

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**

Vinícius Martins Borges

**MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA  
IMUNOTERAPIA COM BCG EM MODELO SINGÊNICO DE  
MELANOMA MURINO**

Belo Horizonte

2023

Vinícius Martins Borges

**MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA IMUNOTERAPIA COM BCG  
EM MODELO SINGÊNICO DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira  
(Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Coorientadora: Profa. Dra. Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)

Belo Horizonte

2023

043

Borges, Vinícius Martins.

Mecanismos imunológicos envolvidos na imunoterapia com BCG em modelo singênico de melanoma murinho [manuscrito] / Vinícius Martins Borges. – 2023. 86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira. Coorientadora: Profa. Dra. Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Mycobacterium bovis. 3. Imunoterapia. 4. Neoplasias. 5. Melanoma. 6. Fator 88 de Diferenciação Mieloide. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Queiroz, Nina Marí Gual Pimenta de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE VINÍCIUS MARTINS BORGES.** Aos cinco dias do mês de maio de 2023 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Teams”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Mecanismos imunológicos envolvidos na imunoterapia com BCG em modelo singênico de melanoma murino”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Ana Carolina Ramos Moreno (Instituto Butantan-SP), aprovado; Dra. Nina Mari Gual Pimenta de Queiroz - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de maio de 2023.

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dra. Ana Carolina Ramos Moreno (Instituto Butantan-SP)

Dra. Nina Mari Gual Pimenta de Queiroz - Coorientadora (UFMG)

Dr. Sérgio Costa Oliveira - Orientador (UFMG)

## DEDICATÓRIA

“Canta, minha Musa amiga, anuncia o início do meu canto e que a brisa dos sacros bosques da ciência vibre o meu coração pela fome de conhecimento”. E é recitando minha versão própria e adaptada da Oração às Musas de Mesomedes de Creta, no intuito de atrair inspiração para a minha escrita, que invoco essas personagens mitológicas admiradas e imprescindíveis para a nossa vida, aquelas que presidem o que os gregos consideravam que há de mais belo no mundo, as artes e as ciências. Eu bem sei que as ideias, assim como as Musas, são aladas e podem rapidamente escapar voando na divagação dos pensamentos. Quicá eu pudesse fazer com as Musas o que os sacerdotes da Acrópole de Atenas fizeram com Nice, a deusa grega da vitória, de torna-la ápteros, esculpida sem asas, para que assim ela jamais partisse da cidade. Porém, a cultura clássica fixou no mito de Tâmiris o castigo exemplar daqueles que submetem sua alma à *hýbris*, à desmedida, à arrogância funesta, ao orgulho, e que tentam inverter a ordem natural em que o poeta deve invocar e tentar atrair as Musas, para que aí sim as Musas decidam a quem possuir. Antônio Cícero bem rememorou o mito nos seguintes versos: “Já Tâmiris quer possuir as Musas que o possuem. É seu fado desafiá-las e perder: insensato, esplêndido, cego, cheio de si”.

Em razão disso, me coloco em uma posição humilde, tento (às vezes sem sucesso, mas sem nunca deixar de lutar) realizar o difícil feito de lançar mão de todo ego, e rogo às Musas que inspirem e guiem meu intelecto, para abandonar o passado sem olhar para trás e velejar no rio de minha formação como profissional e cientista até atingir sua foz, no rio em que não se pode entrar duas vezes, o rio que está em constante mudança com o fluir de suas águas. E o ritual para atrair as Musas inspiradoras está no silêncio do meu quarto, lendo exaustivamente as referências representativas do Estado da Arte do tema que se deseja esmiuçar, está nos seminários amplamente disponíveis na internet, mas, principalmente, está nos locais onde as pessoas constroem o conhecimento, falam e vivem a ciência, está no ambiente do laboratório, nos auditórios, nos congressos e minicursos. Afinal, ciência e construção do conhecimento são empreendimentos fundamentalmente coletivos, que envolvem a apresentação e o debate de ideias, uma equipe multiprofissional com diversos backgrounds de formação empenhados no trabalho de bancada, envolvem também colaborações entre grupos de pesquisa e o processo de revisão dos artigos

por pares, ou seja, necessariamente essa construção ocorre a partir de interações interpessoais. Parafraseando C.S. Lewis em sua obra *O Peso da Glória*: “Não existe gente comum. Você nunca falou com um simples mortal. É com criaturas imortais que brincamos, trabalhamos ou casamos, é a elas que desdenhamos, censuramos ou exploramos”. Por esse motivo, não espero que figuras etéreas, que se alimentam de néctar e ambrosia e em cujas veias circulam ícor, desçam do Monte Hélicon, tornem a travessia do rio sem correnteza e sem obstáculos ou tomem os remos de minhas mãos e façam o trabalho que a mim foi designado. Diferente disso, agradeço pelas Musas de carne e osso presentes em minha vida.

Dedico essa dissertação à minha “Musa amiga”, a personagem imprescindível que dedicou o seu suor e o seu precioso tempo para a prática de bancada e para a elaboração de cada tópico desse trabalho, aquela figura atuante sem a qual nenhum dos resultados aqui apresentados teria existido. É difícil imaginar a trajetória e meu desenvolvimento até aqui alcançado sem a presença ilustre de minha co-orientadora Nina Gual, um exemplo de mulher forte, independente, firme, resolvida, determinada, de bravura calma e refletida, ágil em pensar com acerto, objetiva na solução de problemas, diplomática e acessível, sempre disposta a estabelecer colaborações. Uma mulher que não seguiu o exemplo das “Mulheres de Atenas” da famosa canção de Chico Buarque de Holanda e dessa forma prosperou, se tornando segura de si mesma e tomando o domínio da própria vida. É como se Nina já tivesse nascido armada com a lança e vestida de armadura, assim como a própria divindade patrona de Atenas, porém sou capaz de vislumbrar o penoso caminho que trilhou para chegar até aqui a partir dos breves relatos de sua intimidade que confidencialmente confiou a mim. Consigo ver em seus olhos dardejantes o que a motivou a lutar e chegar até aqui. Olhos como os de coruja, símbolo da reflexão que domina as trevas. Olhos que brilham intensamente quando voltados para aquilo que te faz vibrar, seja quando navega em águas misteriosas de um conhecimento científico ainda a ser explorado, seja participando ativamente da vida de sua família, seja contando alguma peripécia de seu gatinho Noir ou vendo o êxito de seus pupilos e o fruto de seu trabalho.

Ainda explorando a figura de Atena, consigo nos ver na cena da deusa orientando o filho de Frixo a construir a imponente embarcação mitológica dos Argonautas, cuja proa feita da madeira de um carvalho sagrado sibilava oráculos e servia de orientação para navegar em águas desconhecidas. Destaco sua paciência em me ensinar a fina arte de trabalhar a madeira do carvalho sagrado do

conhecimento, metáfora que atribuo ao método científico com suas várias etapas desde elaborar perguntas, levantar hipóteses, traçar objetivos para testar essas hipóteses, colocar em prática as técnicas de bancada e analisar os dados de forma sistemática. Jamais esquecerei de frases icônicas que muito me fizeram refletir, como: “estrelas em gráficos não caem do céu”, “boa vontade sem conhecimento faz com que um homem no deserto ande léguas sem encontrar o Oásis para saciar sua sede”, ou ainda “lentidão não significa cuidado, assim como rapidez é a total falta de cuidado, o ideal em um experimento é ser ágil, realizando as etapas com foco, atenção e eficiência”. São esses os verdadeiros oráculos que guiam a minha embarcação. Uma voz que abalou as estruturas do mundo ctônio no meu interior, que fez a roda viciosa de Íxion, em que os mesmos erros são sempre cometidos, parar por um momento, que fez o rochedo de Sísifo, que todos os dias rolava de volta ao início do trajeto inicial em um esforço inútil, parar de oscilar e o foco se voltar para tarefas realmente necessárias e produtivas. O quão excelente foi a conselheira que até aqui me acompanhou!

Por vários momentos ao longo do mestrado, me fixei em Medusa e me petrifiquei. Justo nela, a autoimagem deformada daquele que a contempla, que petrifica pelo horror no lugar de trazer esclarecimento ao refletir a imagem de um exagero de culpabilidade pessoal e por inibir a iniciativa de um esforço reparador. Ainda estou seguindo a jornada rumo ao lar da terrível fera para derrotá-la. Reconheço que muitos avanços já foram conquistados e pude contar com o braço forte estendido de minha “Musa amiga” para me erguer durante esse breve período como mestrando. Que eu possa ter a coragem de ouvir críticas e de ser imperfeito, para exterminar as minhas górgonas internas que me açoitam e me atormentam remoendo minhas falhas e para instituir uma nova ordem em minha psique, de supremacia do homem sobre o Caos primordial.

## AGRADECIMENTOS

No âmbito profissional, primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira, pela confiança e oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa, por ter me ensinado o caminho que devo seguir através de seus questionamentos, de suas correções e de seu exemplo como profissional pragmático e muito competente.

Espero ter imortalizado nas linhas escritas em minha dedicatória a imensurável contribuição de minha coorientadora Dra. Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz em minha formação e no desenvolvimento desse trabalho. Além disso, reforço aqui o meu agradecimento pela paciência, carinho e cordialidade que ela teve comigo desde o início, pela colaboração, pela orientação cuidadosa, pelos ensinamentos que levaram à minha evolução, pela disponibilidade e pela intensa dedicação a este trabalho.

Reservo um agradecimento especial à aluna de iniciação científica do curso de farmácia da UFMG, Christiane Vieira Alves Caldeira, que se dedicou a este trabalho com intensidade e muita disponibilidade. O seu apoio e amizade possibilitaram que a rotina de laboratório se tornasse mais leve e atingíssemos bons resultados no projeto.

Agradeço aos demais pesquisadores vinculados ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LIDI), que me acolheram como uma grande família e contribuíram para minha formação durante o meu período como mestrando. Menção à Erika Guimarães por ter me dado as boas vindas no laboratório e ter aceitado o desafio de me ensinar algumas técnicas de bancada necessárias para a elaboração dessa dissertação; à Ana Carolina Valente e ao Fábio Marinho pela parceria em experimentos grandes e pela disponibilidade em sanar dúvidas; ao Fábio Mambelli pelo acolhimento e pelo importante apoio em momentos de frustração; ao Rodrigo Sanches pela amizade e pelas discussões científicas; à Juvana Moreira e à Kívia de Andrade pelo carinho, pelos conselhos profissionais e pelo incentivo para seguir em frente; à Camila, ao Marco Túlio e ao Gaston por compartilharem comigo o momento de meu mestrado.

Vale destacar a contribuição da equipe que está nos bastidores dos trabalhos do LIDI. Agradeço especialmente à Sandra Fernandes pelo profissionalismo e dedicação ao seu trabalho, por administrar o laboratório com louvor, mantendo o rigoroso controle da disponibilidade dos materiais. Agradeço, ainda, ao Iuri Fortes por



seu importante apoio no biotério, pela disponibilidade em ajudar e pela paciência em lidar com as prateleiras lotadas de caixas de animais dos meus experimentos.

Digno de nota é o excelente serviço prestado pelo Alexandre Estevan e toda a secretaria do departamento de Bioquímica e Imunologia. Desde antes de meu ingresso e durante todo o meu percurso no mestrado, ele esteve de prontidão para responder às minhas dúvidas de maneira certa e resolver minhas pendências com presteza, sempre me atendendo cordialmente.

Eu não poderia me esquecer de todos aqueles que me iniciaram nos caminhos da pesquisa durante a iniciação científica, dando base aos conhecimentos que eu pude aprimorar no mestrado. Agradeço à profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira, ao prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani, à profa. Dra. Amália Moreno e à profa. Dra. Elisabeth Neumann por acreditarem em meu potencial e depositarem confiança em mim a ponto de gentilmente escreverem as cartas de recomendação, possibilitando, assim, o meu ingresso no mestrado. Eu tive a honra de ter a contribuição de todas essas ilustríssimas autoridades que, cada uma em sua área específica, foram essenciais em minha formação.

Aos membros da banca avaliadora, profa. Dra. Ana Carolina Ramos Moreno (Instituto Butantan), profa. Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Bioquímica/ICB/UFMG) e prof. Dr. Luís Henrique Franco (Bioquímica/ICB/UFMG) pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com este trabalho. À profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes (Farmacologia/ICB/UFMG) por ter cedido gentilmente as células de melanoma murino B16-F10, utilizadas amplamente em todos os experimentos desse trabalho. E, também aos professores que gentilmente nos forneceram animais *knockout* para complementarmos o trabalho.

Minha gratidão a todos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ao Instituto de Ciências Biológicas, à Universidade Federal de Minas Gerais e às agências de fomento científico, FAPEMIG e CNPQ, pela contribuição para a concretização desse trabalho.

No âmbito pessoal, gostaria de homenagear meu pai José Roberto Ferreira Borges, *in memoriam* do maior homem que tive a honra de conhecer em minha história, uma figura emblemática, exemplo de pai presente e amoroso, de profissional dedicado e bem-sucedido. É bem verdade que ele foi tirado de mim em tenra idade, enquanto eu ainda era um efebo, e que talvez a presença dele nesse momento serviria de bússola para a construção de minha vida profissional de maneira mais linear.

Porém, o tempo breve que tivemos juntos foi mais que suficiente para desfrutar momentos de muitas risadas e de absorver dele valores fundamentais, como a dignificação pelo trabalho, a educação financeira, a honestidade, a fidelidade e o bom humor. Tive uma sorte atribuída a poucos de ter um pai como esse, que acreditava em meus sonhos e que mesmo tendo formado em engenharia elétrica e se preocupar com meu futuro profissional, nunca me impôs ingressar em um curso específico e vibrava com meu gosto pela biologia. Adoraria celebrar mais essa conquista de adquirir o título de mestre em Bioquímica e Imunologia juntamente com ele.

Agradeço à minha mãe, Juliana Barroso Martins Borges. Afinal, um grande homem como meu pai só seria compatível com uma grande mulher. E que mulher! Ela teve fibra para assumir inúmeras responsabilidades de gestão de nossa vida, que antes cabiam somente ao meu pai. Uma peça fundamental, que sempre esteve na torcida pelo meu crescimento profissional e vibra com minhas conquistas, que leva o mestrado e a pesquisa científica a sério como minha ocupação e se interessa em ouvir com avidez sobre o que tenho feito. Uma verdadeira mãe-coruja, que me deu todo o apoio emocional necessário, que espera ansiosa por minha chegada em casa com uma deliciosa comida na mesa e que me importuna de noite dizendo para eu ir dormir preocupada com o meu rendimento no dia seguinte, alguém que eu posso contar em qualquer necessidade.

E por falar em esperar ansiosamente em casa pela minha chegada, como eu poderia esquecer de citar Atma, minha Border Collie, que todos os dias fica deitada em minha cama ou na sala de estar, aguardando a chegada do dono. Aquece o coração chegar após um dia intenso no laboratório e ser recebido com empolgação, pulos, abano da cauda e “lambeijos” bem molhados e calorosos. E vale destacar que ela chegou no momento em que eu mais precisava de uma companhia, em plena pandemia de COVID-19, quando o futuro era incerto e mesmo tendo sido aprovado no mestrado, me sentia frustrado com as poucas vezes em que eu frequentava o laboratório no início.

Eu não poderia deixar de mencionar minha avó Lenise, minha tia Pollyana, minha tia Tatiana, meu tio Júlio César e meus primos Matheus e Fernando. Afinal, nas palavras da garotinha havaiana Lilo: “Ohana quer dizer família e família quer dizer nunca mais abandonar ou esquecer”. E a vibração da minha vida não teria a mesma intensidade sem nossos passeios e aventuras juntos, churrascos, conversas, ou ainda sem o apreço e o cuidado que têm comigo.

Agradeço também aos meus fieis amigos Rodrigo Silveira, Larissa Souza e Guilherme Soares, que desde a época do Ensino Fundamental no Colégio Santa Maria estiveram ao meu lado, me aturaram nas diversas fases de meu amadurecimento, estavam de braços abertos quando eu mais precisava para trazer conforto, servir de ouvintes e aconselhar. Eles acompanharam o meu desenvolvimento intelectual e a construção de um sonho acadêmico, não me deixaram desanimar ou desistir. Jamais esquecerei de um dia em que eu estava mais calado do que o normal, chateado pela minha falta de reconhecimento e aparente dificuldade em desenvolver expertise nas técnicas de laboratório, sendo atormentado por exigências e um duro julgamento cujo inquisidor era eu mesmo, até que uma injeção de ânimo foi aplicada por meu amigo Rodrigo, quando ele disse: “o Vinícius está cada vez mais próximo de se tornar um baita professor universitário”. São os melhores amigos que eu poderia pedir.

Muito obrigado a todos!

“Cânceres têm temperamento, personalidade – comportamento. E a heterogeneidade biológica exige heterogeneidade terapêutica; o mesmo tratamento não pode ser aplicado indiscriminadamente a todos”.  
(Siddharta Mukherjee, O Imperador de Todos os Males, 2012).

## RESUMO

O Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é uma bactéria atenuada aplicada como vacina em recém-nascidos para prevenir principalmente formas severas de tuberculose e há mais de 40 anos é utilizada na clínica para o tratamento do câncer de bexiga, sendo proposta também para outros tipos de câncer, incluindo o melanoma. BCG tem potencial de modular o microambiente tumoral (TME), alterando o infiltrado celular e induzindo um perfil de resposta antitumoral, que está associado a um melhor prognóstico e controle da remissão e metástases. No entanto, o mecanismo de ação que leva à indução de uma resposta imune antitumoral ainda não está totalmente esclarecido. No intuito de investigar as vias da imunidade inata envolvidas na ativação de células de melanoma murino B16-F10, foram utilizados BCG e outros agonistas de diferentes vias, como os TLRs, inflamassoma, via cGAS-STING e IFN tipo I. Além disso, estabelecemos um modelo de tumor subcutâneo B16-F10 para tratamento intratumoral com BCG em diferentes camundongos deficientes (KO) para moléculas relacionadas à imunidade inata (TLR3<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR3/7/9<sup>-/-</sup>, Caspase 1<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, IL-1R<sup>-/-</sup>, cGAS<sup>-/-</sup>, STING<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> e MyD88<sup>-/-</sup>) e adaptativa (Rag<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>). BCG não foi capaz de estimular B16-F10 a produzir citocinas inflamatórias ligadas às diferentes vias citadas, ao contrário do que foi observado nos controles de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de animais C57BL/6 selvagem (WT). Apesar disso, BCG é capaz de infectar as células B16-F10, que por sua vez podem ativar BMDMs e esplenócitos de animais WT em cocultura com células tumorais. O efeito do estímulo por BCG não foi observado em células de MyD88<sup>-/-</sup>. De todos os animais KO avaliados, apenas MyD88<sup>-/-</sup>, Rag<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> apresentaram dificuldade em controlar o desenvolvimento do tumor em resposta ao tratamento com BCG quando comparados ao C57BL/6 WT. A sinalização via MyD88 também se mostrou importante para o recrutamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NKT e NK, neutrófilos e macrófagos no infiltrado do TME, que favoreceram o controle do tumor em resposta ao BCG. Esse trabalho contribui para a melhor compreensão das vias relacionadas à imunoterapia com BCG em melanoma murino e poderá auxiliar no futuro para o aperfeiçoamento da terapia e sua possível aplicação em melanoma.

**Palavras-chave:** BCG. Imunoterapia. Câncer. Melanoma. MyD88.

## ABSTRACT

*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) is an attenuated bacterium used as vaccine on newborns to prevent the most severe forms of tuberculosis and has been applied for more than 40 years in bladder cancer immunotherapy. Reference guidelines propose the use of BCG in other types of cancer and melanoma is also included. BCG can modulate the tumor microenvironment (TME), modifying the cellular infiltrate and inducing an antitumoral response in order to control tumor remission and metastasis. However, the mechanism of antitumoral immune response still poorly understood. In order to investigate how innate immunity is involved in the activation of B16-F10 murine melanoma cells, BCG and other agonists for different pathways were used, such as TLRs, inflammasome, cGAS/STING pathway and type I IFN. Furthermore, we established a subcutaneous B16-F10 melanoma model for intratumoral BCG treatment using different mice deficient (KO) for molecules related to innate immunity (TLR3<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR3/7/9<sup>-/-</sup>, Caspase 1<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, IL-1R<sup>-/-</sup>, cGas<sup>-/-</sup>, STING<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup> e MyD88<sup>-/-</sup>) and adaptive immunity (Rag<sup>-/-</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>). BCG was not able to stimulate B16-F10 to produce inflammatory cytokines related to the different mentioned pathways, and the opposite was observed in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from C57BL/6 (WT) animals. Despite this, BCG was able to infect B16-F10 cells, which in turn can activate BMDMs and splenocytes from WT animals in co-culture with these cancer cells. The effect of BCG stimulation was not observed in MyD88<sup>-/-</sup> cells. Taken together all KO animals evaluated, only MyD88<sup>-/-</sup>, Rag<sup>-/-</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice did not show complete tumor control in response to BCG treatment compared to C7BL/6 WT. MyD88 signaling is also important for the recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells, NKT, NK cells, neutrophils and macrophages in the TME infiltrate, favoring tumor control in response to BCG. This work contributes to a better understanding of the immune pathways related to the immunotherapy with BCG in murine melanoma and may imply in future improvements for the treatment and its possible application in melanoma cases.

Keywords: BCG. Immunotherapy. Cancer. Melanoma. MyD88.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferentes possibilidades de ativação dos receptores do tipo Toll (TLRs) induzidos por <i>Mycobacterium</i> .....	31
<b>Figura 2.</b> Possíveis vias de ativação do inflamassoma e/ou recrutamento de caspases em resposta a <i>Mycobacterium</i> .....	34
<b>Figura 3.</b> Possibilidades de ativação da via cGAS-STING após reconhecimento de DNA citoplasmático proveniente de BCG ou células tumorais mortas .....	36
<b>Figura 4.</b> Proposta de mecanismo associado a imunoterapia com BCG e modulação do TME de melanoma .....	41
<b>Figura 5.</b> Estratégia de <i>gating</i> da citometria de fluxo dos tumores de camundongos C57BL/6 e MyD88 <sup>-/-</sup> .....	51
<b>Figura 6.</b> Estabelecimento do modelo de imunoterapia com BCG em tumor singênico murino do tipo melanoma (B16-F10) em camundongos C57BL/6 .....	54
<b>Figura 7.</b> O tratamento com BCG é capaz de controlar o desenvolvimento de tumores subcutâneos de melanoma (B16-F10) .....	55
<b>Figura 8.</b> As vias de sinalização de diferentes TLRs não estão ativas em B16-F10 e não alteram a resposta da imunoterapia com BCG em melanoma .....	57
<b>Figura 9.</b> O efeito antitumoral induzido por BCG não está relacionado às vias do inflamassoma ou a sinalização de IL-1 $\beta$ .....	58
<b>Figura 10.</b> A via de cGAS-STING e a sinalização de IFN tipo I não estão relacionados ao efeito antitumoral induzido por BCG .....	60
<b>Figura 11.</b> MyD88 é determinante para a ação de BCG no tratamento de melanoma e na ativação de BMDMs .....	62
<b>Figura 12.</b> A ação de linfócitos maduros é essencial para a resposta antitumoral de BCG em melanoma .....	64
<b>Figura 13.</b> O tratamento com BCG dependente de MyD88 altera o perfil de células imunológicas infiltradas no TME de melanoma .....	66
<b>Figura 14.</b> A participação essencial de MyD88 na estimulação por BCG em macrófagos e linfócitos e na modulação do infiltrado celular no TME .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ACK</b>	Amônio-Cloreto-Potássio
<b>Ag85</b>	Antígeno 85
<b>AIM2</b>	Receptor ausente em melanoma 2
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>BMDMs</b>	Macrófagos derivados de medula óssea
<b>BLP</b>	Lipoproteína bacteriana sintética
<b>BLS</b>	Lumazina sintase de <i>Brucella</i>
<b>BRAF</b>	do inglês <i>rapidly accelerated fibrosarcoma B-type</i>
<b>CDK4</b>	Quinase dependente de ciclina 4
<b>CDKN2A</b>	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
<b>CFU</b>	Unidade formadora de colônia
<b>cGAS</b>	Sintase de GMP-AMP cíclico
<b>CFP-10</b>	do inglês <i>culture filtrate protein-10 kDa</i>
<b>CRISPR</b>	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
<b>CT</b>	do inglês <i>cycle threshold</i>
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
<b>CXCL10</b>	Ligante de quimiocina de motivo C-X-C 10
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados a dano
<b>DMEM</b>	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ou ensaio imunoenzimático
<b>ESAT-6</b>	do inglês <i>Early Secretory Antigen Target 6 kDa</i>
<b>ESX-1</b>	do inglês <i>ESAT-6 secretion system</i>
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino
<b>FDA</b>	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>



<b>HEPES</b>	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
<b>HMGB1</b>	Proteína de grupo de alta mobilidade 1
<b>HSP65</b>	Proteína de choque térmico 65
<b>HSP70</b>	Proteína de choque térmico 70
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular 1
<b>IFN-β</b>	Interferon β
<b>IFN-γ</b>	Interferon γ
<b>IFNAR</b>	Receptor de interferon-α/β
<b>IL-1β</b>	Interleucina 1β
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-36</b>	Interleucina 36
<b>IL-1R</b>	Receptor de Interleucina 1
<b>IRFs</b>	Fatores reguladores de interferon
<b>IRF3</b>	Fator regulador do interferon 3
<b>KO</b>	do inglês <i>knockout</i>
<b>LAG-3</b>	Gene 3 de ativação de linfócitos
<b>LCCM</b>	do inglês L929 <i>cell conditioned medium</i>
<b>LLO</b>	Listeriolisina O
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LT-α</b>	Linfotoxina α
<b>MAPKs</b>	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos
<b>M-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de monócitos
<b>MDSCs</b>	Células supressoras mieloderivadas
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>M.O.I</b>	Multiplicidade de Infecção
<b>MyD88</b>	Fator de diferenciação mielóide 88
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NLRP3</b>	Proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR
<b>NLRP7</b>	Proteína 7 que contém domínio de pirina da família NLR
<b>NK</b>	do inglês <i>natural killer</i>
<b>NOD2</b>	Domínio de oligomerização ligante de nucleotídeos 2
<b>OADC</b>	do inglês <i>oleic acid-albumin-dextrose-catalase</i>

<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PD-1</b>	Proteína 1 de morte celular programada
<b>PD-L1</b>	Ligante celular de morte programada 1
<b>PIM<sub>1-2</sub></b>	Mono- e Di-manosídeos de Fosfatidilinositol
<b>PIM<sub>4-6</sub></b>	Tetra- e Hexa-manosídeos de Fosfatidilinositol
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>Rag</b>	do inglês <i>Recombination-Activating Gene</i>
<b>RAGE</b>	Receptor para produtos finais da glicação avançada
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>sncRNA</b>	Pequenos RNAs não-codificantes
<b>SPF</b>	Condição sem patógeno específico
<b>STING</b>	Proteína estimuladora de genes do interferon
<b>T7S</b>	Sistema de secreção do tipo VII
<b>TACI</b>	Ativador transmembranar e do interator CAML
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TERT</b>	Telomerase transcriptase reversa
<b>TIM-3</b>	Domínio 3 de mucina e imunoglobulina de célula T
<b>TLRs</b>	Receptores do tipo <i>Toll</i>
<b>TLR2</b>	Receptor do tipo <i>Toll 2</i>
<b>TLR3</b>	Receptor do tipo <i>Toll 3</i>
<b>TLR4</b>	Receptor do tipo <i>Toll 4</i>
<b>TLR5</b>	Receptor do tipo <i>Toll 5</i>
<b>TLR7</b>	Receptor do tipo <i>Toll 7</i>
<b>TLR9</b>	Receptor do tipo <i>Toll 9</i>
<b>TME</b>	Microambiente tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TRAIL</b>	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
<b>Treg</b>	Linfócitos T reguladores
<b>TRP-2</b>	Proteína relacionada a tirosinase 2
<b>T-VEC</b>	<i>Talimogene laherparepvec</i>
<b>UV</b>	Radiação Ultravioleta
<b>Vegi</b>	Inibidor do crescimento endotelial vascular
<b>WT</b>	do inglês <i>wild type</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1. MELANOMA: QUADRO CLÍNICO E TRATAMENTOS .....	20
1.2. O USO DE BCG NA IMUNOTERAPIA DO CÂNCER .....	23
1.3. A IMPORTÂNCIA DOS RECEPTORES DO TIPO <i>TOLL</i> (TLRs) PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER COM BCG .....	27
1.4. A SINALIZAÇÃO DO INFLAMASSOMA NO TRATAMENTO DO CÂNCER COM BCG .....	32
1.5. A VIA cGAS-STING APRESENTA GRANDE RELEVÂNCIA NA IMUNOTERAPIA DO CÂNCER .....	35
1.6. INTERAÇÃO ENTRE MECANISMOS DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA INDUZIDO PELA IMUNOTERAPIA COM BCG EM CÂNCER .....	37
1.7. TRANSFORMANDO TUMORES “FRIOS” (PRO-TUMORAIS) EM TUMORES “QUENTES” (ANTITUMORAIS).....	38
<b>2.JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>42</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 ANIMAIS .....	44
4.2 BACTÉRIAS.....	44
4.3 LINHAGEM TUMORAL E CULTIVO CELULAR.....	45
4.4 MODELO SINGÊNICO DE MELANOMA MURINO (B16-F10).....	45
4.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMs).....	46
4.6 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS.....	46
4.7 Co-CULTURAS DE BMDMs OU ESPLÊNOCITOS COM B16-F10.....	47
4.8 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (CFU) .....	47
4.9 ATIVAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR.....	48
4.10 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA .....	48
4.11 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO (QPCR) .....	48
4.12 CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR DO TME POR CITOMETRIA DE FLUXO .	49
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	50

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE IMUNOTERAPIA COM BCG EM TUMOR SINGÊNICO MURINO DO TIPO MELANOMA (B16-F10).....	52
5.2. AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE DIFERENTES TLRs NÃO ESTÃO ATIVAS EM B16-F10 E NÃO ALTERAM A RESPOSTA DA IMUNOTERAPIA COM BCG EM MELANOMA .....	56
5.3. O EFEITO ANTITUMORAL INDUZIDO POR BCG NÃO ESTÁ RELACIONADO ÀS VIAS DO INFLAMASSOMA OU A SINALIZAÇÃO DE IL-1B .....	57
5.4. AVALIAÇÃO DA VIA cGAS-STING E DA SINALIZAÇÃO DE IFN TIPO I NA REPOSTA ANTITUMORAL INDUZIDA POR BCG.....	59
5.5. A MOLÉCULA ADAPTADORA MYD88 É ESSENCIAL PARA A AÇÃO DE BCG NA ATIVAÇÃO DE BMDMs E NO CONTROLE TUMORAL DE MELANOMA.....	61
5.6. O CONTROLE DE TUMORES B16-F10 INDUZIDA PELA IMUNOTERAPIA COM BCG É DEPENDENTE TAMBÉM DA RESPOSTA DE LINFÓCITOS .....	63
5.7. A AÇÃO DE BCG DEPENDENTE DE MYD88 ALTERA O PERFIL DE CÉLULAS IMUNOLÓGICAS INFILTRADAS NO TME DE MELANOMA .....	65
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Melanoma: quadro clínico e tratamentos

O melanoma é uma neoplasia que se desenvolve a partir da transformação de melanócitos (EDDY; CHEN, 2020), células derivadas da crista neural altamente especializadas que fornecem grânulos contendo melanina para os queratinócitos vizinhos (SHAIN; BASTIAN, 2016). A maioria dos diagnósticos, cerca de 91,2%, corresponde ao melanoma cutâneo e está associada às regiões da pele altamente expostas à radiação solar (WILKINS; NATHAN, 2009). A lesão típica de melanoma cutâneo é caracterizada por uma mácula assimétrica ou nódulo contendo bordas irregulares, frequentemente com variações de pigmentação ao longo da lesão, um diâmetro maior que 6 mm e que apresenta evolução com o passar do tempo (KIBBI *et al.*, 2016).

