natural ou servir como um agente imunomodulador na terapia do câncer. Neste estudo, foram utilizados modelos animais ortotópicos, na qual imitam as fases iniciais da agressividade do câncer de bexiga humano, sendo a primeira demonstração mostrando a atividade anti-câncer de IL-12 nesse modelo animal. Os resultados indicaram que IL-12 exibiu um potente efeito terapêutico dependente de doses em várias vias de administração, como subcutânea, intraperitoneal, intravenosa e intravesical. A administração intravesical de IL-12 foi eficaz no tratamento de carcinoma de bexiga implantado ortotopicamente, podendo ser uma abordagem clínica que irá complementar e melhorar outros tratamentos (O'DONNELL et al., 2004). Ademais, a eficácia antitumoral da IL-12 foi demonstrada em múltiplos estudos em animais, bem como a melhoria da sobrevivência e memória imunológica específica

do tumor com IL-12 sozinha ou em combinação com agentes quimioterápicos (WANG et al., 2014).

Com a estratégia de utilizar um antígeno exógeno para aumentar a resposta antitumoral, NASCIMENTO et. al. (2000) construiu um rBCG que expressa a subunidade S1 da toxina *pertussis* (S1PT) geneticamente desintoxicada (rBCG-S1PT), fundida com a sequência sinal e sob o controle do promotor da β -lactamase de *Mycobacterium fortuitum*. A toxina *pertussis* (PT) é o antígeno mais importante caracterizado até agora de *Bordetella pertussis*, composto por cinco subunidades sendo S1 o domínio ativo (NASCIMENTO et al., 2000). rBCG-S1PT demonstrou ser capaz de induzir uma resposta imune celular mais forte do que o BCG selvagem, assim como reduziu significativamente o peso do tumor na bexiga e aumentou o tempo de sobrevivência em comparação com o BCG. Sendo assim, o rBCG-S1PT é um promissor agente imunoterapêutico para terapia intravesical de câncer de bexiga (ANDRADE et al., 2010; CHADE et al., 2008). Ademais, BEGNINI et al. (2013) verificaram o efeito citotóxico de uma cepa auxotrófica de BCG recombinante super expressando o antígeno Ag85B (rBCG Δ leuD/Ag85B) em células de carcinoma de bexiga humana 5637. O rBCG demonstrou aumentar a citotoxicidade em células de câncer de bexiga superficial *in vitro* e este efeito foi relacionado à apoptose e a parada do ciclo celular (BEGNINI et al., 2013).

O BCG é considerado um veículo eficaz para a entrega de antígenos e, devido as suas propriedades, o desenvolvimento de uma vacina rBCG para a imunoterapia contra o câncer de mama também ganhou grande impulso. CHUNG et. al. (2003) construíram uma vacina de rBCG contra o câncer de mama, que consiste na expressão de uma forma truncada de MUC1 e IL-2 humana, sendo denominada BCG-hIL2MUC1. A Mucina 1 (MUC1) é um potencial candidato para a imunoterapia do câncer de mama, devido a sua super expressão nas células mamárias cancerígenas e está ausente ou expressa em níveis muito baixos na glândula mamária normal, sendo assim as vacinas com MUC1 teriam alta seletividade contra as células cancerígenas da mama. A capacidade de BCG-hIL2MUC1 de inibir o crescimento do câncer de mama foi avaliado em camundongos hu-PBL-SCID. Após a imunização, camundongos hu-PBL-SCID receberam xenoinxertos de células de câncer de mama humano. Os resultados demonstraram que a taxa de crescimento do tumor nos animais imunizados com BCG-hIL2MUC1 foi muito mais lento do que o observado nos grupos controle, além disso o tamanho médio do tumor foi significativamente menor.

Linfócitos CD8 humanos foram detectados apenas nos tumores dos animais imunizados com BCG-hIL2MUC1. Ou seja, a vacina rBCG foi capaz de inibir o crescimento do tumor de mama (CHUNG et al., 2003). Ademais, já foi demonstrado que várias vacinas rBCG baseadas em MUC1 induziram respostas imunes antitumorais específicas em estudos pré-clínicos (YUAN et al., 2010).