A idade média dos pacientes diagnosticados com melanoma é de 62,2 anos, sendo uma doença geralmente associada à idade avançada (VON SCHUCKMANN *et al.*, 2019). Nesses indivíduos mais velhos, com idade superior a 55 anos, as principais regiões acometidas por melanoma são a cabeça, o pescoço e as extremidades mais distais dos membros, sítios que com a exposição crônica à radiação solar ao longo da vida do indivíduo desenvolvem uma lesão característica marcada por elastose, acumulam uma alta carga mutacional e não há dependência da existência de uma lesão pré-cancerosa para a formação de um tumor. Porém, indivíduos mais jovens também podem desenvolver melanoma e aqueles com idade inferior a 55 anos são acometidos principalmente no tronco e nas extremidades proximais dos membros, sítios da pele frequentemente expostos à radiação ultravioleta (UV) de forma intermitente, suscetíveis a queimaduras solares e onde estão presentes nevos benignos ou displásicos precursores (SHAIN; BASTIAN, 2016). Nevos são aglomerados de melanócitos portadores de mutação em BRAF<sup>V600E</sup> (do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma B-type*) (POLLOCK *et al.*, 2003) e que constituem lesões pré-malignas, podendo dar origem a tumores a partir do acúmulo de mutações *driver* secundárias em regiões do DNA como o promotor da telomerase transcriptase reversa (TERT) (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Estima-se que cerca de 75,5% de todos os casos de melanoma estão relacionados ao excesso de exposição à radiação UV (ARNOLD *et al.*, 2018), enquanto que

somente 5% a 12% compreendem casos de melanoma familiar (FORD *et al.*, 1995). Os casos hereditários de melanoma normalmente estão relacionados a herança autossômica dominante de alelos mutados do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) e de quinase dependente de ciclina 4 (CDK4) (SHAIN; BASTIAN, 2016). Dessa forma, melanoma também pode se desenvolver em regiões do organismo não expostas ao Sol, em estruturas do olho altamente pigmentadas, incluindo a íris, o corpo ciliar e a coroide (melanoma uveal), na pele glabra da palma das mãos e da planta dos pés (melanoma acral) e nas mucosas da cavidade oral, da cavidade nasal e da região anogenital (melanoma mucosal), diagnósticos mais raros que correspondem, respectivamente, a 5,2%, 2% e 1,3% do número de casos (WILKINS; NATHAN, 2009).

O melanoma cutâneo é facilmente diagnosticado por se tratar de uma neoplasia superficial e quando o diagnóstico é realizado de forma precoce, nos estágios mais iniciais da doença (estágio I e IIA), a cirurgia é altamente eficaz e curativa (TESTORI *et al.*, 2019). Em razão disso, pacientes tratados enquanto as lesões estão localizadas e em estágio inicial de progressão, quando o tumor ainda é ressecável, tendem a apresentar uma alta taxa de sobrevida de 99%, porém essa taxa cai para preocupantes 30% quando o estágio é mais avançado, em que o tumor se torna irresssecável e há ocorrência de metástase, o que está intimamente relacionado com um pior prognóstico e maior letalidade da doença (SOCIETY, 2022).

O benefício da abordagem cirúrgica é limitado e em estágios avançados há uma grande chance de recorrência da doença a partir de células remanescentes no local após excisão do tumor e a partir de células metastáticas circulantes (VON SCHUCKMANN *et al.*, 2019). Em estudo clínico realizado por von Schuckmann e colaboradores, 700 pacientes diagnosticados com melanoma foram submetidos a ressecção do tumor primário e acompanhados ao longo de dois anos, de forma que 94 indivíduos (13,4%) apresentaram ao menos uma recorrência do tumor, sendo que 66 manifestaram a forma locorregional e 28 apresentaram metástases distantes do sítio primário. Também foi verificado que melanoma se dissemina preferencialmente na própria pele, migrando também para os pulmões, o sistema nervoso central, os ossos, os órgãos abdominais, as glândulas paratireoides e tireoide (VON SCHUCKMANN *et al.*, 2019). Vale destacar que a insuficiência respiratória, uma consequência da ocorrência de metástases pulmonares, é a principal causa de morte em pacientes com melanoma (PETERSEN *et al.*, 2007).

Nesse contexto, há o emprego na clínica de duas abordagens terapêuticas que acompanham a ressecção de tumores em estágio avançado a depender do quadro clínico: a terapia adjuvante e a terapia neoadjuvante. A terapia adjuvante diz respeito ao tratamento adicional administrado após o tratamento primário, geralmente cirurgia, no intuito de reduzir o risco de recidiva da doença. Em pacientes com melanoma ressecado em estágio IIB e IIC, mesmo não havendo evidências de metástases macroscópicas, o quadro é associado há um alto risco de micrometástases, sendo recomendada após a ressecção do tumor local a aplicação tópica de imiquimod (GARBE *et al.*, 2022) ou terapia adjuvante com pembrolizumab (anticorpo anti-PD-1) aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) com base nos dados do ensaio clínico de fase III duplo-cego KEYNOTE-716, que demonstrou um ganho significativo de sobrevida livre de progressão da doença (LUKE *et al.*, 2020). Em pacientes com melanoma em estágio III e IV, muitas vezes associados a metástases macroscópicas, é recomendada a imunoterapia sistêmica com o anticorpo anti-CTLA-4 ipilimumab ou com anticorpos anti-PD-1, como nivolumab e pembrolizumab, e também as terapias-alvo com dabrafenib e trametinib no caso de melanomas portadores de mutação *driver* em BRAF.

Em contrapartida, a terapia neoadjuvante é uma abordagem que envolve o tratamento da lesão antes da cirurgia, de forma a limitar a agressividade e retrair o tumor, podendo até mesmo levar a uma resposta completa confirmada posteriormente por histopatologia. A terapia neoadjuvante tem sido indicada particularmente em melanomas no estágio III, em que há a ocorrência de metástases macroscópicas no linfonodo e em sítios da pele localizados próximos ao tumor primário (podendo ser metástase satélite ou metástase em trânsito). A facilidade de obtenção de amostras clínicas para biópsia após a ressecção do tumor torna a terapia neoadjuvante um protótipo de desenvolvimento racional de novas drogas e de investigação de biomarcadores. Como exemplos de terapia neoadjuvante já aplicadas na clínica, recomenda-se o uso de radioterapia e da imunoterapia intralesional com interleucina 2 (IL-2) ou com o vírus oncolítico *talimogene laherparepvec* (T-VEC) para o controle de metástases em trânsito, que estão muito disseminadas na pele e inviabilizam uma abordagem cirúrgica (GARBE *et al.*, 2022).

No âmbito do tratamento de metástases em trânsito não ressecáveis, um ensaio clínico de fase I de 1974 apresentou dados preliminares que sugerem o benefício da administração do bacilo de Camette-Guérin (BCG) através de injeções intratumorais,

em que a inoculação direta de BCG levou a regressão de 90% dos tumores tratados e apresentou um efeito sistêmico, levando a regressão de 17% das metástases macroscópicas não tratadas, o que possibilitou a 25% dos pacientes submetidos ao tratamento com BCG uma sobrevida livre de doença em 1 a 6 anos (MORTON *et al.*, 1974). A aplicação intralesional de BCG como terapia neoadjuvante em melanoma despertou novos interesses e foi alvo de investigação no ensaio clínico de fase I NCT01838200 como tratamento prévio à imunoterapia sistêmica com ipilimumab, estudo que teve início em 2014, com o patrocínio do *Ludwig Institute for Cancer Research* e da indústria farmacêutica *Bristol-Myers Squibb*, tendo sido interrompido em 2015 em razão de dois pacientes terem manifestado efeitos adversos graves relacionados à autoimunidade (DA GAMA DUARTE *et al.*, 2018). Um ensaio clínico de fase II (NCT03928275) em colaboração com a *Nova Scotia Health Authority*, foi autorizado em 2019 no intuito de avaliar os benefícios da combinação da terapia intralesional com BCG e IL-2 em 100 pacientes com melanoma cutâneo metastático, que serão acompanhados por cinco anos após o tratamento, estendendo a duração do estudo até 2031 (HUMEAU *et al.*, 2021). A compreensão dos mecanismos imunológicos que envolvem a imunoterapia com BCG em melanoma é o foco principal deste estudo e será abordado com mais detalhes nos tópicos seguintes da introdução e na discussão dos resultados do trabalho.

## **1.2. O uso de BCG na imunoterapia do câncer**

O conceito de usar microrganismos e seus produtos como imunoterapia para o tratamento de câncer teve como pioneiro William Bradley Coley, cirurgião norte-americano especialista em sarcomas ósseos e que estava determinado a encontrar um tratamento eficaz para casos de tumores inoperáveis (MCCARTHY, 2006). Ao obter conhecimento de um caso anedótico de um imigrante alemão registrado no New York Hospital, que apresentou regressão de um tumor de pescoço maligno inoperável após ter se infectado com *Streptococcus pyogenes* e desenvolvido erisipelas, Coley empreendeu seus esforços em uma ampla revisão da literatura médica a fim de buscar evidências da possível correlação entre a remissão do câncer e infecções bacterianas concomitantes, encontrando mais de 47 registros (MCCARTHY, 2006).

Em 1891, Coley realizou os primeiros testes clínicos de sua hipótese utilizando injeções intratumorais de amostras vivas e muito virulentas de *S. pyogenes*, o que induziu uma expressiva redução do volume dos sarcomas de ossos longos descritos,



porém o procedimento se mostrou de alto risco, levando dois dos três pacientes tratados a óbito (COLEY, 1991). No intuito de contornar o problema da letalidade do teste anterior, a partir de 1893, Coley passou a administrar sua imunoterapia utilizando injeções de *S. pyogenes* mortos por calor (*heat-killed*) em combinação com *Serratia marcescens* (conhecida na época como *Bacillus prodigiosus*), um microrganismo aparentemente inofensivo e descrito na literatura da época como capaz de aumentar a virulência de *S. pyogenes* em coelhos. Inicialmente, Coley testou sua formulação em cães com sarcoma e observou uma rápida regressão tumoral dias após a administração da formulação bacteriana (COLEY, 1910). Após o sucesso da experimentação animal, Coley testou seu tratamento em dez pacientes com câncer inoperável e depois em mais 80 casos exitosos. Os achados de Coley atraíram investimentos das famílias Rockefeller e Huntington para sua pesquisa e o interesse da Parke Davis Company para a produção comercial do inóculo bacteriano que ficou conhecido como Toxinas de Coley e que foi amplamente utilizado para o tratamento do câncer no período entre 1899 e 1934 (MCCARTHY, 2006).

A primeira proposta de imunoterapia do câncer, o uso das Toxinas de Coley, recebeu duras críticas ao longo dos anos e, mesmo tendo seu valor reconhecido na prevenção do estabelecimento de micrometástases, gradualmente foi caindo no esquecimento após ter sua produção descontinuada em 1952 e ter sua aprovação recusada pelo FDA em 1962, o que tornou o seu uso ilegal, além de ter sido aparentemente superada pelos avanços obtidos com o desenvolvimento das quimioterapias e da radioterapia. Porém, o atual estado da arte no campo de imunologia de tumores corrobora com a hipótese de William Coley de que estimular o sistema imune através do uso de microrganismos pode ser uma forma eficaz de tratar o câncer (MCCARTHY, 2006).

No contexto histórico do ideário de Coley, em 1928, o biólogo e estatístico norte-americano Raymond Pearl avaliou os laudos de 816 autópsias de indivíduos com carcinoma, sarcoma e outros tumores malignos no hospital Johns Hopkins e encontraram uma correlação negativa entre a presença de lesões tuberculosas e a incidência de câncer (PEARL, 1928). Os achados de Pearl inspiraram o doutor Holmgren, médico sueco, a propor pela primeira vez o tratamento de tumores utilizando o bacilo de Camette-Guérin (HOLMGREN, 1936). BCG é uma cepa vacinal atenuada de *Mycobacterium bovis*, nomeada em homenagem aos seus inventores franceses Albert Calmette e Camille Guérin, e amplamente conhecida por sua

aplicação como imunizante em recém-nascidos a fim de prevenir as formas mais severas de tuberculose, a meningite tuberculosa e a tuberculose miliar (ou disseminada) (TRUNZ *et al.*, 2006). No primeiro teste, o doutor Holmgren administrou BCG pela via intravenosa em 27 pacientes com câncer de estômago e em um paciente com câncer de reto, um protocolo que se mostrou seguro, sem provocar lesões em órgãos internos, e que apresentou benefícios limitados ao alívio da dor e ao aumento da sensação de bem-estar (HOLMGREN, 1936).

O entusiasmo da aplicação de BCG para o tratamento de câncer teve início na década de 1950, quando os modelos de tumor murino singênico foram desenvolvidos e pesquisadores do *Memorial Sloan-Kettering Institute* de Nova York, incluindo pesquisadores renomados como Lloyd Old e Baruj Benacerraf, demonstraram que camundongos infectados com BCG apresentavam resistência à implantação das linhagens tumorais S-180, carcinoma 755 e ascite de Ehrlich (OLD *et al.*, 1959). Esse entusiasmo atingiu seu ápice na década de 1970, quando Berton Zbar e Tomiko Tanaka, no *National Cancer Institute*, realizaram um estudo crucial na comprovação da atividade antitumoral do tratamento com BCG. Os porquinhos da índia implantados com linhagem tumoral de hepatocarcinoma pela via intradérmica foram tratados com injeções intralesionais de BCG, o que induziu a regressão tumoral e reduziu consideravelmente a ocorrência de metástases no linfonodo drenante (ZBAR; TANAKA, 1971). As observações em porquinhos da índia possibilitaram que Zbar e Rapp postulassem os fatores relacionados ao sucesso da imunoterapia antitumoral utilizando BCG: o contato direto entre o BCG e as células tumorais; uma dose adequada de micobactérias viáveis; uma baixa carga tumoral restrita a regiões específicas e bem delimitadas, a exemplo de tumores intradérmicos superficiais e micrometástases em linfonodos regionais; e um hospedeiro que expresse uma reação de hipersensibilidade tardia em resposta aos antígenos do BCG (ZBAR; RAPP, 1974).

Na década de 1970, surgiram muitos ensaios clínicos envolvendo BCG na imunoterapia do câncer, cujos dados preliminares apresentaram benefícios do uso de BCG em conjugação com a quimioterapia padrão para leucemia linfoblástica aguda (MATHE *et al.*, 1973), de injeções intratumorais em melanoma metastático (MORTON *et al.*, 1974) e de instilações intravesicais em câncer de bexiga (MORALES *et al.*, 1976). Também houveram tentativas de aplicação de BCG para o tratamento de câncer de pulmão, de próstata, de cólon e de rim, mas os dados não se mostraram conclusivos (MUKHERJEE *et al.*, 2021). A partir da proposta inicial de Morales *et al.*

(MORALES *et al.*, 1976), da validação apresentada por Lamm e colaboradores com uma coorte maior de pacientes (LAMM *et al.*, 1980) e da aprovação pelo FDA em 1989, BCG se consagrou como caso de sucesso de imunoterapia utilizando microrganismos e tem sido utilizada há mais de 40 anos como terapia adjuvante padrão-ouro para evitar metástases e recidivas após a ressecção transuretral do câncer de bexiga não-músculo invasivo (MUKHERJEE *et al.*, 2021). A aplicação de BCG também é citada em *guidelines* de referência como potencial escolha terapêutica para melanoma em estágio III (COIT *et al.*, 2019), porém o seu uso segue restrito a instituições de pesquisa clínica (WRIGHT *et al.*, 2020).

No cenário atual, BCG segue como o tratamento mais eficaz para câncer de bexiga não-músculo invasivo, porém ainda existe um grupo significativo de pacientes (~30%) que não responde favoravelmente ao tratamento, apresentando resistência ao BCG ou recidiva da doença (FUGE *et al.*, 2015). O número de pacientes portadores de melanoma refratário ao BCG é desconhecido. Há grande interesse no aprimoramento da terapia com BCG, a exemplo dos ensaios clínicos NCT01838200 e NCT03928275 citados anteriormente, que seguem a tendência de combinar BCG com inibidores de *checkpoint*, citocinas e agonistas de vias da imunidade inata no intuito de amplificar a resposta imunológica (KREMENOVIC *et al.*, 2020). Também foram desenvolvidas cepas recombinantes de BCG capazes de expressar citocinas ou proteínas heterólogas com propriedades pró-inflamatórias e moduladoras de resposta de perfil Th1 (MARQUES-NETO *et al.*, 2021). BCG VPM1002BC, uma cepa gerada a partir da inserção do gene codificante para listeriolisina O (LLO) e deleção do gene da urease C, se encontra em teste clínico de fase II (NCT04630730) de duração entre o período de 2022 a 2030 para sua aplicação em câncer de bexiga (RENTSCH *et al.*, 2022). A cepa rBCG-S1PT foi desenvolvida no Instituto Butantan e tem como principal característica a expressão de uma forma modificada e não tóxica da subunidade S1 da toxina pertussis, capaz de ativar fortemente uma resposta do tipo Th1 e que apresentou melhores resultados do que a onco BCG comum em modelo ortotópico murino de câncer de bexiga (ANDRADE *et al.*, 2010), completando os testes pré-clínicos para seguir para os testes clínicos. Até o momento, não há nenhuma cepa de BCG recombinante aprovada para uso clínico em quadros de câncer de bexiga ou de melanoma. Apesar do uso da imunoterapia com BCG ser bastante conhecido e consolidado, as pesquisas que investigam o mecanismo de ação do BCG ainda precisam ser aprofundadas para explicar melhor as mudanças no perfil imunológico e

a ativação de vias de sinalização induzidas por BCG, que culminam no controle tumoral em câncer de bexiga e outros tipos de tumores a serem beneficiados dessa terapia.

### **1.3. A importância dos receptores do tipo *Toll* (TLRs) para o tratamento de câncer com BCG**

A interação de *Mycobacterium bovis* com os componentes do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral (TME) ocorre principalmente por intermédio dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (KREMENOVIC *et al.*, 2020). A parede celular é o principal componente imunogênico de BCG (NAKAMURA *et al.*, 2014) e possui uma estrutura em comum com as demais micobactérias, que consiste em uma camada externa de ácidos micólicos, uma camada intermediária de arabinogalactanos e uma camada interna de peptidoglicanos (HOFFMANN *et al.*, 2008). Poucas foram as moléculas purificadas diretamente da parede celular de BCG que tiveram sua atividade imunológica testada e na literatura muitos dos ligantes propostos são especulações de compostos sintéticos e moléculas purificadas de outras espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* capazes de ativar receptores do tipo *Toll*. Os ácidos micólicos são os componentes predominantes da parede das micobactérias e, dentre os compostos conhecidos que pertencem a essa classe, o fator corda (ou trealose 6,6-dimicolato) é considerado o lipídeo mais imunogênico de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo capaz de ativar TLR2 e promover uma resposta granulomatosa robusta (BOWDISH *et al.*, 2009). Outros componentes da parede celular de micobactérias que também foram descritos em *Mycobacterium tuberculosis* como ligantes de TLR2 são: dimanosídeos de fosfatidilinositol (PIM<sub>1-2</sub>) (JONES *et al.*, 2001) e lipoproteínas como LpqH (ou lipoproteína de 19 kDa), LprA e LprG (JO *et al.*, 2007). Em trabalhos explorando *Mycobacterium chelonae* e *M. kansasii*, os lipomananos purificados dessas espécies apresentaram atividade agonista de TLR2 (VIGNAL *et al.*, 2003). Compostos sintéticos derivados de peptidoglicanos estruturalmente semelhantes aos encontrados na parede celular de BCG, do tipo dipeptídeo muramil com uma cadeia de ácido graxo única do tipo octanoil ou estearoil, foram capazes de ativar TLR2 e TLR4 em experimentos *in vitro* envolvendo células dendríticas derivadas de monócitos circulantes humanos (UEHORI *et al.*, 2005). Na Figura 1, representamos um compilado dos estudos descritos na literatura sobre a

diversidade de ligantes de TLRs que podem interagir com moléculas de diferentes espécies de micobactérias, incluindo o BCG.

A importância da via de TLR2 para a montagem de uma resposta imunológica a partir da inoculação de BCG foi explorada em modelo de infecção intraperitoneal em camundongos selvagens (WT) e deficientes em TLR2, no qual essa via se mostrou importante para o estabelecimento de uma resposta aguda com proliferação de células T, polarização de um perfil de resposta Th1 com altos níveis de secreção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e eliminação das bactérias (HELDWEIN *et al.*, 2003). A presença de um eixo de sinalização TLR2-MyD88 funcional também foi relacionada ao controle do desenvolvimento tumoral induzido por injeções intratumorais de *Mycobacterium indicus pranii* em modelo de melanoma murino (B16-F10) (KUMAR *et al.*, 2019). No contexto da imunoterapia do câncer, agonistas de TLR2, a exemplo da lipoproteína bacteriana sintética (BLP), foram avaliados em modelo murino de carcinoma de pulmão, leucemia e melanoma como indutores de regressão tumoral de maneira dose-dependente, por um mecanismo que envolve a redução da atividade supressora de linfócitos T reguladores (Treg) e o aumento da citotoxicidade de células T CD8<sup>+</sup> tumor-específicas. A transferência adotiva de linfócitos pré-tratados com BLP e provenientes de animais selvagens foi suficiente para restaurar a imunidade antitumoral em camundongos deficientes em linfócitos T e B maduros (camundongos SCID), o que não aconteceu quando essa transferência foi realizada com linfócitos provenientes de animais deficientes em TLR2, destacando a importância desse PRR para a indução de uma resposta contra o tumor (ZHANG *et al.*, 2011).

*Mycobacterium tuberculosis* também apresenta ligantes de outras vias da imunidade inata capazes de ativar TLR4, incluindo lipomananos tetra-acilados (DOZ *et al.*, 2007), tetra- e hexa-manosídeos de fosfatidilinositol (PIM<sub>4-6</sub>) (ABEL *et al.*, 2002) e proteínas bacterianas de choque térmico HSP65 e HSP70 (BULUT *et al.*, 2005). A ativação de TLR4, explorada no modelo de infecção intraperitoneal com BCG em camundongos WT e deficientes para a via, aparentemente não demonstrou impacto direto na montagem da resposta imunológica e na eliminação bacteriana, apresentando apenas um efeito tardio de regulação do processo inflamatório crônico (FREMONT *et al.*, 2003). O trabalho de Kumar e colaboradores também investigou a possível participação de TLR4 na imunoterapia do melanoma murino com *M. indicus pranii*, mas este receptor não se mostrou relevante (KUMAR *et al.*, 2019). A

importância de TLR4 especificamente na atividade antitumoral promovida por BCG ainda não está definida.

Os agonistas de TLR4 possuem um efeito pleiotrópico no TME. A liberação da proteína de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) por queratinócitos expostos a radiação UV, por exemplo, induz uma resposta inflamatória pró-tumoral de maneira dependente de TLR4 com um intenso infiltrado de neutrófilos, um maior angiotropismo habilitado pelas células tumorais e o surgimento de metástases espontâneas no pulmão de camundongos (BALD *et al.*, 2014). A liberação de HMGB1 também foi observada em linhagens humanas de câncer de bexiga (T24 e 253J) infectadas com BCG e em modelo murino de tumor MB49 ortotópico tratado com BCG. Nestes modelos, os tumores capazes de secretar HMGB1 foram os que regrediram, enquanto aqueles cuja expressão dessa molécula foi silenciada apresentaram um volume tumoral aumentado (ZHANG *et al.*, 2013). Não obstante, a administração intratumoral de outro agonista de TLR4, a lumazina sintase de *Brucella* (BLS), durante o período inicial do desenvolvimento do melanoma B16-F10 foi responsável por induzir altos níveis de secreção de IFN- $\gamma$  e modificar o TME, aumentando a proporção entre células T CD8<sup>+</sup> efetoras e células reguladoras (Tregs e células supressoras mieloderivadas/MDSCs) (FARIAS *et al.*, 2021).

O papel dos agonistas de TLR5, como a flagelina de *Salmonella thyphimurium*, está relacionado com a ativação de mecanismos imunológicos que culminam na regressão do melanoma (CHEN *et al.*, 2021). Porém, BCG e outras micobactérias não apresentam flagelo (MARTINEZ *et al.*, 1999) e, por isso, um possível envolvimento de TLR5 no mecanismo antitumoral de BCG não foi considerado nesse trabalho.

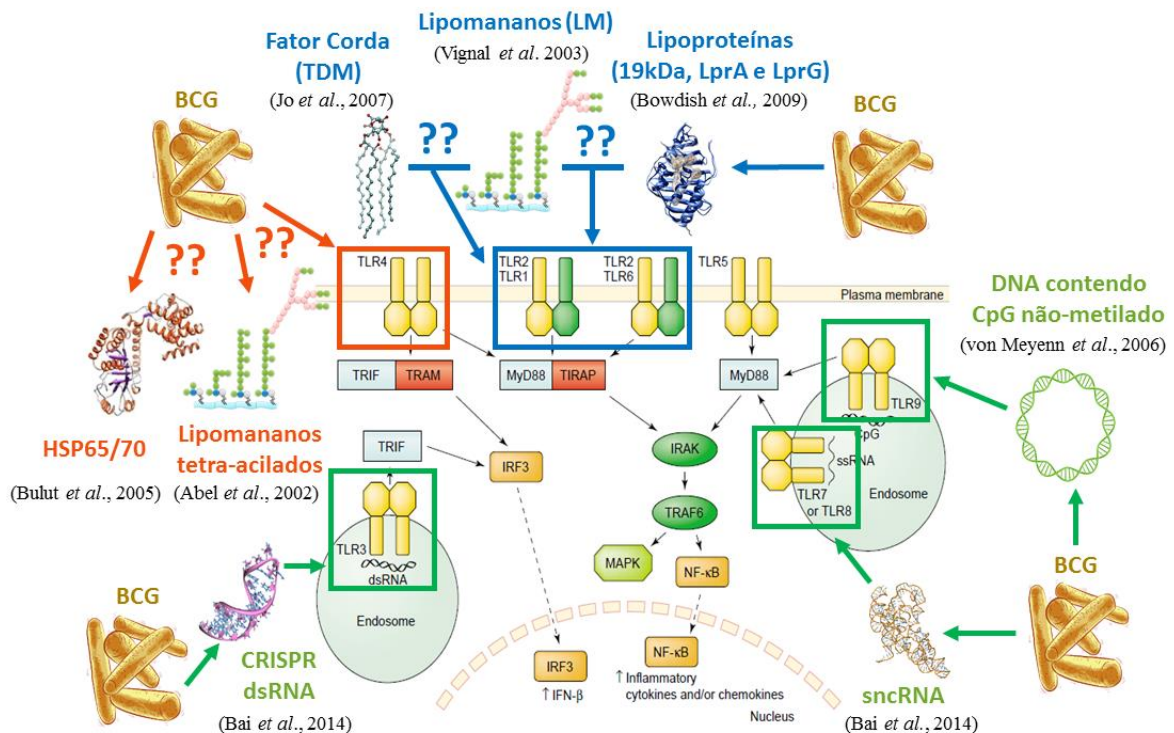
O envolvimento de TLRs endossomais foi avaliado através de uma fração extraída do BCG composta por 70% de DNA e 28% de RNA administrada em cinco linhagens murinas diferentes de tumores sólidos, que apresentou potencial para promover a regressão tumoral (SHIMADA *et al.*, 1985). Essa fração extraída de BCG possui em sua composição moléculas de RNA de dupla fita derivadas de cognatos de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR) passíveis de reconhecimento por TLR3, pequenos RNAs não-codificantes de fita simples (sncRNA) capazes de sinalizar a partir de TLR7 (BAI *et al.*, 2014) e sequências de DNA ricas em ilhas CpG não-metiladas que constituem agonistas de TLR9 (VON MEYENN *et al.*, 2006), como exemplificado na Figura 1. Os três TLRs compõe a via de sinalização endossomal da imunidade inata e dados de nosso grupo

em modelo heterotópico de câncer de bexiga (MB49) sugerem que o *crosstalk* entre TLR3/7/9 está envolvido, ainda que de maneira parcial, com o controle tumoral induzido por BCG (DE QUEIROZ *et al.*, 2021).

Há poucos dados na literatura explorando o papel da BCG na ativação de TLR3 e TLR7, com sugestões de que TLR3 estaria envolvido na indução da secreção de IL-10 por macrófagos peritoneais isolados de camundongos e, conseqüentemente, na regulação da inflamação (BAI *et al.*, 2014), enquanto que TLR7 parece estar envolvido diretamente na indução da apoptose de linhagens tumorais bem diferenciadas de câncer de bexiga como TSGH8301 (YU *et al.*, 2015). O uso de Poli I:C, um agonista de TLR3, já foi proposto como um potenciador do efeito antitumoral na imunoterapia com BCG do câncer de bexiga (AYARI *et al.*, 2016) e foi capaz de induzir a regressão do melanoma murino (B16-F10) (MOORE *et al.*, 2014). Imiquimod, um agonista de TLR7, consiste em uma terapia adjuvante bem estabelecida na clínica para evitar recidivas e metástases após a ressecção do tumor (COIT *et al.*, 2019). As evidências apontam que o mecanismo de ação do Imiquimod está relacionado à indução de autofagia e vias de morte celular e tem como consequência a modulação do TME, com um aumento de células T CD8<sup>+</sup>, redução de Tregs e MDSCs e indução de uma resposta sistêmica antitumoral, em que são observadas populações circulantes de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetores que expressam altos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (CHO *et al.*, 2017).

A via de TLR9, por fim, também participa da ativação imunológica promovida por BCG em sinergia com TLR2 e TLR4, o que foi observado em experimentos *in vitro* utilizando células dendríticas, em que a produção de IL-12 e a expressão da molécula coestimuladora CD86 foram semelhantes em células WT em comparação com células deficientes em TLRs individuais; contudo, uma redução drástica naquelas células deficientes em múltiplos TLR2/4/9 foi observada (VON MEYENN *et al.*, 2006). Existe um interesse crescente na clínica por agonistas de TLR9, para uso na imunoterapia de tumores refratários ao tratamento convencional com pembrolizumab (anti-PD-1) e em estágio avançado metastático, como é o caso de Tilsotolimod em fase III de testes clínicos (HAYMAKER *et al.*, 2021) e Vidutolimod em fase Ib (RIBAS *et al.*, 2021). Neste último trabalho, foi verificado que os agonistas de TLR9 são capazes de induzir uma resposta inflamatória mediada por IFN- $\gamma$ , caracterizada por um número aumentado de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes, maior expressão do ligante celular de morte programada 1 (PD-L1) e maior secreção de CXCL10, o que estaria relacionado a uma reversão da

refratariedade aos inibidores de *checkpoint* (RIBAS *et al.*, 2021). Tendo em vista a grande relevância que os agonistas de TLRs assumiram no campo da imunoterapia do câncer e a grande diversidade de padrões moleculares de BCG passíveis de reconhecimento por esses receptores, um dos focos deste trabalho foi o estudo do papel dessas importantes vias da imunidade inata na resposta imune antitumoral induzida por BCG.



**Figura 1. Diferentes possibilidades de ativação dos receptores do tipo Toll (TLRs) induzidos por *Mycobacterium*.** Em azul, estão representadas as moléculas expostas na parede celular de BCG com evidências na literatura de que possuem ação como agonistas de TLR2. Em laranja, estão destacados os componentes da parede celular (lipomananos tetra-acilados) e moléculas que se acumulam no citosol (HSP65/70) que podem ativar TLR4. Em verde, estão representados os ácidos nucleicos de BCG sugeridos na literatura como possíveis ligantes de TLR3, TLR7 e TLR9. As interrogações (?) indicam moléculas identificadas em outras espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* e que foram extrapoladas como possíveis ligantes presentes em BCG. Figura adaptada de van Duin e colaboradores (VAN DUIN *et al.*, 2006).



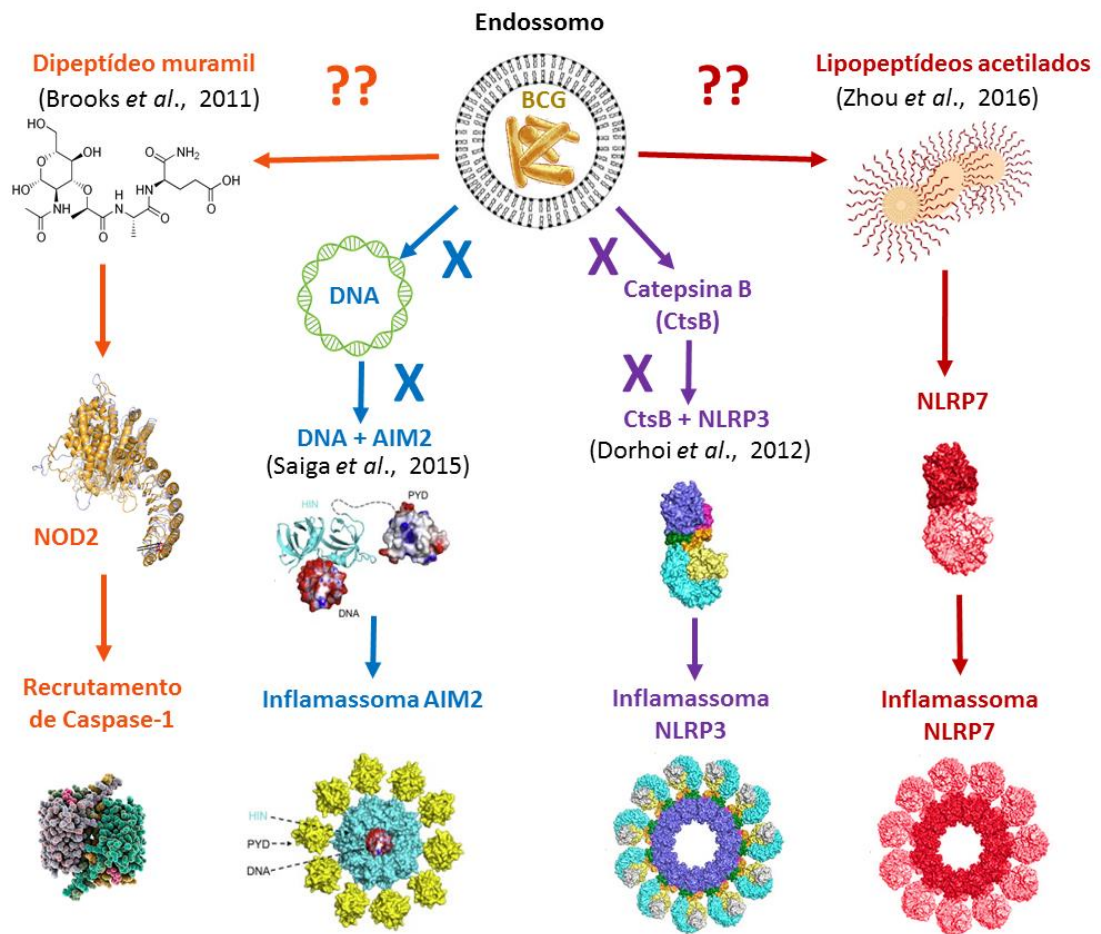
#### 1.4. A sinalização do inflamassoma no tratamento do câncer com BCG

Para o desenvolvimento da cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* ou BCG, foram realizadas 231 passagens em intervalos de três semanas no decorrer de 13 anos (1908 a 1921), com cultivo em meio sólido a base de batata, glicerol e bile de boi (LOBO *et al.*, 2021), condições que acabaram sendo permissivas ao acúmulo de mutações. Este processo permitiu o desenvolvimento da cepa vacinal atenuada a partir do fenômeno de deleção de um segmento de DNA de 9,5 quilobases identificado como RD1, que compreende nove *loci* gênicos expressos na linhagem selvagem de *Mycobacterium bovis* (MAHAIRAS *et al.*, 1996). Dentre os genes deletados da região RD-1, estão subunidades do sistema de secreção do tipo VII (T7S) ESX-1 e dois deles, ESAT-6 (do inglês *Early Secretory Antigen Target 6 kDa*) e CFP-10 (do inglês *culture filtrate protein-10 kDa*), são fatores de virulência por ele secretados no interior da célula hospedeira responsáveis pela ruptura do fagolisossomo e escape do microrganismo para o citosol. O escape é um fenótipo próprio de cepas virulentas de *M. bovis* e de *M. tuberculosis*, que pode ser recuperado em BCG a partir da complementação da região RD1 (VAN DER WEL *et al.*, 2007). Foram identificadas mais de 13 cepas de BCG resultantes da deleção gênica inicial (OETTINGER *et al.*, 1999), dentre as quais as mais comumente utilizadas para a imunoterapia do câncer são BCG Tice, BCG Connaught e BCG Moreau (GAN *et al.*, 2013). No presente trabalho foi utilizada a cepa BCG Moreau, que é utilizada no Brasil.

Considerando as vias do inflamassoma, o fato de BCG ter perdido a habilidade de atingir o citoplasma teve como consequência a baixa secreção de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a partir da sinalização via proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR (NLRP3) em macrófagos derivados de medula (BMDMs) (DORHOI *et al.*, 2012) ou via receptor ausente em melanoma 2 (AIM2) em macrófagos THP-1 (SAIGA *et al.*, 2015). A cepa virulenta *Mycobacterium bovis* Benjing retém a capacidade de atingir o citosol e seus lipopeptídeos microbianos acetilados sinalizam para o inflamassoma via proteína 7 que contém domínio de pirina da família NLR (NLRP7) (ZHOU *et al.*, 2016). Não se sabe até o momento se BCG Moreau, cepa atenuada que perdeu a capacidade de atingir o citosol, é capaz de sinalizar através de NLRP7. O que se conhece sobre a secreção moderada de IL-1 $\beta$  que acompanha o estímulo com BCG em macrófagos, é que o silenciamento da expressão do domínio de oligomerização ligante de nucleotídeos 2 (NOD2), leva a uma queda brusca nos níveis de produção dessa citocina (BROOKS *et al.*, 2011). Uma possível explicação para o fenômeno pode ser

especulada a partir de observações obtidas em macrófagos infectados por *Bacillus anthracis*, em que NOD2 mostrou-se capaz de recrutar caspase-1 a partir de seu domínio CARD (HSU *et al.*, 2008). O estímulo para a liberação de IL-1 $\beta$  no contexto da terapia com BCG pode ser o dipeptídeo muramil amplamente presente na parede celular de BCG e um forte ativador de NOD2 (BROOKS *et al.*, 2011) ou ainda padrões moleculares associados a dano (DAMPs) liberados por células tumorais infectadas ou mortas, a exemplo do trifosfato de adenosina (ATP) capaz de ativar o inflamassoma via NLRP3 (AMORES-INIESTA *et al.*, 2017).

A ativação da via do inflamassoma tem um efeito pleiotrópico no TME e poucas são as terapias do câncer que exploram esse componente da imunidade inata. Esse efeito pode ser pró-tumoral, inclusive em modelo murino de melanoma B16-F10, quando a sinalização de NLRP3 intrínseca ao tumor promove progressão e escape com o auxílio da expansão de MDSCs (TENGEDAL *et al.*, 2021) ou a ativação de AIM2 em células dendríticas no TME promove recrutamento de Tregs e imunossupressão (FUKUDA *et al.*, 2021). A sinalização do inflamassoma pode também ter efeito antitumoral, o que pode ser inferido a partir da comparação dos níveis de expressão de AIM2 expressos em amostras de pacientes com câncer de bexiga que tende a ser maior em casos de baixo grau de progressão e menor em quadros de alto grau e de pior prognóstico. Linhagens celulares de câncer de bexiga murino MBT-2 contendo vetores de expressão diferencial de AIM2 foram utilizadas para simular as observações clínicas e aquelas que super expressavam AIM2 apresentaram um favorecimento da resposta à imunoterapia com BCG (ZHOU *et al.*, 2022), destacando um possível papel de uma via do inflamassoma no mecanismo da imunoterapia com BCG, e foi foco de investigação neste trabalho.



**Figura 2. Possíveis vias de ativação do inflamassoma e/ou recrutamento de caspases em resposta a *Mycobacterium*.** A estimulação de macrófagos por BCG é acompanhada por níveis moderados de secreção de IL-1 $\beta$ . Evidências apontam para a contribuição de NOD2 (em laranja) na indução de IL-1 $\beta$  por BCG e especulamos com base em observações em macrófagos infectados com *Bacillus anthracis* que o mecanismo envolve o recrutamento de Caspase-1. Foi identificada a ativação do inflamassoma NLRP7 (em vermelho) associada ao estímulo com a cepa virulenta *Mycobacterium bovis* Bejing, mas não se sabe se BCG Moreau é capaz de sinalizar através dessa via, o que é indicado pelas interrogações. BCG não é capaz de ativar o inflamassoma via AIM2 (em azul) ou NLRP3 (em roxo), o que é indicado pelo X. Figuras de NLRP3 e NLRP7 adaptadas de (SHARIF *et al.*, 2019); figuras de AIM-2 adaptadas de (JIN *et al.*, 2012); figuras de NOD2 adaptadas de (FRADE-PROUD'HON-CLERC *et al.*, 2019).

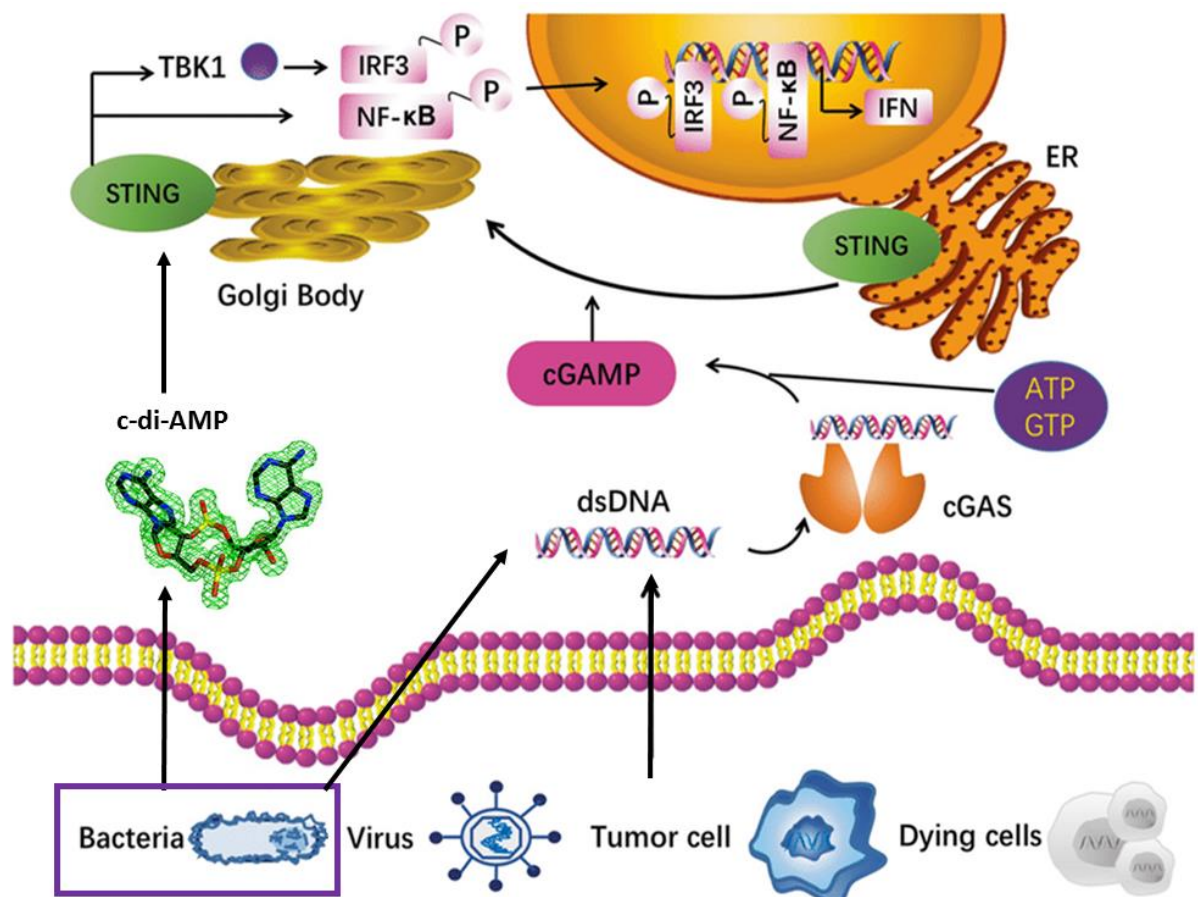
### 1.5. A via cGAS-STING apresenta grande relevância na imunoterapia do câncer

BCG induz a secreção de interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) de forma moderada via indução do eixo que envolve a via de STING (Estimulador de genes do interferon) e IRFs (fatores reguladores de interferon), a uma taxa 20-60% menor em relação aos níveis obtidos na infecção com cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* (DEY *et al.*, 2015). Considerando que BCG tem limitações para escapar do fagolisossomo e atingir o citosol da célula, grande parte da estimulação de STING observada pode estar relacionada com a produção de di-AMP cíclico (DEY *et al.*, 2015), parte do *quorum sensing* bacteriano, cuja função é estabelecer a comunicação célula-célula e sinalizar mudanças na densidade microbiana (PENG *et al.*, 2016). Essa ativação de STING no TME poderia também estar relacionada a liberação de DNA e outros DAMPs no meio extracelular pela grande quantidade de células em processo de morte celular desencadeado pelos próprios mecanismos imunológicos (JIANG *et al.*, 2020). As possibilidades de ativação de STING durante a imunoterapia com BCG estão representadas na Figura 3.

Um aumento expressivo de STING foi observado em lâminas de imunohistoquímica de câncer de bexiga murino induzido por carcinógeno e subsequentemente tratados com instilações intravesicais de BCG. E a presença da sinalização intrínseca de STING funcional em BMDMs se mostrou importante para a ativação de um perfil inflamatório e liberação de CXCL10 após a estimulação *in vitro* com BCG (LOMBARDO *et al.*, 2022). Visando explorar essa via de sinalização para o tratamento de câncer de bexiga, Singh e colaboradores desenvolveram uma BCG recombinante super expressando di-AMP cíclico, nomeada como BCG-disA-OE, que foi testada em modelo murino heterotópico de tumor MB49 e apresentou potencial aumentado para o controle do volume tumoral em comparação com a cepa de BCG selvagem (SINGH *et al.*, 2022). O efeito antitumoral de BCG-disA-OE foi acompanhado por um maior recrutamento de macrófagos inflamatórios, de células T CD8<sup>+</sup> e de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , além de um menor acúmulo de Treg no TME (SINGH *et al.*, 2022).

É amplamente conhecido na literatura que a via envolvendo cGAS (GMP-AMP cíclico sintase) e STING tem contribuição em diferentes contextos da imunidade antitumoral, como por exemplo no recrutamento de linfócitos T para o TME através do uso de agonistas e em processos de quimioterapia e radioterapia (WOO *et al.*, 2015).

Agonistas de STING, como ADU S-100 e 2'3'-cGAMP, tem despertado grande interesse na ativação dessa via para o tratamento do câncer (AMOUZEGAR *et al.*, 2021). O uso de ADU S-100 no tratamento de melanoma murino B16-F10 foi capaz de controlar o crescimento tumoral, o que foi associado com uma maior infiltração de células T CD8<sup>+</sup>, com a normalização da vasculatura ocasionada pela secreção dos fatores antiangiogênicos Vegf (inibidor do crescimento endotelial vascular) e CXCL10, com a formação de estruturas linfoides terciárias induzidas pela presença de CCL19 e CCL21 no TME e por células dendríticas infiltrantes estimuladas pelo agonista de STING que super expressam linfotóxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), interleucina-36 (IL-36) e interferons do tipo I (CHELVANAMBI *et al.*, 2021). Em razão de sua importância para a imunoterapia do câncer, a via cGAS-STING também foi explorada neste estudo para avaliar a sua relevância direta na resposta antitumoral induzida por BCG.



**Figura 3. Possibilidades de ativação da via cGAS-STING após reconhecimento de DNA citoplasmático proveniente de BCG ou células tumorais mortas.** Moléculas de DNA liberadas por BCG ou células tumorais mortas no TME podem ativar cGAS a produzir cGAMP. BCG também é capaz de produzir outra molécula de dinucleotídeo cíclico, c-di-AMP, que é parte da sinalização de seu *quorum sensing*. Tanto cGAMP quanto c-di-AMP são capazes de ativar STING, culminando na ativação dos fatores de transcrição IRF3 (Fator regulador do interferon 3) e NF- $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B) e na subsequente produção de IFN tipo I. Figura adaptada de Jiang e colaboradores (JIANG *et al.*, 2020).

### **1.6. Interação entre mecanismos da imunidade inata e adaptativa induzido pela imunoterapia com BCG em câncer**

Além do papel fundamental das moléculas próprias da imunidade inata, é importante discutir também a respeito do papel essencial dos linfócitos na imunidade antitumoral e a interação entre imunidade inata e adaptativa. Em especial, na imunoterapia com BCG, esses componentes celulares próprios da imunidade adaptativa se mostraram fundamentais em modelo murino de câncer de bexiga MB49 para o controle do desenvolvimento do tumor (RATLIFF *et al.*, 1993). O perfil celular citotóxico induzido por BCG foi associado a altos níveis de produção de Granzima B e de IFN- $\gamma$  (JI *et al.*, 2023). No entanto, o impacto da presença de IFN- $\gamma$  no TME é dependente de cada situação, podendo tanto atuar como um amplificador das funções efetoras de componentes celulares da imunidade inata e adaptativa, como também promover a exaustão da resposta de linfócitos T a partir da indução de uma maior expressão de PD-L1 (BENCI *et al.*, 2019). Apesar de existir um trabalho com modelo ortotópico de câncer de bexiga MB49 que sugere um papel importante de IFN- $\gamma$  no mecanismo de ação de BCG quando se compara a sobrevivência de camundongos WT e deficientes em IFN- $\gamma$  após o tratamento (RIEMENSBERGER *et al.*, 2002), a comparação dos volumes tumorais entre animais WT e deficientes para IFN- $\gamma$  não foi avaliada.

O aumento do infiltrado de linfócitos no TME de tumores B16-F10 tratados com BCG hidrogel foi acompanhado de um aumento da diversidade do repertório de receptor de célula T (TCR) e de uma maior frequência de clones de células T CD8<sup>+</sup> específicas para o antígeno tumoral TRP-2 (Proteína relacionada a tirosinase 2) (KREMENOVIC *et al.*, 2022). Apesar de muitos trabalhos terem falhado em demonstrar o aumento da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II em resposta ao tratamento com BCG (REDELMAN-SIDI *et al.*, 2022), os dados citados anteriormente levantados pelo trabalho de Kremenovic e colaboradores evidenciam que o aumento da apresentação de antígenos tumorais compõe parte do mecanismo de ação da imunoterapia com BCG. Considerando que a grande diversidade de moléculas presentes no BCG sinalize através de PRRs associados à macrófagos e células dendríticas, levanta-se a hipótese de que a interação entre mecanismos da imunidade inata e adaptativa é importante para atingir o efeito antitumoral. A ativação de vários componentes da imunidade inata estimula a indução de uma alta atividade de processamento e apresentação de antígenos, com

exposição de uma ampla gama de moléculas co-estimuladoras (PISHESHA *et al.*, 2022). De acordo com os PRRs ativados, macrófagos e células dendríticas podem secretar quimiocinas como CXCL9 e CXCL10, capazes de recrutar células do infiltrado citotóxico (RESCHKE; GAJEWSKI, 2022) e liberar citocinas no TME, como IL-12, que é um estímulo para a polarização de linfócitos com perfil Th1 e posterior produção de IFN- $\gamma$  por essas células (TRINCHIERI, 2003). O IFN- $\gamma$  liberado por linfócitos Th1 faz parte de um ciclo de potencialização da resposta imunológica, em que a sua atuação torna os macrófagos mais ativados (WU *et al.*, 2014), produzindo maiores níveis de IL-12 (TRINCHIERI, 2003). IFN- $\gamma$  também atua diretamente nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, aumentando sua motilidade e citotoxicidade (BHAT *et al.*, 2017). Portanto, a resposta antitumoral precisa ser avaliada de forma ampla, considerando a interação entre imunidade inata e adaptativa, sendo este um dos objetivos do trabalho na avaliação de diferentes vias imunológicas envolvidas no tratamento de melanoma com BCG (Figura 4).

### **1.7. Transformando tumores “frios” (pro-tumorais) em tumores “quentes” (antitumorais)**

O perfil imunológico do microambiente tumoral impacta diretamente no prognóstico do paciente e na resposta à imunoterapia (BINNEWIES *et al.*, 2018). Em termos gerais, um tumor pode se comportar como “frio” quando há uma baixa expressão ou apresentação de antígenos tumorais e alta expressão de PD-L1, promovendo o estabelecimento de um TME supressor pró-tumoral e a exclusão do infiltrado de células T CD8<sup>+</sup>. Em contraste, o tumor pode apresentar um fenótipo mais inflamado, descrito como “quente”, geralmente associado a tumores com uma alta carga mutacional (TMB - do inglês *tumor mutational burden*), apresentando um TME marcado por um intenso infiltrado de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e altos níveis de IFN- $\gamma$  (DE GUILLEBON *et al.*, 2020).

Tumores do tipo melanoma cutâneo apresentam uma alta TMB, com um valor médio de 49,17 (HAYWARD *et al.*, 2017), o que está associado a uma grande produção de neoantígenos originários dessas mutações, alta imunogenicidade e um grande potencial de responder à imunoterapia de forma eficiente. No entanto, a alta carga antigênica pode levar a exaustão das células T CD8<sup>+</sup> infiltradas no TME, associada à super expressão de moléculas de *checkpoint* imunológico, como a proteína 1 de morte celular programada (PD-1), o domínio 3 de mucina e

imunoglobulina de célula T (TIM-3) e o gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3), levando um tumor muito imunogênico a se comportar como um tumor “frio” (MARZAGALLI *et al.*, 2019).