Existem poucos estudos disponíveis na literatura sobre o desenvolvimento de BCG recombinante para melanoma. DUDA et. al. (1995) desenvolveram um rBCG expressando IL-2 e testaram como uma injeção intratumoral em modelos de camundongo para melanoma. O rBCG foi eficaz contra o melanoma quando comparado com os grupos controle, também resultou em uma redução da carga tumoral de aproximadamente 45%. No entanto, quando comparado os resultados do rBCG com o BCG selvagem, não houve diferença significativamente estatística (DUDA et al., 1995). Em outro estudo, FUJIMOTO et. al. (1996) compararam rBCG expressando IL-2, rBCG expressando GM-CSF e citocinas purificadas em cultura de células de melanoma B16F10, para compreender a contribuição das citocinas inibidoras de tumor. A produção de IFN- γ induzida por rBCG expressando IL-2 ou GM-CSF foi equivalente à induzida pela combinação de BCG selvagem com as citocinas purificadas (FUJIMOTO et al., 1996). A falta de estudos na literatura pode estar relacionada com os resultados de rBCG que não foram muito significativos quando comparados com o BCG selvagem. A maioria dos estudos disponíveis associam as cepas de BCG com quimioterápicos, imunoterápicos ou vacinas baseadas em linhagens celulares de melanoma, como uma forma de aumentar a eficácia terapêutica (CASCINELLI et al., 1989; HSUEH et al., 2002).

4.4.3 BCG como vetor expressando antígenos heterólogos

Vacinas vivas com vetor recombinante são uma alternativa potencial que pode ser eficaz para aumentar o espectro de proteção e fornecer uma estimulação sustentada do sistema imunológico (KOCHI; KILLEEN; RYAN, 2003). A abordagem de usar BCG como um vetor para a expressão recombinante de antígenos heterólogos foi testada anteriormente para vários patógenos, como vírus do sarampo (FENNELLY et al., 1995), *Plasmodium yoelii* (MATSUMOTO et al., 2000), vírus da hepatite B (REZENDE et al., 2005), *Bordetella pertussis* (MEDEIROS et al., 2005), *Toxoplasma*

gondii (WANG et al., 2007) e rotavírus (DENNEHY et al., 2007), exibindo resultados promissores em modelos de camundongos para essas doenças. Todas essas qualidades tornam o BCG extremamente atraente para o desenvolvimento de uma vacina recombinante vetorizada.

GOULART et. al. (2017) desenvolveram cepas de BCG recombinante contra as doenças pneumocócicas causada pela bactéria *Streptococcus pneumoniae*. O rBCG PspA-PdT que expressa uma proteína de fusão PspA-PdT foi capaz de induzir uma resposta imune eficaz e proteção contra sepse em uma estratégia de *prime-boost*. A fim de tentar aumentar ainda mais a resposta imunológica para proteger os camundongos contra a colonização de pneumococos e sepse, o grupo desenvolveu duas outras cepas de rBCG expressando as proteínas SP 0148 e SP 2108. Os camundongos foram imunizados com uma combinação das cepas rBCG PspA-PdT, rBCG 0148 e rBCG 2108, sendo denominado rBCG Mix. Os resultados demonstraram que o rBCG Mix foi capaz de proteger os camundongos contra a colonização pneumocócica e sepse. Essa formulação é potencialmente capaz de proteger nos estágios iniciais da colonização pneumocócica da nasofaringe e contra doenças invasivas (GOULART et al., 2017).

O rBCG também foi utilizado contra o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) e o metapneumovírus humano (hMPV), dois pneumovírus que afetam o trato respiratório inferior de crianças pequenas, idosos e pacientes imunocomprometidos. SOTO et. al. desenvolveram um rBCG expressando a nucleoproteína de hRSV (rBCG-N) e um rBCG expressando a fosfoproteína de hMPV (rBCG-P). Os resultados demonstraram que após o desafio viral, os camundongos imunizados com rBCG desenvolveram anticorpos específicos para a maioria das proteínas de hRSV e hMPV. Além disso, os soros desses animais imunizados e desafiados exibiram capacidade de neutralização do vírus e protegeram camundongos da replicação viral e da doença pulmonar. Isso sugere que o uso de BCG como vetor pode ser considerado como uma abordagem de vacina promissora contra vírus respiratórios (SOTO et al., 2018).

A estratégia vacinal utilizando BCG recombinante também foi testada contra a leptospirose. OLIVEIRA et. al. (2019) desenvolveram uma quimera, contendo porções antigênicas das proteínas LigAni, LemA e LipL32, expressa por BCG sob o controle de diferentes promotores micobacterianos. As vacinas forneceram proteção significativa e imunidade esterilizante em hamsters (OLIVEIRA et al., 2019). Para avaliar qual porção desta quimera seria mais imunoprotetora contra leptospirose,