A dicotomia entre tumor “frio” e “quente” é uma simplificação da complexidade do TME e dos mecanismos de escape tumoral. A avaliação de dados de *microarray* de melanoma depositados no *Cancer Genome Atlas* através do algoritmo CIBERSORT revelaram parte da diversidade dos possíveis perfis imunológicos assumidos pelo TME de melanoma. Três *clusters* com diferentes padrões de infiltrado celular imunológico foram identificados: (1) o *cluster A*, marcado pela presença de um intenso infiltrado de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no parênquima do tumor, o que caracteriza um tumor “quente” típico, imunoinflamado; (2) o *cluster B*, em que o parênquima e o estroma do tumor são densamente povoados por mastócitos, macrófagos M0 e células *natural killer* (NK) inativas, mas há uma ausência de recrutamento e infiltrado de células imunológicas ativadas, o que descreve um deserto imunológico; e, por fim, (3) o *cluster C*, com maior *score* estromal avaliado entre os três, apresentando um intenso infiltrado celular marcado por células B, linfócitos T reguladores (Treg), células T *naive* e células dendríticas, em que não foi verificada a presença de células T CD8<sup>+</sup>, refletindo um fenótipo imunoexcluído. Tanto o perfil de deserto imunológico quanto o imunoexcluído constituem tumores considerados “frios”. Vale destacar que nesse estudo o *cluster A*, que descreve um tumor “quente”, foi associado a amostras de pacientes com melhor prognóstico (LIU *et al.*, 2021).

A proposta de se utilizar BCG como abordagem terapêutica para o melanoma (KREMENOVIC *et al.*, 2020), assim como para o câncer de bexiga (DAMRAUER *et al.*, 2021), baseia-se na modulação do TME, tornando tumores fenotipicamente “frios” em tumores “quentes” (ANNELS *et al.*, 2020) (Figura 4). A biópsia de amostras humanas de metástases cutâneas de melanoma tratadas com injeções intralesionais de BCG indicou que essa imunoterapia está associada a altos níveis de secreção de quimiocinas, tais como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL18, CXCL9 e CXCL10. Esta imunomodulação levaria à quimiotaxia de monócitos e neutrófilos por CCL2 e CCL18 e ao recrutamento de células T CD4<sup>+</sup> com perfil Th1, células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, células NK e células T  $\gamma\delta$ , componentes do sistema imune que sabidamente possuem ação antitumoral (YANG *et al.*, 2017) (Figura 4).

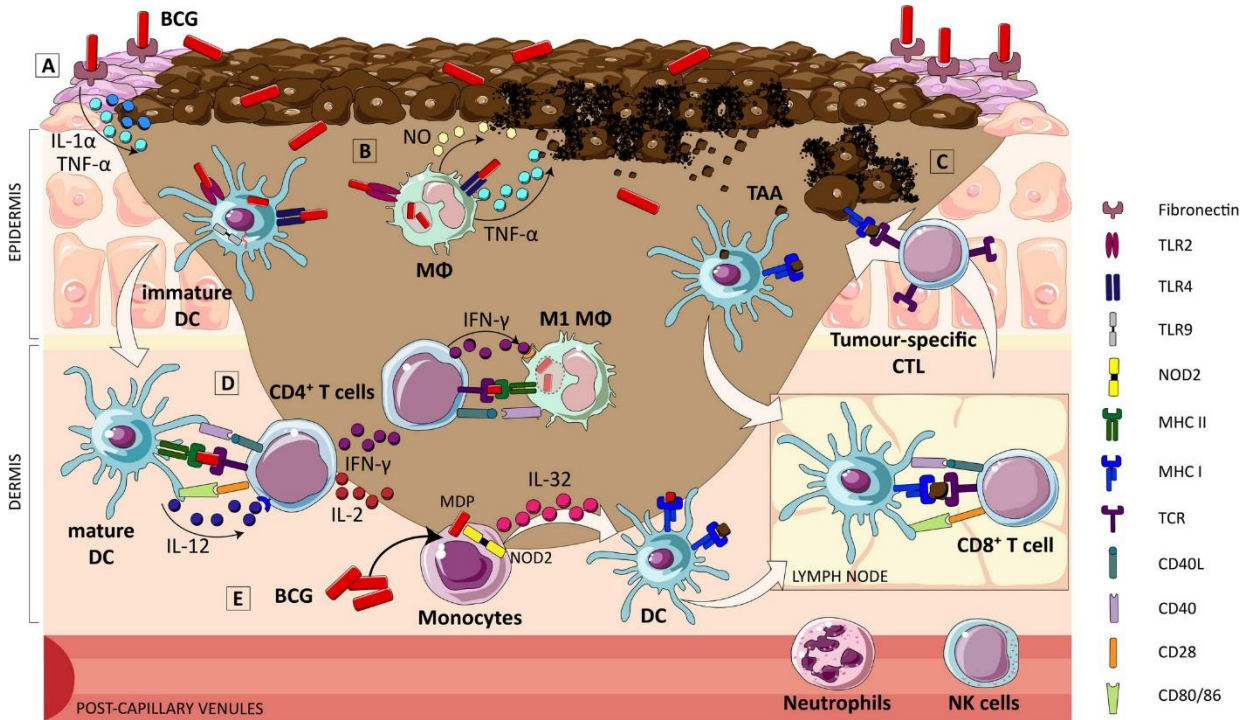
Mudanças no perfil celular do TME que acompanham a estimulação com BCG foram demonstradas a partir de análises de citometria de fluxo utilizando amostras de



tumor de bexiga MB49 ortotópico (SENSERRICH *et al.*, 2022) ou heterotópico subcutâneo (DE QUEIROZ *et al.*, 2021), revelando um aumento de neutrófilos, monócitos com perfil inflamatório, células NKT e linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos camundongos tratados em ambos os modelos citados. Também foi verificada uma maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetores em relação a população de Treg (SENSERRICH *et al.*, 2022), indicando a ruptura dos mecanismos supressores do TME e o estabelecimento de um fenótipo “quente”. Essa pode ser uma possível consequência da capacidade de BCG em estimular macrófagos e células dendríticas a secretarem citocinas inflamatórias no TME, principalmente fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12) (Figura 4), característica observada em tumores de bexiga T24 implantados em camundongos NOD/scid IL2Rg<sup>-/-</sup> (TAN *et al.*, 2020). A imunoterapia com BCG também foi associada à uma maior secreção do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) por neutrófilos recuperados da urina de pacientes após a instilação intravesical de BCG (SIMONS *et al.*, 2008) e de IFN- $\gamma$  por linfócitos infiltrados no TME de tumor ortotópico MB49 (RIEMENSBERGER *et al.*, 2002).

Um trabalho recente de nosso grupo de pesquisa investigou o envolvimento de moléculas próprias da imunidade inata no tratamento com BCG em modelo murino de tumor subcutâneo MB49, utilizando como ferramenta diferentes linhagens de animais *knockout* (KO) e demonstrando o papel essencial do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) para o efeito antitumoral do BCG (DE QUEIROZ *et al.*, 2021). A maior parte das pesquisas envolvendo os mecanismos imunológicos da imunoterapia com BCG foi realizada utilizando modelos de câncer de bexiga e seu uso no tratamento de melanoma segue sendo um campo ainda pouco explorado. Apesar de existirem muitos dados na literatura caracterizando o infiltrado celular no TME após o tratamento com BCG, a relação estabelecida entre a imunidade inata e adaptativa estimulada por BCG em melanoma ainda não está completamente esclarecida (Figura 4). No intuito de explorar esses mecanismos imunológicos, este trabalho apresenta estudos em modelo murino de melanoma (B16-F10) utilizando diferentes linhagens de camundongos deficientes (KO) para moléculas da imunidade inata e adaptativa tratados com BCG intratumoral. Os resultados que serão discutidos a seguir reforçam a importância do conhecimento dessas vias para a aplicação de BCG em melanoma, além de levantar possibilidades futuras para o desenvolvimento de agonistas ou cepas

recombinantes de BCG que potencializem ainda mais o seu efeito na imunoterapia do câncer.



**Figura 4. Proposta de mecanismo associado a imunoterapia com BCG e modulação do TME de melanoma.** BCG presente no TME é passível de reconhecimento por PRRs como TLR2, TLR4, TLR9 e NOD2, culminando na ativação de macrófagos e células dendríticas. O macrófago ativado por BCG desempenha função tumoricida ao secretar níveis aumentados de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (NO), como indicado em (B). A lesão tecidual induzida pela resposta inflamatória local resulta na liberação de antígenos tumorais, que são capturados pelas células dendríticas ativadas e subsequentemente apresentados para células T citotóxicas tumor-específicas no interior do linfonodo, o que foi mostrado em (C). Macrófagos e células dendríticas também são capazes de ativar células T CD4<sup>+</sup> com perfil Th1, associado a altos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2, o que pode ser observado em (D). A presença de IFN- $\gamma$  no TME pode atuar sobre linfócitos e macrófagos, potencializando a resposta antitumoral promovida por essas células. A modulação de um TME inflamado por BCG também é capaz de promover a quimiotaxia de células T CD8<sup>+</sup>, neutrófilos e células NK, como observado no canto direito inferior da figura. Imagem extraída de (KREMENOVIC *et al.*, 2020).

## 2.JUSTIFICATIVA

Há mais de 40 anos a imunoterapia com BCG é amplamente utilizada na clínica para o tratamento de câncer de bexiga não-músculo invasivo e não foi superada por nenhum outro tratamento em termos de sua capacidade de reduzir a recorrência e a progressão da doença (FUGE *et al.*, 2015). A aplicação de BCG também teve a sua utilidade reconhecida em alguns *guidelines* de referência como potencial escolha de terapia neoadjuvante para melanoma em estágio III, mais especificamente para o tratamento de metástases em trânsito muito disseminadas na pele que inviabilizam o procedimento cirúrgico curativo (COIT *et al.*, 2019), porém o seu uso segue restrito a instituições de pesquisa clínica (WRIGHT *et al.*, 2020). O melanoma representa 4,98% das neoplasias diagnosticadas em todo o mundo e é a forma mais agressiva de câncer de pele devido à alta incidência de metástases, com uma probabilidade de se tornar invasivo em 3,5% dos casos (SIEGEL *et al.*, 2023). Os casos de melanoma estão aumentando em todo o mundo a uma taxa anual preocupante de 3-7% (SIEGEL *et al.*, 2021). No Brasil, a estimativa é que em 2023 o número de casos novos diagnosticados atinja 8.980, sendo 4.640 em homens e 4.340 em mulheres. o que corresponde a um risco de 4,13 por 100 mil habitantes (INCA, 2022). Muitos pacientes portadores de melanoma são refratários aos tratamentos de primeira linha e despertam o interesse da ciência para o desenvolvimento e aprimoramento de novas terapias (MACHIRAJU *et al.*, 2021). A elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunoterapia com BCG pode favorecer o seu aprimoramento através da associação de BCG com agonistas da imunidade inata ou com citocinas e até mesmo o desenvolvimento de novas cepas recombinantes de BCG, podendo ser aplicadas ao melanoma e outros tipos de câncer.

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos envolvidos nas respostas imune inata e adaptativa que são importantes para o efeito de BCG no controle do melanoma murino.

#### 3.2 Objetivos Específicos

(I) Estabelecer o modelo singênico de melanoma murino utilizando células B16-F10 implantadas subcutaneamente em animais WT e KO e o tratamento intratumoral com BCG;

(II) Avaliar o potencial de infecção de BCG em células B16-F10 comparado com BMDMs;

(III) Analisar o perfil de resposta imunológica *in vitro* de diferentes vias de sinalização da imunidade inata comparando a linhagem tumoral B16-F10 e BMDMs;

(IV) Investigar o papel de diferentes receptores e moléculas da imunidade inata envolvidos no efeito antitumoral induzido pela imunoterapia com BCG em melanoma utilizando animais deficientes para TLR3, TLR4, TLR7, TLR 3/7/9, caspase-1/11, caspase-11, IL-1R, cGAS, STING, IFNAR e MyD88;

(V) Avaliar a ativação de BMDMs de camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> cultivados em co-cultura com células tumorais B16-F10 infectadas com BCG;

(VI) Comparar a resposta imunológica de esplenócitos provenientes de camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup>, tratados previamente com PBS ou com BCG, quando cultivados em co-cultura com células tumorais B16-F10 infectadas com BCG;

(VII) Avaliar também o papel da resposta imune adaptativa associada ao tratamento com BCG utilizando animais Rag<sup>-/-</sup> e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>;

(VIII) Comparar o perfil do infiltrado de células imunológicas associadas ao TME de tumores B16-F10 em camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> tratados com PBS ou BCG e caracterizar a influência de MyD88 na resposta antitumoral induzida por BCG.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, preferencialmente entre sete a nove semanas, da linhagem C57BL/6 selvagem (WT) ou animais deficientes (KO) para os genes de TLR3, TLR4, TLR7, TLR 3/7/9, MyD88, cGAS, STING, IFNAR, caspase-1/11, caspase-11, IL-1R, Rag e IFN- $\gamma$ , todos com *background* C57BL/6. Os camundongos TLR3<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR 3/7/9<sup>-/-</sup> e MyD88<sup>-/-</sup> foram fornecidos pelo Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Osaka, Japan). Os camundongos cGAS<sup>-/-</sup> e STING<sup>-/-</sup> foram fornecidos pelo Dr. Glen N. Barber (University of Miami, Miami, USA). Os camundongos caspase-1/11<sup>-/-</sup> e IL-1R<sup>-/-</sup> foram fornecidos pelo Dr. Richard A. Flavell (Yale University School of Medicine, New Haven, USA). Os animais caspase-11<sup>-/-</sup> são provenientes do laboratório do Dr. Vishva M. Dixit (Genentech Inc., South San Francisco, California, USA). Os camundongos IFNAR<sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pelo Dr. Dario Zamboni (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pela Dra. Leda Quércia Vieira (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil) e foram gerados pelo Dr. Timothy Stewart (Genentech Inc., South San Francisco, California, USA). Os animais Rag<sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ricardo Gazzinelli (Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil). Todos os animais foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG, coordenado pelo prof. Dr. Sergio Costa Oliveira, em condições livres de patógenos específicos (SPF) e com livre acesso a alimentos e água. Os animais foram submetidos a eutanásia utilizando solução anestésica contendo 25% de ketamina e 9% de xilazina em 0,9% de NaCl. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pelo Conselho de Ética no Uso Animal (protocolo CEUA/UFMG 372/2019).

### 4.2 Bactérias

Neste trabalho, foi utilizada a cepa vacinal *Mycobacterium bovis* BCG Moreau. O estoque foi preparado a partir de uma alíquota de um estoque semente mantido no freezer a -80° C, que foi descongelada e inoculada por via intravenosa em camundongo C57BL/6. Após 30 dias, o baço do animal infectado foi retirado, macerado, diluído e semeado em meio sólido Difco™ Middlebrook 7H11 (BD

Biosciences) suplementado com 10% de OADC (do inglês *oleic acid-albumin-dextrose-catalase*) e 0,5% de glicerol. Uma colônia isolada de BCG foi inoculada em garrafas contendo meio Difco™ Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) suplementado com 10% de OADC e mantidas na estufa a 37° C até atingir a fase exponencial de crescimento, referente a densidade óptica (D.O.) estabelecida na faixa entre 0,8 e 0,9. As bactérias foram recuperadas por centrifugação e as alíquotas preparadas em solução estéril de glicerol 10%. O descongelamento de cada alíquota foi realizado apenas uma vez para garantir a viabilidade bacteriana. O valor de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) referente ao estoque foi mensurado realizando diluições seriadas em solução aquosa estéril contendo 0,05% de Tween 80 e semeando em placas de meio Middlebrook 7H11 agar (Difco™ BD Biosciences) suplementado com 10% de OADC, após 21 a 30 dias o número de CFU foi contado e definido para o uso nos experimentos posteriores.

### **4.3 Linhagem tumoral e cultivo celular**

Células tumorais murinas B16-F10 (melanoma) foram gentilmente cedidas pela Dra. Miriam Teresa Paz Lopes (UFMG, Belo Horizonte, Brasil) e cultivadas em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO), 1% de HEPES 1M (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sendo mantidas incubadas na estufa à 37° C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.4 Modelo singênico de melanoma murino (B16-F10)**

O tumor singênico de melanoma foi gerado a partir da injeção de  $5 \times 10^5$  células B16-F10 (em 100 µl de PBS) no flanco direito dos camundongos pela via subcutânea, utilizando seringa de 1 ml e agulha ultra-fine (calibre 0,3 mm) (BD Biosciences). Inicialmente, avaliamos diferentes protocolos de tratamentos e comparamos o uso de animais de diferentes sexos e idades. Estabelecemos o modelo de tratamento com injeções intratumorais de  $8 \times 10^6$  CFU de BCG (em 60 µl de PBS) nos dias 1, 8 e 12 após injeção das células tumorais, incluindo animais machos e fêmeas. O desenvolvimento tumoral foi monitorado periodicamente com auxílio de um paquímetro digital para avaliação do volume tumoral nos dias 8, 12, 14 e 18. O volume tumoral foi calculado pela fórmula  $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$ . Após 18 dias, foi

realizada a eutanásia dos animais e a coleta dos tumores e baços para realização de citometria dos tumores e isolamento de esplenócitos, respectivamente.

#### **4.5 Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)**

Células de medula óssea foram removidas do fêmur e tibia de animais C57BL/6 ou MyD88 KO. As extremidades destes ossos foram cortadas a medula lavada com 5 a 10 mL de solução salina fria por osso. A suspensão de células obtida foi então centrifugada a 1200 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos a 4° C e o precipitado foi suspenso em meio para cultivo DMEM (GIBCO). As células foram submetidas a uma filtração utilizando filtros com membrana de nylon de 70 µm (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura das ligações entre células. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4° C e os precipitados foram suspensos em meio DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de FBS (GIBCO), 1% de HEPES (GIBCO), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20% de LCCM (do inglês *L929 cell conditioned medium*), fonte de fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF). Aproximadamente  $1 \times 10^7$  células em 10 ml de meio DMEM suplementado foram adicionadas em cada placa de petri e mantidas incubadas a 37° C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 dias, 10 ml de meio DMEM suplementado novo foi adicionado à cultura. No sétimo dia, as células aderidas estavam completamente diferenciadas em BMDMs e prontas para serem utilizadas nos ensaios *in vitro* de ativação das vias de sinalização celular e co-cultura.

#### **4.6 Cultura de esplenócitos**

Os esplenócitos foram isolados de animais C57BL/6 ou MyD88 KO que receberam a implantação de tumores subcutâneos B16-F10 e foram previamente tratados com PBS (Mock) ou BCG. Após 18 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, os baços foram retirados e macerados com redes de aço finas. Após lavagens com salina estéril, os precipitados de células foram tratados com solução hemolítica de amônio-cloreto-potássio (ACK) por 5 minutos. O ACK foi neutralizado adicionando 30 ml de salina por amostra, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. Os precipitados de células resultantes foram suspensos em meio DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de FBS (GIBCO), 1% de HEPES (GIBCO), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Após serem filtrados com

membrana de nylon de 70  $\mu\text{m}$  (BD FALCON), os esplenócitos foram contados e semeados em placas de 24 poços para os experimentos de co-cultura.

#### **4.7 Co-culturas de BMDMs ou esplenócitos com B16-F10**

Células B16-F10 usadas para co-cultura foram previamente semeadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) e infectadas com BCG (MOI 5) por 24 h. Após este período, as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS para remover todas as bactérias livres no sobrenadante. A mesma quantidade de BMDMs ( $2 \times 10^5$  células/poço) derivados de animais WT ou MyD88<sup>-/-</sup> ou 1:2 esplenócitos ( $4 \times 10^5$  células/poço) isolados de animais C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> foram adicionados juntamente com células B16-F10 infectadas ou não infectadas. A co-cultura foi mantida por mais 24 h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e depois as amostras foram coletadas para diferentes análises. Células B16-F10, BMDMs e esplenócitos sozinhos também foram semeadas em placas de 24 poços ( $4 \times 10^5$  células/poço), infectadas com BCG (MOI 5) ao mesmo tempo em que iniciamos a co-cultura e avaliadas após 24 h como controle.

#### **4.8 Avaliação da carga bacteriana através da determinação do número de unidades formadoras de colônia (CFU)**

BMDMs ( $5 \times 10^5$  células/poço) ou células tumorais B16-F10 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram infectadas com diferentes M.O.I. de BCG em 300  $\mu\text{L}$ /poço de DEMEM (GIBCO) suplementado com 10% de FBS (GIBCO) e 1% de HEPES (GIBCO). As células foram incubadas por 24h a 37° C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período de incubação, as células foram lavadas com solução salina em temperatura ambiente para remover todo BCG que não foi internalizado. Para quantificação do número de bactérias intracelulares, as células foram lisadas com 1 ml/poço de solução de 0,1% (v/v) de saponina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37° C por 10 a 20 minutos até a lise total das células. O conteúdo do lisado foi submetido a diluições seriadas e plaqueado em meio Middlebrook 7H11 agar (Difco™ BD Biosciences) suplementado com 10% de OADC. As placas foram incubadas por 21 a 30 dias na estufa a 37° C e contadas para determinação de CFU.



#### 4.9 Ativação das vias de sinalização celular

Para avaliação da ativação de vias de sinalização celulares foram comparados BMDMs e células tumorais B16-F10 que foram cultivadas na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço em volume final de 300  $\mu$ L/poço de DEMEM (GIBCO) suplementado com 10% de FBS (GIBCO) e 1% de HEPES (GIBCO). BMDMs e células B16-F10 foram infectadas com BCG em diferentes M.O.I. (5, 10, 20 e 40) ou tratados com agonistas específicos de vias da imunidade inata, incluindo: Pam3CSK4 (1 $\mu$ g/ml) para TLR2, Poli I:C (3 $\mu$ g/ml) para TLR3, LPS ultrapuro (100ng/ml) para TLR4, CpG 1826 (1 $\mu$ g/ml) para TLR9, dsDNA90 (3 $\mu$ g/ml) para cGAS-STING e LPS de *Escherichia coli* (1 $\mu$ g/ml) acrescido de nigericina (20 $\mu$ M) para ativação dos dois sinais de inflamassoma. Poli I:C e dsDNA90 foram transfectados utilizando Lipofectamina 2000 (3 $\mu$ g/ml) de acordo com as orientações do fabricante. As culturas foram incubadas a 37° C por 3h para quantificação da expressão de mRNA por qPCR ou 24h para dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA.

#### 4.10 Dosagem de citocinas por ELISA

A dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL10 (IP10) secretadas nos sobrenadantes das culturas celulares após 24h de infecção/estímulos foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, utilizando kit comercial (R&D Systems, Abingdon, UK) de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.11 PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

A técnica de qPCR foi utilizada para avaliar o nível de transcritos (RNA mensageiro, mRNA) de IFN- $\beta$  expresso nas células. BMDMs e células tumorais B16-F10 previamente infectadas com BCG ou estimuladas com Poli:I:C ou dsDNA90 em placa de 24 poços por 3h foram homogeneizados em reagente TRIzol (Invitrogen) para extração do mRNA segundo as orientações do fabricante. O precipitado de células foi suspenso em água livre de nucleases e a concentração do RNA foi dosada por meio do NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro. A transcrição reversa para síntese do cDNA partiu de reações contendo 1  $\mu$ g de RNA acrescido de oligo-dT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) e água livre de nucleases q.s.p 8  $\mu$ L. Em seguida as reações foram levadas ao termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia EUA) para

hibridização. Após esta etapa, cada reação foi acrescida de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP - 10 mM), ditioneitol (DTT - 0,1 M), tampão 5x, enzima transcriptase reversa (2 U por reação) e água livre de nucleases q.s.p 20 µL. As reações foram novamente submetidas ao termociclador com programação de 42°C por 60 min, 70°C por 15 min. Reações sem transcriptase reversa foram utilizadas como controle negativo de possíveis contaminações com DNA endógeno durante a extração. A reação de PCR em tempo real (qPCR) foi conduzida em volume final de 10 µl contendo cDNA diluído 5x, SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MS, USA), oligo-dT cDNA e 5 µM de cada *primer* do par conforme as sequências apresentadas a seguir:  $\beta$ -actina (*forward*) 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3';  $\beta$ -actina (*reverse*) 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'; IFN- $\beta$  (*forward*) 5'-AGC TCC AAG AAA GGA CGA ACA T-3'; IFN- $\beta$  (*reverse*) 5'-GCC CTG TAG GTG AGG TTG ATC T-3. As reações de qPCR foram realizadas utilizando QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) com os seguintes parâmetros: 60°C por 10min, 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1 min, e um estágio de dissociação de 95°C por 15s, 60°C por 1 min, 95°C por 15s, e 60°C por 15s. Os dados foram analisados usando o método  $\Delta\Delta CT$  e foram apresentados como unidades de expressão relativa depois da normalização com o gene constitutivo ( $\beta$ -actin). As análises foram feitas em triplicata.

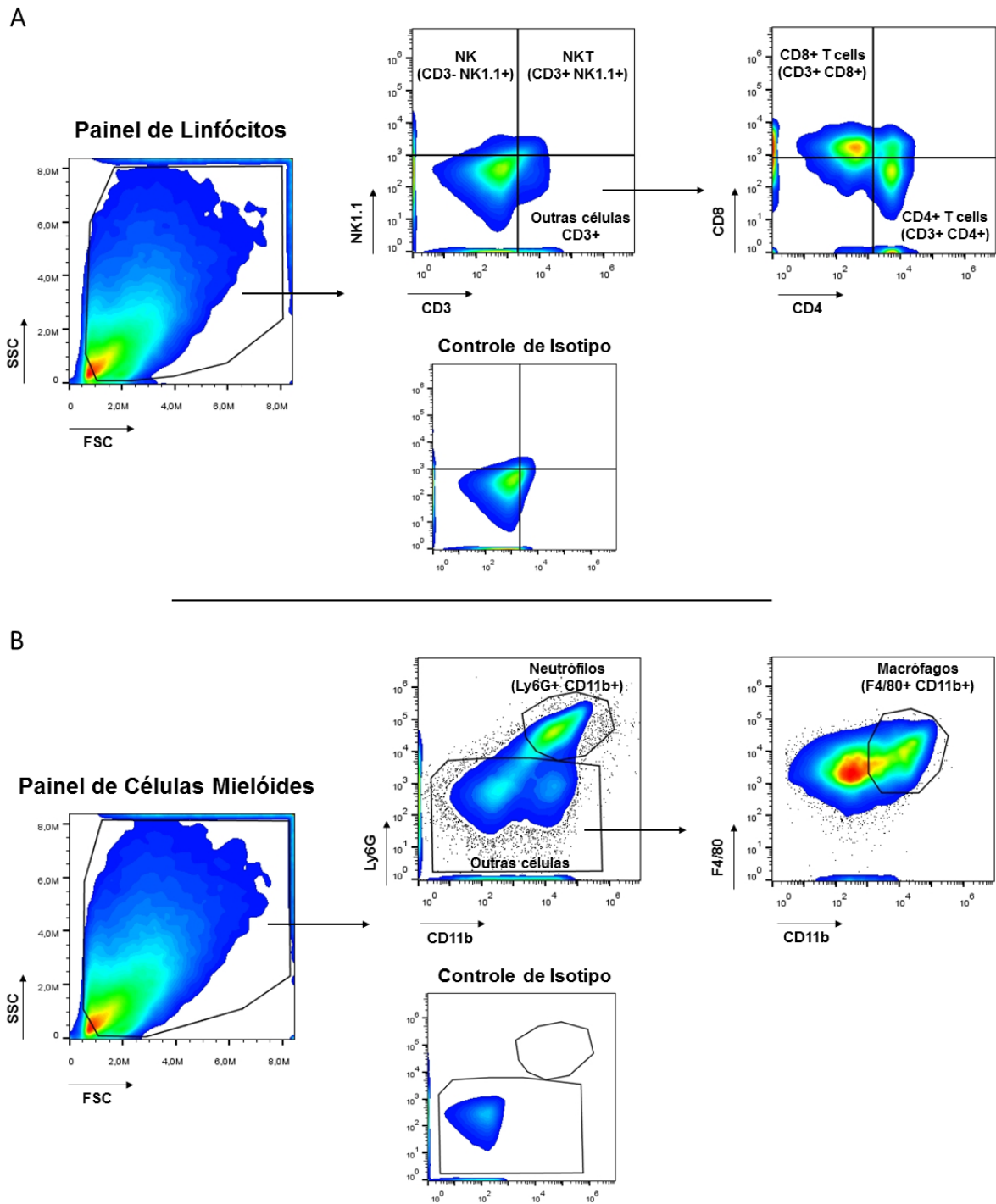
#### 4.12 Caracterização do Infiltrado Celular do TME por Citometria de Fluxo

Os camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> foram eutanasiados após 18 dias de tratamento com PBS (Mock) ou BCG e os tumores foram removidos, macerados com bisturi e incubados em 200 U/ml de Colagenase IV (GIBCO) sob agitação constante no thermomixer (Eppendorf) a 1000 rpm, 37°C por 1 h. As células tumorais dissociadas foram filtradas com membrana de nylon de 70 µm (BD FALCON), centrifugadas a 1200 rpm por 5 min e o pellet foi suspenso em meio DMEM (GIBCO). Para cada amostra de tumor, foram separadas 1x10<sup>6</sup> células no total para marcação com diferentes anticorpos de células linfóides e mielóides. Em resumo, o protocolo de marcação para citometria de fluxo seguiu os seguintes passos: as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 7 min a 4°C e lavadas com PBS; posteriormente, as células foram incubadas com anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores Fc (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA) em tampão FACS (PBS, 0,25% BSA, 1 mM NaN3) durante 20 min a 4°C. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas e

então incubadas durante 20 min a 4°C com os seguintes marcadores de superfície: anti-CD3 conjugado com PE-Cy-7 (clone 145-2C11), anti-NK1.1 conjugado com PE (clone PK136), anti-CD4 conjugado com APC-Cy-7 (clone GK1.5), anti-CD8 conjugado com FITC (clone 53-6.7), anti-CD11b conjugado com APC-Cy-7 (clone M1/70), anti-Ly6G conjugado com PE (clone 1A8) e anti-F4/80 conjugado com biotina (clone BM8). As células foram centrifugadas e lavadas novamente e, quando necessário, foram incubadas com estreptavidina conjugada com PerCP-Cy5.5 por 20 minutos a 4°C. Os controles de isotipos apropriados foram utilizados. Todos os anticorpos utilizados são da BD Bioscience. Por fim, as células foram lavadas, suspensas em tampão PBS e avaliadas utilizando equipamento Attune Acoustic Focusing® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Cerca de 100.000 eventos foram coletados e os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA). A estratégia de *gating* (Figura 5) utilizada para a delimitação das populações de células imunológicas associadas ao microambiente do tumor B16-F10 consistiu em painéis de marcação de linfócitos (Figura 5A) e de células mielóides (Figura 5B). No painel de linfócitos (Figura 5A), a utilização de anti-NK1.1 e anti-CD3 possibilitou a delimitação de células NK (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) e NKT (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) a partir da população total de células e as demais células CD3<sup>+</sup> foram analisadas em relação à expressão de CD8 ou CD4 para a identificação das respectivas populações de linfócitos T (CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>). No painel de células mielóides, a população total de células isoladas do tumor foi analisada quanto à expressão de CD11b e Ly6G, sendo selecionadas como neutrófilos aquelas CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> e a partir das demais células CD11b<sup>+</sup> foi utilizada a marcação de F4/80 para a delimitação da população correspondente aos macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>).

#### 4.13 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os resultados foram avaliadas utilizando ANOVA one-way seguido por pós-teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) ou teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ). As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).



**Figura 5. Estratégia de gating da citometria de fluxo dos tumores de camundongos C57BL/6 e *MyD88*<sup>-/-</sup>.** (A) No painel de linfócitos, a população total de células foi separada para NK1.1+CD3- (células NK) ou NK1.1+CD3+ (células NKT) e as demais células CD3+ foram analisadas em relação à expressão de CD8 ou CD4 (células T CD8+ ou células T CD4+). (B) No painel de células mielóides, a população total de células isoladas do tumor foi analisada quanto à expressão de CD11b e Ly6G, sendo selecionadas como neutrófilos aquelas CD11b+Ly6G+. As demais células foram então separadas em CD11b+F4/80+ (Macrófagos).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estabelecimento do modelo de imunoterapia com BCG em tumor singênico murino do tipo melanoma (B16-F10)

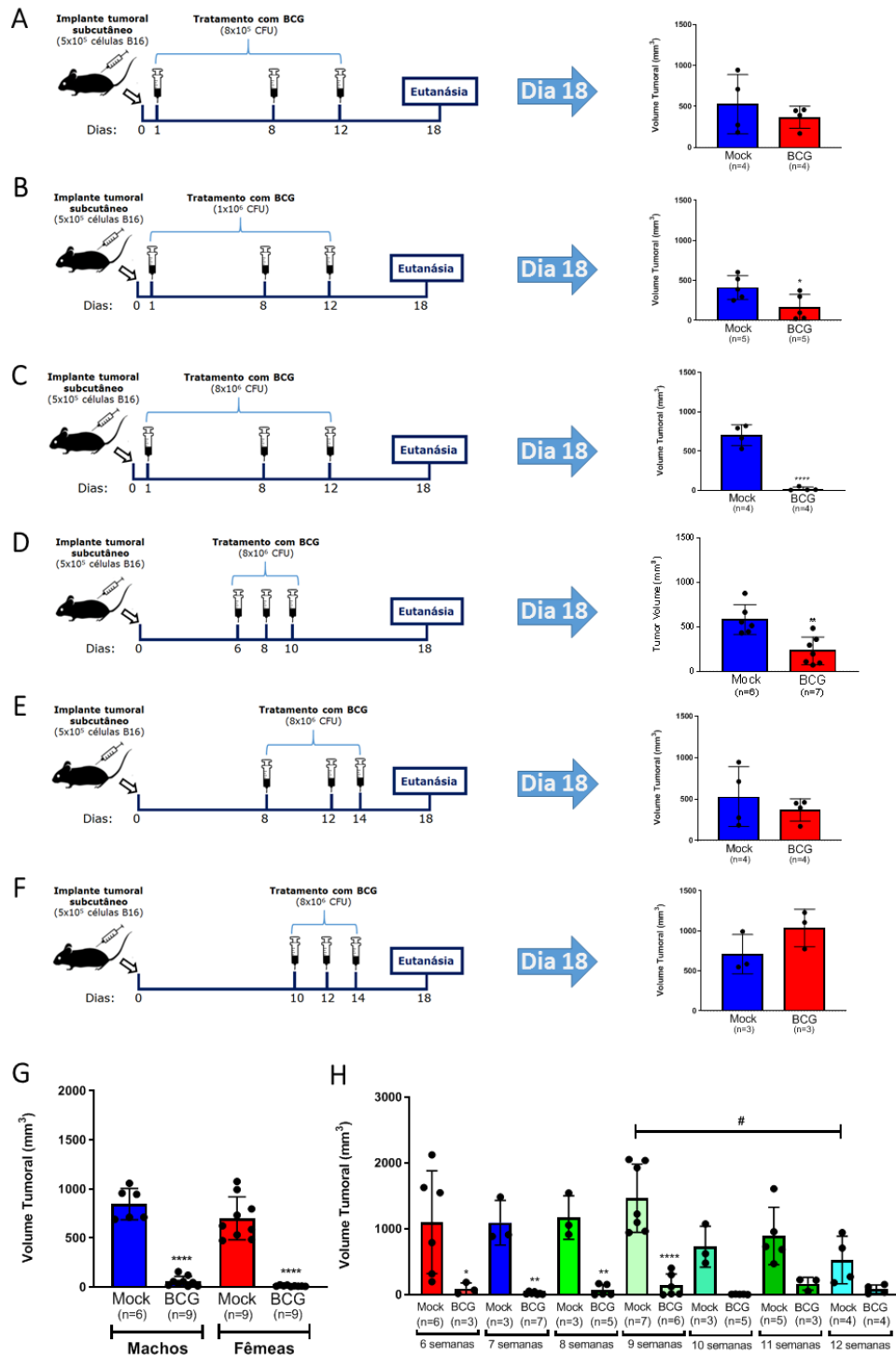
O ponto de partida para possibilitar a investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunoterapia com BCG foi o estabelecimento do modelo experimental, que apresentasse um fenótipo claro de controle do desenvolvimento tumoral em resposta ao tratamento. Neste trabalho, utilizamos a linhagem tumoral murina de melanoma B16-F10 em razão de sua ampla utilização em modelo murino e de similaridades com o melanoma humano quanto a alguns antígenos tumorais produzidos (gp100/pmel17, MART-1/Melan-A, tirosinase, TRP-1/gp75 e TRP-2), a capacidade de expressar MHC de classe II em resposta a IFN- $\gamma$  e o comportamento mais agressivo e invasivo quando comparado a outras linhagens disponíveis como B16-F1 (OVERWIJK; RESTIFO, 2001). A implantação do tumor foi realizada no flanco direito de camundongos C57BL/6 e KO. A quantidade de  $5 \times 10^5$  células B16-F10 implantadas subcutaneamente foi definida com base em outros trabalhos que utilizaram essa mesma quantidade de células (LUCAS *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2014; OVERWIJK; RESTIFO, 2001), assim como a definição pelo tratamento com BCG intratumoral, que já foi descrita como a melhor via de administração desse tratamento em melanoma murino (PROCTOR *et al.*, 1976).

Nós comparamos o modelo de tratamento nos dias 1, 8 e 12 após injeção tumoral com escalonamento de doses de BCG entre  $8 \times 10^5$  CFU,  $1 \times 10^6$  CFU e  $8 \times 10^6$  CFU (Figuras 6 A-C). Considerando as doses de BCG testadas,  $8 \times 10^5$  CFU se mostrou insuficiente para controlar o desenvolvimento do tumor (Figura 6A) e  $1 \times 10^6$  CFU se comportou como a dose mínima capaz de induzir algum controle tumoral, ainda que parcial (Figura 6B). O efeito desejável, a redução drástica do volume tumoral, só foi obtido com a dose de  $8 \times 10^6$  CFU (Figura 6C). Além disso, avaliamos também diferentes intervalos de tempo em que os tratamentos intratumorais foram administrados após a injeção tumoral (Figura 6C-F). Entre os regimes de tratamento testados, aquele em que a primeira injeção intratumoral de BCG foi administrada logo após a implantação do tumor no dia 1 e depois nos dias 8 e 12 (Figura 6C) foi o que apresentou um controle mais eficiente do desenvolvimento do tumor. No regime em que a primeira injeção de BCG foi aplicada seis dias após a implantação do tumor e depois nos dias 8 e 10 (Figura 6D), observamos um menor controle dos tumores.

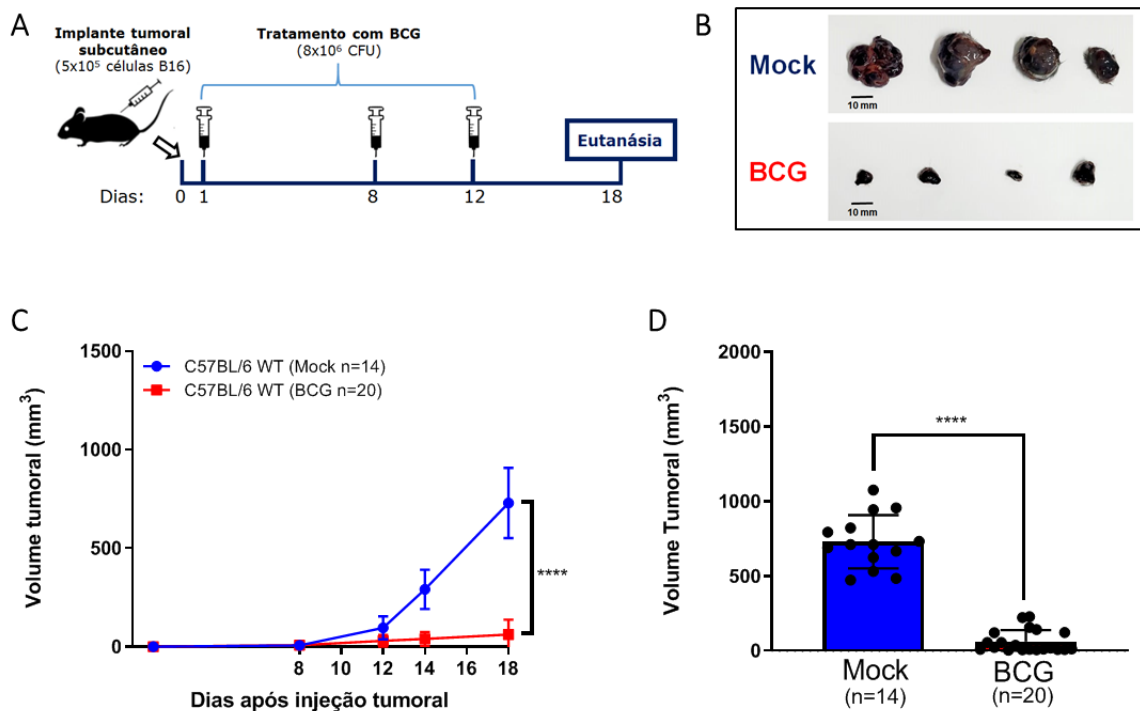
Sendo que, ao iniciarmos a primeira dose de BCG em tempos mais longos após 8 dias (Figura 6E) ou 10 dias (Figura 6F), o BCG não foi capaz de controlar o crescimento tumoral. Assim, o regime de tratamento em que BCG foi mais eficaz no controle tumoral (Figura 6C) foi o escolhido para ser utilizado em todos os outros experimentos do trabalho.

Os possíveis efeitos do sexo e da idade dos animais também foram comparados para avaliar se influenciavam no desenvolvimento dos tumores e na resposta às injeções intratumorais com BCG (Figuras 6G e H). O dimorfismo sexual não influenciou no controle dos tumores induzido por BCG (Figura 6G). Por outro lado, a idade dos camundongos foi considerada um fator que interfere no desenvolvimento dos tumores (Figura 6H). Os camundongos com 6 semanas de idade apresentaram volumes tumorais muito variáveis e em alguns casos até mesmo uma maior dificuldade de implantação tumoral (Figura 6H). Enquanto os camundongos com idade superior a 10 semanas apresentaram volumes tumorais menores que a média dos tumores dos animais entre 7 a 9 semanas, o que influenciou na identificação estatística do fenótipo de resposta ao tratamento (Figura 6H). As diferenças no desenvolvimento do tumor possivelmente são um reflexo do perfil do sistema imune em diferentes estágios do desenvolvimento. É importante observar que a resposta ao tratamento com BCG aconteceu de maneira semelhante em todas as idades (Figura 6H). Portanto, estabelecemos como padrão o uso de animais machos e fêmeas, preferencialmente com idades entre 7 e 9 semanas, tratados com injeções intratumorais contendo  $8 \times 10^6$  CFU de BCG nos dias 1, 8 e 12. Os animais foram eutanasiados após 18 dias ou em dias anteriores quando os tumores atingiam volumes acima de  $1000 \text{ mm}^3$ , no intuito de minimizar o sofrimento animal.

O efeito do tratamento com BCG no modelo estabelecido como padrão (Figura 7A) está representado através das imagens comparativas entre tumores tratados com PBS (Mock) ou BCG na Figura 7B. A capacidade que o BCG tem para controlar o



**Figura 6. Estabelecimento do modelo de imunoterapia com BCG em tumor singênico murino do tipo melanoma (B16-F10) em camundongos C57BL/6.** A-C) Comparação do escalonamento de doses de BCG, sendo as doses testadas  $8 \times 10^5$  (A),  $1 \times 10^6$  (B) e  $8 \times 10^6$  CFU (C) aplicadas nos dias 1, 8 e 12 após injeção tumoral. C-F) Variações no regime de tratamento, sendo as aplicações intratumorais de BCG realizadas nos dias 1, 8 e 12 (C); 6, 8 e 10 (D); 8, 12 e 14 (E); ou 10, 12 e 14 (F). A influência das variáveis sexo biológico (G) e idade dos animais (H) também foram avaliadas. Teste T \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao Mock do mesmo grupo; ANOVA one-way #  $p \leq 0,05$  comparando Mock dos grupos de 9 e 12 semanas.



**Figura 7. O tratamento com BCG é capaz de controlar o desenvolvimento de tumores subcutâneos de melanoma (B16-F10).** (A) Esquema do modelo de tratamento com BCG em tumor singênico murino do tipo melanoma. Células da linhagem tumoral B16-F10 ( $5 \times 10^5$  células) foram implantadas pela via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Um dia após a injeção das células tumorais, os camundongos receberam o primeiro tratamento intratumoral contendo BCG ( $8 \times 10^6$  CFU) ou PBS (Mock), seguidos de mais dois tratamentos com a mesma dose de BCG realizados nos dias 8 e 12. O volume tumoral foi avaliado nos dias 8, 12, 14 e 18 utilizando um paquímetro digital. Os camundongos foram eutanasiados e os tumores removidos para diferentes análises após 18 dias. (B) Imagem representativa do efeito dos tratamentos com PBS (Mock) e BCG em tumores de animais C57BL/6 no dia 18. (C) Curva de crescimento tumoral e (D) volume tumoral final após 18 dias. As figuras (C) e (D) representam as médias e os desvios padrões dos volumes tumorais de um conjunto de animais C57BL/6 utilizados como controles em diferentes experimentos que virão a seguir comparando animais WT e KO. Teste T \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao Mock.

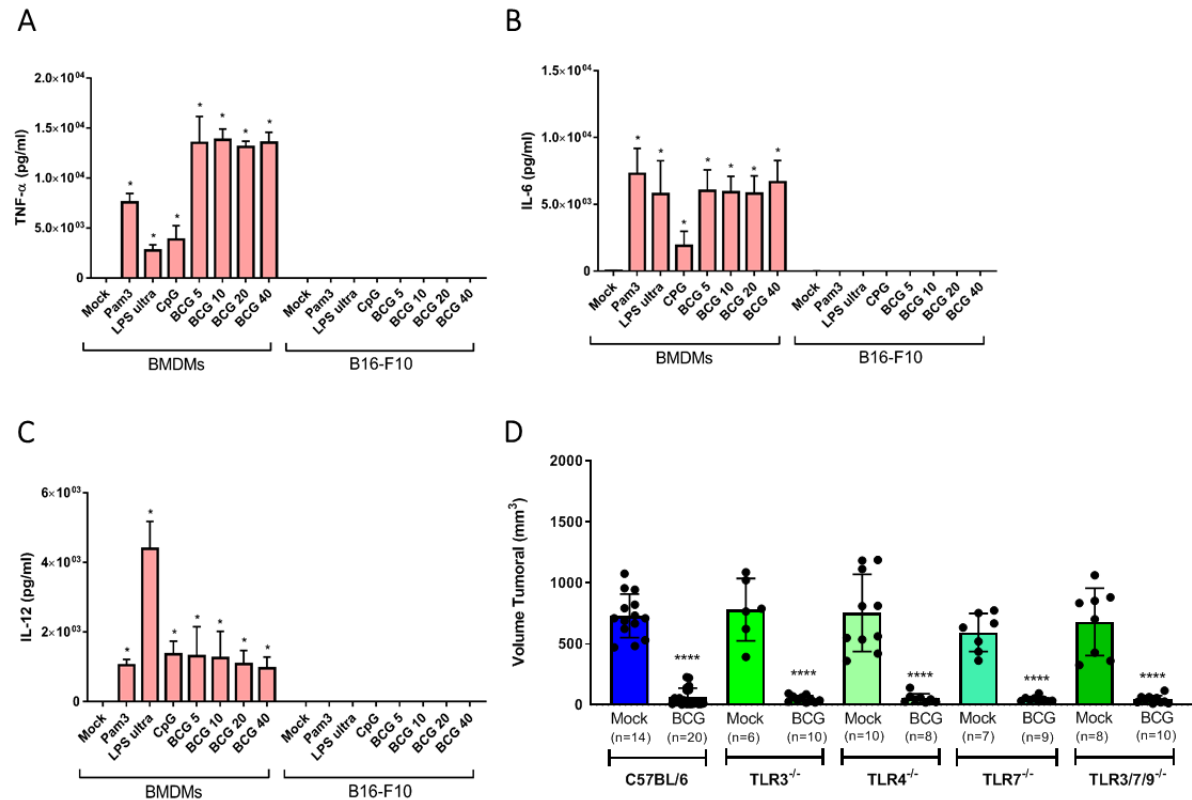
desenvolvimento dos tumores B16-F10 fica bastante evidente quando utilizamos um número maior de animais C57BL/6, que foram utilizados como controles em diferentes experimentos do trabalho, e estão aqui agrupados e apresentados na curva de crescimento tumoral (Figura 7C) e na comparação da média de tumores após 18 dias de tratamento (Figura 7D). O tratamento com BCG em tumores iniciais de animais C57BL/6 confirma o grande potencial já descrito desta bactéria no controle do desenvolvimento do melanoma murino.



## **5.2. As vias de sinalização de diferentes TLRs não estão ativas em B16-F10 e não alteram a resposta da imunoterapia com BCG em melanoma**

A ativação de diferentes vias da imunidade inata tanto nas células tumorais quanto nas outras células presentes no TME é essencial para fornecer uma resposta imune eficiente contra o tumor. No entanto, sabemos que muitas linhagens de células tumorais são deficientes para algumas dessas vias e isto pode alterar a resposta à imunoterapia. Os receptores TLRs são responsáveis pelo reconhecimento de diferentes agonistas, incluindo aqueles apresentados pelo BCG, que podem induzir a ativação dessas vias e a produção de citocinas e quimiocinas. Para avaliar a ativação das vias de sinalização da imunidade inata em células B16-F10, comparamos a resposta das células tumorais com BMDMs, que são bem conhecidos por sua capacidade de responder fortemente após estimulação com diferentes agonistas e infecção por BCG. Em células B16-F10, a infecção com diferentes M.O.I. de BCG e o uso dos agonistas específicos de TLR2 (Pam3CSK4), TLR4 (LPS ultrapuro) e TLR9 (CpG 1826) não foram capazes de induzir a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  (Figura 8A), IL-6 (Figura 8B) e IL-12 (Figura 8C). Por outro lado, os mesmos estímulos induziram forte resposta em BMDMs controles (Figura 8A-C), indicando que possivelmente essas vias não estão funcionais nas células B16-F10.

No intuito de investigar se os TLRs presentes também em outras células do organismo poderiam estar envolvidos na redução tumoral induzida pelo tratamento com BCG, foram utilizados camundongos TLR3<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup> e TLR3/7/9<sup>-/-</sup> comparados com C57BL/6 seguindo o modelo de melanoma B16-F10 subcutâneo tratado com BCG (Figura 7A). Todos os camundongos deficientes para TLRs responderam ao tratamento com BCG e apresentaram um controle tumoral comparável ao WT (Figura 8D), indicando que o tratamento não depende exclusivamente das vias relacionadas aos TLRs avaliados. TLR2 é outro receptor de grande importância para a resposta relacionada ao BCG, mas não foi possível ainda realizar as análises por falta de animais, que foram adquiridos novamente para fecharmos todos os TLRs importantes nesse trabalho.



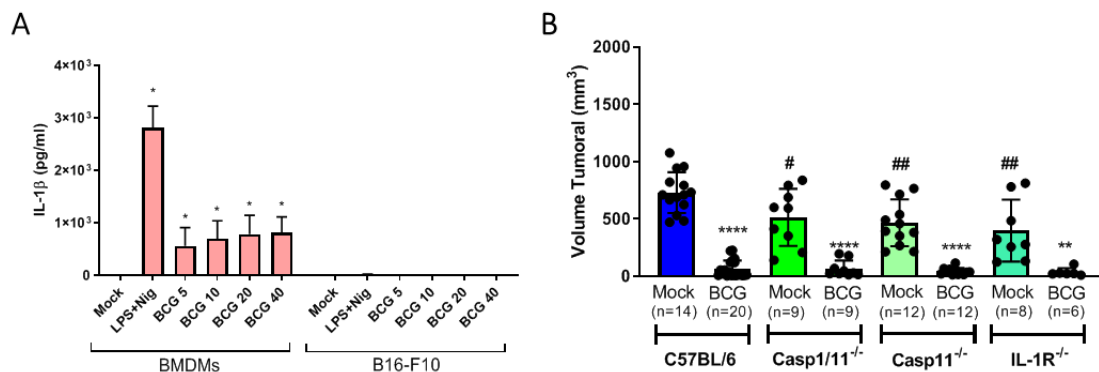
**Figura 8.** As vias de sinalização de diferentes TLRs não estão ativas em B16-F10 e não alteram a resposta da imunoterapia com BCG em melanoma. A-C) Células da linhagem tumoral B16-F10 e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) foram estimulados com Pam3CSK4 (1 µg/ml), LPS ultrapuro (100 ng/ml), CpG 1826 (1 µg/ml) ou BCG (MOI 5, 10, 20 ou 40). Após 24h de estímulo, a produção de TNF-α (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) foi avaliada por ELISA. Os valores representam a média de três experimentos independentes. ANOVA one-way \*  $p \leq 0,05$  em relação ao Mock do mesmo tipo celular. D) Animais C57BL/6 WT, TLR3<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR3/7/9<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo estabelecido de imunoterapia com BCG em tumores B16-F10 apresentado na Figura 6 A. Os valores são referentes à média e desvio padrão do volume tumoral aferido no dia 18 em dois ou mais experimentos independentes apresentados em conjunto. Teste T \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao Mock da mesma linhagem animal.

### 5.3. O efeito antitumoral induzido por BCG não está relacionado às vias do inflamassoma ou a sinalização de IL-1β

BCG perdeu a capacidade de evasão do fagolisossomo para o citoplasma, mesmo assim pode ativar fracamente o inflamassoma e conseqüentemente induzir a secreção de IL-1β, que pode ocorrer também de forma independente ao inflamassoma como mostrado na Figura 2. A secreção de IL-1β, um dos ligantes do receptor IL-1R, depende de um primeiro estímulo que induz a expressão do mRNA da pró-IL-1β, a exemplo da ativação de TLRs, e de um segundo sinal que culmine na clivagem de IL-1β em sua forma ativa, o que está diretamente relacionado a ativação dos inflamassomas e ao processamento de caspases (Li *et al.*, 2021). A ativação do

inflamassoma no TME pode estar relacionado também à liberação de DAMPs por células tumorais infectadas ou mortas.

Neste trabalho, verificamos que BCG não foi capaz de induzir a secreção de IL-1 $\beta$  em culturas de células B16-F10, enquanto que em BMDMs foi possível detectar a liberação dessa citocina em níveis moderados (Figura 9A). Como controle positivo da ativação do inflamassoma e subsequente secreção de IL-1 $\beta$  utilizamos LPS como primeiro estímulo e Nigericina como segundo sinal, que foram capazes de ativar altos níveis de IL-1 $\beta$  apenas em BMDMs (Figura 9A). O papel das vias do inflamassoma e da sinalização de IL-1 $\beta$  foi avaliado também *in vivo* comparando camundongos C57BL/6 com caspase-1/11 $^{-/-}$ , caspase-11 $^{-/-}$  e IL-1R $^{-/-}$ . Todos os animais deficientes também responderam ao tratamento (Figura 9B), sugerindo que não há contribuição significativa dessas vias para a imunoterapia com BCG. A comparação do desenvolvimento de tumores B16-F10 não tratados (Mock) dos animais WT e KO confirma um dado da literatura que demonstrou a importância da sinalização de IL-1 $\beta$  na progressão tumoral (VORONOV *et al.*, 2003) e acrescenta a informação de que caspase-1/11 e caspase-11 também estão envolvidas no desenvolvimento tumoral independente de BCG (Figura 9B).