quatro porções da mesma, sendo elas P1 (lipL32), P2 (ligAni), P3 (lemA:ligAni) e P4 (lipL32:lemA) foram individualmente transformadas em uma cepa de BCG Pasteur. Os resultados demonstraram 100% de proteção e prevenção significativa de colonização renal induzida por todas as cepas de rBCG. No entanto, as análises histopatológicas mostraram que as vacinas testadas não foram capazes de prevenir danos aos tecidos pulmonar e renal, porém este fato pode ser explicado pela indução de um estado pró-inflamatório na fase aguda da doença, já que as análises realizadas por cultura e qPCR não detectaram carga leptospiral nos rins dos animais. Sendo assim, o BCG provou o seu potencial como um vetor vacinal, fornecendo proteção e imunidade esterilizante contra leptospirose em hamsters (DORNELES et al., 2020).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do que foi exposto no presente trabalho, o potencial da vacina BCG se torna evidente. Seu uso como um imunoterápico eficaz para os cânceres de bexiga e melanoma bem como, seu potencial como vetor vacinal para a entrega de antígenos heterólogos demonstram a versatilidade desse microrganismo como imunobiológico. A estratégia de desenvolvimento de BCG recombinante pode aprimorar ainda mais a sua eficácia como imunoterápico e como vacina contra tuberculose, a exemplo da vacina VMP1002, que tem demonstrado ser muito promissora, de acordo com seus ensaios clínicos.

Após a compreensão dos seus mecanismos imunológicos, como a imunidade treinada e a reprogramação epigenética e metabólica das células, os seus mecanismos de ação em diversas doenças se tornaram mais claros. Deste modo, esses mecanismos podem ser ainda mais explorados daqui em diante, buscando a sua utilização para a modulação do sistema imunológico em doenças autoimunes, alérgicas e neurodegenerativas ou até mesmo como uma espécie de vacina inespecífica para vírus com uma alta taxa de mutação, na qual as vacinas específicas são ineficientes.

6. REFERÊNCIAS

- AABY, P.; BENN, C. S. Saving lives by training innate immunity with bacille Calmette-Guérin vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. National Academy of Sciences, v. 109, n.43, p. 17317-17318, 2012.
- ABADIE, V. et al. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1843–1850, 2005.
- ABDALLAH, A. M. et al. Type VII secretion - Mycobacteria show the way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 883–891, 2007.
- ABDALLAH, A. M.; BEHR, M. A. Evolution and strain variation in BCG. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1019, p. 155–169, 2017.
- ABUBAKAR, I. et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. **Health Technology Assessment**. Health Technol Assess, v. 17, n. 37, 2013.
- ABZUG, M. J. Acute sinusitis in children: Do antibiotics have any role? **Journal of Infection**, v. 68, n. SUPPL1, p. S33–S37, 2014.
- ANDRADE, P. M. et al. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 28, n. 5, p. 520–525, 2010.
- ANTONI, S. et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**. Elsevier B.V., v. 71, n. 1, p. 96-108, 2017.
- BACH, J. F. The hygiene hypothesis in autoimmunity: The role of pathogens and commensals. **Nature Reviews Immunology**. Nature Publishing Group, v. 18, n. 2, p. 105-120, 2018.
- BALCH, C. M. et al. An Evidence-based Staging System for Cutaneous Melanoma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, n. 3, p. 131–149, 2004.

BAN, L. et al. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 36, p. 13644–13649, 2008.

BASTOS, R. G. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6495-6503, 2009.

BCG World Atlas, 2020. Disponível em <<http://www.bcgatlas.org/index.php>>. Acesso em: 19 maio de 2021.

BEGNINI, K. R. et al. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1543-1552, 2013.

BEGNINI, K. R. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3741–3754, 2015.

BEHR, M. A. et al. A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 12, p. 3394–3399, 2000.

BEHR, M. A. BCG - Different strains, different vaccines? **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 86–92, 2002.

BELLEY, A. et al. Impact of Methoxymycolic Acid Production by *Mycobacterium bovis* BCG Vaccines. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2803–2809, 2004.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T. C. et al. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis - Review **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Fundacao Oswaldo Cruz, v. 100, n. 5, p. 459-465, 2005.

BENITEZ, M. L. R. et al. *Mycobacterium bovis* BCG in metastatic melanoma therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 7903–7916, 2019.

BOER, M. C. et al. CD8⁺ regulatory T cells, and not CD4⁺ T cells, dominate suppressive phenotype and function after in vitro live *Mycobacterium bovis*-BCG activation of human cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

BOER, M. C. et al. *Mycobacterium bovis* BCG vaccination induces divergent proinflammatory or regulatory T cell responses in adults. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 7, p. 778–788, 2015.

BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. **Journal of Urology**. Lippincott Williams and Wilkins, v. 170, n. 3, p. 964-969, 2003.

BROSCH, R. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 13, p. 5596–5601, 2007.

BRYDER, L. “We shall not find salvation in inoculation”: BCG vaccination in Scandinavia, Britain and the USA, 1921-1960. **Social Science and Medicine**, v. 49, n. 9, p. 1157–1167, 1999.