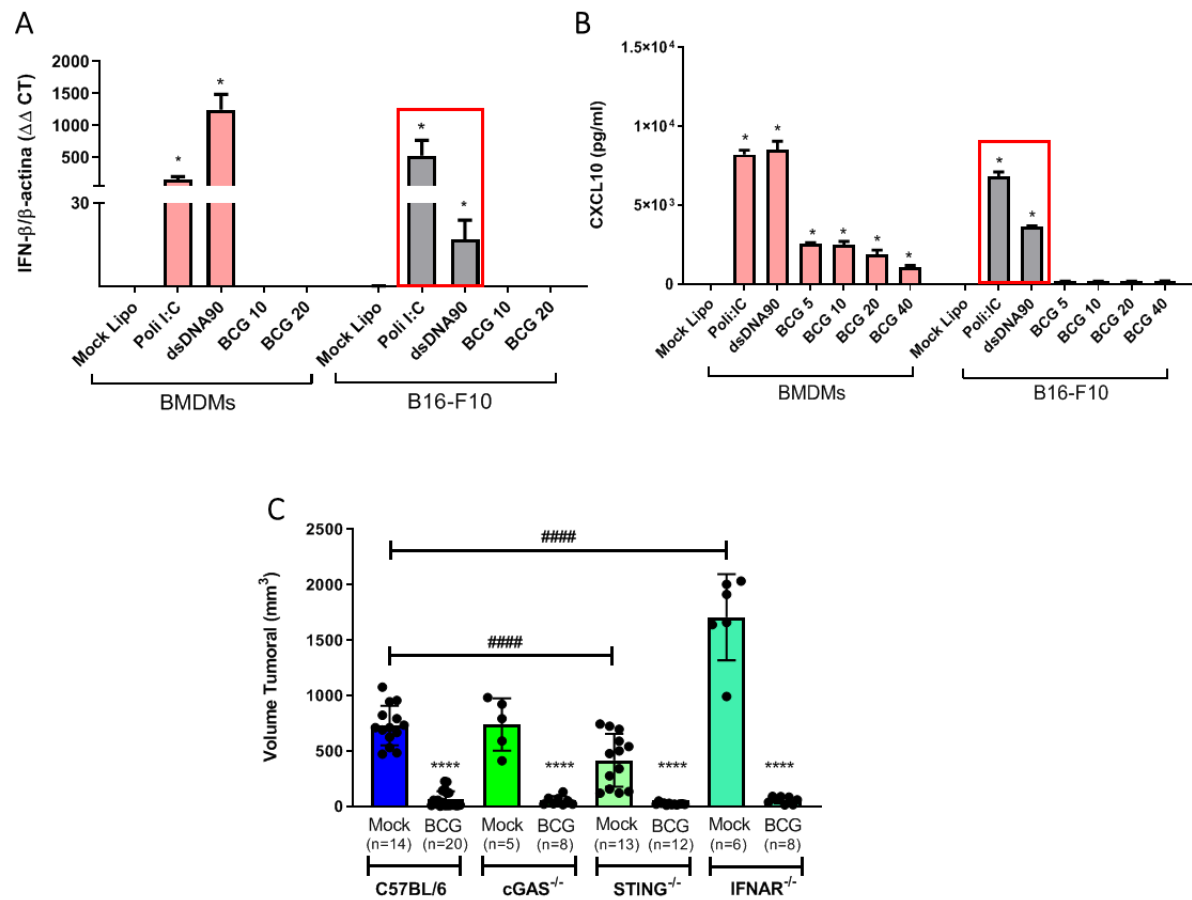
**Figura 9. O efeito antitumoral induzido por BCG não está relacionado às vias do inflamassoma ou a sinalização de IL-1 $\beta$ .** A) Células da linhagem tumoral B16-F10 e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) foram estimulados com LPS por 4 horas e Nigericina (Nig) nos 45 minutos finais da incubação ou infectadas com BCG (MOI 5, 10, 20 ou 40) por 24h. A secreção de IL-1 $\beta$  no sobrenadante foi avaliada por ELISA. Os valores representam a média de três experimentos independentes. ANOVA one-way \*  $p \leq 0,05$  em relação ao Mock do mesmo tipo celular. B) Animais C57BL/6 WT, Caspase 1 $^{-/-}$ , Caspase 11 $^{-/-}$  e IL-1R $^{-/-}$  foram submetidos ao modelo estabelecido de imunoterapia com BCG em tumores B16-F10 apresentado na Figura 6 A. Os valores são referentes à média e desvio padrão do volume tumoral aferido no dia 18 em três experimentos independentes de Caspase 1 $^{-/-}$  e Caspase 11 $^{-/-}$  e apenas um experimento de IL-1R $^{-/-}$ . Teste T \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao Mock da mesma linhagem animal ou #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$  comparado ao mock de C57BL/6 WT.

#### **5.4. Avaliação da via cGAS-STING e da sinalização de IFN tipo I na resposta antitumoral induzida por BCG**

Outro mecanismo importante da imunidade inata na resposta antiviral e também com grande relevância na imunoterapia do câncer é a via de cGAS-STING, que atua no reconhecimento de ácidos nucleicos citoplasmáticos provenientes de microrganismos invasores ou liberados após danos e morte celular. Uma das consequências da ativação dessa via é a produção da quimiocina CXCL10 e da citocina IFN- $\beta$ , sabidamente importante para o recrutamento de linfócitos e a eliminação de tumores.

A infecção com BCG em células B16-F10 e BMDMs não foi capaz de estimular a expressão de mRNA de IFN- $\beta$  (Figura 10A) ou a produção de CXCL10 (Figura 10B) e apenas uma quantidade baixa de CXCL10 foi secretada por BMDMs (Figura 10B). Apesar disso, quando utilizamos agonistas específicos que levam ao estímulo das vias de IFN tipo I através de TLR3 (Poli I:C) ou cGAS-STING (dsDNA90), observamos que essas vias se encontram funcionais nos controles BMDMs e surpreendentemente também estimulando altos níveis em células B16-F10 (Figuras 10A-B). Apesar de BCG não ser um bom estimulador de IFN tipo I, os nossos dados reforçam a ideia de uma possível associação de BCG com outros agonistas da imunidade inata na imunoterapia, como por exemplo o Poli I:C (AYARI *et al.*, 2016) ou moléculas ativadoras da via cGAS-STING (SINGH *et al.*, 2022).

O modelo de tratamento tumoral com BCG foi avaliado também em camundongos cGAS<sup>-/-</sup>, STING<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup> e observamos que todos os animais apresentaram um menor volume tumoral após o tratamento, comparável ao WT, indicando que não há envolvimento dessas vias no controle tumoral induzido por BCG. Outra observação é que os tumores não tratados (Mock) desenvolveram menos em STING<sup>-/-</sup> do que em WT e apresentaram volumes bem maiores em IFNAR<sup>-/-</sup>, demonstrando que, apesar de STING e IFN tipo I alterarem o desenvolvimento tumoral normal, não tem impacto no tratamento com BCG (Figura 10C).

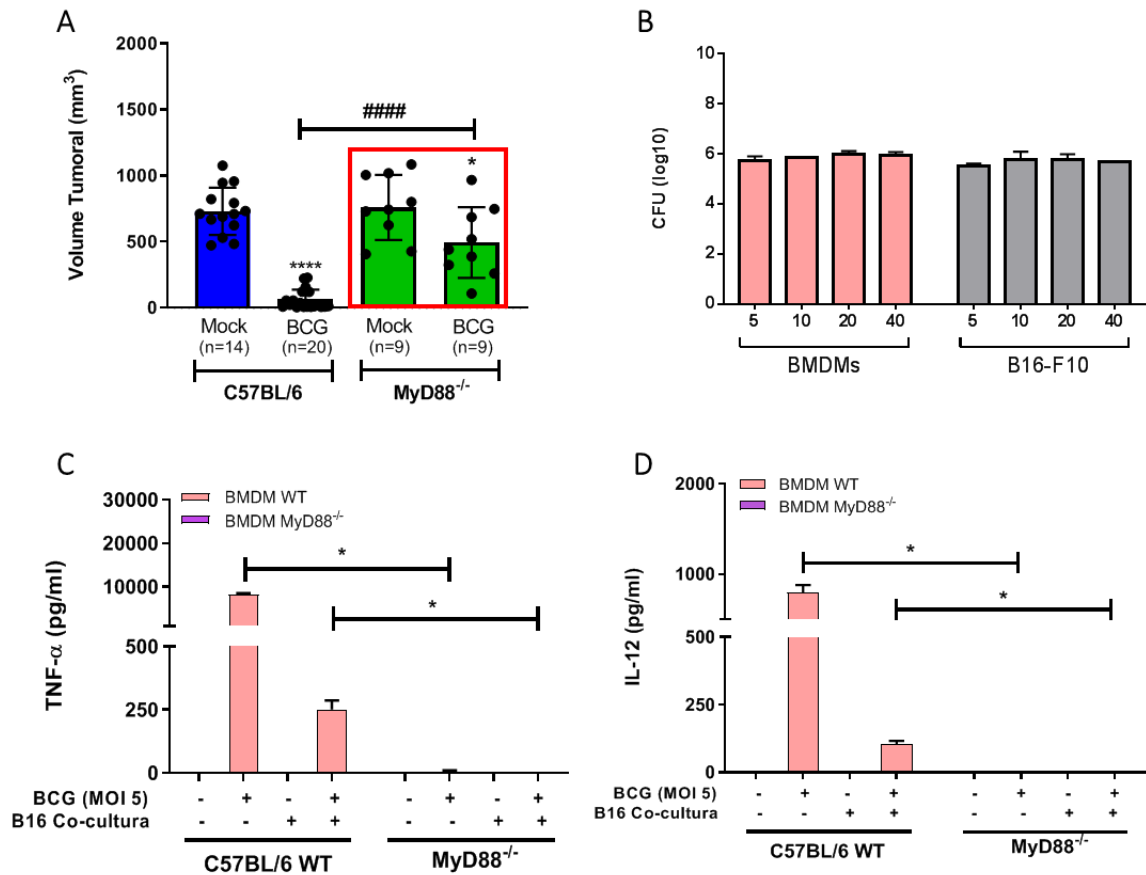


**Figura 10. A via de cGAS-STING e a sinalização de IFN tipo I não estão relacionados ao efeito antitumoral induzido por BCG.** A-B) Células da linhagem tumoral B16-F10 e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) foram infectados com BCG (MOI 5, 10, 20 e 40) ou transfectados com Poli I:C (3 µg/ml) ou dsDNA90 (3 µg/ml) com a adição de Lipofectamina 2000 (3 µg/ml). A expressão de IFN-β foi avaliada por qPCR após 3h de transfecção (A) e a produção de CXCL10 foi analisada por ELISA após 24h (B). Os resultados de qPCR utilizaram o mRNA de β-actina como normalizador e B16-F10 (Mock) ou BMDMD (Mock) foram os controles para o cálculo do ΔΔCT. Os dados de qPCR e ELISA apresentados correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes e reprodutíveis. Teste T \* p ≤ 0,05 em relação ao Mock do mesmo tipo celular. C) Animais C57BL/6 WT, cGAS<sup>-/-</sup>, STING<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo estabelecido de imunoterapia com BCG em tumores B16-F10 apresentado na Figura 6 A. Os valores são referentes à média e desvio padrão do volume tumoral aferido no dia 18 em dois experimentos independentes de cGAS<sup>-/-</sup>, três experimentos de STING<sup>-/-</sup> e apenas um experimento de IFNAR<sup>-/-</sup>. Teste T \*\*\*\* p ≤ 0,0001 comparado ao Mock da mesma linhagem animal ou ##### p ≤ 0,0001 comparado ao mock de C57BL/6 WT.

### **5.5. A molécula adaptadora MyD88 é essencial para a ação de BCG na ativação de BMDMs e no controle tumoral de melanoma**

As vias de sinalização da imunidade inata analisadas até aqui não mostraram papel relevante na ação de BCG para o tratamento de melanoma murino. A maioria dos TLRs depende da molécula adaptadora MyD88, exceto TLR3 que recruta TRIF e TLR4 que depende de MyD88 e TRIF. MyD88 ativa MAPKs (proteínas-quinases ativadas por mitógenos) e NF- $\kappa$ B induzindo a síntese de TNF- $\alpha$  entre outras citocinas, enquanto TRIF ativa IRF-3 levando à produção de IFN tipo I. Além das vias de TLRs, MyD88 também está envolvido na sinalização via IL-1R. Em trabalho recente publicado por nosso grupo, foi demonstrado que a ação da imunoterapia com BCG em câncer de bexiga murino é dependente de MyD88, que deve agir de maneira sinérgica envolvendo mais de uma via de sinalização dependente desta molécula (DE QUEIROZ et al., 2021).

No caso dos tumores de melanoma B16-F10, quando utilizamos animais deficientes para MyD88, observamos que na ausência dessa molécula o BCG não é tão eficiente, apresentando uma maior média de volume tumoral após o tratamento em animais MyD88<sup>-/-</sup> quando comparados aos C57BL/6 (Figura 11A). Confirmada a importância de MyD88 no controle do melanoma, foram realizados experimentos *in vitro* para avaliar o papel dessa molécula na ativação de BMDMs após infecção por BCG. Antes disso, foi importante confirmar que, apesar de BCG não ativar diretamente a produção de citocinas inflamatórias em B16-F10, essa bactéria é capaz de infectar as células tumorais de forma semelhante à infecção em BMDMs avaliada através da carga bacteriana intracelular determinada por contagem de CFU (Figura 11B). Sendo assim, o papel de MyD88 na ativação de macrófagos foi avaliado através da co-cultura de BMDMs derivados de animais WT e MyD88<sup>-/-</sup> na presença de células B16-F10, que foram infectadas ou não com BCG (MOI 5) previamente por 24h. A análise após 24h de co-cultura demonstrou que a produção de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  (Figura 11C) e IL-12 (Figura 11D) induzida pela infecção com BCG em BMDMs WT sozinhas ou em co-cultura com células tumorais infectadas foi totalmente abolida em BMDMs de MyD88<sup>-/-</sup>, comprovando o papel determinante dessa molécula na ação da BCG.



**Figura 11. MyD88 é determinante para a ação de BCG no tratamento de melanoma e na ativação de BMDMs.** A) Animais C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> foram submetidos ao modelo estabelecido de imunoterapia com BCG em tumores B16-F10 apresentado na Figura 7 A. Os valores são referentes à média e desvio padrão do volume tumoral aferido no dia 18 em mais de três experimentos independentes. Teste T \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao Mock da mesma linhagem animal ou #####  $p \leq 0,0001$  comparado ao BCG de C57BL/6 WT. B) BMDMs e células B16-F10 foram infectadas in vitro com BCG (MOI 5, 10, 20 e 40) durante 24h. Após este período, as culturas celulares sofreram duas lavagens sucessivas com PBS para remover as bactérias livres no meio e posteriormente foram lisadas, diluídas e plaqueadas em meio sólido para quantificação da carga bacteriana intracelular por contagem de CFU após 21-30 dias de incubação. C-D) Células B16-F10 foram previamente infectadas com BCG (MOI 5) por 24 h. Após este período, as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS para remover todas as bactérias livres no sobrenadante e os BMDMs derivados de animais WT ou MyD88<sup>-/-</sup> foram adicionados em co-cultura. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h e as amostras coletadas para análise da produção de TNF- $\alpha$  (C) e IL-12 (D) por ELISA. B16-F10 e BMDMs sozinhos também foram infectados com BCG (MOI 5) e usados como controles. Teste T \*  $p \leq 0,05$  comparando os resultados do mesmo estímulo entre grupos de linhagens animais diferentes.

## 5.6. O controle de tumores B16-F10 induzida pela imunoterapia com BCG é dependente também da resposta de linfócitos

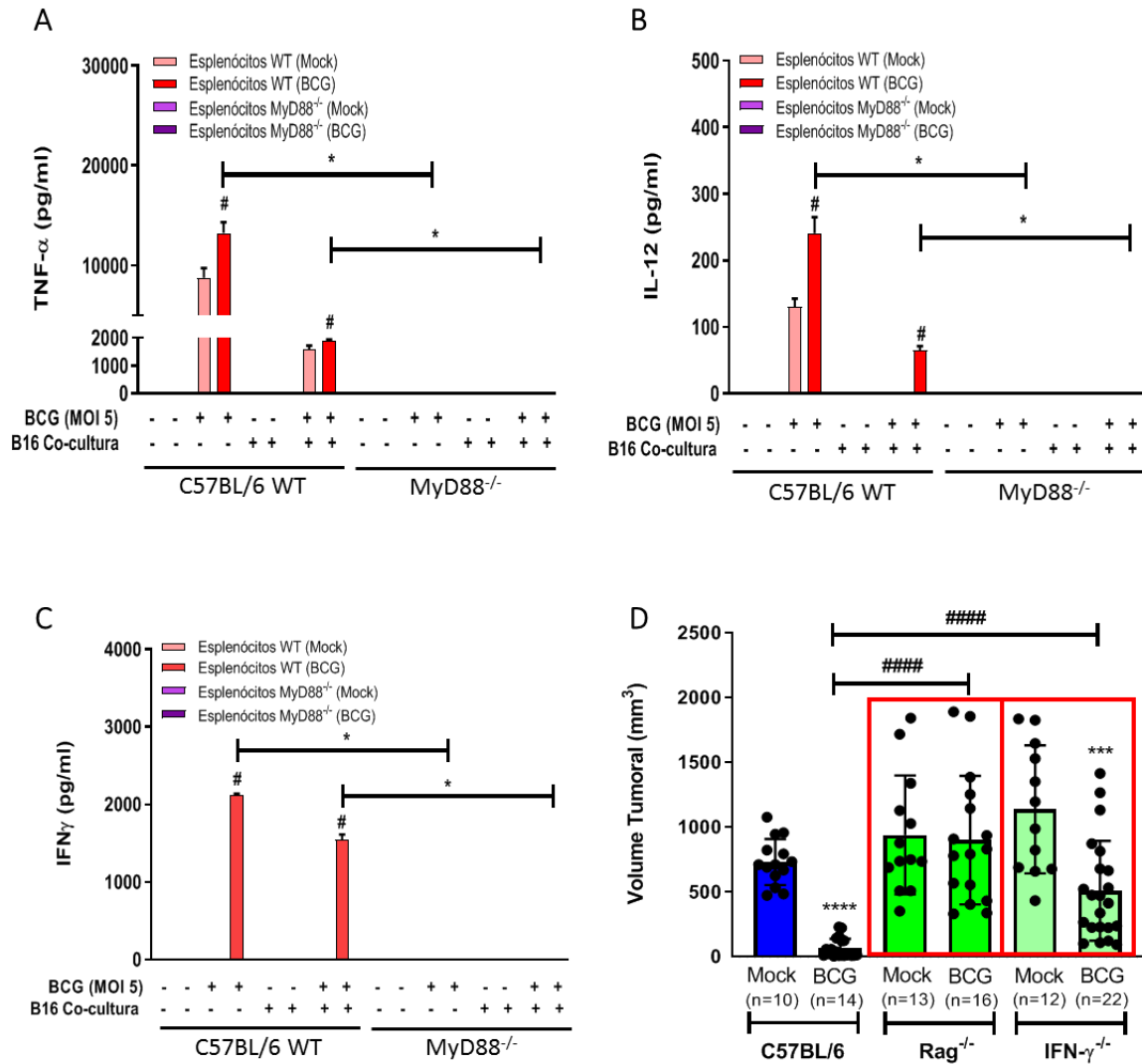
Os esplenócitos constituem uma população mista composta por células mielóides (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas) e linfóides (linfócitos T e B, células NK) obtidas a partir do baço (HENSEL *et al.*, 2019). Dentre os componentes deste conjunto de células, as principais fontes de IFN- $\gamma$  são células NK e NKT, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020). Neste trabalho, os esplenócitos foram isolados de baços dos animais WT e MyD88<sup>-/-</sup> utilizados nos experimentos *in vivo* para avaliação de volume tumoral. Os esplenócitos de animais tratados com PBS (Mock) ou BCG foram isolados após eutanásia dos animais ao final do experimento (dia 18) e colocados em co-cultura com células B16-F10 previamente infectadas com BCG (MOI 5) ou controles não infectadas. Após 24h de co-cultura, a produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  (Figura 12A), IL-12 (Figura 12B) e IFN- $\gamma$  (Figura 12C) foram avaliados por ELISA. Apenas as co-culturas com células B16-F10 previamente infectadas com BCG foram capazes de estimular os esplenócitos de animais WT, sendo que os esplenócitos provenientes de animais WT que receberam os tratamentos intratumorais com BCG apresentaram uma tendência de maior resposta na produção das citocinas analisadas (Figura 12A-C). A avaliação da produção de IFN- $\gamma$  indica um estado de maior ativação dos linfócitos que compõe o *pool* de esplenócitos e pode sugerir uma resposta de memória, pois só foi detectada a produção dessa citocina em esplenócitos isolados de animais WT que foram previamente tratados com BCG (Figura 12C).

A sinalização via MyD88 se mostrou essencial para a resposta tanto dos esplenócitos sozinhos estimulados com BCG ou em co-cultura com células tumorais infectadas, pois não foi detectada a produção de nenhuma dessas citocinas em esplenócitos isolados de animais MyD88<sup>-/-</sup> (Figura 12A-C). Dessa forma, confirmamos mais uma vez a importância da sinalização via molécula adaptadora MyD88 na resposta imunológica induzida por BCG em melanoma, envolvendo tanto células da imunidade inata como adaptativa.

Para confirmar a importância da resposta adaptativa, coordenada principalmente por linfócitos, utilizamos animais Rag<sup>-/-</sup> (deficientes para linfócitos maduros) e animais deficientes para a produção da citocina IFN- $\gamma$ , conhecida por seu papel de intermediar as respostas inata e adaptativa. A participação dos linfócitos se mostrou essencial para a resposta induzida por BCG, visto que os tumores de Rag<sup>-/-</sup> não responderam



aos tratamentos (Figura 12D). Por outro lado, o tratamento com BCG em tumores nos animais  $IFN-\gamma^{-/-}$  apresentou uma contribuição parcial no controle tumoral (Figura 12D). Assim, concluímos que a montagem de uma resposta robusta envolvendo linfócitos maduros é um componente essencial do mecanismo antitumoral induzido por BCG contra o melanoma.

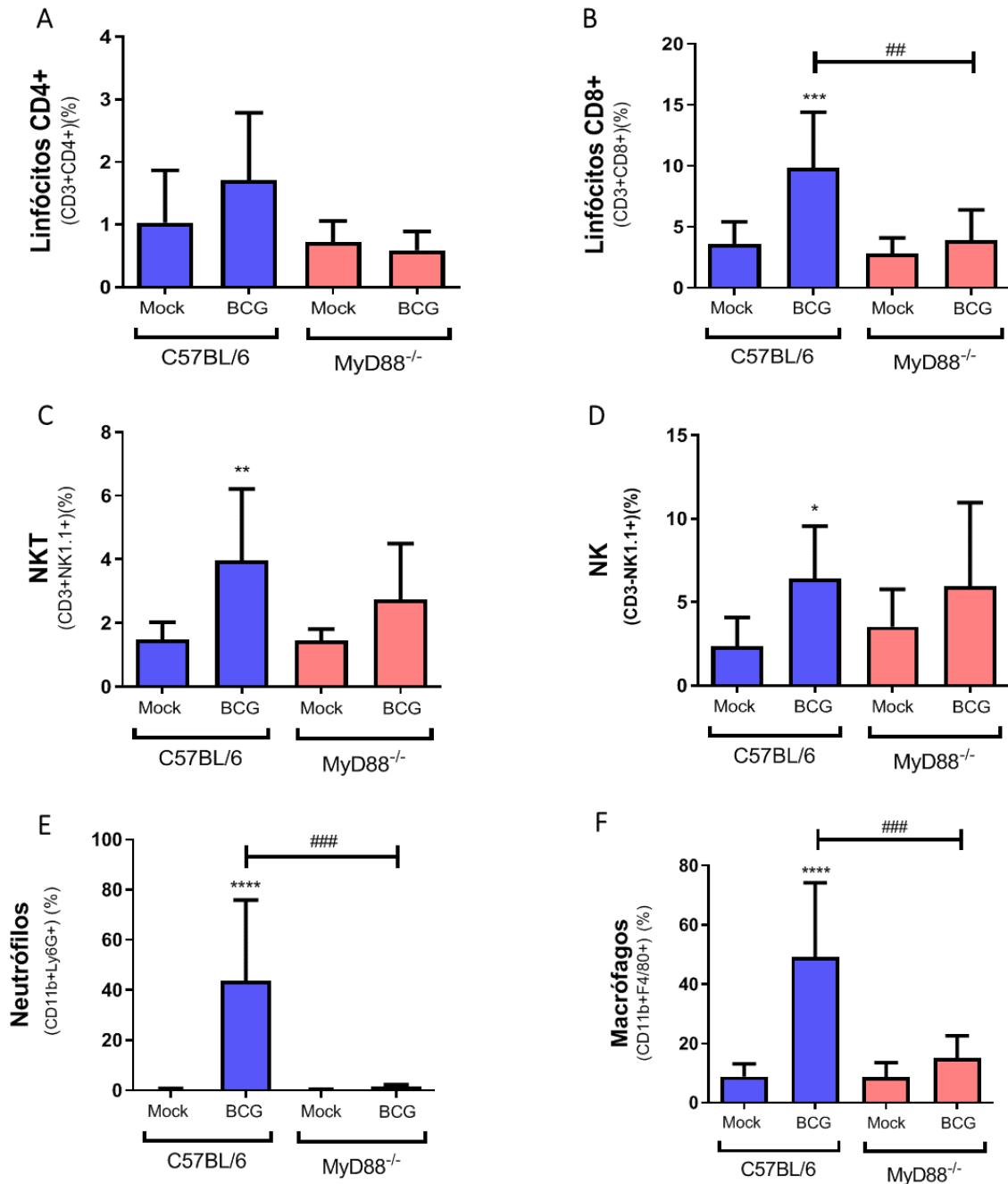


**Figura 12. A ação de linfócitos maduros é essencial para a resposta antitumoral de BCG em melanoma.** A-C) Células B16-F10 foram previamente infectadas com BCG (MOI 5) por 24 h. Após este período, as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS para remover todas as bactérias livres no sobrenadante antes da adição dos esplenócitos isolados de animais C57BL/6 ou MyD88<sup>-/-</sup>, que foram eutanasiados após o final do tratamento com PBS (Mock) ou BCG. As células tumorais e os esplenócitos foram mantidos em co-cultura por 24 h e as amostras coletadas para análise da produção de TNF- $\alpha$  (A), IL-12 (B) e IFN- $\gamma$  (C) por ELISA. B16-F10 e esplenócitos sozinhos também foram infectados com BCG (MOI 5) e usados como controles. Os valores de ELISA apresentados correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes e reprodutíveis. Teste T \*  $p \leq 0,05$  comparando os resultados entre esplenócitos isolados de C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup>; #  $p \leq 0,05$  comparando os resultados entre esplenócitos isolados de animais que receberam tratamento com PBS (Mock) ou BCG dentro da mesma linhagem. D) Animais C57BL/6 WT, Rag<sup>-/-</sup> e IFN- $\gamma^{-/-}$  foram submetidos ao modelo estabelecido de imunoterapia com BCG em tumores B16-F10 apresentado na Figura 6 A. Os valores são referentes à média e desvio padrão do volume tumoral aferido no dia 18 em três experimentos independentes. Teste T \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao Mock da mesma linhagem animal; #####  $p \leq 0,0001$  comparado ao BCG de C57BL/6 WT.

### **5.7. A ação de BCG dependente de MyD88 altera o perfil de células imunológicas infiltradas no TME de melanoma**

O resultado da imunoterapia de tumores depende do perfil de células imunológicas presentes no TME, que pode promover uma resposta pró- ou antitumoral. A resposta imunológica antitumoral eficiente depende inicialmente da ativação da imunidade inata, envolvendo principalmente as células apresentadoras de antígenos, que posteriormente estimulam o recrutamento dos linfócitos para o reconhecimento e controle tumoral. Para avaliar a importância de MyD88 nesta modulação do perfil de infiltrado celular no TME, os tumores B16-F10 de camundongos C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> foram retirados após eutanásia no final do tratamento (dia 18) com PBS (Mock) ou BCG. Os tumores foram dissecados, macerados com bisturi e as células foram dissociadas usando colagenase IV. O infiltrado celular dos tumores foi analisado por citometria de fluxo usando marcadores específicos para diferentes populações celulares. O tratamento intratumoral com BCG em camundongos C57BL/6 alterou o perfil das populações de células imunológicas no TME com aumento significativo na porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NKT e NK, neutrófilos e macrófagos (Figura 13). O perfil das células analisadas no TME de MyD88<sup>-/-</sup> não apresentou diferença significativa após tratamento com BCG (Figura 13), indicando a importância dessa molécula para o recrutamento de células imunológicas com potencial favorável ao controle tumoral de melanoma.

Em conjunto, os resultados deste trabalho são consistentes e apontam para a molécula MyD88 como sendo essencial para o tratamento com BCG, que atua na modulação do perfil de células infiltradas no TME com potencial efeito antitumoral. Algumas questões ainda precisam ser melhor investigadas, como a análise das moléculas de ativação celulares e do perfil de macrófagos, células dendríticas e linfócitos presentes no TME, além de avaliar o papel de IFN- $\gamma$  e também investigar em qual ou quais vias e componentes celulares o MyD88 estaria atuando para favorecer a resposta antitumoral induzida por BCG. O melhor entendimento dos mecanismos de ação de BCG em melanoma pode favorecer o desenvolvimento de novos adjuvantes associados e a aplicação desta imunoterapia em melanoma e em outros tipos de câncer.



**Figura 13. O tratamento com BCG dependente de MyD88 altera o perfil de células imunológicas infiltradas no TME de melanoma.** Tumores B16-F10 foram retirados de animais C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup> eutanasiados após 18 dias de tratamento com PBS (Mock) ou BCG. Os tumores foram dissecados, macerados com bisturi e as células foram dissociadas com colagenase IV (200 U/ml). O infiltrado celular foi analisado por citometria de fluxo usando marcadores específicos para: Linfócitos T CD4 (CD3+ CD4+) (A); Linfócitos T CD8 (CD3+ CD8+) (B); Células NKT (CD3+ NK1.1+) (C); Células NK (CD3-NK1.1+) (D); neutrófilos (CD11b+ Ly6G+) (E); e macrófagos (CD11b+ F4/80+) (F). Os gráficos representam a porcentagem de células em relação à população total de células contidas no TME. Os resultados são referentes à média e desvio padrão de três experimentos independentes e reprodutíveis. Anova one-way \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado aos tumores Mock da mesma linhagem animal; ou ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$  comparando os tumores BCG de C57BL/6 e MyD88<sup>-/-</sup>.