CASCINELLI, N. et al. The significance of conversion of skin reactivity to efficacy of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccinations given immediately after radical surgery in stage II melanoma patients. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 28, n. 4, p. 282–286, 1989.

CERNUSCHI, T. et al. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine: A global assessment of demand and supply balance. **Vaccine**, v. 36, n. 4, p. 498–506, 2018.

CHADE, D. C. et al. Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing pertussis toxin on TNF-alpha and IL-10 in a bladder cancer model. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 1, 2008.

CHEN, J. M. et al. Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8114–8122, 2007.

CHENG, S. C. et al. MTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. **Science**, v. 345, n. 6204, 2014.

CHISTI, M. J. et al. Lack of BCG vaccination and other risk factors for bacteraemia in severely malnourished children with pneumonia. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 4, p. 799–803, 2015.

CHOI, I. S.; KOH, Y. I. Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: A randomized, controlled trial. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 88, n. 6, p. 584–591, 2002.

CHUNG, M. A. et al. Development and Preclinical Evaluation of a Bacillus Calmette-Guérin-MUC1-based Novel Breast Cancer Vaccine. **Cancer Research**, v. 63, n. 6, 2003.

COVIÁN, C. et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., vol. 10, n. 2806, 2019.

CUMMINS, D. L. et al. Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier Ltd, v. 81, n. 4, p. 500-507, 2006.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, 2006.

DARRAH, P. A. et al. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. **Nature**, v. 577, n. 7788, p. 95–102, 2020.

DATAU, E. et al. The Efficacy of Bacillus Calmette-Guérin Vaccinations for The Prevention of Acute Upper Respiratory Tract Infection in The Elderly. **Acta Med Indones**, v. 43, n. 3, p. 185-190, 2011.

DENNEHY, M. et al. Evaluation of recombinant BCG expressing rotavirus VP6 as an anti-rotavirus vaccine. **Vaccine**, v. 25, n. 18, p. 3646–3657, 2007.

DENNEHY, M.; WILLIAMSON, A. L. Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. **Vaccine**. Vaccine, v. 23, n. 10, p. 1209-1224, 2005.

DIJKMAN, K. et al. Prevention of tuberculosis infection and disease by local BCG in repeatedly exposed rhesus macaques. **Nature Medicine**, v. 25, n. 2, p. 255–262, 2019.

DORNELES, J. et al. Protection against leptospirosis conferred by *Mycobacterium bovis* BCG expressing antigens from *Leptospira interrogans*. **Vaccine**, v. 38, n. 51, p.

8136–8144, 2020.

DUDA, R. B. et al. Recombinant BCG therapy suppresses melanoma tumor growth. **Annals of Surgical Oncology**, v. 2, n. 6, p. 542–549, 1995.

EBERL, G. Immunity by equilibrium. **Nature Reviews Immunology**. Nature Publishing Group, v. 16, n. 8, p. 524–532, 2016.

EL-ZEIN, M. et al. Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 469–486, 2010.

ESMAIL, H. et al. The ongoing challenge of latent tuberculosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. Royal Society, v. 369, n. 1645, 2014.

FANUCCHI, S. et al. Immune genes are primed for robust transcription by proximal long noncoding RNAs located in nuclear compartments. **Nature Genetics**, v. 51, n. 1, p. 138–150, 2019.

FARLING, K. B. Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. **Nurse Practitioner**, v. 42, n. 3, p. 26–33, 2017.

FATIMA, S. et al. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. **Life sciences**. NLM (Medline), v. 252, 2020.

FENNELLY, G. J. et al. Recombinant Bacille Calmette-Guerin Priming against Measles. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 3, p. 698–705, 1995.

FINE, P. E. M. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **The Lancet**, v. 346, n. 8986, p. 1339–1345, 1995.

FLETCHER, H. A. et al. T-cell activation is an immune correlate of risk in BCG vaccinated infants. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2016.

FUJIMOTO, T. et al. Bacillus Calmette-Guerin plus interleukin-2 and/or granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor enhances immunocompetent cell production of interferon- γ , which Inhibits B16F10 melanoma cell growth in vitro.

Cancer Immunology Immunotherapy, v. 42, n. 5, p. 280–284, 1996.

Fundação Ataulpho de Paiva (FAP), 2021. Disponível em: <<https://www.fundacaoataulphodepaiva.com.br/sobre/>>. Acesso em: 26 jan. 2021.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **The Lancet**. Lancet Publishing Group, v. 393, n. 10181, p. 1642-1656, 2019.

GOULART, C. et al. A combination of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG strains expressing pneumococcal proteins induces cellular and humoral immune responses and protects against pneumococcal colonization and sepsis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 10, 2017.