## 6. DISCUSSÃO

Os benefícios do tratamento de melanoma com injeções intratumorais de BCG são conhecidos desde 1974 quando o ensaio clínico de fase I de Morton e colaboradores foi publicado (MORTON *et al.*, 1974). O modelo de tumor subcutâneo murino B16-F10 é amplamente utilizado na literatura para o estudo do melanoma e teve seu desenvolvimento em 1975, a partir de uma malignidade que se desenvolveu espontaneamente na orelha de um camundongo C57BL/6 e foi posteriormente isolada e cultivada (FIDLER, 1975). Apesar do tempo que se tem conhecimento do modelo tumoral e dos benefícios de BCG, poucos trabalhos estabeleceram modelos murinos de tratamento com BCG em melanoma. O presente trabalho traz a sua contribuição ao estabelecer um modelo robusto para estudo da imunoterapia de B16-F10 com BCG, após avaliar a dose ótima para a obtenção de um fenótipo claro de controle tumoral, comparar diferentes intervalos de tratamento e avaliar a influência do sexo e idade no desenvolvimento do tumor.

Na literatura estão descritos alguns modelos de tratamento intratumoral com BCG em tumor B16-F10 com regimes de tratamentos nos dias 5 e 12 (FANG *et al.*, 2014), 7 e 11 (KREMENOVIC *et al.*, 2022) e 1, 8 e 15 (DUDA *et al.*, 1995). Com a ressalva de que o primeiro partiu da injeção tumoral de  $2 \times 10^6$  células B16-MUC1 e não foi informada a cepa e a dose em CFU de BCG (FANG *et al.*, 2014), o segundo utilizou  $2 \times 10^5$  células B16-F10 e tratamento com lisado de BCG Tice e o terceiro,  $10^6$  células B16-F0 e  $10^6$  CFU de BCG Pasteur (DUDA *et al.*, 1995). As diferenças entre os modelos quanto a linhagem tumoral utilizada, a cepa de BCG e a necessidade de utilizar o BCG vivo motivou o estabelecimento de nosso modelo. O melanoma murino B16-F10 se torna palpável entre os dias 8 e 10 (OVERWIJK; RESTIFO, 2001) e se desenvolve mais agressivamente após o dia 12, sendo necessário eutanasiar os animais entre os dias 15 e 18, como mostramos também em nosso trabalho. Por isso, os modelos iniciam o regime de tratamento em dias anteriores ao aparecimento do tumor palpável, utilizando BCG como imunoterapia de um tumor em estágio inicial de desenvolvimento. A redução parcial do volume tumoral que obtivemos com o regime de tratamento nos dias 6, 8 e 10 foi semelhante àquela obtida com o regime de 7 e 11 aplicado no trabalho de Kremenovic e colaboradores (KREMENOVIC *et al.*, 2022), o que torna esses modelos de controle parcial do tumor importantes ferramentas para outros trabalhos de comparação dose-resposta, diferentes tratamentos e cepas de

BCG. Os modelos em que o tratamento iniciou em tempos mais tardios não apresentaram controle do tumor. Neste trabalho, optou-se por um modelo em que o BCG induzisse um controle eficiente do tumor (Figura 7A), possibilitando a caracterização, sem margem de dúvidas, dos fenótipos de resposta em camundongos KO comparados aos obtidos no grupo C57BL/6.

A influência do sexo no desenvolvimento tumoral não é um consenso (SIMON; ERSHLER, 1985), existindo evidências de que o desenvolvimento do tumor possa ser mais agressivo em machos (DAKUP *et al.*, 2020) ou em fêmeas (THOMPSON *et al.*, 2017). Neste trabalho, não encontramos diferença estatística quando comparamos os volumes tumorais entre os sexos e o controle do tumor obtido com injeções intratumorais de BCG também foi semelhante. Além disso, foram comparados animais com diferença de idade em semanas, uma menor escala de tempo quando comparado com dados de Eshler e colaboradores, que avaliaram animais de 3 e 24 meses (ERSHLER *et al.*, 1984). Mesmo assim, observamos que essa diferença de idade ao iniciarmos a inoculação dos tumores pode alterar o seu desenvolvimento. Portanto, optou-se pelo uso de animais de ambos os sexos e com idades preferencialmente entre 7 e 9 semanas.

Estabelecido o modelo de tratamento com BCG em melanoma murino, partimos para avaliar a participação de diferentes moléculas envolvidas em vias de sinalização da imunidade inata, como: receptores do tipo *Toll* (TLRs 3, 4, 7 e 9), inflamassomas (caspase 1 e 11), cGAS e STING e os receptores de IL-1 e IFN do tipo I. Algumas dessas vias são exploradas na imunoterapia do câncer, a exemplo de TLR7 na terapia adjuvante com Imiquimod (COIT *et al.*, 2019), TLR9 e seus agonistas emergentes Tilsotolimod (HAYMAKER *et al.*, 2021) e Vidutolimod (RIBAS *et al.*, 2021), o uso clínico de IFN do tipo I (TARHINI *et al.*, 2012) e a participação de cGAS-STING no controle de tumores (SINGH *et al.*, 2022). A super ativação do inflamassoma também parece favorecer a imunoterapia com BCG em tumor MB49 (ZHOU *et al.*, 2022). Além disso, STING tem sua expressão aumentada no tumor de bexiga induzido por carcinógeno e tratado com BCG (LOMBARDO *et al.*, 2022). A avaliação específica de cada uma dessas vias utilizando camundongos KO nos permitiu demonstrar que não há envolvimento de nenhuma dessas vias com o efeito antitumoral de BCG em melanoma murino. Os resultados de melanoma corroboram com dados anteriores do nosso grupo obtidos em modelo heterotópico de câncer de bexiga MB49, em que nenhuma das vias citadas foi relevante para a resposta antitumoral induzida por BCG,

com exceção do envolvimento de TLRs endossomais, em que os animais TLR3/7/9<sup>-/-</sup> apresentaram controle parcial do crescimento tumoral (DE QUEIROZ *et al.*, 2021). A contribuição dos TLRs endossomais para a resposta induzida por BCG parece ser uma particularidade do tumor de bexiga MB49 e não foi observada em melanoma murino B16-F10.

O perfil imunológico intrínseco às células tumorais também pode impactar na resposta da imunoterapia. Há evidências de que BCG é capaz de estimular certas linhagens tumorais, como as células de câncer de bexiga T24, a secretarem TNF- $\alpha$  e IL-6 (DE REIJE *et al.*, 1993). Enquanto MB49, uma outra linhagem de câncer de bexiga, não foi capaz de produzir nenhuma das citocinas inflamatórias avaliadas (TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL10 e IFN- $\beta$ ) em resposta a BCG (DE QUEIROZ *et al.*, 2021). No presente trabalho, exploramos o perfil imunológico das células B16-F10 quanto a ativação das vias da imunidade inata e a consequente produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  e CXCL10 além da expressão de IFN- $\beta$  após estímulo das células com BCG ou agonistas específicos. BCG foi incapaz de estimular B16-F10 a produzir as citocinas inflamatórias avaliadas, apresentando um perfil de resposta semelhante ao de MB49 e diferente dos BMDMs utilizados como controle, que responderam aos estímulos como esperado. Estes resultados sugerem que algumas vias de sinalização podem estar deficientes ou silenciadas em B16-F10, uma característica frequente em muitas linhagens tumorais que passaram pela imunoedição (DE QUEIROZ *et al.*, 2021; XIA *et al.*, 2016). Descrevemos aqui que a célula B16-F10 apresenta as vias de TLR2, TLR4, TLR9 e inflamassoma não funcionais e as vias de TLR3 e cGAS-STING passíveis de ativação com o uso dos agonistas Poli I:C e dsDNA, respectivamente. Apesar de estarem funcionais em B16-F10, as vias de TLR3 e cGAS-STING não foram ativadas por BCG nessas células.

A associação de Poli I:C e BCG foi previamente explorada no trabalho de Ayari e colaboradores em modelo murino de câncer de bexiga MBT-2 e obteve resultados animadores, demonstrando que os tratamentos com Poli I:C e BCG administrados em combinação são mais eficientes em controlar o crescimento do tumor do que quando administrados individualmente (AYARI *et al.*, 2016). Em melanoma, o trabalho de Aznar e colaboradores demonstrou que a administração de Poli I:C é capaz de controlar o desenvolvimento do tumor B16-F10 de maneira dependente de interferons do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) e do tipo II (IFN- $\gamma$ ) e foi relacionada a um aumento do infiltrado de células T citotóxicas tumor-específicas (AZNAR *et al.*, 2019). Os resultados aqui

apresentados reforçam a possibilidade de utilizar Poli I:C e outros agonistas da imunidade inata associados ao BCG, potencializando ainda mais essa imunoterapia.

A maioria dos receptores TLRs, com exceção de TLR3, e o IL-1R explorados nesse trabalho dependem de MyD88 para a cascata de sinalização intracelular (SAIKH, 2021). Outros receptores não abordados que contém domínio citoplasmático TIR, como, IL-18R, IL-33R/ST2 (SAIKH, 2021), IL-36R (ZHAO *et al.*, 2019) e que não possuem domínio TIR, como RAGE (SAKAGUCHI *et al.*, 2011), TACI (HE *et al.*, 2010) e IFN $\gamma$ R1 (SUN; DING, 2006) também sinalizam a partir do recrutamento da molécula adaptadora MyD88. Entre as moléculas da imunidade inata avaliadas neste estudo, MyD88 se mostrou a mais relevante atuando no efeito antitumoral de BCG em modelo de melanoma B16-F10 e também no modelo heterotópico de câncer de bexiga MB49, como demonstrado anteriormente por de Queiroz e colaboradores (DE QUEIROZ *et al.*, 2021). O controle do melanoma murino B16 induzido por *M. indicus pranii* também se mostrou dependente de MyD88 e TLR2 (KUMAR *et al.*, 2019). O efeito antitumoral em B16 induzido por componentes da parede celular de BCG (AKAZAWA *et al.*, 2004) ou pelo vírus da estomatite vesicular (WONGTHIDA *et al.*, 2011) são outros exemplos da dependência de MyD88 para a modulação de uma resposta imune antitumoral por microrganismos e seus componentes estruturais. Apesar de identificarmos o importante papel de MyD88 na imunoterapia com BCG aplicada em melanoma murino B16-F10, quando avaliamos individualmente os possíveis receptores que dependem da molécula adaptadora MyD88 utilizando animais TLR4<sup>-/-</sup>, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup> ou IL-1R<sup>-/-</sup>, nenhum deles apresentou ter influência no controle tumoral induzido por BCG. O papel de MyD88 observado como essencial na redução tumoral induzida por BCG pode estar atuando através da associação de vários receptores dependentes dessa molécula ou através de outros receptores ou células não investigados até o momento neste estudo.

O controle do tumor ortotópico de bexiga promovido por BCG pode ser correlacionado com a liberação de HMGB1 (ZHANG *et al.*, 2013), sugerindo um possível envolvimento de TLR4 e/ou RAGE. Entretanto, não foi observado papel relevante de TLR4 para a resposta de BCG em melanoma murino e RAGE não foi analisado até o presente momento. Uma outra possibilidade sugerida é a participação de TLR2, destacado como o PRR de maior impacto na sinalização por BCG para o estabelecimento de uma resposta robusta de linfócitos com perfil Th1 (HELDWEIN *et al.*, 2003). TLR2 é a via proposta no mecanismo de ação da imunoterapia utilizando

outra espécie de micobactéria, *M. indicus pranii*, em modelo de melanoma murino (KUMAR *et al.*, 2019). Todavia, em tumor subcutâneo MB49 tratado com BCG essa via não se mostrou importante quando analisada individualmente utilizando animais TLR2<sup>-/-</sup> (DE QUEIROZ *et al.*, 2021). O papel de TLR2 na imunoterapia com BCG em tumor B16-F10 será ainda investigado pelo nosso grupo.

Ao compararmos BMDMs derivados de animais WT e MyD88<sup>-/-</sup> estimulados com BCG ou em co-cultura com células tumorais B16-F10 infectadas, observamos que a produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 foi baixa na ausência de MyD88, sugerindo o impacto dessa molécula na resposta de macrófagos ao BCG. Nesse tipo celular, o recrutamento de MyD88 via domínio TIR de TLRs (FENG *et al.*, 2019) ou via interação física de IFN $\gamma$ R1 com MLK3 (SUN; DING, 2006) está intimamente relacionado à polarização de um perfil inflamatório (M1-like), com a secreção de altos níveis de IL-12 (RIEMENSBERGER *et al.*, 2002), de TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico (LUO *et al.*, 2010) e, conseqüentemente, à promoção de uma resposta imune antitumoral (DE QUEIROZ *et al.*, 2021; FENG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016). Além dos resultados obtidos *in vitro* nos experimentos de co-cultura, a análise do infiltrado celular comparando tumores WT e MyD88<sup>-/-</sup> indica que MyD88 também é importante no recrutamento de macrófagos para o TME do melanoma murino tratado com BCG e o aumento dessa população celular em animais WT foi associado com o efeito antitumoral. O papel de macrófagos é conhecido no estabelecimento de um TME “quente”, com perfil antitumoral, associado a presença de altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 (TAN *et al.*, 2020). O papel de MyD88 na ativação e polarização de macrófagos ainda precisa ser melhor estudado, mas podemos sugerir que o impacto de MyD88 na resposta ao tratamento com BCG em melanoma B16-F10 possa ser um reflexo da ativação dessa via em macrófagos tumorais, como demonstrado no modelo da Figura 14.

A sinalização via MyD88 também se mostrou essencial em esplenócitos isolados de animais WT e MyD88<sup>-/-</sup>, que foram previamente inoculados com tumor B16-F10 e tratados com PBS (Mock) ou BCG, e *in vitro* foram estimulados com BCG ou colocados em co-cultura com células tumorais B16-F10 infectadas. A ausência de MyD88 afetou a produção de citocinas por esplenócitos, como TNF- $\alpha$  e IL-12, que são produzidas por monócitos e, de maneira surpreendente, IFN- $\gamma$  também não foi detectado em esplenócitos isolados de MyD88<sup>-/-</sup>. A principal fonte de IFN- $\gamma$  na população mista de células isoladas do baço são células NK e NKT, linfócitos T CD4<sup>+</sup>



e CD8<sup>+</sup> (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020) e a perda da capacidade de secretar IFN- $\gamma$  em resposta a BCG na ausência de MyD88 sugere uma possível influência da sinalização intrínseca de MyD88 em componentes da imunidade adaptativa. Em células T CD8<sup>+</sup>, a sinalização intrínseca de MyD88 é importante para a potencialização da resposta citotóxica, levando a altos níveis de expressão de IFN- $\gamma$ , perforina e de granzima B de forma dependente do fator de transcrição T-bet ativado por MyD88 via mTOR (GENG *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2019). MyD88 desempenha função co-estimulatória para a diferenciação de células T *naïve* em células efetoras citotóxicas quando recrutada via TLR2 (GENG *et al.*, 2010), TLR7 (LI *et al.*, 2019) ou IFN $\gamma$ R1 (CURTSINGER *et al.*, 2012) e no TME a sinalização de MyD88 via IL-18R (TIMPERI *et al.*, 2017) ou IL-36R (ZHAO *et al.*, 2019) está intimamente relacionada com células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes (TILs) funcionais (T-bet<sup>+</sup>EOMES<sup>+</sup>) que desempenham intensa atividade antitumoral (TIMPERI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2019). Nós verificamos que o aumento do infiltrado de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NKT e NK ocorre de maneira dependente de MyD88 em melanoma, destacando a dependência dessa molécula no recrutamento de linfócitos. Além disso, nós confirmamos a importância da participação de linfócitos maduros utilizando animais Rag<sup>-/-</sup>, que não apresentaram resposta ao tratamento com BCG nos tumores B16-F10.

O impacto da sinalização via MyD88 na produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 por macrófagos, aqui representados por BMDMs, e de IFN- $\gamma$  por linfócitos que compõe a população de esplenócitos, indica que a molécula adaptadora MyD88 atua estabelecendo uma ponte que regula tanto a imunidade inata quanto adaptativa. Outros resultados obtidos em modelo ortotópico de câncer de bexiga MB49 sugerem o envolvimento das citocinas citadas, IL-12 e IFN- $\gamma$ , no aumento da sobrevivência dos animais tratados com BCG (RIEMENSBERGER *et al.*, 2002). Para avaliarmos melhor o papel de IFN- $\gamma$  em tumores B16-F10 tratados com BCG, utilizamos camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, que apresentaram um maior volume tumoral após o tratamento em comparação com animais WT, indicando que esta citocina pode estar envolvida no mecanismo de controle tumoral. IFN- $\gamma$  pode atuar na própria célula tumoral, uma vez que B16-F10 expressa IFN $\gamma$ R (NG *et al.*, 2022) e é capaz de secretar altos níveis de CXCL10 e níveis moderados de CCL5 quando estimulada com IFN- $\gamma$  em ensaios *in vitro* (KIM *et al.*, 2018). Resultados preliminares (não mostrados) envolvendo a estimulação prévia com IFN- $\gamma$  em células B16-F10 infectadas com BCG, indicam um aumento da expressão de MHC de classe I na presença desta citocina. Esses

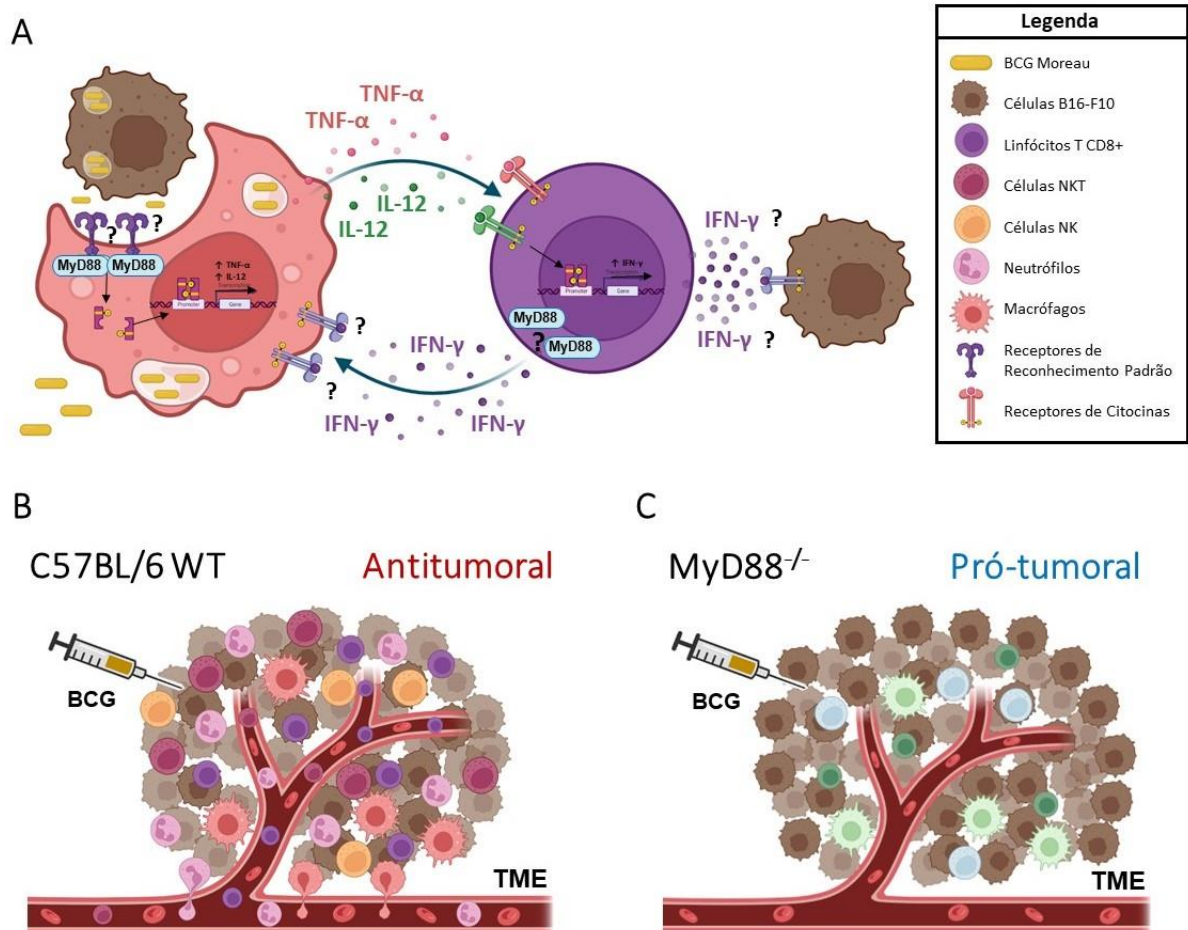
exemplos fortalecem a hipótese de que a secreção de IFN- $\gamma$  em resposta ao BCG pode tornar a célula tumoral mais imunogênica, além do seu efeito conhecido em células imunológicas. Em macrófagos, IFN- $\gamma$  potencializa a secreção de outras citocinas inflamatórias e aumenta a atividade tumoricida da célula (WU *et al.*, 2014) e em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$  aumenta sua motilidade e citotoxicidade (BHAT *et al.*, 2017).

A principal contribuição deste trabalho foi investigar individualmente o papel de diferentes vias da imunidade inata em células B16-F10 e o papel dessas vias em associação com a resposta adaptativa para a redução de tumores de melanoma tratados com BCG. Identificamos o papel da molécula MyD88 como sendo essencial na ativação tanto de macrófagos como de linfócitos, impactando diretamente no recrutamento de células que modulam o perfil antitumoral e permitem o controle do crescimento do melanoma em resposta ao tratamento com BCG, como demonstrado no modelo proposto na Figura 14. Como perspectivas futuras pretendemos aprofundar as análises de subpopulações celulares recrutadas no TME e o perfil de ativação de macrófagos, células dendríticas e outras populações de linfócitos, como Treg (Foxp3<sup>+</sup>), linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores (Th1 – T-bet<sup>+</sup>; Th2 – GATA3<sup>+</sup>; Th17 – ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) e a produção de IFN- $\gamma$  nas diferentes populações de linfócitos. Além disso, vamos investigar outros receptores possivelmente envolvidos com a molécula MyD88 em resposta ao BCG no melanoma e buscar identificar as populações celulares em que essa molécula está atuando, contribuindo ainda mais para o esclarecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunoterapia com BCG.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho são consistentes e ajudam a esclarecer melhor os mecanismos imunológicos induzidos por BCG em melanoma murino. Nós identificamos a molécula adaptadora MyD88 como sendo o principal componente na resposta inata de BCG em B16-F10, além de propormos uma possível ponte realizada entre as vias da imunidade inata e adaptativa envolvendo MyD88, macrófagos, linfócitos e a secreção de IFN- $\gamma$  para o completo efeito da imunoterapia com BCG na redução dos tumores de melanoma. Assim, contribuímos para identificar vias que auxiliam na elucidação da resposta imunológica induzida na imunoterapia com BCG, que podem favorecer o aprimoramento desta terapia através da associação

de BCG com outros agonistas e a sua futura aplicação em outros tipos de câncer, além do melanoma.



**Figura 14. O impacto da sinalização de MyD88 na estimulação de BCG em macrófagos e linfócitos e na modulação do infiltrado associado ao TME de tumores B16-F10 tratados com BCG.** (A) Os dados *in vitro* sugerem que células tumorais infectadas com BCG e as próprias micobactérias presentes no meio são capazes de estimular a ativação de macrófagos a partir de um ou mais PRRs ainda não identificados (?) que são capazes de recrutar MyD88. Em consequência da sinalização de MyD88 intrínseca aos macrófagos, ocorre a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-12. MyD88 também se mostrou importante para o estabelecimento do perfil efetor de linfócitos, impactando na secreção de IFN- $\gamma$ . As setas indicam a alça de potencialização da resposta imune, em que a IL-12 liberada por macrófagos pode atuar em linfócitos estimulando sua ativação e a secreção de IFN- $\gamma$  e, subsequentemente, IFN- $\gamma$  pode atuar em macrófagos de forma a induzir um estado de maior ativação, com aumento na secreção de citocinas. IFN- $\gamma$  também poderia atuar diretamente nas células tumorais, tornando-as mais imunogênicas. (B) Os tratamentos intratumorais com BCG em B16-F10 induzem o recrutamento de células inflamatórias (linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NKT e NK, neutrófilos e macrófagos) e a polarização para o perfil “quente” (antitumoral) no TME de animais WT, que está associado ao controle tumoral. (C) Os animais MyD88 tratados com BCG não apresentaram aumento no infiltrado das células inflamatórias analisadas, indicando um perfil “frio” deste TME e o consequente efeito pró-tumoral observado no crescimento dos tumores, que não respondem ao tratamento com BCG. As imagens foram criadas utilizando as BioRender.com *templates*.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, B.; THIEBLEMONT, N.; QUESNIAUX, V. J.; BROWN, N. *et al.* Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Immunol**, 169, n. 6, p. 3155-3162, Sep 15 2002.
- AKAZAWA, T.; MASUDA, H.; SAEKI, Y.; MATSUMOTO, M. *et al.* Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. **Cancer Res**, 64, n. 2, p. 757-764, Jan 15 2004.
- AMORES-INIESTA, J.; BARBERA-CREMADES, M.; MARTINEZ, C. M.; PONS, J. A. *et al.* Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection. **Cell Rep**, 21, n. 12, p. 3414-3426, Dec 19 2017.
- AMOUEZGAR, A.; CHELVANAMBI, M.; FILDERMAN, J. N.; STORKUS, W. J. *et al.* STING Agonists as Cancer Therapeutics. **Cancers (Basel)**, 13, n. 11, May 30 2021.
- ANDRADE, P. M.; CHADE, D. C.; BORRA, R. C.; NASCIMENTO, I. P. *et al.* The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urol Oncol**, 28, n. 5, p. 520-525, Sep-Oct 2010.
- ANNELS, N. E.; SIMPSON, G. R.; PANDHA, H. Modifying the Non-muscle Invasive Bladder Cancer Immune Microenvironment for Optimal Therapeutic Response. **Front Oncol**, 10, p. 175, 2020.
- ARNOLD, M.; DE VRIES, E.; WHITEMAN, D. C.; JEMAL, A. *et al.* Global burden of cutaneous melanoma attributable to ultraviolet radiation in 2012. **Int J Cancer**, 143, n. 6, p. 1305-1314, Sep 15 2018.
- AYARI, C.; BESANCON, M.; BERGERON, A.; LARUE, H. *et al.* Poly(I:C) potentiates Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. **Cancer Immunol Immunother**, 65, n. 2, p. 223-234, Feb 2016.
- AZNAR, M. A.; PLANELLES, L.; PEREZ-OLIVARES, M.; MOLINA, C. *et al.* Immunotherapeutic effects of intratumoral nanoplexed poly I:C. **J Immunother Cancer**, 7, n. 1, p. 116, May 2 2019.
- BAI, W.; LIU, H.; JI, Q.; ZHOU, Y. *et al.* TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K/AKT signaling pathway. **Cell Signal**, 26, n. 5, p. 942-950, May 2014.
- BALD, T.; QUAIST, T.; LANDSBERG, J.; ROGAVA, M. *et al.* Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. **Nature**, 507, n. 7490, p. 109-113, Mar 6 2014.
- BENCI, J. L.; JOHNSON, L. R.; CHOA, R.; XU, Y. *et al.* Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. **Cell**, 178, n. 4, p. 933-948 e914, Aug 8 2019.
- BHAT, P.; LEGGATT, G.; WATERHOUSE, N.; FRAZER, I. H. Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. **Cell Death Dis**, 8, n. 6, p. e2836, Jun 1 2017.
- BINNEWIES, M.; ROBERTS, E. W.; KERSTEN, K.; CHAN, V. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. **Nat Med**, 24, n. 5, p. 541-550, May 2018.

BOWDISH, D. M.; SAKAMOTO, K.; KIM, M. J.; KROOS, M. *et al.* MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, 5, n. 6, p. e1000474, Jun 2009.

BROOKS, M. N.; RAJARAM, M. V.; AZAD, A. K.; AMER, A. O. *et al.* NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages. **Cell Microbiol**, 13, n. 3, p. 402-418, Mar 2011.

BULUT, Y.; MICHELSEN, K. S.; HAYRAPETIAN, L.; NAIKI, Y. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. **J Biol Chem**, 280, n. 22, p. 20961-20967, Jun 3 2005.

CHELVANAMBI, M.; FECEK, R. J.; TAYLOR, J. L.; STORKUS, W. J. STING agonist-based treatment promotes vascular normalization and tertiary lymphoid structure formation in the therapeutic melanoma microenvironment. **J Immunother Cancer**, 9, n. 2, Feb 2021.

CHEN, J.; QIAO, Y.; CHEN, G.; CHANG, C. *et al.* Salmonella flagella confer anti-tumor immunological effect via activating Flagellin/TLR5 signalling within tumor microenvironment. **Acta Pharm Sin B**, 11, n. 10, p. 3165-3177, Oct 2021.