GOULART, C. et al. Early pneumococcal clearance in mice induced by systemic immunization with recombinant BCG PspA-PdT prime and protein boost correlates with cellular and humoral immune response in bronchoalveolar fluids (BALF). **Vaccine: X**, v. 4, p. 100049, 2020.

GRANGE, J. M. et al. What is BCG? **Tubercle**. v. 64, p. 129–139, 1983.

GUALLAR-GARRIDO, S. et al. Each *Mycobacterium* requires a specific culture medium composition for triggering an optimized immunomodulatory and antitumoral effect. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 734, 2020.

GURSEL, M.; GURSEL, I. Is global BCG vaccination-induced trained immunity relevant to the progression of SARS-CoV-2 pandemic? **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Blackwell Publishing Ltd, v. 75, n. 7, p. 1815-1819, 2020.

HALL, M. C. et al. Guideline for the Management of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer (Stages Ta, T1, and Tis): 2007 Update. **Journal of Urology**, v. 178, n. 6, p. 2314–2330, 2007.

HEGARTY, P. K. et al. COVID-19 and Bacillus Calmette-Guérin: What is the Link? **European urology oncology**. NLM (Medline), v. 3, n. 3, p. 259-261, 2020.

HOFT, D. F. et al. A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. **Journal of**

Infectious Diseases, v. 198, n. 10, p. 1491–1501, 2008.

HORWITZ, M. A.; HARTH, G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1672–1679, 2003.

HSUEH, E. C. et al. Prolonged survival after complete resection of disseminated melanoma and active immunotherapy with a therapeutic cancer vaccine. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 23, p. 4549–4554, 2002.

HUEBNER, R. E.; SCHEIN, M. F.; BASS, J. B. The tuberculin skin test. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 968–975, 1993.

HUSSAIN, M. H. A. et al. Bladder cancer: Narrowing the gap between evidence and practice. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 34, p. 5680-5684, 2009.

HUYGEN, K. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Research Foundation, v. 5, 2014.

Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

JAGANNATH, C. et al. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p. 267–276, 2009.

KARVONEN, M.; PITKÄNIEMI, J.; TUOMILEHTO, J. The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. **Diabetes Care**, v. 22, n. 7, p. 1066–1070, 1999.

KAUFMANN, E. et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 176- 190.e19, 2018.

KAUFMANN, S. H. E. Vaccination Against Tuberculosis: Revamping BCG by Molecular Genetics Guided by Immunology. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., v. 11, 2020.

KAUFMANN, S. H.; LADEL, C. H.; FLESCH, I. E. T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. **Ciba Foundation symposium**. Ciba Found Symp, v. 195, p. 123-136, 1995.

KHADER, S. A. et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. **Journal of Clinical Investigation**. American Society for Clinical Investigation, v. 129, n. 9, p. 3482-3491, 2019.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, 2012.

KOCHI, S. K.; KILLEEN, K. P.; RYAN, U. S. Advances in the development of bacterial vector technology. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, n. 1, p. 31-43, 2003.

KOTZ, D.; SIMPSON, C. R.; SHEIKH, A. Incidence, prevalence, and trends of general practitioner-recorded diagnosis of peanut allergy in England, 2001 to 2005. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 623- 630.e1, 2011.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**. Elsevier, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KOWALEWICZ-KULBAT, M. et al. Tuberculin skin test reaction is related to memory, but not naive CD4+ T cell responses to mycobacterial stimuli in BCG-vaccinated young adults. **Vaccine**, v. 36, n. 30, p. 4566–4577, 2018.

KOZAK, R.; BEHR, M. A. Divergence of immunologic and protective responses of different BCG strains in a murine model. **Vaccine**, v. 29, n. 7, p. 1519–1526, 2011.

KREMENOVIC, M.; SCHENK, M.; LEE, D. J. Clinical and molecular insights into BCG immunotherapy for melanoma. **Journal of Internal Medicine**. Blackwell Publishing Ltd, v. 288, n. 6, p. 625-640, 2020.

KROCOVA, Z. et al. The role of B cells in an early immune response to *Mycobacterium bovis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, 2020.

KÜHTREIBER, W. M. et al. Long-Term reduction in hyperglycemia in advanced type 1 diabetes: The value of induced aerobic glycolysis with BCG vaccinations. **npj Vaccines**, v. 3, n. 1, 2018.

KÜHTREIBER, W. M.; FAUSTMAN, D. L. BCG Therapy for Type 1 Diabetes: Restoration of Balanced Immunity and Metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. Elsevier Inc., v. 30, n. 2, p. 80-92, 2019.

LAGRANDERIE, M. et al. *Mycobacterium bovis* BCG killed by extended freeze-drying reduces airway hyperresponsiveness in 2 animal models. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. 471–478, 2008.

LAGRANDERIE, M. et al. Therapeutic Administration of *Mycobacterium bovis* BCG Killed by Extended Freeze-Drying Modulates Airway Inflammation in a Chronic Murine Model of Asthma. **Open Journal of Respiratory Diseases**, v. 03, n. 02, p. 79–88, 2013.

LAGRANDERIE, M.; GUYONVARCH, P. M. The interplay between bacillus Calmette-Guérin and Treg cells and its role to prevent or cure inflammatory diseases. **Expert Review of Clinical Immunology**. Expert Reviews Ltd., v. 10, n. 6, p. 741-745, 2014.

LARDONE, R. D. et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guérin Alters melanoma microenvironment Favoring antitumor T cell responses and improving M2 Macrophage Function. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

LARSEN, E. S. et al. Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects and BCG infections. **APMIS**. Blackwell Munksgaard, v. 128, n. 2, p. 92-103, 2020.

LENIS, A. T.; LEC, P. M.; CHAMIE, K. Bladder cancer a review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**. American Medical Association, v. 324, n. 19, p. 1980-1991, 2020.

LI, H.; JAVID, B. Antibodies and tuberculosis: finally coming of age? **Nature Reviews**

Immunology, v. 18, n. 9, p. 591–596, 2018.

LIPPENS, C. et al. Extended freeze-dried BCG instructed pDCs induce suppressive tregs and dampen EAE. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

LIU, Y. et al. BCG-induced trained immunity in macrophage: reprogramming of glucose metabolism. **Reviews of Immunology**. Taylor and Francis Ltd, v. 39, n. 3, p. 83-96, 2020.

LUGOSI, L. Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from the discovery of Calmette and Guérin to molecular biology. **A review Tubercle and Lung Disease**, v. 73, n. 5, p. 252-261, 1992.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M. A. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN- γ production: Cytokine promotion and simulation of BCG effect. **Cytokine**, v. 21, n. 1, p. 17–26, 2003.

LUO, Y.; HENNING, J.; O'DONNELL, M. A. Th1 cytokine-secreting recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and prospective use in immunotherapy of bladder cancer. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.

MARTINEAU, A. R. et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1988–1994, 2007.

MASTRANGELO, G.; FADDA, E.; MILAN, G. Cancer increased after a reduction of infections in the first half of this century in Italy: Etiologic and preventive implications. **European Journal of Epidemiology**, v. 14, n. 8, p. 749–754, 1998.

MATSUMOTO, S. et al. *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin induces protective immunity against infection by *Plasmodium yoelii* at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. **Vaccine**, v. 19, n. 7–8, p. 779–787, 2000.

MEDEIROS, M. A. et al. Induction of humoral immunity in response to immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the S1 subunit of *Bordetella pertussis* toxin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 1015–1020, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immune recognition: Mechanisms and

- pathways. **Immunological Reviews**. Immunol Rev, v. 173, p. 89-97, 2000.
- MILUTINOVIĆ, B.; KURTZ, J. Immune memory in invertebrates. **Seminars in Immunology**. Academic Press, v. 28, n. 4, p. 328-342, 2016.
- MOORLAG, S. J. C. F. M. et al. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. **Clinical Microbiology and Infection**. Elsevier B.V., v. 25, n. 12, p. 1473-1478, 2019.
- MOREL, C. et al. *Mycobacterium bovis* BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induced specific T cell responses in humans and mice. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 2, p. 437–447, 2008.
- MORTON, D. L. et al. BCG immunotherapy of malignant melanoma: Summary of a seven year experience. **Annals of Surgery**, v. 180, n. 4, p. 635–643, 1974.
- MOULSON, A. J.; AV-GAY, Y. BCG immunomodulation: From the ‘hygiene hypothesis’ to COVID-19. **Immunobiology**. Elsevier, v. 226, n. 1, 2021.
- MURRAY, P. J.; ALDOVINI, A.; YOUNG, R. A. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guérin strains that secrete cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 934–939, 1996.
- NANKABIRWA, V. et al. Child survival and BCG vaccination: A community based prospective cohort study in Uganda. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, 2015.
- NASCIMENTO, I. P. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing *pertussis* toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4877–4883, 2000.
- NASCIMENTO, I. P. et al. Recombinant BCG expressing LTAK63 adjuvant induces superior protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- NETEA, M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews Immunology**. Nature Research, v. 20, n. 6, p. 375-388, 2020.

NIEUWENHUIZEN, N. E. et al. The recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine VPM1002: Ready for clinical efficacy testing. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., v. 8, 2017.