CHO, J. H.; LEE, H. J.; KO, H. J.; YOON, B. I. *et al.* The TLR7 agonist imiquimod induces anti-cancer effects via autophagic cell death and enhances anti-tumoral and systemic immunity during radiotherapy for melanoma. **Oncotarget**, 8, n. 15, p. 24932-24948, Apr 11 2017.

COIT, D. G.; THOMPSON, J. A.; ALBERTINI, M. R.; BARKER, C. *et al.* Cutaneous Melanoma, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, 17, n. 4, p. 367-402, Apr 1 2019.

COLEY, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). **Proc R Soc Med**, 3, n. Surg Sect, p. 1-48, 1910.

COLEY, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. **Clin Orthop Relat Res**, n. 262, p. 3-11, Jan 1991.

CURTSINGER, J. M.; AGARWAL, P.; LINS, D. C.; MESCHER, M. F. Autocrine IFN-gamma promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. **J Immunol**, 189, n. 2, p. 659-668, Jul 15 2012.

DA GAMA DUARTE, J.; PARAKH, S.; ANDREWS, M. C.; WOODS, K. *et al.* Autoantibodies May Predict Immune-Related Toxicity: Results from a Phase I Study of Intralesional *Bacillus Calmette-Guerin* followed by Ipilimumab in Patients with Advanced Metastatic Melanoma. **Front Immunol**, 9, p. 411, 2018.

DAKUP, P. P.; PORTER, K. I.; LITTLE, A. A.; ZHANG, H. *et al.* Sex differences in the association between tumor growth and T cell response in a melanoma mouse model. **Cancer Immunol Immunother**, 69, n. 10, p. 2157-2162, Oct 2020.

DAMRAUER, J. S.; ROELL, K. R.; SMITH, M. A.; SUN, X. *et al.* Identification of a Novel Inflamed Tumor Microenvironment Signature as a Predictive Biomarker of *Bacillus Calmette-Guerin* Immunotherapy in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. **Clin Cancer Res**, 27, n. 16, p. 4599-4609, Aug 15 2021.

DE GUILLEBON, E.; DARDENNE, A.; SALDMANN, A.; SEGUIER, S. *et al.* Beyond the concept of cold and hot tumors for the development of novel predictive biomarkers and the rational design of immunotherapy combination. **Int J Cancer**, 147, n. 6, p. 1509-1518, Sep 15 2020.

DE QUEIROZ, N.; MARINHO, F. V.; DE ARAUJO, A.; FAHEL, J. S. *et al.* MyD88-dependent BCG immunotherapy reduces tumor and regulates tumor microenvironment in bladder cancer murine model. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 15648, Aug 2 2021.

DE REIJKE, T. M.; VOS, P. C.; DE BOER, E. C.; BEVERS, R. F. *et al.* Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guerin (BCG). **Urol Res**, 21, n. 5, p. 349-352, 1993.

DEY, B.; DEY, R. J.; CHEUNG, L. S.; POKKALI, S. *et al.* A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. **Nat Med**, 21, n. 4, p. 401-406, Apr 2015.

DORHOI, A.; NOUAILLES, G.; JORG, S.; HAGENS, K. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. **Eur J Immunol**, 42, n. 2, p. 374-384, Feb 2012.

DOZ, E.; ROSE, S.; NIGOU, J.; GILLERON, M. *et al.* Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. **J Biol Chem**, 282, n. 36, p. 26014-26025, Sep 7 2007.

DUDA, R. B.; YANG, H.; DOOLEY, D. D.; ABU-JAWDEH, G. Recombinant BCG therapy suppresses melanoma tumor growth. **Ann Surg Oncol**, 2, n. 6, p. 542-549, Nov 1995.

EDDY, K.; CHEN, S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. **Int J Mol Sci**, 21, n. 23, Nov 26 2020.

ERSHLER, W. B.; STEWART, J. A.; HACKER, M. P.; MOORE, A. L. *et al.* B16 murine melanoma and aging: slower growth and longer survival in old mice. **J Natl Cancer Inst**, 72, n. 1, p. 161-164, Jan 1984.

FANG, F.; MA, J.; NI, W.; WANG, F. *et al.* MUC1 and maltose-binding protein recombinant fusion protein combined with Bacillus Calmette-Guerin induces MUC1-specific and nonspecific anti-tumor immunity in mice. **Mol Med Rep**, 10, n. 2, p. 1056-1064, Aug 2014.

FARIAS, A.; SOTO, A.; PUTTUR, F.; GOLDIN, C. J. *et al.* A TLR4 agonist improves immune checkpoint blockade treatment by increasing the ratio of effector to regulatory cells within the tumor microenvironment. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 15406, Jul 28 2021.

FENG, Y.; MU, R.; WANG, Z.; XING, P. *et al.* A toll-like receptor agonist mimicking microbial signal to generate tumor-suppressive macrophages. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 2272, May 22 2019.

FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Res**, 35, n. 1, p. 218-224, Jan 1975.

FORD, D.; BLISS, J. M.; SWERDLOW, A. J.; ARMSTRONG, B. K. *et al.* Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). **Int J Cancer**, 62, n. 4, p. 377-381, Aug 9 1995.

FRADE-PROUD'HON-CLERC, S.; SMOL, T.; FRENOIS, F.; SAND, O. *et al.* A Novel Rare Missense Variation of the NOD2 Gene: Evidences of Implication in Crohn's Disease. **Int J Mol Sci**, 20, n. 4, Feb 15 2019.

FREMOND, C. M.; NICOLLE, D. M.; TORRES, D. S.; QUESNIAUX, V. F. Control of Mycobacterium bovis BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. **Microbes Infect**, 5, n. 12, p. 1070-1081, Oct 2003.

FUGE, O.; VASDEV, N.; ALLCHORNE, P.; GREEN, J. S. Immunotherapy for bladder cancer. **Res Rep Urol**, 7, p. 65-79, 2015.

FUKUDA, K.; OKAMURA, K.; RIDING, R. L.; FAN, X. *et al.* AIM2 regulates anti-tumor immunity and is a viable therapeutic target for melanoma. **J Exp Med**, 218, n. 9, Sep 6 2021.

GAN, C.; MOSTAFID, H.; KHAN, M. S.; LEWIS, D. J. BCG immunotherapy for bladder cancer--the effects of substrain differences. **Nat Rev Urol**, 10, n. 10, p. 580-588, Oct 2013.

GARBE, C.; AMARAL, T.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A. *et al.* European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment - Update 2022. **Eur J Cancer**, 170, p. 256-284, Jul 2022.

GENG, D.; ZHENG, L.; SRIVASTAVA, R.; ASPRODITES, N. *et al.* When Toll-like receptor and T-cell receptor signals collide: a mechanism for enhanced CD8 T-cell effector function. **Blood**, 116, n. 18, p. 3494-3504, Nov 4 2010.

HAYMAKER, C.; JOHNSON, D. H.; MURTHY, R.; BENTEBIBEL, S. E. *et al.* Tilsotolimod with Ipilimumab Drives Tumor Responses in Anti-PD-1 Refractory Melanoma. **Cancer Discov**, 11, n. 8, p. 1996-2013, Aug 2021.

HAYWARD, N. K.; WILMOTT, J. S.; WADDELL, N.; JOHANSSON, P. A. *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. **Nature**, 545, n. 7653, p. 175-180, May 11 2017.

HE, B.; SANTAMARIA, R.; XU, W.; COLS, M. *et al.* The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. **Nat Immunol**, 11, n. 9, p. 836-845, Sep 2010.

HELDWEIN, K. A.; LIANG, M. D.; ANDRESEN, T. K.; THOMAS, K. E. *et al.* TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. **J Leukoc Biol**, 74, n. 2, p. 277-286, Aug 2003.

HENSEL, J. A.; KHATTAR, V.; ASHTON, R.; PONNAZHAGAN, S. Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. **Lab Invest**, 99, n. 1, p. 93-106, Jan 2019.

HOFFMANN, C.; LEIS, A.; NIEDERWEIS, M.; PLITZKO, J. M. *et al.* Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 10, p. 3963-3967, Mar 11 2008.

HOLMGREN, I. Employment of BCG, especially in Intravenous Injection. **Acta Medica Scandinavica**, 90, n. (S78), p. 350-361, 1936.

HSU, L. C.; ALI, S. R.; MCGILLIVRAY, S.; TSENG, P. H. *et al.* A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 22, p. 7803-7808, Jun 3 2008.

HUMEAU, J.; LE NAOUR, J.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. *et al.* Trial watch: intratumoral immunotherapy. **Oncoimmunology**, 10, n. 1, p. 1984677, 2021.

INCA. Estimativa 2023 - Incidência de Câncer no Brasil. **Biblioteca Virtual em Saúde Prevenção e Controle de Câncer** ISBN 978-65-88517-10-9, 2022.

JI, N.; LONG, M.; GARCIA-VILANOVA, A.; AULT, R. *et al.* Selective delipidation of Mycobacterium bovis BCG retains antitumor efficacy against non-muscle invasive bladder cancer. **Cancer Immunol Immunother**, 72, n. 1, p. 125-136, Jan 2023.

JIANG, M.; CHEN, P.; WANG, L.; LI, W. *et al.* cGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. **J Hematol Oncol**, 13, n. 1, p. 81, Jun 22 2020.

JIN, T.; PERRY, A.; JIANG, J.; SMITH, P. *et al.* Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. **Immunity**, 36, n. 4, p. 561-571, Apr 20 2012.

JO, E. K.; YANG, C. S.; CHOI, C. H.; HARDING, C. V. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. **Cell Microbiol**, 9, n. 5, p. 1087-1098, May 2007.

JONES, B. W.; MEANS, T. K.; HELDWEIN, K. A.; KEEN, M. A. *et al.* Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. **J Leukoc Biol**, 69, n. 6, p. 1036-1044, Jun 2001.

JORGOVANOVIC, D.; SONG, M.; WANG, L.; ZHANG, Y. Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review. **Biomark Res**, 8, p. 49, 2020.

KIBBI, N.; KLUGER, H.; CHOI, J. N. Melanoma: Clinical Presentations. **Cancer Treat Res**, 167, p. 107-129, 2016.

KIM, J.; KIM, J. S.; LEE, H. K.; KIM, H. S. *et al.* CXCR3-deficient natural killer cells fail to migrate to B16F10 melanoma cells. **Int Immunopharmacol**, 63, p. 66-73, Oct 2018.

KREMENOVIC, M.; CHAN, A. A.; FENG, B.; BARISWYL, L. *et al.* BCG hydrogel promotes CTSS-mediated antigen processing and presentation, thereby suppressing metastasis and prolonging survival in melanoma. **J Immunother Cancer**, 10, n. 6, Jun 2022.

KREMENOVIC, M.; SCHENK, M.; LEE, D. J. Clinical and molecular insights into BCG immunotherapy for melanoma. **J Intern Med**, 288, n. 6, p. 625-640, Dec 2020.

KUMAR, P.; DAS, G.; BHASKAR, S. Mycobacterium indicus pranii therapy induces tumor regression in MyD88- and TLR2-dependent manner. **BMC Res Notes**, 12, n. 1, p. 648, Oct 7 2019.

LAMM, D. L.; THOR, D. E.; HARRIS, S. C.; REYNA, J. A. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. **J Urol**, 124, n. 1, p. 38-40, Jul 1980.

LI, Q.; YAN, Y.; LIU, J.; HUANG, X. *et al.* Toll-Like Receptor 7 Activation Enhances CD8+ T Cell Effector Functions by Promoting Cellular Glycolysis. **Front Immunol**, 10, p. 2191, 2019.

LI, Y.; HUANG, H.; LIU, B.; ZHANG, Y. *et al.* Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases. **Signal Transduct Target Ther**, 6, n. 1, p. 247, Jul 2 2021.



LIU, D.; YANG, X.; WU, X. Tumor Immune Microenvironment Characterization Identifies Prognosis and Immunotherapy-Related Gene Signatures in Melanoma. **Front Immunol**, 12, p. 663495, 2021.

LOBO, N.; BROOKS, N. A.; ZLOTTA, A. R.; CIRILLO, J. D. *et al.* 100 years of Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy: from cattle to COVID-19. **Nat Rev Urol**, 18, n. 10, p. 611-622, Oct 2021.

LOMBARDO, K. A.; OBRADOVIC, A.; SINGH, A. K.; LIU, J. L. *et al.* BCG invokes superior STING-mediated innate immune response over radiotherapy in a carcinogen murine model of urothelial cancer. **J Pathol**, 256, n. 2, p. 223-234, Feb 2022.

LUCAS, M. L.; HELLER, L.; COPPOLA, D.; HELLER, R. IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. **Mol Ther**, 5, n. 6, p. 668-675, Jun 2002.

LUKE, J. J.; ASCIERTO, P. A.; CARLINO, M. S.; GERSHENWALD, J. E. *et al.* KEYNOTE-716: Phase III study of adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected high-risk stage II melanoma. **Future Oncol**, 16, n. 3, p. 4429-4438, Jan 2020.

LUO, Y.; HAN, R.; EVANOFF, D. P.; CHEN, X. Interleukin-10 inhibits Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. **Clin Exp Immunol**, 160, n. 3, p. 359-368, Jun 2010.

MACHIRAJU, D.; SCHAFFER, S.; HASSEL, J. C. Potential Reasons for Unresponsiveness to Anti-PD1 Immunotherapy in Young Patients with Advanced Melanoma. **Life (Basel)**, 11, n. 12, Nov 30 2021.

MAHAIRAS, G. G.; SABO, P. J.; HICKEY, M. J.; SINGH, D. C. *et al.* Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. **J Bacteriol**, 178, n. 5, p. 1274-1282, Mar 1996.

MARQUES-NETO, L. M.; PIWOWARSKA, Z.; KANNO, A. I.; MORAES, L. *et al.* Thirty years of recombinant BCG: new trends for a centenary vaccine. **Expert Rev Vaccines**, 20, n. 8, p. 1001-1011, Aug 2021.

MARTINEZ, A.; TORELLO, S.; KOLTER, R. Sliding motility in mycobacteria. **J Bacteriol**, 181, n. 23, p. 7331-7338, Dec 1999.

MARZAGALLI, M.; EBELT, N. D.; MANUEL, E. R. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. **Semin Cancer Biol**, 59, p. 236-250, Dec 2019.

MATHE, G.; HALLE-PANNENKO, O.; BOURUT, C. BCG in cancer immunotherapy: results obtained with various BCG preparations in a screening study for systemic adjuvants applicable to cancer immunoprophylaxis or immunotherapy. **Natl Cancer Inst Monogr**, 39, p. 107-113, Dec 1973.

MCCARTHY, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. **Iowa Orthop J**, 26, p. 154-158, 2006.

MOORE, T. C.; KUMM, P. M.; BROWN, D. M.; PETRO, T. M. Interferon response factor 3 is crucial to poly-I:C induced NK cell activity and control of B16 melanoma growth. **Cancer Lett**, 346, n. 1, p. 122-128, Apr 28 2014.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A. W. **Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors.** 1976. 180-183 f. (116) - J Urol Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/820877>.

MORTON, D. L.; EILBER, F. R.; HOLMES, E. C.; HUNT, J. S. *et al.* BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience. **Ann Surg**, 180, n. 4, p. 635-643, Oct 1974.

MUKHERJEE, N.; JULIAN, E.; TORRELLES, J. B.; SVATEK, R. S. Effects of Mycobacterium bovis Calmette et Guerin (BCG) in oncotherapy: Bladder cancer and beyond. **Vaccine**, 39, n. 50, p. 7332-7340, Dec 8 2021.

NAKAMURA, T.; FUKIAGE, M.; SUZUKI, Y.; YANO, I. *et al.* Mechanism responsible for the antitumor effect of BCG-CWS using the LEEL method in a mouse bladder cancer model. **J Control Release**, 196, p. 161-167, Dec 28 2014.

NG, S.; LIM, S.; SIM, A. C. N.; MANGADU, R. *et al.* STUB1 is an intracellular checkpoint for interferon gamma sensing. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 14087, Aug 18 2022.

OETTINGER, T.; JORGENSEN, M.; LADEFOGED, A.; HASLOV, K. *et al.* Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. **Tuber Lung Dis**, 79, n. 4, p. 243-250, 1999.

OLD, L. J.; CLARKE, D. A.; BENACERRAF, B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. **Nature**, 184(Suppl 5), p. 291-292, Jul 25 1959.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Curr Protoc Immunol**, Chapter 20, p. Unit 20 21, May 2001.

PEARL, R. On the pathological relations between cancer and tuberculosis. **Exp Biol Med**, 26, n. (1), p. 73-75, 1928.

PENG, X.; ZHANG, Y.; BAI, G.; ZHOU, X. *et al.* Cyclic di-AMP mediates biofilm formation. **Mol Microbiol**, 99, n. 5, p. 945-959, Mar 2016.

PETERSEN, R. P.; HANISH, S. I.; HANEY, J. C.; MILLER, C. C., 3rd *et al.* Improved survival with pulmonary metastasectomy: an analysis of 1720 patients with pulmonary metastatic melanoma. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 133, n. 1, p. 104-110, Jan 2007.

PISHESHA, N.; HARMAND, T. J.; PLOEGH, H. L. A guide to antigen processing and presentation. **Nat Rev Immunol**, 22, n. 12, p. 751-764, Dec 2022.

POLLOCK, P. M.; HARPER, U. L.; HANSEN, K. S.; YUDT, L. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet**, 33, n. 1, p. 19-20, Jan 2003.

PROCTOR, J. W.; AUCLAIR, B. G.; LEWIS, M. G. The effect of BCG on B16 mouse melanoma: a comparison of routes of administration on tumour growth at different anatomical sites. **Eur J Cancer (1965)**, 12, n. 3, p. 203-210, Mar 1976.

RATLIFF, T. L.; RITCHEY, J. K.; YUAN, J. J.; ANDRIOLE, G. L. *et al.* T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. **J Urol**, 150, n. 3, p. 1018-1023, Sep 1993.

REDELMAN-SIDI, G.; BINYAMIN, A.; ANTONELLI, A. C.; CATALANO, W. *et al.* BCG-Induced Tumor Immunity Requires Tumor-Intrinsic CIITA Independent of MHC-II. **Cancer Immunol Res**, 10, n. 10, p. 1241-1253, Oct 4 2022.

RENTSCH, C. A.; THALMANN, G. N.; LUCCA, I.; KWIATKOWSKI, M. *et al.* A Phase 1/2 Single-arm Clinical Trial of Recombinant Bacillus Calmette-Guerin (BCG) VPM1002BC Immunotherapy in Non-muscle-invasive Bladder Cancer Recurrence After Conventional BCG Therapy: SAKK 06/14. **Eur Urol Oncol**, 5, n. 2, p. 195-202, Apr 2022.

RESCHKE, R.; GAJEWSKI, T. F. CXCL9 and CXCL10 bring the heat to tumors. **Sci Immunol**, 7, n. 73, p. eabq6509, Jul 22 2022.

RIBAS, A.; MEDINA, T.; KIRKWOOD, J. M.; ZAKHARIA, Y. *et al.* Overcoming PD-1 Blockade Resistance with CpG-A Toll-Like Receptor 9 Agonist Vidutolimod in Patients with Metastatic Melanoma. **Cancer Discov**, 11, n. 12, p. 2998-3007, Dec 1 2021.

RIEMENSBERGER, J.; BOHLE, A.; BRANDAU, S. IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. **Clin Exp Immunol**, 127, n. 1, p. 20-26, Jan 2002.

SAIGA, H.; NIEUWENHUIZEN, N.; GENGENBACHER, M.; KOEHLER, A. B. *et al.* The Recombinant BCG DeltaureC::hly Vaccine Targets the AIM2 Inflammasome to Induce Autophagy and Inflammation. **J Infect Dis**, 211, n. 11, p. 1831-1841, Jun 1 2015.

SAIKH, K. U. MyD88 and beyond: a perspective on MyD88-targeted therapeutic approach for modulation of host immunity. **Immunol Res**, 69, n. 2, p. 117-128, Apr 2021.

SAKAGUCHI, M.; MURATA, H.; YAMAMOTO, K.; ONO, T. *et al.* TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. **PLoS One**, 6, n. 8, p. e23132, 2011.

SENSERRICH, J.; GUALLAR-GARRIDO, S.; GOMEZ-MORA, E.; URREA, V. *et al.* Remodeling the bladder tumor immune microenvironment by mycobacterial species with changes in their cell envelope composition. **Front Immunol**, 13, p. 993401, 2022.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nat Rev Cancer**, 16, n. 6, p. 345-358, Jun 2016.

SHARIF, H.; WANG, L.; WANG, W. L.; MAGUPALLI, V. G. *et al.* Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. **Nature**, 570, n. 7761, p. 338-343, Jun 2019.

SHIMADA, S.; YANO, O.; INOUE, H.; KURAMOTO, E. *et al.* Antitumor activity of the DNA fraction from Mycobacterium bovis BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors. **J Natl Cancer Inst**, 74, n. 3, p. 681-688, Mar 1985.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 1, p. 7-33, Jan 2021.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; WAGLE, N. S.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. **CA Cancer J Clin**, 73, n. 1, p. 17-48, Jan 2023.

SIMON, S. R.; ERSHLER, W. B. Hormonal influences on growth of B16 murine melanoma. **J Natl Cancer Inst**, 74, n. 5, p. 1085-1088, May 1985.

SIMONS, M. P.; O'DONNELL, M. A.; GRIFFITH, T. S. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. **Urol Oncol**, 26, n. 4, p. 341-345, Jul-Aug 2008.

SINGH, A. K.; PRAHARAJ, M.; LOMBARDO, K. A.; YOSHIDA, T. *et al.* Re-engineered BCG overexpressing cyclic di-AMP augments trained immunity and exhibits improved efficacy against bladder cancer. **Nat Commun**, 13, n. 1, p. 878, Feb 15 2022.

SOCIETY, A. C. Cancer Facts and Figures. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/2022-cancer-facts-and-figures.pdf>: American Cancer Society 2022.

SUN, D.; DING, A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. **Nat Immunol**, 7, n. 4, p. 375-381, Apr 2006.

TAN, Q. L.; ZHOU, C. Y.; CHENG, L.; LUO, M. *et al.* Immunotherapy of Bacillus Calmette-Guerin by targeting macrophages against bladder cancer in a NOD/scid IL2Rg<sup>-/-</sup> mouse model. **Mol Med Rep**, 22, n. 1, p. 362-370, Jul 2020.

TARHINI, A. A.; GOGAS, H.; KIRKWOOD, J. M. IFN-alpha in the treatment of melanoma. **J Immunol**, 189, n. 8, p. 3789-3793, Oct 15 2012.

TENGESDAL, I. W.; MENON, D. R.; OSBORNE, D. G.; NEFF, C. P. *et al.* Targeting tumor-derived NLRP3 reduces melanoma progression by limiting MDSCs expansion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 118, n. 10, Mar 9 2021.

TESTORI, A. A. E.; BLANKENSTEIN, S. A.; VAN AKKOOI, A. C. J. Primary Melanoma: from History to Actual Debates. **Curr Oncol Rep**, 21, n. 12, p. 112, Dec 19 2019.

THOMPSON, M. G.; PEIFFER, D. S.; LARSON, M.; NAVARRO, F. *et al.* FOXO3, estrogen receptor alpha, and androgen receptor impact tumor growth rate and infiltration of dendritic cell subsets differentially between male and female mice. **Cancer Immunol Immunother**, 66, n. 5, p. 615-625, May 2017.

TIMPERI, E.; FOCACCETTI, C.; GALLERANO, D.; PANETTA, M. *et al.* IL-18 receptor marks functional CD8(+) T cells in non-small cell lung cancer. **Oncoimmunology**, 6, n. 7, p. e1328337, 2017.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, 3, n. 2, p. 133-146, Feb 2003.

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**, 367, n. 9517, p. 1173-1180, Apr 8 2006.

UEHORI, J.; FUKASE, K.; AKAZAWA, T.; UEMATSU, S. *et al.* Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. **J Immunol**, 174, n. 11, p. 7096-7103, Jun 1 2005.

VAN DER WEL, N.; HAVA, D.; HOUBEN, D.; FLUITSMA, D. *et al.* M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. **Cell**, 129, n. 7, p. 1287-1298, Jun 29 2007.

VAN DUIN, D.; MEDZHITOV, R.; SHAW, A. C. Triggering TLR signaling in vaccination. **Trends Immunol**, 27, n. 1, p. 49-55, Jan 2006.

VIGNAL, C.; GUERARDEL, Y.; KREMER, L.; MASSON, M. *et al.* Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- $\alpha$  and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. **J Immunol**, 171, n. 4, p. 2014-2023, Aug 15 2003.

VON MEYENN, F.; SCHAEFER, M.; WEIGHARDT, H.; BAUER, S. *et al.* Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. **Immunobiology**, 211, n. 6-8, p. 557-565, 2006.

VON SCHUCKMANN, L. A.; HUGHES, M. C. B.; GHIASVAND, R.; MALT, M. *et al.* Risk of Melanoma Recurrence After Diagnosis of a High-Risk Primary Tumor. **JAMA Dermatol**, 155, n. 6, p. 688-693, Jun 1 2019.

VORONOV, E.; SHOUVAL, D. S.; KRELIN, Y.; CAGNANO, E. *et al.* IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 5, p. 2645-2650, Mar 4 2003.

WILKINS, D. K.; NATHAN, P. D. Therapeutic opportunities in noncutaneous melanoma. **Ther Adv Med Oncol**, 1, n. 1, p. 29-36, Jul 2009.

WONGTHIDA, P.; DIAZ, R. M.; GALIVO, F.; KOTTKE, T. *et al.* VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling. **Mol Ther**, 19, n. 1, p. 150-158, Jan 2011.

WOO, S. R.; CORRALES, L.; GAJEWSKI, T. F. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. **Trends Immunol**, 36, n. 4, p. 250-256, Apr 2015.

WRIGHT, F. C.; KELLETT, S.; HONG, N. J. L.; SUN, A. Y. *et al.* Locoregional management of in-transit metastasis in melanoma: an Ontario Health (Cancer Care Ontario) clinical practice guideline. **Curr Oncol**, 27, n. 3, p. e318-e325, Jun 2020.

WU, C.; XUE, Y.; WANG, P.; LIN, L. *et al.* IFN- $\gamma$  primes macrophage activation by increasing phosphatase and tensin homolog via downregulation of miR-3473b. **J Immunol**, 193, n. 6, p. 3036-3044, Sep 15 2014.

XIA, T.; KONNO, H.; AHN, J.; BARBER, G. N. Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. **Cell Rep**, 14, n. 2, p. 282-297, Jan 12 2016.

YANG, J.; JONES, M. S.; RAMOS, R. I.; CHAN, A. A. *et al.* Insights into Local Tumor Microenvironment Immune Factors Associated with Regression of Cutaneous Melanoma Metastases by *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin. **Front Oncol**, 7, p. 61, 2017.

YU, D. S.; WU, C. L.; PING, S. Y.; KENG, C. *et al.* Bacille Calmette-Guerin can induce cellular apoptosis of urothelial cancer directly through toll-like receptor 7 activation. **Kaohsiung J Med Sci**, 31, n. 8, p. 391-397, Aug 2015.

ZBAR, B.; RAPP, H. J. Immunotherapy of guinea pig cancer with BCG. **Cancer**, 34, n. 4 Suppl, p. suppl:1532-1540, Oct 1974.

ZBAR, B.; TANAKA, T. Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. **Science**, 172, n. 3980, p. 271-273, Apr 16 1971.

ZHANG, C.; HOU, D.; WEI, H.; ZHAO, M. *et al.* Lack of interferon-gamma receptor results in a microenvironment favorable for intestinal tumorigenesis. **Oncotarget**, 7, n. 27, p. 42099-42109, Jul 5 2016.

ZHANG, G.; CHEN, F.; CAO, Y.; JOHNSON, B. *et al.* HMGB1 release by urothelial carcinoma cells is required for the in vivo antitumor response to Bacillus Calmette-Guerin. **J Urol**, 189, n. 4, p. 1541-1546, Apr 2013.

ZHANG, Y.; LUO, F.; CAI, Y.; LIU, N. *et al.* TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. **J Immunol**, 186, n. 4, p. 1963-1969, Feb 15 2011.

ZHAO, X.; CHEN, X.; SHEN, X.; TANG, P. *et al.* IL-36beta Promotes CD8(+) T Cell Activation and Antitumor Immune Responses by Activating mTORC1. **Front Immunol**, 10, p. 1803, 2019.

ZHOU, H.; ZHANG, L.; LUO, W.; HONG, H. *et al.* AIM2 inflammasome activation benefits the therapeutic effect of BCG in bladder carcinoma. **Front Pharmacol**, 13, p. 1050774, 2022.

ZHOU, Y.; SHAH, S. Z.; YANG, L.; ZHANG, Z. *et al.* Virulent Mycobacterium bovis Beijing Strain Activates the NLRP7 Inflammasome in THP-1 Macrophages. **PLoS One**, 11, n. 4, p. e0152853, 2016.