NIEUWENHUIZEN, N. E.; KAUFMANN, S. H. E. Next-generation vaccines based on Bacille Calmette-Guérin. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

O'DONNELL, M. A. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG secreting functional interleukin-2 enhances gamma interferon production by splenocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2508–2514, 1994.

O'DONNELL, M. A. et al. Interleukin-12 immunotherapy of murine transitional cell carcinoma of the bladder: Dose dependent tumor eradication and generation of protective immunity. **Journal of Urology**, v. 171, n. 3, p. 1330–1335, 2004.

O'LEARY, S.; O'SULLIVAN, M. P.; KEANE, J. IL-10 blocks phagosome maturation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 172–180, 2011.

O'NEILL, L. A. J.; NETEA, M. G. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? **Nature Reviews Immunology**. Nature Research, v. 20, n. 6, p. 335-337, 2020.

OETTINGER, T. et al. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine : review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. **Tubercle and Lung Disease** v. 79, p. 243–250, 1999.

OHRUI, T. et al. Prevention of elderly pneumonia by pneumococcal, influenza and BCG vaccinations. **Japanese Journal of Geriatrics**, v. 42, n. 1, p. 34–36, 2005.

OLIVEIRA, T. L. et al. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. **Vaccine**, v. 37, n. 6, p. 776–782, 2019.

OLIVEIRA, T. L.; RIZZI, C.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, v. 101, n. 18, p. 6865-6877,

2017.

OTA, M. O. C. et al. Influence of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin on Antibody and Cytokine Responses to Human Neonatal Vaccination. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 2, p. 919–925, 2002.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**. Nature Publishing Group, v. 2, 2016.

PATEL, A. A. et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 7, p. 1913–1923, 2017.

PENKOV, S. et al. Immunometabolic Crosstalk: An Ancestral Principle of Trained Immunity?. **Trends in Immunology**. Elsevier Ltd, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2019.

PEREIRA, S. M. et al. BCG vaccine against tuberculosis: Its protective effect and vaccination policies. **Revista de Saude Publica**, v. 41, n. 1, p. 59–66, 2007.

PITT, J. M. et al. Blockade of IL-10 Signaling during Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Enhances and Sustains Th1, Th17, and Innate Lymphoid IFN- γ and IL-17 Responses and Increases Protection to *Mycobacterium tuberculosis* Infection . **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 8, p. 4079–4087, 2012.

PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. **Nature**. Nature Publishing Group, v. 405, n. 6783, p. 212-219, 2000.

PYM, A. S. et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 533–539, 2003.

REDELMAN-SIDI, G. et al. Oncogenic activation of Pak1-dependent pathway of macropinocytosis determines BCG entry into bladder cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, n. 3, p. 1156–1167, 2013.

REDELMAN-SIDI, G. Could BCG be used to protect against COVID-19?. **Nature Reviews Urology**. Nature Research, v. 17, n. 6, p. 316-317, 2020.

REIMER-MICHALSKI, E. M.; CONRATH, U. Innate immune memory in plants.

Seminars in Immunology. Academic Press, v. 28, n. 4, p. 319-327, 2016.

REZENDE, C. A. F. et al. Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. **Journal of Virological Methods**, v. 125, n. 1, p. 1–9, 2005.

RICHTERS, A.; ABEN, K. K. H.; KIEMENEY, L. A. L. M. The global burden of urinary bladder cancer: an update. **World Journal of Urology**. Springer, v. 38, n. 8, p. 1895-1904, 2020.

RISTORI, G. et al. Use of Bacille Calmette-Guerin (BCG) in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 53, n. 7, p. 1588–1589, 1999.

RISTORI, G. et al. Effects of Bacille Calmette-Guérin after the first demyelinating event in the CNS. **Neurology**, v. 82, n. 1, p. 41–48, 2014.

RIZZI, C. et al. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

RODRIGUES, L. C. et al. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: The BCG-REVAC cluster-randomised trial. **Lancet**, v. 366, n. 9493, p. 1290–1295, 2005.

ROSENTHAL, S. R. Laboratory and technical aspects of BCG vaccination. **The Proceedings of the Institute of Medicine of Chicago**, v. 17, n. 1, p. 14, 1948.

SAEED, S. et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. **Science**, v. 345, n. 6204, 2014.

SAKULA, A. BCG: Who were Calmette and Guerin? **Thorax**, v. 38, n. 11, p. 806–812, 1983.

SCHUSTER, S.; HURREL, B.; TACCHINI-COTTIER, F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 671-675, 2013.

SEPULVEDA, R. L.; PARCHA, C.; SORENSEN, R. U. Case-control study of the efficacy of BCG immunization against pulmonary tuberculosis in young adults in

Santiago, Chile. **Tubercle and Lung Disease**, v. 73, n. 6, p. 372–377, 1992.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**. *Nat Immunol*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SINGH, V. K.; SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, B. S. Manipulation of BCG vaccine: a double-edged sword. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. Springer Verlag, v. 35, n. 4, p. 535-543, 2016.

SLOOT, S. et al. Developments in intralesional therapy for metastatic melanoma. **Cancer Control**, v. 23, n. 1, p. 12–20, 2016.

SMALE, S. T.; TARAKHOVSKY, A.; NATOLI, G. Chromatin contributions to the regulation of innate immunity. **Annual Review of Immunology**. Annual Reviews Inc., v. 32, p. 489-511, 2014.

SOTO, J. A. et al. Recombinant BCG Vaccines Reduce Pneumovirus-Caused Airway Pathology by Inducing Protective Humoral Immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2875, 2018.

STENSBALLE, L. G. et al. Acute lower respiratory tract infections and respiratory syncytial virus in infants in Guinea-Bissau: A beneficial effect of BCG vaccination for girls: Community based case-control study. **Vaccine**, v. 23, n. 10, p. 1251–1257, 2005.

STEWART, G. R. et al. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. **Nature Medicine**, v. 7, n. 6, p. 732–737, 2001.

STOVER, C. K. et al. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 456–460, 1991.

SUN, E. et al. BCG-induced neutrophil extracellular traps formation and its regulatory mechanism. **Research Square**, 2020.

TAKAYAMA, K.; WANG, L.; DAVID, H. L. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid

synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 29–35, 1972.

TAN, J. K. L.; HO, V. C. Pooled Analysis of the Efficacy of Bacille Calmette-Guerin (BCG) Immunotherapy in Malignant Melanoma. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, v. 19, n. 11, p. 985–990, 1993.

TANNER, R. et al. The humoral immune response to BCG vaccination. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., v. 10, 2019.

TRAN, V. et al. Loss of Lipid Virulence Factors Reduces the Efficacy of the BCG Vaccine. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

TRIOZZI, P. L.; TUTHILL, R. J.; BORDEN, E. Re-inventing intratumoral immunotherapy for melanoma. **Immunotherapy**, v. 3, n. 5, p. 653-671, 2011.

TRUNZ, B. B.; FINE, P.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **Lancet**, v. 367, n. 9517, p. 1173–1180, 2006.

VAN DER MEER, J. W. M. et al. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. **Molecular Immunology**. Elsevier Ltd, v. 68, n. 1, p. 40-44, 2015.

VAUGHN, C. B. et al. Epidemiology and treatment of multiple sclerosis in elderly populations. **Nature Reviews Neurology**. Nature Publishing Group, v. 15, n. 6, p. 329-342, 2019.

WANG, H. et al. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v. 56, n. 4, p. 263–268, 2007.

WANG, K. C. et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 120–126, 2011.

WANG, Y. et al. Recombinant bacillus Calmette-Guérin in urothelial bladder cancer immunotherapy: Current strategies. **Expert Review of Anticancer Therapy**. Expert Reviews Ltd., v. 15, n. 1, p. 85-93, 2014.

WATERS, W. R. et al. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. **Vaccine**, v. 30, n.16, p. 2611-2622, 2012.

WITT, D. J.; CRAVEN, D. E.; MCCABE, W. R. Bacterial infections in adult patients with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. **The American Journal of Medicine**, v. 82, n. 5, p. 900–906, 1987.

XU, H. et al. IL-10 dampens the Th1 and Tc activation through modulating DC functions in BCG vaccination. **Mediators of Inflammation**, 2019.

XUE, K. S. et al. Within-Host Evolution of Human Influenza Virus. **Trends in Microbiology**. Elsevier Ltd, v. 26, n. 9, p. 781-793, 2018.

YUAN, S. et al. MUC1-based recombinant Bacillus Calmette-Guerin vaccines as candidates for breast cancer immunotherapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 7, p. 1037-1048, 2010.

YUAN, X. et al. A live attenuated BCG vaccine overexpressing multistage antigens Ag85B and HspX provides superior protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 24, p. 10587–10595, 2015.

ZHANG, L. et al. Variable virulence and efficacy of BCG vaccine strains in mice and correlation with genome polymorphisms. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 2, p. 398–405, 2016.

ZHANG, W. et al. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. **PLoS one**, v. 8, n. 8, p. 71243, 2013.

ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. The influence of BCG on vaccine responses—a systematic review. **Expert Review of Vaccines**. Taylor and Francis Ltd, v. 17, n. 6, p. 547-554, 2018.

ZWERLING, A. et al. The BCG world atlas: A database of global BCG vaccination policies and practices. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 3, 2011.